

Rádioimunoanalytické sledovanie výskytu aflatoxínu M_1 v mlieku

ALAN MARKO – MILAN KOVÁČ

Súhrn. Obsah aflatoxínu M_1 sa stanovil vo vzorkách konzumného mlieka a mlieka z prvovýroby z územia Západoslonského kraja rádioimunoanalytickou metódou na báze komerčnej československej RIA súpravy. Z analyzovaných 25 vzoriek konzumného mlieka ani v jednej sa neprekročil limit $0,1 \mu\text{g.kg}^{-1}$. Zo 110 vzoriek mlieka z prvovýroby 93 vzoriek (84,5 %) neobsahovalo aflatoxín M_1 , resp. obsah bol nižší ako $0,1 \mu\text{g.kg}^{-1}$, 15 vzoriek (13,6 %) obsahovalo aflatoxín M_1 v množstve $0,1-0,5 \mu\text{g.kg}^{-1}$ a 2 vzorky (1,8 %) obsahovali aflatoxín M_1 v rozmedzí $0,5-1,0 \mu\text{g.kg}^{-1}$.

Ak odhliadneme od priamej tvorby v podmienkach spracovania a skladovania, kontaminácia mlieka a mliečnych produktov mykotoxínmi vzniká ako dôsledok kontaminácie krmiva.

Aflatoxín M_1 je karcinogénny metabolit vyskytujúci sa v kravskom mlieku ako dôsledok skrmovania krmiva obsahujúceho aflatoxín B_1 . Po prijatí aflatoxínu B_1 vzniká v hepatocytoch oxidatívnou metabolizáciou za účasti enzýmov mikrozomálnej frakcie 4-monohydroxyderivát, t.j. aflatoxín M_1 , ktorý organizmus vylučuje mliekom v množstve $0,2-3 \%$ z prijatého množstva aflatoxínu B_1 . Dánski autori [1] na základe rozsiahleho experimentu odvodili vzťah medzi prijatým aflatoxínom B_1 v krmive a aflatoxínom M_1 vylúčeným v mlieku:

$$\text{ng aflatoxínu } M_1/\text{kg mlieka} = 1,24 (\mu\text{g aflatoxínu } B_1 \text{ za deň})^{0,834}.$$

Toxicita aflatoxínu M_1 je asi polovičná v porovnaní s aflatoxínom B_1 , pričom však aflatoxín M_1 má silný nefrotoxický účinok. Kancerogenita aflatoxínu M_1 je síce nižšia ako aflatoxínu B_1 , obidva však patria medzi najsilnejšie hepatokarcinogény.

Ing. Alan Marko, Ing. Milan Kováč, CSc., Výskumný ústav potravinársky, Trenčianska 53, 825 09 Bratislava.

Vzhľadom na svoju relatívnu stabilitu a potrebu šetrného spracovania mlieka sa počas technologického procesu množstvo aflatoxínu M_1 významne neznižuje [2]. Keďže sa aflatoxín M_1 viaže na kazeín, dochádza pri výrobe syrov a sušeného mlieka k relatívnemu zvyšovaniu jeho koncentrácie [3]. Doteraz nie je známy efektívny spôsob eliminácie výskytu aflatoxínov v požívatinách [4]. Preto je potrebná aj kontrola mlieka a mliečnych výrobkov, a to najmä tých, ktoré sú určené na detskú a dojčenskú výživu.

Výskyt aflatoxínu M_1 bol zaznamenaný v Holandsku [3], Taliansku [5], NSR [6] a ďalších krajinách [2]. V Československu sa roku 1980 zistil aflatoxín M_1 v konzumnom mlieku v 9 vzorkách zo 67 v množstve 0,05–0,10 $\mu\text{g.l}^{-1}$. V 50 vzorkách analyzovaných roku 1982 sa výskyt aflatoxínu M_1 nezistil [7]. V poslednom období sa opäť zaznamenal výskyt aflatoxínu M_1 vo vzorkách mlieka z prvovýroby [8].

Na stanovenie aflatoxínu M_1 sa používajú predovšetkým chromatografické techniky, najmä vysokoúčinná kvapalinová chromatografia s fluorescenčnou detekciou [9–12]. Vzhľadom na ich prístrojovú náročnosť, zložitosť a zdĺhavosť, ako aj potrebu spracovať veľké množstvá vzoriek sa vyvinuli imunochemické metódy stanovenia aflatoxínu M_1 [9, 13–16]. ČSSR je jediným štátom na svete, ktorý komerčne vyrába súpravu pre rádioimunoanalytické stanovenie aflatoxínov priamo v tekutom mlieku, bez predchádzajúcej extrakcie a separácie.

Princíp stanovenia sa zakladá na kompetetívnej reakcii medzi ^{125}I značným konjugátom aflatoxínu B_1 a aflatoxínom M_1 , ktorý obsahujú štandardy a neznáme vzorky a o obmedzený počet väzbových miest na špecifickej protilátke proti aflatoxínu M_1 . Použitá protilátka v súprave sa získala imunizáciou králika a má tieto krížové reakcie s jednotlivými typmi aflatoxínov [17]: aflatoxín B_1 – 100 %, aflatoxín B_2 – 29 %, aflatoxín G_1 – 52 %, aflatoxín G_2 – 7 %, aflatoxín M_1 – 76 %, aflatoxín M_2 – 21 %. Tieto krížové reakcie umožňujú použiť 3-(^{125}I tyramid *O*-karboxymetyl)-oxim aflatoxínu B_1 ako rádioindikátor a súčasne aflatoxín M_1 ako štandard, pretože pri príjme nízkych dávok aflatoxínu B_1 v krmive sa mliekom vylučuje takmer výhradne aflatoxín M_1 .

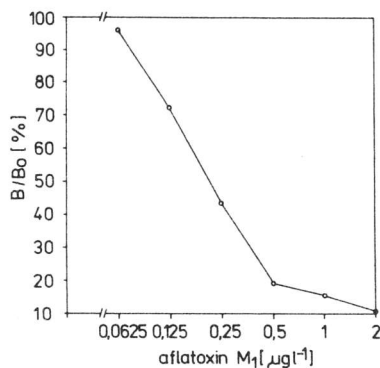
Otázkami možných interferencií pri rádioimunoanalytickom stanovení aflatoxínov sa zaoberali Ruprich a kol. a Fukal a kol. Nezistila sa však reakcia protilátky s laktoalbumínom, čo umožňuje priamu kontrolu mlieka bez extrakcie a separácie vzorky. Aj keď aflatoxín M_1 je nízkomolekulová látka (M_r 328,3) a v imunochemickej reakcii vystupuje ako haptén, pri zachovaní všeobecne platných zásad a poznatkov pre rádioimunoanalytické stanovenie mykotoxínov [18–20] uvedená metóda umožňuje veľmi jednoducho, s vysokou citlivosťou a rýchlo spracovať veľké množstvo vzoriek.

V práci sme rádioimunoanalytickou metódou použitím súpravy RIA-test-AFLATOXÍN M_1B_1 sledovali výskyt aflatoxínu M_1 v mlieku vo vzorkách z obchodnej siete a prvovýroby na území Západoslovenského kraja.

Materiál a metódy

Vzorky konzumného mlieka sme získali z obchodnej siete, vzorky mlieka z provýroby sa odobrali v jednotlivých výrobných strediskách poľnohospodárskych podnikov Západoslovenského kraja od augusta 1987 do februára 1988. Hneď po odbere sa vzorky v množstve asi 2 ml odstredili v chladnej centrifúge 30 minút pri 2500 g a odstredeného mlieka sa do analýzy uchovávalo pri -20°C .

Vlastné rádioimunoanalytické stanovenie sa robilo podľa postupu odporúčaného výrobcom súpravy RIA-test-AFLATOXÍN M_1B_1 . K 100 μl odstredeného mlieka sa pipetovalo po 100 μl precipitačnej protilátky, vlastnej protilátky a rádioindikátora. Inkubovalo sa 24 hodín (cez noc) pri laboratórnej teplote. Ďalej sa pridalo 100 μl gamaglobulínu a 1 ml polyetylén glykolu 6000 vychladeného na 4°C . Po inkubácii 60 minút pri 4°C sa frakcie viazaného značeného konjugátu aflatoxínu oddelili od voľného značeného konjugátu centrifugáciou v chladenej odstredivke. Supernatant sa odsal a premeriavala sa aktivita ^{125}I značeného konjugátu aflatoxínu v sedimente makroprecipitátu. Na meranie aktivity sa použil studnicový scintilačný detektor NaI(Tl) typ SKW ISN 04 v spojení so scintilačnou meracou sondou typ 27 000 a jednokanálovým gamaanalýzátorom typ 20 046 Robotron.



Obr. 1. Príklad kalibračnej krivky RIA stanovenia aflatoxínu M_1 .

Fig. 1. The example of calibration curve RIA for aflatoxin M_1 determination.

Vypočítali sa priemerné hodnoty početnosti duplikátov vzoriek a štandardov a koncentrácia aflatoxínu M_1 vo vzorkách sa určila z kalibračnej krivky, ktorá sa zostrojila ako závislosť pomeru aktivít viazanej (B) a voľnej (B_0) frakcie oproti logaritmu koncentrácie neznačených štandardov aflatoxínu M_1 (obr. 1).

Hodnoty špecifickej väzby RIA stanovenia boli v rozsahu 31–38 %, nešpecifickej väzby 4–5 %, 50 % intercept kalibračnej krivky I_{50} bol 0,19–0,24 $\mu\text{g.l}^{-1}$. Detekčný limit metódy bol 0,05–0,06 $\mu\text{g.l}^{-1}$.

Výsledky a diskusia

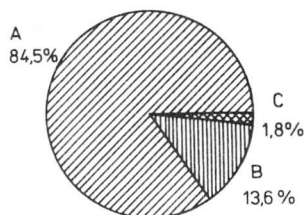
V období od augusta 1987 do februára 1988 sa rádioimunoanalytickou metódou vyšetrilo 25 vzoriek konzumného mlieka a 110 vzoriek mlieka z prvovýroby na prítomnosť aflatoxínu M_1 .

V Československu najvyššie prípustné množstvo aflatoxínu M_1 v tekutom mlieku je 0,5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ a v mliečnej dojčenskej výžive v prepočte na obnovené mlieko 0,1 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

Tomuto kritériu zodpovedali všetky analyzované vzorky konzumného mlieka, keďže sa neprekročil limit 0,1 $\mu\text{g.kg}^{-1}$. Ide vlastne o bazénové vzorky mlieka vzniknuté zmiešaním v mliekárenskom závode a podrobené technologickému spracovaniu. Kvalita mlieka od jednotlivých dodávateľov z prvovýroby môže byť však rozdielna. Obrázok 2 graficky znázorňuje frekvenciu výskytu

Obr. 2. Frekvencia výskytu aflatoxínu M_1 v mlieku z prvovýroby. A – pod 0,1 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, B – 0,1–0,5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, C – 0,5–1,0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.

Fig. 2. Frequency of aflatoxin M_1 content in milk from milk farms. A – under 0.1 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, B – 0.1–0.5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, C – 0.5–1.0 $\mu\text{g.kg}^{-1}$.



aflatoxínu M_1 v mlieku z prvovýroby. Zo 110 vzoriek 93 vzoriek (84,5 %) neobsahovalo aflatoxín M_1 , resp. obsah bol nižší ako 0,1 $\mu\text{g.kg}^{-1}$, 15 vzoriek (13,6 %) obsahovalo aflatoxín M_1 v množstve 0,1–0,5 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ a 2 vzorky (1,8 %) obsahovali 0,5–1,0 μg aflatoxínu M_1 v 1 kg.

Z porovnateľných údajov bolo v zimnom období 1986/87 v Juhomoravskom kraji z 837 vzoriek mlieka z prvovýroby kontaminovaných 1,4 % vzoriek na úrovni 0,1–0,5 $\mu\text{g.l}^{-1}$, v ani jednej vzorke však nebola prekročená úroveň 0,5 μg aflatoxínu M_1 v 1 litri mlieka.

Výsledky stanovenia poukazujú na existujúcu možnosť kontaminácie konzumného mlieka a mliečnych výrobkov aflatoxínom M_1 a nevyhnutnosť ďalšej monitorizácie jeho výskytu.

Literatúra

- [1] MUNKSGAARD, L. – LARSEN, J. – WERNER, H. – ANDERSEN, P.E. – VIUF, B.T., *Milchwissenschaft*, 42, 1987, s. 165.
- [2] MALIN, P., *Milchwirtsch. Ber.*, 76, 1983, s. 201.
- [3] EGMOND van, H.P., *Food Chem.*, 11, 1983, s. 289.
- [4] SCHMIDT, F.R. – ESSER, K., *Process Biochem.*, 1985, s. 167.
- [5] QUINTAVALLA, S. – CASOLARI, A., *Ind. Conserve*, 60, 1985, s. 85.
- [6] HEESCHEN, W. – BLUETHGEN, A. – TOLLE, A. – ENGEL, G., *Milchwissenschaft*, 36, 1981, s. 1.
- [7] VESELÝ, D. – VESELÁ, D., *Veter. Med.*, 28, 1983, s. 57.
- [8] RUPRICH, J. – PISKÁČ, A., *Veter. Péče potr. Prům.*, 1987, č. 4, s. 21.
- [9] QIAN, G. – YASEI, P. – YANG, G.C., *Anal. Chem.*, 56, 1984, s. 2079.
- [10] FERGUSON-FOOS, J. – WARREN, J.D., *J. AOAC*, 67, 1984, s. 1111.
- [11] CARISANO, A. – DELLA TORRE, G., *J. Chromatogr.*, 355, 1986, s. 340.
- [12] ADENSAM, L. – LEBEDOVÁ, M. – TUREK, B., *Čs. Hyg.*, 32, 1987, s. 362.
- [13] PESTKA, J.J. – LI, Y. – HARDER, W.O., – CHU, F.S., *J. AOAC*, 64, 1981, s. 294.
- [14] FREMY, J.M. – CHU, F.S., *J. AOAC*, 67, 1984, s. 1098.
- [15] GROOPMAN, J.D. – TRUDEL, L.J. – DONAHUE, P.R. – MARSHAK-ROTHSTEIN, A. – WOGAN, G.N., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA, Biol. Sci.*, 81, 1984, s. 7728.
- [16] RAUCH, P. – FUKAL, L. – PROŠEK, J. – BŘEZINA, P. – KÁŠ, J., *J. Radioanal. Nucl. Chem. Lett.*, 117, 1987, s. 163.
- [17] Návod na použitie súpravy RIA-test-AFLATOXÍN M₁B₁; Košice, ÚRVJT, 1987.
- [18] RUPPRICH, J. – PISKÁČ, A. – VEREŠ, K., *Čs. Hyg.*, 31, 1986, s. 288.
- [19] RUPPRICH, J., *Veter. Péče potr. Prům.*, 1987, č. 4, s. 60.
- [20] FUKAL, L. SOVA, Z. – REISNEROVÁ, H. – RAUCH, P., *Biol. Chem. Veter. (Praha)*, 23, 1987, s. 557.

Исследование наличия афлатоксина M₁ в молоке радиоиммуноаналитическим методом

Резюме

Содержание афлотоксина M₁ было определено в пробах потребительского молока и молока производящего в западнословацкой области радиоиммуноаналитическим методом на базе коммерческого чехословацкого РИМ состава. Из 25 анализируемых проб потребительского молока ни одна не превысила предел 0,1 мкг.кг⁻¹. Из 110 проб производственного молока 93 проб (84,5 %) не содержало афлатоксин M₁ а также содержание было ниже чем 0,1 мкг.кг⁻¹, 15 проб (13,6 %) содержало афлатоксин M₁ в количестве 0,1-0,5 мкг.кг⁻¹ и 2 пробы (1,8 %) содержали афлатоксин M₁ в диапазоне 0,5-1,0 мкг.кг⁻¹.

Radioimmunoassay determination of aflatoxin M₁ in milk

Summary

The content of aflatoxin M₁ in samples of commercial milk as well as in milk farms from Western Slovakia was determined by radioimmunoassay on the basis of commercial Czechoslovak RIA kit. From 25 analysed samples of commercial milk the limit of 0.1 μg kg⁻¹ aflatoxin M₁ was not overstepped. From 110 milk samples from milk farms 93 samples (84.5%) had none aflatoxin, respectively less than 0.1 μg kg⁻¹, in 15 samples (13.6%) was the content of aflatoxin M₁ in ranges 0.1-0.5 μg kg⁻¹ and 2 samples contained 0.5-1.0 μg kg⁻¹ of aflatoxin M₁.