



ÚŘAD PRO VYNÁLEZY
A OBJEVY

POPIS VYNÁLEZU K AUTORSKÉMU OSVĚDČENÍ

215289

(11)

(B1)

(51) Int. Cl.³
G 01 N 33/56

(22) Přihlášeno 10 01 80

(21) (PV 225 - 80)

(40) Zveřejněno 30 10 81

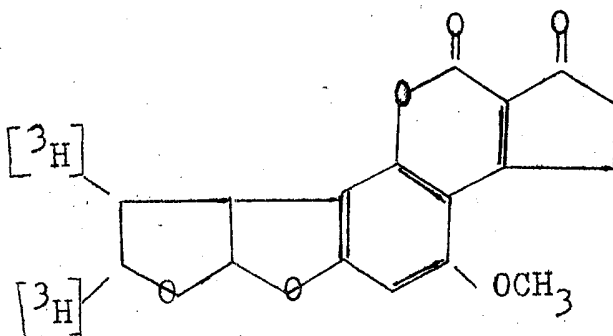
(45) Vydáno 01 08 85

(75)
Autor vynálezu

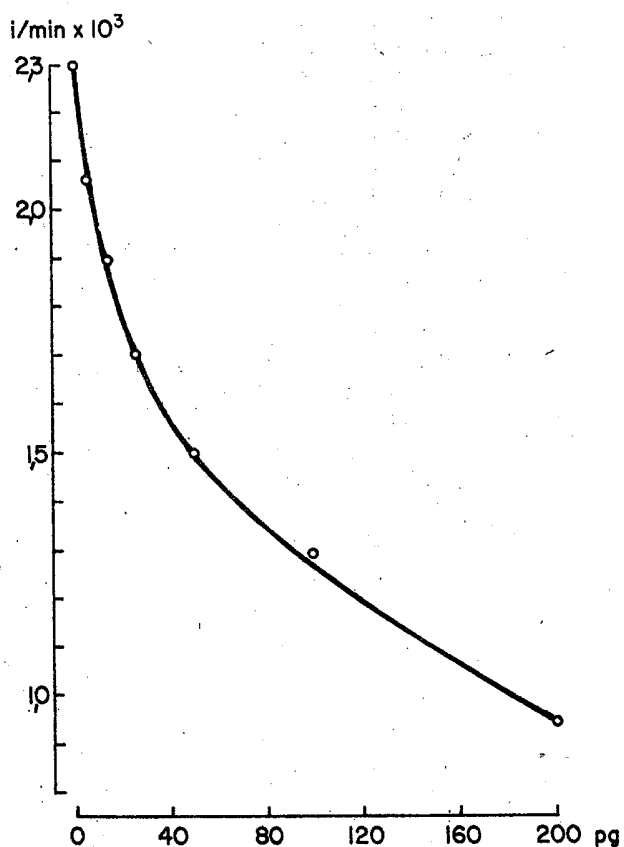
VEREŠ KAREL, doc., RNDr., CSc., PÍCHOVÁ DRAHOMÍRA MVDr., CSc., PRAHA
DOLEŽALOVÁ VLADIMÍRA RNDr., CSc., BRNO

[54] Způsob stanovení aflatoxinů radioimunologickou analýzou

Vynález se týká způsobu stanovení aflatoxinů radioimunologickou analýzou, při které se jako tritiováného radioligandu použije (2,3-³H) aflatoxinu—B₂ vzorce I.

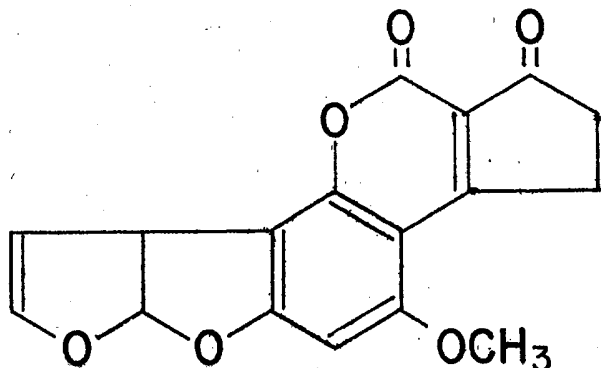


Způsob umožňuje stanovení pikogramových množství všech aflatoxinů jako celku vyskytujících se v biologických materiálech.



Vynález se týká způsobu stanovení aflatoxinů radioimmunologickou analýzou.

Aflatoxiny jsou toxické metabolity plísní rodu *Aspergillus*, působící především jako jaterní toxiny, karcinogeny, taratogeny a mutageny. Zatím se jako nejtoxickejší z nich se jeví aflatoxin—B₁ vzorce I



který je produkován plísněmi *Aspergillus flavus* a *Aspergillus parasiticus*.

Uvedené plísně a jejich toxické metabolity se vyskytují v nejrůznějších zemědělských a potravinářských produktech při běžném způsobu zpracování a skladování (seno, sláma, zrniny, krmná moučka a granuláty, mouka, sušené mléko apod.). Z těchto produktů přecházejí mykotoxiny do zvířat, kontaminují mléko, maso a transplacentárně přecházejí dokonce i do mláďat. Závažná je skutečnost, že tyto mykotoxiny se vyskytují ve velmi nízkých koncentracích a že příznaky, které vyvolávají, jsou všeobecné, jako je snížená spotřeba potravy a poruchy růstu. Toxický účinek dosahuje LD₅₀ u aflatoxinu—B₁ 1 až 10 mg/kg živé váhy zvířete. Prahové dávky kancerogenního účinku aflatoxinu—B₁ jsou 5 µg/kg pro krys a 0,1 µg/kg pro pstruha.

Geografická distribuce aflatoxinu—B₁ je velmi rozdílná; nejvyšší koncentrace byly nalezeny v některých tropických oblastech (100 až 1000 µg/kg), pro Evropu se uvádí hladina 50 až 150 µg/kg. Aflatoxin—B₁ je chemicky relativně stálá sloučenina, varem v neutrálním prostředí se prakticky nemění a dekontaminace je velmi obtížná. Sledování hladiny aflatoxinu—B₁ je problém nejen potravinářsko-veterinářský, ale i epidemiologicko-zdravotnický.

Problém detekce a kvantitativního stanovení aflatoxinů je řešen již řadu let. Většina dosud užívaných metod stanovení je založena na detekci nebo kvantitativním vyhodnocení v UV oblasti. To však předpokládá již jejich oddělení od velkého množství interferujících látek. Nejnovější fyzikálně-chemické metody chromatografické, kombinované s fluorescenční detekcí, dovolují stanovit pomocí minikolon 70 ng aflatoxinu—B₁ ve vzorku (Holaday Ch. a Landsen J., *Agricultural Food Chemistry* **23**, 1134 (1975)) nebo 0,5 µg/kg metodou vysokotlaké kapalinové chromatografie (Altex Chromatogram **1**, 1-5 (1978)), nebo subpikogramová množství metodou vysokotlaké kapalinové chromatografie kombinovanou s laserovou detekcí (Diebold G. J., Zare R. N.; *Science* **196**, 1439 (1977)) a tenkovrstvou chromatografií 2 µg/kg (Balzer J.; *L. Assoc. Off. Anal. Chem.* **61**

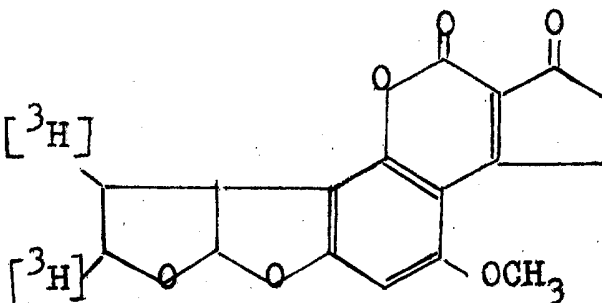
584 (1978)). Uvedené metody mají své nevýhody, protože jsou pracné, dlouhotrvající a vyžadují velké množství výchozího vzorku pro extrakci. Dále postrádají citlivost a specifitu pro stanovení stopových množství aflatoxinů v biologických tekutinách a tkáních, kde je množství vzorků často limitováno.

Nové možnosti stanovení aflatoxinů v nejrůznějších biologických materiálech poskytují radioimmunologické metody. První radioimmunologické stanovení aflatoxinu—B₁ popsali Langone a Van Vunakisová (*J. Nat. Cancer Inst.* **56**, 591 (1976)). Imunizací králíků konjugátem aflatoxinu—B₁ získali tyto autoři protilátky a pomocí nespecificky tritiovaného aflatoxinu—B₁ o specifické aktivitě 4,0 Ci/mmol vypracovali postup pro kvantitativní stanovení. Citlivost jejich metody je 75 pg/0,1 ml aflatoxinu—B₁ v různých biologických materiálech.

Podobný postup popsali Chu a Ueno (*Appl. Environment. Microbiology* **33**, 1125 (1977/)), kteří použitím nespecificky tritiovaného aflatoxinu—B₁ o specifické aktivitě 13 Ci/mmol dosáhli citlivosti pouze 200 až 2000 pg v 0,5 ml kapalného vzorku.

Citlivost každé metody radioimunoanalýzy je limitována specifickou aktivitou použitého radioligandu. Tritiace na základě výměnné reakce, aplikovaná v případě aflatoxinu—B₁, nemůže zaručit specifické aktivity alespoň 25 Ci/mmol, minimálně vyžadované pro stanovení organických sloučenin metodou radioimunoanalýzy.

Uvedené nedostatky odstraňuje způsob stanovení aflatoxinů radioimmunologickou analýzou podle vynálezu, jehož podstatou je, že jako tritiovaného radioligandu s použije (2,3—³H) aflatoxinu—B₂ vzorce I,



který se dá připravit o specifické aktivitě minimálně 30 Ci/mmol a jehož použitím při stanovení aflatoxinů metodou radioimunoanalýzy se dá zvýšit citlivost této metody až na 6 pg/0,1 ml vzorku.

Dále jsou uvedeny příklady použití (2,3—³H) aflatoxinu—B₂ jako radioligandu při stanovení aflatoxinů v biologických materiálech.

Příklad 1

Stanovení aflatoxinu v mléce

Vzorek mléka (asi 10 ml) se homogenisuje zahřátím na 60 °C na vodní lázni za promíchávání.

Ze vzorku se odpipetuje do 5 ml aglutinační zkumavky 10 µl, přidá se 100 µl protilátek (při ředění 1:3000) a 100 µl roztoku tritiovaného radioligandu (2,3—³H) aflatoxinu—B₂ o celkové aktivitě 5—8000 i/min. Obsah zkumavky se promíchá a nechá inkubovat při 4 °C do druhého dne.

Zkumavka se přenese do ledové lázně, přidá se 0,5 ml 0,3% vodní suspenze aktivního uhlí (Norit), promíchá se a obsah se centrifuguje (asi 600 g) 10 minut. Do lahvičky pro měření radioaktivity, obsahující 5 ml scintilačního roztoku, se odpipetuje 0,5 ml supernatantu a změří se radioaktivita na nukleárním počítači. Změřená radioaktivita vzorku byla 1700 i/min, čemuž odpovídá podle grafu 30 pg aflatoxinu. Uvedený graf kalibrační křivky je znázorněn na přiloženém výkrese, kde na ose x je uvedeno množství aflatoxinu v pg a na ose y radioaktivita vzorku vyjádřena v impulsech/min.

Celý postup se provádí dvojmo a z průměrné hodnoty stanovené radioaktivity se určí obsah aflatoxinu odečtením z kalibrační křivky, připravené známým způsobem, uvedené na grafu.

Příklad 2

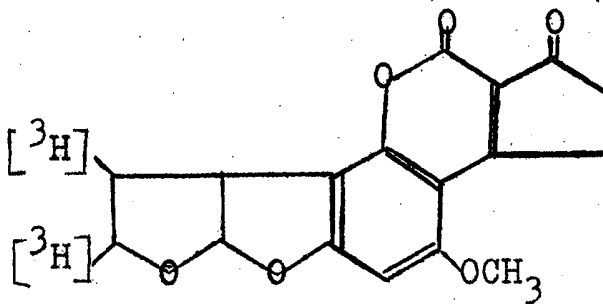
Stanovení aflatoxinu v krmivu

5 g krmiva se extrahuje 100 ml směsí aceton : voda (80:15) po dobu 30 minut. Pevné zbytky se oddělí filtrací nebo centrifugací a rozpouštědlo se odpaří k suchu. Zbytek se rozpustí ve 2 ml metanolu a alikvotní podíl 10 /ul se přidá do 2,5 ml fosfátového pufru 0,05 M a pH 7,5 s přidavkem 3% hovězího sérového albuminu.

Vlastní stanovení se provádí stejným způsobem jako v příkladu 1, ale s použitím 100 /ul takto připraveného roztoku. Změřená radioaktivita vzorku byla 1200 i/min, čemuž odpovídá podle grafu 118 pg aflatoxinu.

PŘEDMĚT VÝNÁLEZU

Způsob stanovení aflatoxinů radioimunologickou analýzou, vyznačený tím, že jako tritiovaného radio-ligandu se použije (2,3-³H) aflatoxinu—B₂ vzorce I.



1 výkres

