МИНИСТЕРСТВО СЕЛЬСКОГО ХОЗЯЙСТВА РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

ФЕДЕРАЛЬНОЕ АГЕНТСТВО ПО СЕЛЬСКОМУ ХОЗЯЙСТВУ

УПРАВЛЕНИЕ ВЕТЕРИНАРИИ

Орликов пер., д. 1/11, Москва, 107139
Для телеграмм: Москва 84
Тел./факс: (095) 975-51-05
E-mail: gost.e-ecolog.ru
gost.e-ecolog.ru

10.10.2005 № 5-1-14/1001

На № _____

УТВЕРЖДАЮ
Начальник Управления ветеринарии
Федерального агентства по сельскому хозяйству

_____ А. Апалькин

«_____» _____ 2005 г.

МЕТОДИЧЕСКИЕ УКАЗАНИЯ

по экспресс-определению микотоксинов в зерне, кормах и компонентах для их производства

1. Общие положения

1.1. Настоящие методические указания предназначены для экспресс-определения микотоксинов в пробах зерна, кормов и компонентов для их производства методами иммунохимического анализа

1.2. В основе процедуры анализа лежит взаимодействие антигенов с антителами. Специфическое иммунохимическое взаимодействие происходит в объеме иммуносорбента (колонки Aflascan, Ochrascan), в объеме и на поверхности полистиролового планшета (Aflaplate, Ridascreen), на поверхности мембраны

gost.e-ecolog.ru

(Aflacard, Ochracard) или в капиллярных каналах иммунохроматографической полоски (Rida Quick). В процессе реакции антигены (микотоксины), содержащиеся в экстрактах исследуемых образцов, образуют комплекс со специфическими антителами. Иммуносорбированные микотоксины затем эллюируются денатурирующим растворителем и наблюдаются по собственной флуоресценции (Aflascan, Ochrascan), детектируются путем непрямого конкурентного иммуноферментного анализа (Aflaplate, Ridascreen, Aflacard, Ochracard), либо методами иммунохроматографии (Rida Quick).

1.3. Основными компонентами реакции являются антигены (микотоксины), содержащиеся в экстрактах испытуемых образцов, специфические антитела к определяемым антигенам и коньюгаты определяемых антигенов с пероксидазой или коллоидным золотом

1.4. При выборе процедуры исследования руководствуются таблицами 1-8

Таблица 1. Определение суммы афлатоксинов B1, B2, G1 и G2

	Метод	Результат	Предел обнаружения, мг/кг	Время исследования, мин
Aflascan	Флуоресценцентный	Полуколичественный	0,001 – 0,01	45 - 15
Aflacard **Total**	Иммуноферментный	Полуколичественный	0,004 – 0,03	30
Aflacard T_{20}	Иммуноферментный	Полуколичественный	0,02	15
Ridascreen **Aflatoxin** EXPRESS	Иммуноферментный	Полуколичественный	0,02	20
Ridascreen FAST Aflatoxin	Иммуноферментный	Количественный	0,0017	30
Ridascreen FAST Aflatoxin SC	Иммуноферментный	Количественный	0,002	30

Таблица 2. Определение афлатоксина B1

	Метод	Результат	Предел обнаружения, мг/кг	Время исследования, мин
Aflacard B1	Иммуноферментный	Полуколичественный	0,002 – 0,1	30
Aflaplate	Иммуноферментный	Количественный	0,0015	30
Ridascreen Aflatoxin B1 30/15	Иммуноферментный	Количественный	0,001	90

Таблица 3. Определение охратоксина А

	Метод	Результат	Предел обнаружения, мг/кг	Время исследования, мин
Ochrascan	Флуоресценцентный	Полуколичественный	0,002 – 0,02	30
Ochracard	Иммуноферментный	Полуколичественный	0,003– 0,01	30
Ridascreen FAST Ochratoxin	Иммуноферментный	Количественный	0,005	30
Ridascreen Ochratoxin	Иммуноферментный	Количественный	0,000625	240

Таблица 4. Определение цитринина

	Метод	Результат	Предел обнаружения, мг/кг	Время исследования, мин
Ridascreen FAST Citrinin	Иммуноферментный	Количественный	0,05	30

Таблица 5. Определение дезоксиниваленола (ДОН)

	Метод	Результат	Предел обнаружения, мг/кг	Время исследования, мин
Rida Quick DON	Иммунохроматографический	Полуколичественный	1,0 или 2,0	15
Ridascreen DON EXPRESS	Иммуноферментный	Полуколичественный	0,5	20
Ridascreen FAST DON	Иммуноферментный	Количественный	0,2	30
Ridascreen DON	Иммуноферментный	Количественный	0,0185	60

Таблица 6. Определение фумонизина

	Метод	Результат	Предел обнаружения, мг/кг	Время исследования, мин
Ridascreen Фумонизин EXPRESS	Иммуноферментный	Полуколичественный	1,0	20
Ridascreen FAST Фумонизин	Иммуноферментный	Количественный	0,222	30
Ridascreen Фумонизин	Иммуноферментный	Количественный	0,025	90

Таблица 7. Определение зеараленона

	Метод	Результат	Предел обнаружения, мг/кг	Время исследования, мин
Ridascreen FAST Зеараленон	Иммуноферментный	Количественный	0,05	30
Ridascreen Зеараленон	Иммуноферментный	Количественный	0,00175	170

Таблица 8. Определение Т-2 токсина

	Метод	Результат	Предел обнаружения, мг/кг	Время исследования, мин
Ridascreen FAST T-2 toxin	Иммуноферментный	Количественный	0,05	30
Ridascreen T-2 toxin	Иммуноферментный	Количественный	0,005	120

2. Необходимое оборудование.

Весы лабораторные общего назначения 2-го класса точности с наибольшим пределом взвешивания 200 г по ГОСТ 24104

Меры массы по ГОСТ 7328

Лабораторный таймер электронный

Мельница для размола сыпучих продуктов типа ЛЗМ, блендер типа Waring или гомогенизатор типа «Ультратюракс» с частотой 8000 – 24000 об/мин

ИФА-анализатор (ридер), снабженный фильтром на 450 нм

Одноканальная автоматическая пипетка на 50 и 100 мкл

Одноканальная автоматическая пипетка на 1000 мкл

8-канальная автоматическая пипетка на 50 мкл

8-канальная автоматическая пипетка на 250 мкл

Наконечники для автоматических пипеток

Колба мерная 2-го класса точности вместимостью 100 мл исп. 2 по ГОСТ 1770

Цилиндры градуированные 2-го класса точности вместимостью 25 мл и 100 мл

Стакан лабораторный ВН-50 ХС с меткой по ГОСТ 25336

Колба коническая со шлифом и притертой пробкой на 100 мл типа КН-1-100-29/32 по ТУ 92-891.029-91

Пробирки П-2-5-14/23 с притертыми стеклянными пробками

Стеклянные цилиндры для твердофазной экстракции

Штатив для пробирок на 10 гнезд

Воронка лабораторная В-56-80 ХС по ГОСТ 25336

Фильтры обеззоленные, красная лента, 100х15 см

Разовые фильтры на шприц или стеклянные микроволоконные фильтры GMF

3. Необходимые реактивы и материалы

Колонки Aflascan и Ochrascan, полоски Rida Quick, карточки Aflacard и Ochracard, планшеты Ridascreen в стандартной комплектации

Метанол, хч

Хлорид натрия, хч

Бикарбонат натрия, хч

Вода дистиллированная по ГОСТ 6709

4. Порядок отбора проб и подготовка к проведению исследований

4.1. Отбор проб осуществляют в соответствии с действующей нормативной документацией по отбору проб.

Пробы доставляют в лабораторию не позднее 6 часов после их отбора. Пробы, предназначенные для анализа, должны хранится в холодном темном месте.

4.2. Приготовление вспомогательных растворов.

4.2.1 Приготовление 80% раствора метанола

В мерную колбу на 100 мл помещают 80 мл метанола и доводят объем раствора до метки дистиллированной водой. Раствор тщательно перемешивают.

Срок хранения раствора при комнатной температуре – 4 недели.

4.2.2 Приготовление 70% раствора метанола

В мерную колбу на 100 мл помещают 70 мл метанола и доводят объем раствора до метки дистиллированной водой. Раствор тщательно перемешивают.

Срок хранения раствора при комнатной температуре – 4 недели

4.2.3 Приготовление 60% раствора метанола

В мерную колбу на 100 мл помещают 60 мл метанола и доводят объем раствора до метки дистиллированной водой. Раствор тщательно перемешивают.

Срок хранения раствора при комнатной температуре – 4 недели

4.2.4 Приготовление 20% раствора метанола (только для колонок Ochrascan)

В мерную колбу на 100 мл помещают 20 мл метанола и доводят объем раствора до метки дистиллированной водой. Раствор тщательно перемешивают.

Срок хранения раствора при комнатной температуре – 4 недели

4.2.5 Приготовление десорбирующего раствора (только для колонок Ochrascan)

Десорбирующий раствор представляет собой смесь метанола (98%) с уксусной кислотой (2%).

Для анализа каждой пробы необходимо 1,5 мл десорбирующего раствора. Приготовьте нужное количество раствора. Можно приготовить большее количество десорбента при условии его последующего хранения в емкости с плотно закрывающейся винтовой пробкой во избежание испарения метанола. Десорбирующий раствор можно хранить при комнатной температуре (22°С) в течение одного месяца с даты приготовления

4.2.6 Приготовление моющего буферного раствора

Приготовление 10 мМ фосфатного буферного раствора (только для Ridascreen FAST Aflatoxin SC, Ridascreen Aflatoxin B1 30/15, Ridascreen FAST DON, Ridascreen DON).

В мерную колбу на 1000 мл переносят содержимое пакетика с буферным составом и доводят объем раствора до метки дистиллированной водой. Раствор тщательно перемешивают.

При использовании Aflaplate моющий буфер готовится путем смешивания 1 часть 25-кратного концентрированного буфера и 24 части дистиллированной воды. Срок хранения раствора– 4 недели при температуре 4°С.

5. Подготовка проб для исследования

5.1. Взвесьте 5 г размолотой пробы в колбе с притертой пробкой, прилейте в колбу 25 мл 70% -го водного раствора метанола*.

* При необходимости навеска пробы может быть увеличена с пропорциональным увеличением объема экстагента

ПРИМЕЧАНИЕ: при использовании Ridascreen FAST Ochratoxin экстракция выполняется 12,5 мл 70% -го водного раствора метанола, при использовании Aflaplate и Aflascan экстракция 50 г пробы выполняется 60% раствором метанола с с добавкой 4 г хлорида натрия на 250 мл раствора, при использовании Aflacard и Ochracard 50 г пробы экстрагируются 100 мл 80% раствора метанола, при использовании Ochrascan 10 г пробы экстрагируются 200 мл 1% раствора бикарбоната натрия, при использовании Ridascreen Quick DON 1 г пробы экстрагируются 10 мл экстрагирующего буфера из комплекта поставки, при использовании Ridascreen DON EXPRESS 5 г пробы экстрагируются 50 мл воды, при использовании Ridascreen FAST DON и Ridascreen DON 5 г пробы экстрагируются 100 мл воды, при использовании Ridascreen DON 5 г пробы экстрагируются 25 мл воды

5.2. Тщательно встряхивайте колбу в течение трех минут (вручную или с помощью лабораторного встряхивателя). Высокую эффективность экстракции можно обеспечить с помощью гомогенизатора или блендера

5.3. Профильтруйте раствор через фильтровальную бумагу типа «красная лента»

5.4. При дальнейшей работе с планшетами Ridascreen, Ridascreen FAST, Ridascreen EXPRESS, Aflaplate смешайте в пробирке 1 мл фильтрата и 1 мл дистиллированной воды

ПРИМЕЧАНИЕ: при анализе на дезоксиниваленол фильтрат не разбавляется

5.5А. Процедура очистки фильтратов при работе с иммуноафинными колонками Aflascan

5.5А.1. Отфильтруйте 50 – 100 мл экстракта полученного по п. 5.2. Руководствуясь нижеприведенной таблицей перенесите выбранный объем фильтрата в стеклянный цилиндр над иммуноаффинной колонкой

Таблица 9.

НЕОБХОДИМЫЙ ОБЪЕМ ФИЛЬТРАТА					
Детектируемый пороговый уровень	10 мкг/кг	5 мкг/кг	4 мкг/кг	2 мкг/кг	1 мкг/кг
Необходимый объем фильтрата	10 мл	20 мл	25 мл	50 мл	100 мл
Концентрация афлатоксинов (мкг/кг), соответствующая стандартам компаратора	0, 10, 20, 50, 100	0, 5, 10, 25, 50	0, 4, 8, 20, 40	0, 2, 4, 10, 20	0, 1, 2, 5, 10

Примечание: оставшийся объем фильтрата может быть использован для подтверждения результатов анализа хроматографическими методами (ТСХ или ВЭЖХ) с предварительной иммуноаффинной очисткой фильтратов на колонках AFLAPREP

5.5А.2. Сорбция афлатоксинов на колонке

Снимите пробку с нижней части колонки. Установите шприц с полностью вытянутым поршнем на верхнюю часть стеклянного цилиндра через резиновый переходник. Убедитесь в герметичности соединения. Подставьте под колонку стеклянный стаканчик. Создавая небольшое давление на входе в цилиндр, пропустите через колонку выбранный объем фильтрата со скоростью 2-3 мл/мин.

Примечание: для того чтобы обеспечить количественную сорбцию афлатоксинов на колонке необходимо соблюдать рекомендованную скорость пропускания фильтрата через колонку (2-3 мл/мин)

Примечание: повышение чувствительности определения достигается при увеличении объема фильтрата, пропускаемого через колонку (см. Таблицу 9)

Примечание: не допускайте контакта метанольных экстрактов с резиновым переходником, резиновыми перчатками и внешней поверхностью колонок, поскольку это может повлиять на результаты определения. Будьте особенно внимательны при элюировании афлатоксинов с колонки на последней стадии иммуноаффинной очистки

5.5А.3. Отмывка

Снимите шприц с цилиндра. Перенесите 10 мл дистиллированной воды в стеклянный цилиндр, установите шприц и пропустите воду через колонку со скоростью примерно 5 мл/мин. Убедившись, что в колонке не осталось воды, повторите промывку еще раз.

5.5А.4. Элюирование

Установите под колонкой чистую стеклянную пробирку или виалку. Снимите шприц с цилиндра. Перенесите в цилиндр над колонкой 1,0 мл метанола. Установите шприц и медленно пропустите метанол через колонку со скоростью не более чем одна капля в секунду, собирая элюат в подготовленную чистую пробирку или виалку.

Для того, чтобы обеспечить максимально полную десорбцию афлатоксинов, метанол должен находиться в контакте с антителами не менее, чем 30 секунд в процессе элюирования. Для этого, с помощью шприца, нужно создать разряжение на входе в колонку, чтобы элюант медленно пошел вверх по колонке. Эту процедуру нужно повторить трижды. Соберите весь элюат в подготовленную чистую пробирку или виалку.

5.5А.5. Удаление мешающих примесей из элюата

Внесите в пробирку (виалку) с элюатом 1 мл дистиллированной воды и 1 мл хлороформа. Закройте крышку и осторожно встряхните пробирку (виалку). Оставьте пробирку (виалку) в покое до расслоения на 2 фазы. Снимите иммуноаффинную колонку с цилиндра и утилизируйте её. Присоедините наконечник с сорбентом флурисил к нижней части стеклянного цилиндра. С помощью пипетки осторожно отберите из пробирки (виалки) нижний хлороформенный слой и перенесите его в стеклянный цилиндр. Установите шприц и медленно пропустите хлороформенный раствор через наконечник с сорбентом флурисил.

5.5Б. Процедура очистки фильтратов при работе с иммуноафинными колонками Ochrascan

5.5Б.1. Отфильтруйте 50 мл экстракта полученного по п. 5.2.

5.5Б.2. Для определения 4 мкг/кг охратоксина перенесите в стеклянный цилиндр над колонкой 20 мл фильтрата порциями по 10 мл (этот объем фильтрата эквивалентен 1 г пробы). Позвольте раствору протечь через колонку под влиянием гравитации, либо установите шприц на стеклянный цилиндр и создавая небольшое давление на входе в цилиндр, пропустите фильтрат через колонку со скоростью 2 – 3 мл/мин

Для определения 2 мкг/кг охратоксина перенесите в стеклянный цилиндр над колонкой 40 мл фильтрата порциями по 10 мл (этот объем фильтрата эквивалентен 2 г пробы). Позвольте раствору протечь через колонку под влиянием гравитации, либо установите шприц на стеклянный цилиндр и создавая небольшое давление на входе в цилиндр, пропустите фильтрат через колонку со скоростью 2 – 3 мл/мин

5.5Б.3. Перенесите 20 мл моющего буфера для зерновых культур (20% раствор метанола) в стеклянный цилиндр, установите шприц и пропустите буфер через колонку со скоростью примерно 5 мл/мин. Подсушите колонку, пропуская через неё воздух.

5.5Б.4. Установите под колонкой чистую пробирку. Снимите шприц с цилиндра. Перенесите в цилиндр над колонкой 1,5 мл десорбирующего раствора. Установите шприц и медленно пропустите раствор через колонку со скоростью не более чем одна капля в секунду, собирая элюат в подготовленную пробирку. Для того, чтобы обеспечить максимально полную десорбцию охратоксина, в процессе элюирования проводится обращение потока элюанта. Для этого, с помощью шприца, нужно создать разряжение на входе в колонку, чтобы элюант медленно пошел вверх по колонке. Эту процедуру нужно повторить трижды. Соберите весь элюат в подготовленную пробирку. Пропустите воздух через колонку, для того, чтобы собрать в пробирке последние капли элюата

5.5Б.5. Внесите в пробирку с элюатом 6 мл готового фосфатного буфера и 3 мл хлороформа. Туго закрутите крышку пробирки, обеспечивая полную

герметичность и энергично встряхните пробирку. Оставьте пробирку в покое до полного расслоения на 2 фазы. Осторожно удалите верхний слой водной фазы

Примечание: если элюат или нижний хлороформенный слой получаются мутными, это может привести к высокому фоновому уровню флуоресценции на стадии детекции охратоксина. В этом случае рекомендуется повторно отфильтровать ранее полученные фильтраты и повторить процедуру иммуноаффинной очистки на колонках OCHRASCAN.

5.5Б.6. Снимите иммуноаффинную колонку с цилиндра и утилизируйте её. Для просушки стеклянного цилиндра промойте его 5 мл хлороформа. Присоедините наконечник с сорбентом флурисил к нижней части стеклянного цилиндра. С помощью автоматической пипетки осторожно отберите из пробирки нижний хлороформенный слой и перенесите его в стеклянный цилиндр. Установите шприц и медленно пропустите хлороформенный раствор через наконечник с сорбентом флурисил со скоростью 2 – 3 мл/мин.

5.5Б.7. Протрите внешнюю поверхность наконечника с сорбентом флурисил салфеткой, немного смоченной метанолом, для того чтобы снять с наконечника частички пыли. Протирайте наконечник таким образом, чтобы избежать контакта метанола с сорбентом

5.5В. Процедура очистки фильтратов при работе с карточками Aflacard Total

5.5В.1. Отфильтруйте как минимум 10 мл экстракта полученного по п. 5.2.

5.5В.2. Поместите 5 мл фильтрата на колонку с сорбентом (входит в комплект Aflacard). Создавая небольшое давление на входе в колонку с помощью поршня, пропустите раствор по каплям через колонку в пластиковую пробирку. Если очищенный раствор кажется мутным, следует пропустить его через ту же колонку еще раз с меньшей скоростью.

5.5В.3. С помощью таблицы 10 выберите необходимую чувствительность анализа и соответственно нужную пропорцию разведения растворов.

Смешайте в градуированной пластиковой пробирке необходимые количества очищенного фильтрата и 80% водного раствора метанола в выбранной

пропорции. Закройте пробирку крышкой и переверните её несколько раз. Перенесите 1 мл раствора из градуированной пробирки в пробирку с 3 мл разбавляющего буфера. Закройте крышкой и переверните пробирку несколько раз. Очищенный и разбавленный экстракт готов для последующего анализа с помощью карточки AFLACARD TOTAL.

Таблица 10. Пропорции разбавления растворов

НЕОБХОДИМЫЕ ОБЪЕМЫ РАСТВОРОВ						
Детектируемый пороговый уровень	4 мкг/кг	5 мкг/кг	10 мкг/кг	15 мкг/кг	20 мкг/кг	30 мкг/кг
Необходимый объем фильтрата	1 мл	1 мл	1 мл	1 мл	1 мл	0,5 мл
Необходимый объем 80% метанола	1 мл	1,5 мл	4 мл	6,5 мл	9 мл	7 мл

5.5Г. Процедура очистки фильтратов при работе с карточками Aflacard B1

5.5Г.1. Отфильтруйте как минимум 10 мл экстракта полученного по п. 5.2.

5.5Г.2. При необходимости определения афлатоксина B1 на уровне 2 мкг/кг поместите 5 мл фильтрата на колонку с сорбентом (входит в комплект набора). Создавая небольшое давление на входе в колонку с помощью поршня, пропустите раствор по каплям через колонку в поставляемую пластиковую пробирку. Если очищенный раствор кажется мутным, следует пропустить его через ту же колонку еще раз с меньшей скоростью.

5.5Г.3. Перенесите 1 мл очищенного раствора в пробирку с 3 мл разбавляющего буфера. Закройте крышкой и переверните пробирку несколько раз. Очищенный и разбавленный экстракт готов для последующего анализа с помощью тест-карточки AFLACARD B1.

5.5Г.4. При необходимости установки других пороговых величин (5 мкг/кг, 10 мкг/кг, 20 мкг/кг, 50 мкг/кг, 100 мкг/кг) фильтраты следует разбавить перед выполнением последующих операций. С помощью таблицы 11 выберите

необходимую чувствительность анализа и соответственно нужную пропорцию разведения фильтратов.

Таблица 11. Пропорции разбавления растворов

НЕОБХОДИМЫЕ ОБЪЕМЫ РАСТВОРОВ						
Детектируемый пороговый уровень	2 мкг/кг	5 мкг/кг	10 мкг/кг	20 мкг/кг	50 мкг/кг	100 мкг/кг
Необходимый объем фильтрата	1 мл	1 мл	1 мл	1 мл	1 мл	1 мл
Необходимый объем 80% метанола	-	1,5 мл	4 мл	9 мл	24 мл	49 мл

5.5Г.5. Смешайте в пробирке необходимые количества фильтрата и 80% водного раствора метанола в выбранной пропорции. Закройте пробирку крышкой и переверните её несколько раз.

5.5Г.6. Перенесите 1 мл разбавленного фильтрата в пробирку с 3 мл разбавляющего буфера. Закройте крышкой и переверните пробирку несколько раз.

5.5Г.7. Перенесите весь раствор на колонку с сорбентом (входит в комплект набора). Создавая небольшое давление на входе в колонку с помощью поршня, пропустите раствор по каплям через колонку в пластиковую пробирку. Если очищенный раствор кажется мутным, следует пропустить его через ту же колонку еще раз с меньшей скоростью.

5.5Г.8. Разбавленный и очищенный экстракт готов для последующего анализа с помощью тест-карточки AFLACARD B1.

5.5Д. Процедура очистки фильтратов при работе с карточками Aflacard T_{20}

5.5Д.1. Отфильтруйте как минимум 10 мл экстракта полученного по п. 5.2.

5.5Д.2. Откройте крышку пробирки с разбавляющим буфером, добавьте в пробирку 200 мкл фильтрата Закройте крышку и перемешайте раствор, переворачивая пробирку

5.5Д.3. Разбавленный экстракт готов для последующего анализа с помощью тест-карточки AFLACARD T_{20}.

5.5Е. Процедура очистки фильтратов при работе с карточками Ochracard

5.5Е.1. Отфильтруйте как минимум 10 мл экстракта полученного по п. 5.2.

5.5Е.2. Внесите 9 мл фильтрата и 18 мл фосфатного буфера в пробирку для разбавления фильтрата. Закройте крышку пробирки и перемешайте раствор, переворачивая пробирку

5.5Е.3. Присоедините разовый шприц-фильтр к нижней части стеклянного цилиндра. Снимите верхнюю крышку колонки с сорбентом и присоедините колонку к нижней части шприц-фильтра через адаптер. Закрепите полученную сборку на лабораторном штативе. Поставьте под колонку лабораторный стаканчик .

5.5Е.4. Руководствуясь нижеприведенной таблицей (см. таблицу 12) внесите выбранный объем разбавленного фильтрата в стеклянный цилиндр, чтобы обеспечить скрининг исследуемых проб на необходимом уровне концентрации охратоксина (в цилиндр следует последовательно вносить аликвоты объемом 10 мл или меньше).

5.5Е.5. Снимите с колонки нижнюю пробку. Создавая небольшое давление на входе в колонку с помощью шприца, медленно пропустите раствор через колонку со скоростью 1 капля в секунду.

Таблица 12.

	Пороговый уровень охратоксина для скрининга зерна			
	3 мкг/кг	4 мкг/кг	5 мкг/кг	10 мкг/кг
Необходимый объем раствора, пропускаемый через колонку	25 мл	20 мл	15 мл	7,5 мл

5.5Е.6. Продуйте воздух через колонку с помощью шприца. Внесите в верхний стеклянный цилиндр 5 мл фосфатного буфера и промойте колонку (не нужно подсушивать стеклянный цилиндр). Снимите промежуточный шприц-

фильтр с колонки и утилизируйте его. Подсоедините колонку напрямую к стеклянному цилиндру через адаптер.

5.5Е.7. Поместите пластиковую пробирку для сбора растворов непосредственно под колонку. Внесите в стеклянный цилиндр 1 мл метанола. Осторожно элюируйте сорбированный на колонке охратоксин, медленно, по каплям, пропуская через колонку метанол. Для того, чтобы обеспечить максимально полную десорбцию охратоксина с колонки, следует трижды прокачивать одну и ту же порцию метанола через колонку обратным ходом, каждый раз осторожно вытягивая поршень шприца. После элюирования охратоксина внесите 2 мл разбавляющего буфера из комплекта поставки в стеклянный цилиндр, пропустите через колонку и соберите в ту же пробирку. Таким образом, суммарный объем раствора в пробирке составит 3 мл

5.5Е.8. Продуйте воздух через колонку с помощью шприца, для того, чтобы собрать в пробирку капли раствора, ещё оставшиеся в колонке. Закройте пробирку и переверните её несколько раз для перемешивания раствора. Раствор готов для анализа на тест-карточке OCHRACARD.

6. Постановка реакции

6.1. Работа с планшетами Ridascreen, Ridascreen FAST, Ridascreen EXPRESS, Aflaplate

6.1.1. Вставьте в рамку планшета лунки в количестве, необходимом для выполнения всех запланированных определений. Запишите координаты лунок, предназначенных для стандартных растворов и подготовленных исследуемых растворов

6.1.2. Добавьте по 50 мкл (100 мкл для Aflaplate) стандартных и исследуемых растворов в соответствующие лунки. При каждом дозировании используйте новый наконечник дозатора.

6.1.3. Осторожно встряхните флакон с готовым коньюгатом, избегая образования пены. Добавьте по 50 мкл (100 мкл для Aflaplate) препарата коньюгата в каждую лунку.

6.1.4. Осторожно встряхните флакон с готовым антителом, избегая образования пены. Добавьте в каждую лунку по 50 мкл препарата антител. Тщательно перемешайте, осторожно вращая планшет рукой, и оставьте на инкубацию при комнатной температуре в течение 10 мин (± 1 мин). Не встряхивайте планшет во время инкубации!

ПРИМЕЧАНИЕ: при работе с планшетами Ridascreen EXPRESS время первой инкубации составляет 3 минуты, при работе с планшетами Ridascreen FAST DON время первой инкубации составляет 5 минуты, при работе с планшетами Ridascreen Aflatoxin B1 30/15, Ridascreen DON, Ridascreen Fumonisin время первой инкубации составляет 30 минут, при работе с планшетами Ridascreen T-2 время первой инкубации составляет 60 минут, при работе с планшетами Ridascreen Ochratoxin, Ridascreen Zearalenon, Aflaplate антитела не дозируются, время первой инкубации составляет 2 часа

6.1.5. Вылейте жидкость из лунок, переверните рамку планшета и тщательно выбейте капельки жидкости, оставшиеся в лунках, путем троекратного (не более!) постукивания рамки с лунками по столу, накрытому фильтровальной бумагой. Наполните лунки 250 мкл дистиллированной воды и снова опорожните лунки. Выбейте капельки жидкости как описано выше. Повторите процедуру промывки лунок еще два раза (4 раза для Aflaplate).

ПРИМЕЧАНИЕ: при работе с планшетами Ridascreen FAST DON , Ridascreen DON, Ridascreen FAST Aflatoxin SC, Ridascreen Aflatoxin B1 30/15, Aflaplate отмывка планшета производится моющим буферным раствором (см. п. 4.2.4)

6.1.6. Добавьте по 2 капли (100 мкл) раствора хромогена/субстрата или последовательно 50 мл субстрата и 50 мл хромогена в каждую лунку. Тщательно перемешайте, осторожно вращая планшет рукой, и оставьте на инкубацию при комнатной температуре в течение 5 минут (± 0.5 мин) в темноте. Не встряхивайте планшет во время инкубации!

ПРИМЕЧАНИЕ: при работе с планшетами Ridascreen EXPRESS время второй инкубации составляет 2 минуты, при работе с планшетами Ridascreen FAST DON время второй инкубации составляет 3 минуты, при работе с планшетами Ridascreen Aflatoxin B1 30/15, Ridascreen DON время второй инкубации составляет 15 минут, при работе с планшетами Ridascreen T-2, Ridascreen Zearalenon время второй инкубации составляет 30 минут

6.1.7. Добавьте в каждую лунку по 2 капли (100 мкл) стоп-реагента и хорошо перемешайте. В течение 10-ти минут после добавления стоп-реагента измерьте оптическую плотность в каждой лунке при 450 нм относительно воздуха

6.2. Работа с иммунохроматографическими полосками Rida Quick DON

6.2.1. Внесите 120 мкл супернатанта (см. пробоподготовку **п. 5.1** – 5.3) на приемную мембрану тест-полоски

6.2.2. Считайте результат через 5 минут

6.3. Работа с карточками AFLACARD TOTAL, AFLACARD B1, AFLACARD T_{20}, OCHRACARD

Выньте карточки из холодильника и оставьте при комнатной температуре в течение 30 минут перед использованием

6.3.1. Снимите защитную пленку с карточки. В каждом порту видны два голубоватых пятна (после нанесения реагентов эти пятна обесцветятся).

6.3.2. С помощью пипетки перенесите 500 мкл (250 мкл для AFLACARD T_{20}) подготовленного экстракта (см. пп. 5.5В.3, 5.5Г.8, 5.5Д.3, 5.5Е.8.) в один порт карточки. В течение 5 минут (1 мин для AFLACARD T_{20})раствор должен впитаться в мембрану карточки.

6.3.3. После впитывания экстракта перенесите в порт карточки 100 мкл (3 капли для AFLACARD T_{20}) готового коньюгата и дождитесь его впитывания в мембрану

6.3.4. После впитывания коньюгата внесите в порт 100 мкл (3 капли для AFLACARD T_{20}) моющего буфера. Позвольте раствору впитаться в мембрану и протрите поверхность вокруг порта фильтровальной бумагой

6.3.5. Внесите в порт карточки 100 мкл (3 капли для AFLACARD T_{20}) субстрата. Включите таймер. В течение 5 минут (2 мин для AFLACARD T_{20}) на поверхности мембраны будет развиваться цветная реакция

6.3.6. Через 5 минут (2 мин для AFLACARD T_{20}) после добавления субстрата внесите в порт карточки 100 мкл (3 капли для AFLACARD T_{20}) стоп-раствора. После впитывания стоп-раствора в мембрану выполняется визуальная интерпретация результатов анализа.

7. Учет результатов

7.1. Полоски Rida Quick

Верхняя черта в реакционном окне полоски называется контрольной.

Испытание считается действительным, если через 5 минут после внесения пробы в приемное окно полоски в аналитическом окне появляется ясно различимая контрольная черта (полоса).

В течение нескольких дней проявившиеся черточки на полоске являются стабильными.

7.1.1. Отрицательный результат

Исследуемая проба не содержит ДОН (или содержит ДОН на уровне, менее 1 мг/кг), если на полоске ясно различимы контрольная и аналитическая черта

7.1.2. Положительный результат

Исследуемая проба контаминирована ДОН, если на полоске проявляется контрольная черта, а аналитическая отсутствует или слабо различима

7.2. Карточки AFLACARD TOTAL, AFLACARD B1, AFLACARD T20, OCHRACARD

Если в контрольной зоне появляется ясно различимое пурпурное пятно, результаты считаются действительными. Цвет пятна в контрольной и аналитической зоне не обязательно должен быть одинаковой интенсивности.

7.2.1. Результаты анализа интерпретируются как отрицательные (содержание афлатоксинов в пробе меньше, чем установленная чувствительность определения), если на поверхности мембраны можно наблюдать два цветных пятна.

7.2.2. Результаты анализа интерпретируются как положительные (содержание афлатоксинов в пробе больше, чем установленная чувствительность определения), если на поверхности мембраны можно наблюдать одно цветное пятно только в контрольной зоне мембраны.

7.3. Колонки Aflascan

Поместите наконечник с сорбентом флурисил и компаратор в темный бокс, оснащенный УФ-лампой на 366 нм и наблюдайте голубую флуоресценцию от наконечника, сравнивая её с флуоресценцией компаратора. Полуколичественный результат анализа афлатоксинов в мкг/кг определяется по наиболее близкому по интенсивности флуоресценции стандарту компаратора при учете пропущенного через колонку объема фильтрата соответственно таблице 9

Компаратор AFLASCAN имеет 2 шкалы:

Шкала, соответствующая объему фильтрата 10 мл:

0 мкг/кг, 10 мкг/кг, 20 мкг/кг, 50 мкг/кг, 100 мкг/кг

Шкала, соответствующая объему фильтрата 25 мл:

0 мкг/кг, 4 мкг/кг, 8 мкг/кг, 20 мкг/кг, 40 мкг/кг

7.4. Колонки Ochrascan

Не более, чем через 20 мин после исполнения п. 5.5Б.7, поместите наконечник с сорбентом флурисил и компаратор в темный бокс, оснащенный УФ-лампой на 366 нм, мощностью 6 Вт. Расстояние от наконечника и компаратора до УФ-лампы должно быть 5 – 10 см. Наблюдайте голубую флуоресценцию от наконечника, сравнивая её с флуоресценцией компаратора. Полуколичественный результат анализа охратоксина в мкг/кг определяется по наиболее близкому по интенсивности флуоресценции стандарту компаратора при учете пропущенного через колонку объема фильтрата

Если содержание охратоксина контролируется на уровне 4 мкг/кг (через колонку пропущено 20 мл фильтрата), для интерпретации результатов анализа используется верхняя шкала компаратора: 0 мкг/кг, 4 мкг/кг, 10 мкг/кг, 20 мкг/кг

Если содержание охратоксина контролируется на уровне 2 мкг/кг (через колонку пропущено 40 мл фильтрата), для интерпретации результатов анализа используется нижняя шкала компаратора: 0 мкг/кг, 2 мкг/кг, 5 мкг/кг, 10 мкг/кг

Сорбированный охратоксин А наблюдается как узкая полоска голубой флуоресценции в верхней части наконечника флурисил

Примечание: голубая флуоресценция окошек компаратора служит образцом для атрибуции флуоресценции наконечника. Иногда, при анализе сложных пигментированных образцов, на наконечнике можно наблюдать желтую или зеленую флуоресценцию, которая не относится к флуоресценции охратоксина

7.5. Планшеты Ridascreen EXPRESS

Положительный результат

Если раствор в лунке с исследуемым экстрактом приобрел цвет, который бледнее или такой же, как цвет в лунке со стандартом, результат считается положительным, то есть концентрация микотоксинов в пробе равна или выше, чем концентрация микотоксинов в стандартном растворе

Отрицательный результат

Если раствор в лунке с исследуемым экстрактом приобрел цвет, который темнее относительно стандарта, результат считается отрицательным, то есть концентрация микотоксинов в пробе ниже, чем концентрация микотоксинов в стандартном растворе

7.6. Планшеты Ridascreen FAST, Ridascren и Aflaplate

Значения оптической плотности, измеренной в лунках со стандартными и исследуемыми растворами делятся на значение оптической плотности, измеренной в лунках с первым (нулевым) стандартом, результат умножается на 100. Таким образом, результат измерения оптической плотности выражается в процентах от оптической плотности лунки с нулевым стандартом, то есть:

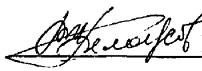
$$\frac{\text{Оптическая плотность лунки со стандартом (пробой)}}{\text{Оптическая плотность лунки с нулевым стандартом}} \times 100 = \%\ \text{поглощения}$$

По величинам относительного поглощения, вычисленным для стандартных растворов и соответствующим значениям концентрации микотоксинов в мкг/кг или мг/кг строится калибровочная кривая в полулогарифмической системе координат

Концентрация микотоксинов в исследуемых растворах считывается по калибровочной кривой соответственно относительному поглощению, измеренному и вычисленному для этих растворов.

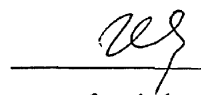
Для компьютерной обработки результатов измерений рекомендуется использовать специализированное программное обеспечение, например, RIDA Soft. При компьютерной обработке результатов следует руководствоваться инструкцией по использованию программного обеспечения и рекомендациями разработчика.

Начальник отдела Управления ветеринарного надзора



В.И. Белоусов

ФГУ ЦНМВЛ



Г.В. Иванова



Л.П. Сатюкова

ООО «СТАЙЛАБ»



А.В. Галкин

gost.e-ecolog.ru