

Helica® Ochratoxin A Universal ELISA
Номер по каталогу – KIT5015 (961OCH01LM–96)





Helica® Ochratoxin A Universal ELISA

Для количественного определения охратоксина А в зерне, кофе, какао-порошке и какао-масле, различных специях, алкогольных напитках, молоке и молочной сыворотке.

Содержание

Введение. Охратоксин А	3
Назначение.....	3
Принцип метода.....	3
Компоненты набора.....	4
Необходимые инструменты и материалы	4
Условия хранения и срок годности.....	5
Правила применения и утилизации отходов	5
Подготовка образца	6
Процедура анализа	7
Интерпретация результатов	8
Аналитические характеристики	8
Техническая поддержка	13

Введение. Охратоксин А

Охратоксин А — токсичный вторичный метаболит, продуцируемый несколькими представителями плесневых грибов *Aspergillus* и *Penicillium*, включая *Aspergillus ochraceus*. Охратоксин А — нефротоксин и канцероген. У людей воздействие охратоксина А связывают с балканской эндемической нефропатией (БЭН), хроническим заболеванием почек, связанным с опухолями почечной системы. У индеек и кур симптоматика включает замедление роста, снижение усвоения корма, нефропатию и падеж. Отказ от корма также наблюдался у индеек. Снижение яйценоскости и качества скорлупы было отмечено как у индеек, так и у кур. У свиней также отмечены патологии выделительной системы. Охратоксин А часто обнаруживался в продуктах питания человека и кормах для животных, при этом основными источниками охратоксина для человека являются злаки и зерновые продукты, хотя было обнаружено, что токсин содержится во многих видах сельхозпродукции. К ним относятся зерно, зеленый и жареный кофе, какао, специи и продукция из винограда, такие как изюм, виноградный сок и вина.

Назначение

Наборы Helica® Mycotoxin ELISA от компании Hygiena — это удобные и экономичные комплекты реагентов для обнаружения микотоксинов в широком спектре продуктов, включая корма для животных, зерно, кукурузу и мочу животных, разработанные для защиты здоровья человека и животных от действия микотоксинов.

Набор Helica Ochratoxin A Universal ELISA предназначен для количественного определения охратоксина А в зерне, кофе, какао-порошке и какао-масле, различных специях, алкогольных напитках, молоке и сыворотке.

Данные, полученные в результате анализа, не должны использоваться для диагностики или лечения заболеваний человека. Тест-системы не валидированы United States Food and Drug Administration или каким-либо другим регулирующим органом США или иного государства для использования в диагностике или лечении человека. Результаты анализа не должны являться единственным основанием для оценки безопасности продуктов перед выпуском потребителям. Полученная информация должна использоваться только в сочетании с обычной программой обеспечения качества пользователя.

Не для клинической диагностики. Пригодно только для исследовательских целей, обеспечения качества и контроля качества при использовании квалифицированным персоналом.

Принцип метода

Набор Helica Ochratoxin A Universal ELISA включает реагенты для твердофазного иммуноферментного анализа с прямым конкурентным ингибированием. Антитела, специфичные к охратоксину А, нанесены на внутреннюю поверхность лунок микропланшета. Токсины экстрагируют из измельченного образца 70% метанолом или 80% ацетонитрилом и после разбавления добавляют в покрытую антителами лунку. Охратоксин А, экстрагированный из образца, и конъюгированный с HRP конкурируют за связывание с антителами, нанесенными на микролунку. После инкубации содержимое лунок декантируют, промывают и добавляют субстрат HRP (ТМВ), который приобретает синий цвет под действием фермента. Интенсивность цвета прямо пропорциональна количеству связанного конъюгата и обратно пропорциональна количеству охратоксина А в стандарте или образце. Поэтому по мере увеличения концентрации охратоксина А в образце или стандарте интенсивность синего цвета будет уменьшаться. Затем добавляют кислый стоп-раствор, который изменяет цвет хромогена с синего на желтый. С помощью микропланшетного ридера измеряют оптическую плотность раствора в лунке с фильтром поглощения 450 нм (OD450). Оптические плотности образцов и стандартов из набора сравнивают, результат определяют путем интерполяции по стандартной кривой

Компоненты набора

Упаковка, кол-во	Компонент	Описание
Пакет, 1 шт.	Микропланшет, покрытый антителами	96 лунок (12 стрипов по 8 лунок) в держателе, покрыты моноклональными антителами мыши к ДОН. <i>Готово к использованию.</i>
Планшет, 1 шт.	Микропланшет для смешивания	96 лунок (12 стрипов по 8 лунок) в держателе. <i>Готово к использованию (для приготовления смеси).</i>
Пробирки, 6 шт.	Standards (стандарты)	6×1,5 мл раствора охратоксина А концентрацией: 0.00, 0.05, 0.1, 0.2, 0.4 и 0.8 нг/мл в 70% метанола. <i>Готово к использованию.</i>
Флакон, 1 шт.	Conjugate (конъюгат)	12 мл раствора конъюгата охратоксина А с пероксидазой хрена (HRP) в буфере со стабилизатором. <i>Готово к использованию.</i>
Флаконы, 2 шт.	Assay Diluent (разбавитель для образцов)	2×12 мл запатентованного разбавителя для образцов. <i>Готово к использованию</i>
Флакон, 1 шт.	Substrate (субстрат)	12 мл раствора стабилизированного тетраметилбензидина (ТМВ). <i>Готово к использованию.</i>
Флакон, 1 шт.	Stop solution (стоп-раствор)	12 мл раствора кислоты. <i>Готово к использованию.</i>
Пакет, 1 шт.	PBS-T powder (сухая смесь)	Сухая смесь для промывочного буфера PBS с 0,05% Tween® 20, растворить в дист.воде, довести до 1 л, хранить в холодильнике.

TWEEN® 20 – зарегистрированная торговая марка компании CRODA International Plc.

Необходимые инструменты и материалы

- Измельчитель, подходящий для измельчения образца до размера частиц кофейного порошка
- Емкость для сбора образца на 100 мл или более
- Весы для взятия навески 20 г
- Цилиндр мерный, 100 мл
- Метанол или ацетонитрил (химически чистый, reagent grade): 3,5–40 мл на образец
- Дистиллированная или деионизованная вода: 1–15 мл на образец
- Фильтровальная бумага Whatman #1 или эквивалент
- Воронка для фильтрации
- Центрифуга
- Автоматические пипетки с наконечниками на 100 и 200 мкл
- Микропробирки для разведения образцов
- Таймер
- Промывалка
- Впитывающие бумажные салфетки
- Микропланшетный ридер со светофильтром 450 нм

Условия хранения и срок годности

- Хранить при 2–8 °С. Не замораживать.
- Реагенты следует использовать до истечения срока годности, указанного на этикетках.
- Конъюгат, меченый HRP, и субстрат TMB чувствительны к свету и упакованы в непрозрачные флаконы. Хранить в темноте, беречь от действия света в процессе использования.

Правила применения и утилизации отходов

Общие правила применения набора:

- Перед использованием выдержите реагенты при комнатной температуре (19–25°C).
- Не переставляйте компоненты между наборами разных партий (lot number).
- Не пользуйтесь растворами помутневшими или с осадком.
- Не сливайте оставшиеся реагенты назад во флаконы и пробирки. Все требуемые объемы приведены в описании процедуры анализа.
- Строго соблюдайте время, температуру и другие условия анализа, указанные в инструкции.
- В процессе экстракции избегайте риска перекрестной контаминации.
- Инструменты, такие как измельчитель, должны быть вымыты после обработки каждого образца.
- Образцы должны иметь нейтральный pH (7,0± 1,0). Сильнощелочная или кислая среда может повлиять на результаты анализа.

Техника безопасности:

Микотоксины (афлатоксины, трихотецены и другие) хорошо известны как канцерогены и считаются высокотоксичными. Поскольку микотоксины могут вызывать заболевания человека, в работе с ними необходимо соблюдать технику безопасности, а все образцы, реагенты, стеклянную посуду, другие принадлежности и оборудование, которое использовали для обработки образцов, следует считать потенциально загрязненным микотоксинами.

- Перед началом работы ознакомьтесь с паспортом безопасности (Safety Data Sheet, SDS), доступным на сайте www.hygienea.com.
- Следуйте правилам безопасности, действующим на вашем предприятии.
- В работе с наборами реагентов и всеми их компонентами настоятельно рекомендуется надевать перчатки, халат и защитные очки. Все материалы, посуду и инструменты, контактировавшие с образцами или стандартами, считайте загрязненными микотоксинами.
- Никогда не набирайте реагенты или образцы в пипетку ртом.
- Стандарты – легковоспламеняемые жидкости. Соблюдайте осторожность при обращении с ними.
- Стоп -раствор содержит серную кислоту – едкое вещество (см. SDS). Не допускайте контакта с кожей и глазами. При попадании на кожу или в глаза немедленно промойте их водой.

Утилизация отходов:

Деактивируйте материалы и утилизируйте отходы в соответствии с правилами, действующими на вашем предприятии. Не сливайте отходы в канализацию. Микотоксины могут загрязнять окружающую среду.

- Собирайте все материалы, посуду и инструменты после использования в одной емкости. Перед проведением анализа приготовьте контейнер для отходов. Использованные наконечники для пипеток и другие материалы сбрасывайте в этот контейнер.
- После завершения работы контейнер должен быть заполнен достаточным количеством 5-6% гипохлорита натрия (NaOCl), приблизительно это 1/10 объема контейнера. NaOCl разрушает микотоксины и нейтрализует отходы, что делает их безопасным для утилизации. Переверните закрытый контейнер несколько раз, чтобы полностью смочить все отходы.
- В случае случайного разлива токсина обработайте поверхность 5-6% NaOCl в течение как минимум 10 минут, а затем 5% водным раствором ацетона. Наконечник насухо протрите поверхность впитывающей бумажной салфеткой.

Подготовка образца

Примечание: отбор образца следует проводить согласно действующим нормативным документам.

Процедура экстракции

Кофе, какао и специи

1. Измельчите репрезентативную пробу до состояния мелкой крупы (50% проходит через сито 20 меш).
2. Приготовьте 50 мл раствора для экстракции (см. раздел «Аналитические характеристики» о выборе эффективного разбавителя).
3. Перенесите 50 мл раствора для экстракции в подходящую емкость и прибавьте 10 г измельченного образца.
Примечание: разведение образца в растворе для экстракции равно 1:5 (вес/объем).
4. Размешайте путем встряхивания в герметично закрытой емкости в течение 5 мин.
5. Дайте осесть крупным частицам, затем отфильтруйте 5–10 мл экстракта через фильтр Whatman #1 (или эквивалент) и соберите фильтрат в чистую емкость. Иначе центрифугируйте тот же объем при 3 500 об./мин в течение 5 мин и отберите супернатант в чистую пробирку.
6. Аликвоту полученного экстракта разбавьте 1:10 70% раствором метанола в дистиллированной воде. Образец готов для тестирования. Конечное разведение образца – **1:50**.

Какао масло

1. Взвесьте 1 г какао масла в пробирку с крышкой.
2. Приготовьте раствор для экстракции смешав 1,5 мл дистиллированной или деионизованной воды и 3,5 мл метанола (или 1 мл дистиллированной или деионизованной воды и 4 мл ацетонитрила; см. раздел «Аналитические характеристики» о выборе эффективного разбавителя).
3. Перенесите 5 мл раствора для экстракции в пробирку с крышкой, поместите пробирку в горячую воду (50–70°C) до момента, пока какао-масло не расплавится и смесь не достигнет температуры воды.
Примечание: разведение образца в растворе для экстракции равно 1:5 (вес/объем).
4. Энергично встряхните пробирку до образования эмульсии масла в растворе для экстракции, продолжайте перемешивать эмульсию в течение 5 мин, поддерживая температуру пробирки с образцом 37°C или выше.
5. Быстро профильтруйте эмульсию через фильтр Whatman #1 (или аналог) и соберите фильтрат для последующего анализа. В ходе фильтрации масло может затвердеть, однако необходимо успеть собрать достаточное кол-во фильтрата.
6. Аликвоту полученного экстракта разбавьте 1:10 70% раствором метанола в дистиллированной воде. Образец готов для тестирования. Конечное разведение образца – **1:50**.

Зерновые культуры

1. Приготовьте раствор для экстракции (70% метанол), прибавив 30 мл дистиллированной или деионизованной воды к 70 мл метанола (химически чистый, reagent grade) для каждого образца.
2. Измельчите репрезентативную пробу до состояния мелкой крупы (95% проходит через сито 20 меш).
3. Перенесите 100 мл раствора для экстракции в подходящую емкость и прибавьте к нему 20 г измельченного образца.
Примечание: разведение образца в растворе для экстракции равно 1:5 (вес/объем).
4. Размешайте путем встряхивания в герметично закрытой емкости не менее 2 мин.
5. Дайте осесть крупным частицам, затем отфильтруйте 5–10 мл экстракта через фильтр Whatman #1 (или эквивалент) и соберите фильтрат.
6. Аликвоту полученного экстракта разбавьте 1:10 70% раствором метанола в дистиллированной воде. Образец готов для тестирования. Конечное разведение образца – **1:50**.

Алкогoльные напитки и сок

1. Разбавьте образец вина, виноградного сусла или сока 1:20 70% метанолом. Образец пива разбавьте 1:2 абсолютным метанолом.
2. Конечное разведение образца – **1:20** (вино, виноградное сусло, сок) или **1:4** (пиво).

Молоко и молочная сыворотка

1. К 250 мкл образца (молоко или молочная сыворотка) прибавьте 750 мкл абсолютного метанола. Можно отобрать другие объемы образца и разбавителя, но разведение 1:4 следует сохранить. Тщательно перемешайте и оставьте на 5 мин при комнатной тем-ре.
2. Центрифугируйте или отфильтруйте образец, аликвоту супернатанта или фильтрата используйте для анализа. Конечное разведение образца – **1:4**.

Процедура анализа

Примечание: рекомендуется использовать многоканальный дозатор. При его отсутствии можно пользоваться одноканальным, но в этом случае не желательно анализировать одновременно более 16 образцов и стандартов (2 целых стрипа).

1. Перед использованием доведите все реагенты до комнатной температуры (19–25°C). Приготовьте промывочный буфер, для этого растворите содержимое пакета PBS-T в дистиллированной воде, доведите объем раствора до 1 л. До использования храните в холодильнике.
2. Поместите в держатель по одной лунке для смешивания каждого стандарта и каждого образца. В другой держатель поместите такое же количество лунок, покрытых антителами. Все оставшиеся лунки с антителами уберите обратно в пакет с осушителем и закройте его.
3. Перемешайте все реагенты во флаконах и пробирках перед использованием.
4. Внесите 200 мкл разбавителя для образцов (Assay Diluent) в каждую лунку для смешивания.
5. Каждый раз используя чистый наконечник внесите по 100 мкл стандартов и всех анализируемых образцов в соответствующие лунки для смешивания. Трижды пипетируйте содержимое.
6. **Примечание:** расположение стандартов и образцов должно быть зафиксировано оператором.
7. Каждый раз используя чистый наконечник перенесите по 100 мкл содержимого лунок для смешивания в соответствующие лунки с антителами. Инкубируйте 30 мин при комнатной тем-ре.
Примечание: объем смеси в лунках для смешивания достаточен для двукратного повторения анализа (рекомендуется). Если необходимо больше повторений, объемы разбавителя Assay Diluent и образца/ стандарта должны быть соответственно масштабированы.
8. Декантируйте содержимое лунок с антителами в емкость для сбора отходов. Промойте лунки промывочным буфером 3 раза, наполняя их и полностью удаляя содержимое.
9. Постучите держателем с лунками (верхом вниз) по впитывающей бумажной салфетке для удаления из них остатков промывочного буфера
10. Внесите 100 мкл конъюгата в каждую лунку для смешивания. Инкубируйте 30 мин при комнатной тем-ре. Накройте лунки чем-либо подходящим для защиты от света.
11. Промойте лунки как указано в пп. 8 и 9.
12. Отмерьте необходимый объем раствора субстрата (1 мл на стрип или 120 мкл на лунку) в чистую кювету или другую емкость. Внесите по 100 мкл раствора субстрата в каждую лунку. Инкубируйте 10 мин при комнатной тем-ре. Накройте лунки чем-либо подходящим для защиты от света.
13. Отмерьте необходимый объем стоп-раствора (1 мл на стрип или 120 мкл на лунку) в чистую кювету или другую емкость. Внесите по 100 мкл стоп-раствора в каждую лунку в том же темпе, в каком был добавлен субстрат.
14. Считайте оптическую плотность (OD) содержимого лунок с помощью ридера для микропланшет со светофильтром 450 нм (эталон – нет или светофильтр 630 нм). Запишите оптическую плотность (OD450) для каждой лунки. Завершите измерения в течение 10 мин после прибавления стоп-раствора.

15. Установите для нулевого стандарта связывание 100% (V_0), рассчитайте связывание (%V) для каждого стандарта и образца в процентах от связывания нулевого стандарта ($\%V/V_0$).

Примечание: особенностью кривых ИФА является их переход к горизонтали при экстремально низких и высоких значениях концентрации микотоксина. Экстраполяция к значениям за пределами самой низкой и самой высокой точек на стандартной кривой приведет к неточным и недостоверным результатам.

Интерпретация результатов

Постройте стандартную кривую зависимости OD от концентрации охратоксина А в стандартах, при этом используйте исходные значения OD или значения OD, выраженные в процентах ($\%V/V_0$) от OD нулевого стандарта (0,0 нг/мл) по отношению к стандартам, содержащим охратоксин А. Концентрацию охратоксина А в анализируемых образцах вычисляют путем интерполяции по стандартной кривой.

Концентрация, указанная на этикетке пробирки со стандартом, относится только к содержимому этой пробирки. Поскольку образец был разбавлен в ходе подготовки к анализу, для получения величины содержания охратоксина А в образце в нг/г (ppb), рассчитанное значение должно быть умножено на разбавление, как указано ниже.

Стандарт (нг/мл)	Какао, какао масло, кофе, специи, зерновые культуры (ppb) 1:50	Вино, виноградное сусло, сок (нг/мл) 1:20	Молоко и молочная сыворотка (нг/мл) 1:4	Пиво (нг/мл) 1:2
0	0	0	0	0
0,05	2,5	1	0,2	0,1
0,1	5	2	0,4	0,2
0,2	10	4	0,8	0,4
0,4	20	8	1,6	0,8
0,8	40	16	3,2	1,6

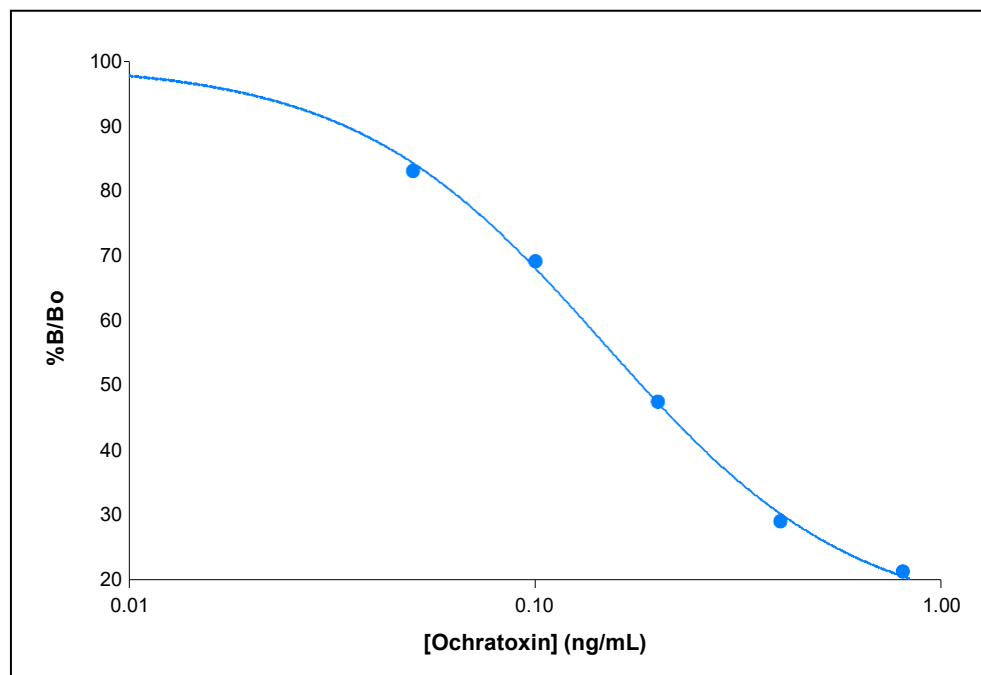
Если концентрация охратоксина А в образце превышает самую высокую в стандарте, такой образец следует соответствующим образом разбавить раствором для экстракции и снова проанализировать его. Дополнительное разведение должно быть учтено при вычислении конечного результата.

Аналитические характеристики

Данные 21 последовательного построения стандартных кривых дали следующие усредненные результаты:

Стандарт (нг/мл)	% V/V_0	% CV
0	100,0	-
0,05	91,3	4,0
0,1	80,4	5,7
0,2	60,0	7,6
0,4	35,4	9,7
0,8	18,4	17,8

Вид полученной усредненной стандартной кривой для охратоксина А следующий:



Зеленый кофе, содержащий менее 1 ppb охратоксина А по данным ВЭЖХ, был получен из Trilogy Labs. Остальная продукция, использованная для определения эффективности анализа, была приобретена как потребительские товары и не подвергалась анализу с помощью ВЭЖХ. Каждый вид продукции был подвергнут экстракции в трех различных растворах:

- Раствор 1: 70% метанол в 1% гидрокарбоната натрия
- Раствор 2: 70% метанол в дистиллированной воде
- Раствор 3: 80% ацетонитрил в дистиллированной воде

Полученные экстракты были разбавлены 1:10 70% раствором метанола в дистиллированной воде, как описано в разделе «Процедура экстракции». Затем образцы были проанализированы против нулевого стандарта в 12 (n) повторах. Результаты приведены ниже.

Раствор 1, n=12

Продукция	Среднее %B/B ₀	% CV	ppb	Среднее – 2 стандартных отклонения (ppb)
Зеленый кофе	95,7	2,0	<1	<1
Жареный кофе	99,3	1,1	<1	<1
Растворимый кофе	92,3	1,0	<1	<1
Какао порошок	93,0	1,4	<1	<1
Какао масло	99,3	3,4	<1	<1
Паприка	99,9	1,8	<1	<1
Чили порошок	100,5	1,6	<1	<1

Раствор 2, n=12

Продукция	Среднее %В/В ₀	% CV	ppb	Среднее – 2 стандартных отклонения (ppb)
Зеленый кофе	94,9	2,5	<1	1,1
Жареный кофе	99,7	2,3	<1	<1
Растворимый кофе	90,5	2,0	<1	1,1
Какао порошок	90,7	2,2	<1	1,2
Какао масло	99,6	2,7	<1	<1
Паприка	97,7	1,5	<1	<1
Чили порошок	93,2	2,3	<1	<1

Раствор 3, n=12

Продукция	Среднее %В/В ₀	% CV	ppb	Среднее – 2 стандартных отклонения (ppb)
Зеленый кофе	95,4	1,1	<1	<1
Жареный кофе	94,9	2,8	<1	<1
Растворимый кофе	92,3	2,1	<1	1,0
Какао порошок	90,7	2,6	1,0	1,3
Какао масло	101,7	2,6	<1	<1
Паприка	96,4	1,7	<1	<1
Чили порошок	94,2	1,4	<1	<1

Для оценки эффективности экстракции разными растворами, в 1 г образца был внесен охратоксин А в абсолютном метаноле до конечной концентрации 5 нг/г (ppb), образец был высушен в течение ночи и подвергнут процедуре экстракции, как описано в разделе «Процедура экстракции». В случае с какао пастой ее разрезали на мелкие кусочки, к 5 мл пасты прибавляли охратоксин А в метаноле и плавил, перемешивая пасту и ее расплав. Затем дожидались, пока паста затвердеет, и подвергали процедуре экстракции. Экстракцию повторяли трижды для каждого образца, данные приведены в таблице:

Раствор 1

Продукция	Извлечение 1 (%)	Извлечение 2 (%)	Извлечение 3 (%)
Зеленый кофе	83	92	85
Жареный кофе	79	84	79
Растворимый кофе	79	81	73
Какао порошок	94	94	92
Какао масло	90	87	91
Паприка	79	81	73
Чили порошок	87	96	97

Раствор 2

Продукция	Извлечение 1 (%)	Извлечение 2 (%)	Извлечение 3 (%)
Зеленый кофе	93	79	83
Жареный кофе	75	79	78
Растворимый кофе	75	74	89
Какао порошок	89	108	113
Какао масло	101	101	98
Паприка	77	102	96
Чили порошок	98	79	81

Раствор 3

Продукция	Извлечение 1 (%)	Извлечение 2 (%)	Извлечение 3 (%)
Зеленый кофе	99	96	90
Жареный кофе	91	97	92
Растворимый кофе	107	103	98
Какао порошок	110	108	108
Какао масло	97	104	100
Паприка	102	104	109
Чили порошок	101	102	107

Судя по результатам, раствор 3, 80% ацетонитрил в дистиллированной воде, является наиболее универсальным в данном наборе видов продукции, хотя метанол лучше экстрагирует токсин из какао-продуктов. 5 ppb охратоксина А, добавленного непосредственно в раствор для экстракции и использованного в качестве контроля (в нескольких повторях), в экспериментах по извлечению показал результат $4,86 \pm 0,39$ ppb (извлечение 97,2%, CV=8,0%, n=27,).

Извлечение охратоксина А из сертифицированных эталонных образцов кукурузы с использованием 70% метанола в пяти независимых экспериментах (n=5) было следующим:

Эталонный образец кукурузы (ppb)	Извлечение (%)	Сходимость результатов (CV%)
18	101	8,9
4,8	104	10,6
2,9	95	10,2

Алкольные напитки также был проверен. Вся продукция была произведена в Калифорнии, за исключением пива, которое было сварено в Бельгии.



Сравнение образцов с нулевым стандартом (70% метанол) в четырех независимых экспериментах и в двух повторах каждый показало следующие усредненные результаты:

Образец	OD	Стандартное отклонение	%CV
Нулевой стандарт	1,918	0,09	4,7
Красное вино (Merlot)	1,922	0,09	4,7

Образец	OD	Стандартное отклонение	%CV
Нулевой стандарт	1,847	0,11	6,0
Белое вино (Chardonnay)	1,817	0,11	6,1

Образец	OD	Стандартное отклонение	%CV
Нулевой стандарт	1,926	0,11	5,7
Port	1,909	0,13	6,8

Образец	OD	Стандартное отклонение	%CV
Нулевой стандарт	1,945	0,11	5,7
Sherry	1,955	0,05	2,6

Образец	OD	Стандартное отклонение	%CV
Нулевой стандарт	2,030	0,12	5,9
Red Grape Must	2,045	0,09	4,4

Образец	OD	Стандартное отклонение	%CV
Нулевой стандарт	1,827	0,07	3,8
Red Grape Juice	1,819	0,07	3,8

Образец	OD	Стандартное отклонение	%CV
Нулевой стандарт	1,870	0,09	4,8
Пиво	1,841	0,11	6,0

Убедившись, что ни один из видов продукции не содержит охратоксин А, все они были контаминированы охратоксином А до концентрации 0,0, 0,4, 1,0, 2,0, 4,0 и 8,0 нг/мл. Раствор для экстракции (70% метанол) был контаминирован аналогичным образом. Пиво контаминировали до концентрации 0,0, 0,04, 0,1, 0,2, 0,4 и 0,8 нг/мл. Затем все образцы были разбавлены 1:20 70% метанолом, за исключением пива, которое было разбавлено 1:2 абсолютным метанолом. Образцы проанализировали как описано выше (в представленном наборе стандарты предварительно разбавлены и должны использоваться без дальнейшего разбавления). Данные об извлечении для каждого вида продукции приведены ниже.

Стандарт (нг/мл)	Красное вино, %	Белое вино, %	Port, %	Sherry, %	Сусло, %	Сок, %	Пиво, %
0,05	104	98	102	104	101	72	112
0,1	100	92	98	105	99	80	115
0,2	103	110	98	93	98	93	120
0,4	110	99	108	101	91	95	113

Результаты показывают, что набор Helica Ochratoxin A Universal ELISA можно использовать для определения охратоксина А в широком спектре алкогольных и безалкогольных напитков.

Также с помощью Helica Ochratoxin A Universal ELISA были протестированы некоторые биологические жидкости, в частности (1) нормальная сыворотка человека, очищенная углем, (2) нормальная сыворотка свиньи, очищенная углем, (3) человеческое молозиво/молоко, (4) цельное коровье молоко. Все образцы проанализированы в сравнении с нулевым стандартом в 12 повторах.

Образец	% V_0 в образце	% V_0 в образце, <2 станд.отклон.	% CV	ng/mL
Сыворотка человека	99,7	96,3	1,7	<0,08
Сыворотка свиньи	100,2	97,4	1,4	<0,08
Молоко человека	92,3	89,3	1,6	<0,08
Молоко коровье	91,1	88,9	1,2	<0,08

Приведенные результаты показывают, что данные образцы не содержат (<0,08 нг/мл) охратоксин А. Тогда они были контаминированы охратоксином А до конечной концентрации 0,2 нг/мл и после уравнивания в течение ночи были проанализированы, как описано выше. Экстракцию проводили трижды для каждого образца. В качестве контроля использовали промывочный буфер PBS, который был контаминирован и проанализирован аналогичным образом.

Образец	Извлечение 1 (%)	Извлечение 2 (%)	Извлечение 3 (%)	Извлечение, сред. (%)
Сыворотка человека	102	102	104	103
Сыворотка свиньи	100	94	96	97
Молоко человека	96	110	95	100
Молоко коровье	114	116	113	114

0,2 нг/мл охратоксина А, внесенного в PBS, в экспериментах по извлечению показал результат $0,214 \pm 0,011$ нг/мл (извлечение 107%, CV=5.1%, n= 8). Постоянные величины извлечения, превышающие 100%, указывают о фоновом содержании охратоксина А в исследованных образцах, в концентрации 0,0-0,08 нг/мл.

Техническая поддержка

Со всеми вопросами и замечаниями обращайтесь к своему региональному представителю или дистрибьютору. Вы можете так же обратиться по email techsupport@hygiena.com, посетить страницу с контактной информацией [Contact Us](#) для получения номера телефона или сделать запрос в службу технической поддержки <https://www.hygiena.com/hygiena/technical-support-request.html>.