



ПРОДОСКРИН® «ИФА-ЗЕАРАЛЕНОН»

Набор реагентов для определения зеараленона
в пищевой продукции и кормах
методом иммуноферментного анализа

Версия 2.1

ТУ ВУ 100185129.134-2015

Разработано
в Институте биоорганической химии НАН Беларуси

Анализ *in vitro*

Хранить при 2-8°C

Пожалуйста, по вопросам технической поддержки и дополнительной информации обращайтесь к производителю или официальному дистрибьютору на территории Вашей страны:



Изготовитель:

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

Официальный дистрибьютор в России:

ООО "НеоТест"

ул. Растопчина, 1Г, г. Владимир

+7 499 911 02 01

info@neo-test.ru

www.neo-test.ru

Техническая поддержка

support@neo-test.ru

+7 499 444 05 50



ПРОДОСКРИН® «ИФА-ЗЕАРАЛЕНОН»

1 ОБЩИЕ СВЕДЕНИЯ

1.1 Набор реагентов «ИФА-ЗЕАРАЛЕНОН» предназначен для количественного определения содержания зеараленона в зерне, зернобобовых и масличных культурах, продуктах их переработки: мукомольно-крупяных, макаронных и хлебобулочных изделиях, продукции масложировой промышленности, а также в кормах растительного происхождения, комбикормах и глютенах в целях ветеринарно-санитарной экспертизы и санитарно-гигиенического контроля методом прямого конкурентного иммуноферментного анализа.

1.2 Наличие микотоксинов в кормах, продовольственном сырье и продуктах питания вызывает ряд необратимых патологических изменений в организме, представляя серьёзную угрозу для здоровья человека и животных, и приносит большой экономический ущерб в сельском хозяйстве. Во многих странах мира существует обязательная система контроля кормов, пищевого сырья и продуктов питания на наличие и содержание основных микотоксинов. В частности, в странах ЕС это отражено в ряде Регламентов и Директив ЕС, таких как 2002/32/ЕС, ЕЕС №1881/ 2006, 2006/576/ЕС и т.д. В Республике Беларусь эти мероприятия регулируются санитарными нормами и правилами «Требования к продовольственному сырью и пищевым продуктам», утвержденными постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 21.06.2013 №52, и гигиеническим нормативом «Показатели безопасности и безвредности для человека продовольственного сырья и пищевых продуктов», утвержденным постановлением Министерства здравоохранения Республики Беларусь от 21.06.2013 №52, ТР ТС 021 «О безопасности пищевой продукции»,

ТР ТС 015/2011 «О безопасности зерна» и ветеринарно-санитарными правилами обеспечения безопасности кормов, кормовых добавок и сырья для производства комбикормов, утвержденными Постановлением Минсельхозпрода РБ от 10.02.2011 № 10 в редакции №33 от 20.05.2011.

1.3 Набор рассчитан на проведение анализа 43 исследуемых проб и 5 градуировочных растворов в дубликатах или 91 исследуемой пробы и 5 градуировочных растворов при проведении единичных измерений, всего 96 определений. При необходимости набор может быть разделен на 3-4 независимые части с различным количеством определяемых проб. Для каждой постановки необходимо построение нового градуировочного графика.

Предел измерений зеараленона определяется нижним значением величины диапазона измерений. Диапазон измерения (50 – 800,0) мкг/кг. Продолжительность анализа составляет 30-40 мин без учета пробоподготовки.

2 СОСТАВ И ПРИНЦИП РАБОТЫ НАБОРА

2.1 В состав набора входят следующие компоненты, представленные в таблице 1.

Таблица 1 – Состав набора

Компонент	Количество
1 Иммуносорбент	1 планшет, разборный, 12 стрипов по 8 лунок
2 Планшет для смешивания	1 планшет, разборный, 12 стрипов по 8 лунок
3 Градуировочные растворы С ₀ , С ₁ , С ₂ , С ₃ и С ₄ с условными значениями концентрации зеараленона 0; 50; 100; 300 и 800 мкг/кг, готовы к использованию	5 флаконов по 0,7 мл
4 Конъюгат, 21-кратный концентрат	1 флакон, 0,70 мл
5 Раствор для разведения конъюгата, готов к использованию	1 флакон, 14 мл
6 Промывочный раствор, 10-кратный концентрат	1 флакон, 50 мл
7 Хромоген-субстратный раствор, готов к использованию	1 флакон, 14 мл
8 Стоп-реагент, готов к использованию	1 флакон, 14 мл
9 Клейкая пленка	1 штука

Примечания

1 Для удобства расчетов результатов анализа сделан перевод истинных концентраций зеараленона в градуировочных растворах в массовые доли (мкг/кг) зеараленона в образцах путем умножения на коэффициент 20, учитывающий фактор разведения при подготовке пробы из исследуемого сухого образца продукции. Это позволяет находить значение массовой доли зеараленона в образце непосредственно по градуировочному графику.

2 В состав набора вместо хромоген-субстратного раствора могут быть включены раствор хромогена ТМБ (3,3',5,5'-тетраметилбензидин), 1 флакон, 0,7 мл, и субстратный буферный раствор, 1 флакон, 14 мл.

2.2 Принцип работы набора. В наборе «ИФА-ЗЕАРАЛЕНОН» использован метод прямого конкурентного иммуноферментного анализа (далее – ИФА). Зеараленон экстрагируют из размолотого образца раствором метанол:вода = 70:30. В лунки планшета для предварительного смешивания вносят рабочий раствор конъюгата зеараленона с пероксидазой из корней хрена, добавляют градуировочные растворы зеараленона с известной концентрацией или подго-

товленные к анализу растворы проб и аликвоты полученной смеси переносят в лунки иммуносорбента. Во время последующей инкубации зеараленон в составе градуировочного раствора или анализируемой пробы конкурирует с конъюгатом за связывание с антителами, иммобилизованными на внутренней поверхности лунок иммуносорбента. После промывки, в ходе которой из лунок удаляют не прореагировавшие с антителами микотоксины, добавляют хромоген-субстратный раствор, который под действием фермента в составе связанного с антителами конъюгата превращается в окрашенный продукт. Интенсивность окраски обратно пропорциональна концентрации зеараленона в анализируемом образце или градуировочном растворе. Затем добавляют стоп-реагент, останавливающий ферментативную реакцию и одновременно изменяющий окраску раствора с голубой на желтую. Интенсивность окрашивания раствора в лунках измеряют на многоканальном планшетном фотометре как величину оптической плотности, выраженную в оптических единицах (о.е.), при длине волны 450 нм. По результатам измерений оптической плотности градуировочных растворов с известным содержанием зеараленона строят градуировочную зависимость, с помощью которой определяют массовую долю зеараленона в анализируемых образцах.

3 МЕРЫ ПРЕДОСТОРОЖНОСТИ ПРИ РАБОТЕ С НАБОРОМ

3.1 При работе с набором следует соблюдать правила работы с химическими веществами.

3.2 Соблюдайте меры предосторожности при работе с анализируемыми образцами, экстрактами и стандартами для градуировки, так как они содержат зеараленон, обладающий анаболическим и эстрагеноподобным действием.

Метанол, входящий в состав экстрагирующего раствора и градуировочных растворов, является сильным ядом. Не допускайте его контактов с кожей и глазами. В случае попадания немедленно промойте пораженный участок большим количеством воды.

Стоп-реагент содержит разбавленную серную кислоту, которая обладает раздражающим действием. В случае попадания на кожу и слизистые оболочки пораженный участок следует немедленно промыть большим количеством проточной воды.

3.3 Рабочие места должны быть обеспечены приточно-вытяжной вентиляцией.

3.4 При работе следует надевать халат и одноразовые пластиковые или резиновые перчатки.

3.5 Химическая посуда и оборудование, которые используют при работе с набором, должны быть соответствующим образом промаркированы и храниться отдельно.

3.6 Запрещается прием пищи, использование косметических средств и курение в помещениях, предназначенных для работы с набором.

4 ПРАВИЛА РАБОТЫ С НАБОРОМ

4.1 Реагенты набора, экстракты проб, градуировочные и другие растворы, используемые в анализе, необходимо отбирать отдельными наконечниками к пипетке.

4.2 Не допускается использование набора после окончания срока годности.

4.3 При проведении анализа нельзя использовать реагенты из разных серий данного набора или отдельные компоненты из наборов других изготовителей.

4.4 Для приготовления каждого реагента должна использоваться отдельная емкость. Вся используемая для приготовления реагентов стеклянная посуда должна быть тщательно вымыта хромовой смесью, многократно промыта водопроводной водой и сполоснута дистиллированной водой.

4.5 Необходимо обратить внимание на тщательное, но аккуратное перемешивание содержимого каждого компонента, а также растворов в лунках планшета для смешивания. Во всех случаях следует избегать образования пены.

4.6 Если проведение ИФА начато, то все последовательные стадии следует выполнять, не делая перерывов, соблюдая рекомендуемые ограничения по времени и выдерживая установленную продолжительность инкубации. Следует исключить подсыхание лунок на всех этапах проведения ИФА.

4.7 Во время проведения ИФА следует избегать попадания прямых солнечных лучей на рабочие поверхности или держать компоненты на ярком свете во время инкубации или хранения.

4.8 Поставленный в наборе хромоген-субстратный раствор перед использованием должен быть бесцветным. Посуду, которая будет в ходе реакции контактировать с этим раствором, отмывают без применения синтетических моющих средств. Используют только новые наконечники.

4.9 Необходимо использовать микропланшетный фотометр и дозаторы пипеточные переменного объема, поверенные государственной метрологической службой.

5 ОБОРУДОВАНИЕ И МАТЕРИАЛЫ

5.1 При работе с набором следует использовать следующие средства измерений, оборудование и материалы.

Автоматический микропланшетный фотометр, позволяющий измерять оптическую плотность раствора при длине волны 450 нм, с пределом допускаемой погрешности измерения оптической плотности не более 5 %.

Весы лабораторные среднего класса точности с наибольшим пределом взвешивания 400 г и погрешностью взвешивания не более 0,1 г.

Восьмиканальный дозатор переменного объема (30-300) мкл с погрешностью дозирования не более 3 % со сменными одноразовыми наконечниками.

Одноканальные дозаторы переменного объема: (5-50) мкл с погрешностью дозирования не более 3 %, (20-200) мкл с погрешностью дозирования не более 1,5 %, (100-1000) мкл с погрешностью дозирования не более 1,5% со сменными одноразовыми наконечниками соответствующего объема.

Водяная баня, обеспечивающая температуру нагрева (37-40) °С.

Лабораторный встряхиватель, диапазон регулирования скорости (0-300) об/мин.

Мельница типа «Циклон» (Cyclotec Tecator, Швеция; ЛМТ-1, Россия и др.), снабженная металлическими ситами с отверстиями диаметром 1 мм, обеспечивающая 100 %-ный проход частиц через указанные сита.

Мельница типа МЛЗ или других аналогичных марок по ТНПА, обеспечивающая требуемую крупность размола.

Сита лабораторные для мукомольной промышленности с номинальным размером круглого отверстия в свету или квадратного отверстия сетки 1 мм.

Секундомер или таймер.

Термостат, обеспечивающий поддержание температуры (20-25) °С.

Холодильник бытовой, обеспечивающий температуру (2-8) °С в холодильной камере, и температуру не выше минус 18 °С в морозильной камере.

Воронки стеклянные.

Колбы конические вместимостью 100 мл.

Стаканы вместимостью 100 и 500 мл.

Цилиндры вместимостью 50, 100 и 500 мл.

Пробирки стеклянные с пробкой вместимостью 15 мл.

Пробирки полипропиленовые вместимостью 5,0 мл.

Стеклянные или пластмассовые флаконы с завинчивающейся крышкой вместимостью 20 мл.

Фильтры обеззоленные «белая лента».

Бумага индикаторная универсальная.

Стеклянные или полиэтиленовые емкости с плотно закрывающимися крышками.

Пленка «парафильм», клейкая лента или крышка для микротитровального планшета.

Чашки Петри стеклянные многоразовые диаметр 100 мм, высота 15 мм или кюветы для дозирования жидких реагентов при использовании многоканальной пипетки.

Штатив для пробирок.

Перчатки резиновые или пластиковые.

5.2 Реактивы, используемые в работе.

Вода дистиллированная или деионизованная.

Кислота соляная х.ч. (плотность 1,19 г/мл, массовая доля HCl 38,3 %).

Метанол ч.д.а,

Натрия гидроокись х.ч.

Примечание – Допускается применение другого оборудования и реактивов, не уступающих по своим свойствам и качеству приведенным выше.

6 ПОДГОТОВКА К ВЫПОЛНЕНИЮ ИЗМЕРЕНИЙ

6.1 Приготовление 20 %-го раствора натрия гидроокиси

Взвешивают (10,0±0,1) г натрия гидроокиси в стакане вместимостью 100 мл и растворяют в 40 мл дистиллированной воды. После охлаждения до комнатной температуры раствор переносят в полиэтиленовую емкость с плотно закрывающейся крышкой.

Срок хранения при температуре (20±5) °С – 1 мес.

6.2 Приготовление раствора метанола в объемном соотношении метанол:вода=70:30

В стакан вместимостью 500 мл цилиндром приливают 350 мл метанола и 150 мл дистиллированной воды, перемешивают.

Раствор переносят в стеклянную емкость с плотно закрывающейся крышкой.

Срок хранения раствора при температуре (20±5) °С – 3 мес.

6.3 Приготовление раствора метанола в объемном соотношении метанол:вода=35:65

В стакан вместимостью 100 мл цилиндром приливают 35 мл метанола и 65 мл дистиллированной воды, перемешивают.

Раствор переносят в стеклянную ёмкость с плотно закрывающейся крышкой.

Срок хранения раствора при температуре (20±5) °С – 3 мес.

6.4 Приготовление рабочего промывочного раствора

Содержимое флакона с концентратом промывочного раствора интенсивно встряхивают в течение 10-20 с, в случае образования кристаллов помещают флакон на водяную баню при температуре 37 °С и выдерживают до полного растворения кристаллов.

Рабочий промывочный раствор готовят, разбавляя концентрат промывочного раствора дистиллированной водой в соотношении 1+9. Для этого в чистый стакан вместимостью 500 мл вносят необходимое количество дистиллированной воды, добавляют в 9 раз меньшее количество концентрата промывочного раствора.

вочного раствора и интенсивно перемешивают, не допуская образования пены.

Раствор переносят в емкость с плотно закрывающейся крышкой.

Срок хранения раствора при температуре (2-8) °С – 1 мес.

6.5 Приготовление рабочего раствора конъюгата

Рабочий раствор конъюгата готовят в пробирке или флаконе, разбавляя концентрат конъюгата зеараленон-пероксидаза раствором для разбавления конъюгата в 21 раз (соотношение по объему 1+20), из расчета 100 мкл рабочего раствора конъюгата на каждую лунку. Для этого в чистую пробирку или флакон вносят необходимое количество раствора для разбавления конъюгата, добавляют в 20 раз меньшее количество концентрата конъюгата и перемешивают круговыми движениями, не допуская образования пены.

Раствор готовят непосредственно перед использованием.

6.6 Приготовление хромоген-субстратного раствора.

Хромоген-субстратную смесь готовят в темных стеклянных или пластмассовых флаконах непосредственно перед использованием. Приготовленный раствор хранению не подлежит.

Раствор хромогена разводят субстратным буферным раствором в 21 раз (соотношение по объему 1+20) из расчета 100 мкл на каждую из заданного количества лунок. Для этого в чистый флакон вместимостью 20 мл вносят необходимое количество субстратного буферного раствора, добавляют в 20 раз меньшее количество раствора хромогена и интенсивно перемешивают в течение (30-40) с.

Примечание – Субстратный буферный раствор и раствор хромогена могут поставляться в одном флаконе в форме готового для использования компонента.

Приготовленный или поставленный в наборе хромоген-субстратный раствор необходимо предохранять от попадания света и контакта с металлами или ионами металлов. Перед использованием раствор должен быть бесцветным. Посуду, которая будет в ходе реакции контактировать с этим раствором, отмывать без применения синтетических моющих средств. Использовать только новые наконечники.

7 ОТБОР ОБРАЗЦОВ И ПОДГОТОВКА ПРОБ

7.1 Отбор образцов проводят по СТБ 1036, ГОСТ 13496.0, ГОСТ 13586.3, ГОСТ 13979.0, ГОСТ 26312.1, ГОСТ 27668, ГОСТ ISO 6497, и другим ТНПА на конкретные виды продукции.

Отобранные образцы могут храниться в защищенном от света месте при температуре от плюс 2 до плюс 25 °С в течение 30 суток без доступа влаги. Допускается хранение при температуре минус 18 °С в течение 6 месяцев в

условиях, исключая изменение их влажности. Перед проведением подготовки проб замороженные образцы должны быть разморожены при температуре от плюс 2 до плюс 8 °С.

7.2 Доводят температуру образцов, отобранных в соответствии с п. 7.1, до значений от плюс 20 до плюс 25 °С, выдерживая их при температуре окружающей среды.

Образцы зерна, зернобобовых, масличных, макаронных, крупяных изделий, продуктов переработки зерновых (отруби, жмыхи, шроты), кормов измельчают с помощью лабораторной мельницы, просеивают через лабораторное сито с отверстиями диаметром 1 мм и тщательно перемешивают. Остаток образца на сите снова измельчают на мельнице лабораторной так, чтобы он весь прошел через сито с отверстиями диаметром 1 мм, добавляют к просеянной части и тщательно перемешивают.

Образцы хлебобулочных изделий измельчают с помощью гомогенизатора или бытового блендера, перемешивают. Образцы мукомольных изделий, глютену – тщательно перемешивают.

7.3 При анализе каждого образца выполняют два параллельных определения (возможно проведение единичного анализа).

Взвешивают $(5,0 \pm 0,1)$ г размолотого образца, приготовленного по п.7.2. Навеску исследуемой пробы помещают в коническую колбу вместимостью 100 мл и мерным цилиндром добавляют 25 мл раствора метанола, приготовленного в объемном соотношении метанол:вода = 70:30. Важно соблюдать соотношение масса образца:объем экстрагирующей смеси = 1:5.

7.4 Коническую колбу закрывают пробкой и, не допуская разбрызгивания, встряхивают вручную или на встряхивателе при 150 об/мин в течение 5-7 мин. Затем раствор выдерживают в течение 20 мин для осаждения частиц пробы и быстро фильтруют от 10 до 15 мл верхнего слоя в стеклянную пробирку или колбу через бумажный фильтр «белая лента». Контроль pH фильтрата проводят с помощью универсальной индикаторной бумаги, доводя до значения pH 6-8 с использованием концентрированной соляной кислоты или 20 %-ого раствора гидроксида натрия.

Пробирку закрывают пробкой, профильтрованный раствор перемешивают и используют для приготовления раствора пробы.

7.5 В чистую пробирку отбирают дозатором 0,5 мл фильтрата и добавляют 0,5 мл дистиллированной воды. Раствор перемешивают и добавляют 1 мл раствора метанола, приготовленного в объемном соотношении метанол:вода = 35:65, приготовленного по п.6.3.

Пробирку закрывают пробкой, раствор перемешивают и используют для проведения ИФА в течение двух часов.

8 ПОДГОТОВКА РЕАГЕНТОВ ДЛЯ ПРОВЕДЕНИЯ АНАЛИЗА

8.1 Перед проведением ИФА компоненты набора, подготовленные реагенты и исследуемые пробы выдерживают при температуре (20-25) °С в течение 60 мин. Перед использованием жидкие реагенты и пробы тщательно перемешивают легким встряхиванием, избегая образования пены.

8.2 Составляют схему расположения лунок для градуировочных растворов и растворов проб в микропланшетах согласно таблице 2, с учетом того, что для каждого градуировочного раствора и раствора пробы требуется две лунки (возможно проведение единичного анализа).

Таблица 2– Схема расположения лунок (при исследовании проб в дубликатах)

Лунка	Номер стрипа											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	C ₀	C ₀	П ₄	П ₄								
B	C ₁	C ₁	П ₅	П ₅								
C	C ₂	C ₂	П ₆	П ₆								
D	C ₃	C ₃	П ₇	П ₇								
E	C ₄	C ₄	П ₈	П ₈								
F	П ₁	П ₁	П ₉	П ₉								
G	П ₂	П ₂	П ₁₀	П ₁₀								
H	П ₃	П ₃	П ₁₁	П ₁₁								

Примечания:

1 C₀–C₄ – градуировочные растворы в лунках А-Е стрипов №1 и №2, П₁–П₁₁ – растворы проб в лунках F-H стрипов №1 и №2 и в лунках А-Н стрипов №3 и 4.

2 Для проведения исследований рекомендуется использовать 8-канальную пипетку. Не следует использовать более 4 стрипов в одной группе исследований.

8.3 Подготовка иммуносорбента

Планшетный иммуносорбент освобождают от упаковочного пакета. Необходимое для проведения анализа количество стрипов вставляют в рамку. Оставшиеся неиспользованные стрипы немедленно помещают в фольгированный пакет, герметично заклеивают его клейкой лентой и хранят в холо-

дильнике при температуре (2-8) °С в течение 6 месяцев, но не дольше срока годности набора.

8.4 Планшет для смешивания конъюгата и проб освобождают от упаковочного пакета. Необходимое количество стрипов, равное количеству стрипов иммуносорбента, устанавливают в рамку. Схема маркировки этих стрипов аналогична схеме маркировки иммуносорбента. Неиспользованные стрипы помещают в пакет и хранят при температуре (2-8)°С в течение всего срока годности набора.

9 ПРОВЕДЕНИЕ АНАЛИЗА

Выполняют ИФА согласно приведенной в таблице 3 схеме и описаниям этапов.

9.1 В чашку Петри или пластмассовую кювету дозатором вносят конъюгат в объеме из расчета 1,0 мл на стрип.

С помощью восьмиканального дозатора в лунки планшета для смешивания вносят по 100 мкл рабочего раствора конъюгата, приготовленного в соответствии с п.6.5 (возможно использование одноканального дозатора). Затем в лунки планшета для смешивания в соответствии с их маркировкой одноканальным дозатором вносят по 50 мкл градуировочных растворов в порядке возрастания их концентраций и растворов исследуемых проб, приготовленных в соответствии с п.7.5.

При проведении одного измерения для градуировочных растворов и растворов проб в лунки вносят по одной аликвоте этих растворов способом, описанным выше.

9.2 Используя восьмиканальную пипетку с новыми наконечниками, аккуратно перемешивают содержимое лунок стрипа путем пипетирования раствора вверх и вниз 3-4 раза, не допуская образования пены, и немедленно переносят по 100 мкл полученной смеси в соответствующие лунки иммуносорбента.

Примечание – Временной интервал от начала перемешивания до начала инкубирования – не более 3 мин.

9.3 Иммуносорбент заклеивают изолирующим листком или закрывают крышкой и инкубируют при температуре (20-25) °С в течение 15 мин в термостате или на воздухе, исключая попадание света на планшет.

9.4 По окончании времени инкубации удаляют растворы из всех лунок путем резкого переворачивания планшета. Затем с помощью восьмиканальной пипетки промывают лунки 4 раза по 200 мкл каждую рабочим промывочным раствором (п.6.4), который предварительно вносят в чистую ванночку в объеме из расчета 6,5 мл на один стрип.

При промывании планшета необходимо контролировать заполнение всех лунок и полное удаление жидкости; не допуская переполнения лунок и перетекания промывочного раствора между ними. Остатки жидкости удаляют, постукивая планшетом по ровной поверхности, покрытой фильтровальной бумагой.

9.5 В чашку Петри или пластмассовую кювету дозатором вносят хромоген-субстратный раствор из расчета 1 мл на стрип.

В каждую лунку промытого планшета восьмиканальным дозатором вносят 100 мкл хромоген-субстратного раствора. Общее время внесения должно быть не более 2 мин. Закрывают планшет изолирующим листком или крышкой и инкубируют в течение 5 мин в термостате или на воздухе способом, исключая попадание света, при температуре (20-25) °С.

9.6 Останавливают ферментативную реакцию путем внесения во все лунки планшета по 100 мкл стоп-реагента, предварительно внесенного в чашку Петри или пластмассовую кювету из расчета 1 мл на стрип. Растворы в лунках перемешивают круговыми движениями планшета по поверхности лабораторного стола.

9.7 В течение не более 15 мин после остановки реакции измеряют в планшетном спектрофотометре оптическую плотность растворов в лунках при длине волны 450 нм.

10. РАСЧЕТЫ, ГРАФИЧЕСКИЕ ПОСТРОЕНИЯ И ИНТЕРПРЕТАЦИЯ РЕЗУЛЬТАТОВ

10.1 Для построения градуировочного графика и расчета массовой доли зеараленона в анализируемых образцах используют прилагаемый шаблон в формате Microsoft Excel, поставляемый к набору на компакт-диске по запросу, или программное обеспечение стороннего производителя (например, встроенное программное обеспечение микропланшетного фотометра), после внесения необходимых параметров данного ИФА.

10.2 На основании внесенных оператором в таблицу раздела 1 прилагаемого шаблона параллельных измерений оптической плотности для каждого градуировочного раствора программным обеспечением строится градуировочная зависимость $\text{logit } V_i/V_0$ (ось ординат) от десятичного логарифма концентрации $\text{log } C_i$ (ось абсцисс), где

$$\text{logit } V_i/V_0 = \log (V_i/V_0 / 1 - V_i/V_0), \quad (1)$$

где V_i – среднее значение оптической плотности для i -го градуировочного раствора, о.е, (при исследовании проб в дубликатах используют среднее значение двух параллельных измерений),

V_0 – среднее значение оптической плотности для градуировочного раствора C_0 , о.е, (при исследовании проб в дубликатах используют среднее значение двух параллельных измерений),

C_i – массовая доля зеараленона в градуировочном растворе, выраженная в мкг/кг.

Программа автоматически рассчитывает на основании градуировочного графика массовую долю зеараленона мкг/кг в лунках с анализируемой пробой после внесения оператором значений оптической плотности, в о.е, в соответствующие графы таблицы раздела 2 прилагаемого шаблона. За окончательный результат измерений принимают среднее арифметическое значение результатов измерений двух параллельных проб, при этом полученный результат округляют до первого десятичного знака.

При получении для образца только одного единичного результата измерений, за окончательный результат измерений принимают полученное значение результата единичных измерений.

10.3 Интерпретация результатов

В случае, когда массовая концентрация зеараленона в растворе пробы превышает максимальное значение массовой концентрации зеараленона в градуировочном растворе C_4 , то есть, когда результат измерений оптической плотности раствора пробы менее оптической плотности градуировочного раствора с массовой концентрацией 800 мкг/кг, проводят разбавление подготовленного раствора пробы, используя для разбавления раствор в объемном соотношении метанол:вода = 35:65. Полученный результат измерений умножают на кратность разбавления.

Предел измерений (LOQ) определяют нижним значением диапазона измерений. Если одно из параллельных результатов измерений массовой доли зеараленона оказывается меньше предела измерений, равного 50 мкг/кг, то дают одностороннюю оценку данной характеристики в виде: $X < X_{LOQ}$.

11 ТЕХНИЧЕСКИЕ ХАРАКТЕРИСТИКИ И АНАЛИТИЧЕСКИЕ ПАРАМЕТРЫ НАБОРА

11.1 Параметры ИФА для градуировочных растворов – связывание конъюгата зеараленон-пероксидаза: V_0 – от 1,3 до 2,8 о.е; V_1/V_0 – от 70 до 95 %, V_4/V_0 – от 5 до 30 % .

11.2 Чувствительность: минимальная концентрация зеараленона в градуировочных растворах, достоверно определяемая с помощью набора ($V_0 - 2 SD$), не превышает 50 мкг/кг.

11.3 Специфичность. В наборе «ИФА-ЗЕАРАЛЕНОН» при изготовлении иммуносорбента используются высокоспецифичные антитела к зеараленону.

11.4 Диапазон измерений составляет от 50 до 800 мкг/кг.

Предел измерений (LOQ) определяется нижним значением диапазона измерений.

11.5 Извлечение (открытие) добавки зеараленона в холостом образце продукта – не менее 75 %.

11.6 Повторяемость (коэффициент вариации) результатов определения зеараленона в контрольных пробах различных видов продуктов в одной поста-новке ИФА в одной лаборатории не превышает 15 %.

11.7 Воспроизводимость (коэффициент вариации) результатов определения зеараленона в контрольных пробах различных видов продуктов в не-скольких постановках ИФА в нескольких лабораториях не превышает 25 %.

12 УСЛОВИЯ ХРАНЕНИЯ И ЭКСПЛУАТАЦИИ НАБОРА



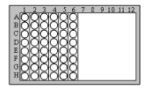
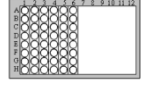
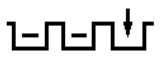







12.1 Набор хранят в упаковке изготовителя при температуре (2-8) °С в течение всего срока годности, замораживания не допускают.

12.2 Срок годности набора – 12 месяцев от даты изготовления.

13 ОБЗОР ВЕРСИЙ

Номер версии	Описание
1.0	Первая версия
2.0	Внесены изменения в п. 2.1 – добавлена клейкая пленка
2.1	Исправлена неточность в п.7.4, связанная со временем осаждения

Таблица 3 – Схема анализа

Подготовка экстрактов анализируемых проб		Смешать 500 мкл экстракта и 500 мкл дистиллированной воды, затем добавить 1000 мкл раствора метанол:вода=35:65
Приготовление рабочих растворов компонентов		Разбавить необходимое количество концентрата конъюгата раствором для разбавления конъюгата и концентрата промывочного раствора дистиллированной водой
Подготовка иммуносорбента		Вставить необходимое количество стрипов с иммобилизованными антителами в рамку
Подготовка планшета для смешивания		Вставить необходимое количество стрипов в рамку
<i>Планшет для смешивания</i>		
Внесение рабочего раствора конъюгата		Добавить по 100 мкл конъюгата в каждую лунку
Внесение градуировочных растворов и растворов анализируемых проб		Добавить по 50 мкл градуировочного раствора и подготовленного раствора пробы в соответствующую лунку
<i>Иммуносорбент</i>		
Перенесение содержимого из планшета для смешивания в иммуносорбент		Аккуратно перемешать и перенести по 100 мкл проб из планшета для смешивания в соответствующие лунки иммуносорбента
Инкубация		Выдержать 15 мин при температуре (20-25) °С в темноте
Промывание		Промыть четыре раза рабочим промывочным раствором порциями по 200 мкл на каждую лунку
Внесение хромоген-субстратного раствора		Добавить по 100 мкл в каждую лунку и выдержать 5 минут в темноте при температуре (20-25) °С
Внесение стоп-реагента		Добавить по 100 мкл в каждую лунку
Измерение оптической плотности		Измерить на микропланшетном фотометре, длина волны 450 нм