



УКРАЇНА

(19) UA

(11) 93342

(13) U

(51) МПК

A61B 5/145 (2006.01)

G01N 33/48 (2006.01)

ДЕРЖАВНА СЛУЖБА
ІНТЕЛЕКТУАЛЬНОЇ
ВЛАСНОСТІ
УКРАЇНИ

(12) ОПИС ДО ПАТЕНТУ НА КОРИСНУ МОДЕЛЬ

| | |
|---|--|
| (21) Номер заявки: u 2014 04614 | (72) Винахідник(и): Бойко Юрій Васильович (UA), Бойко Василь Васильович (UA), Бойко Григорій Васильович (UA), Духницький Володимир Богданович (UA) |
| (22) Дата подання заявки: 29.04.2014 | |
| (24) Дата, з якої є чинними права на корисну модель: 25.09.2014 | |
| (46) Публікація відомостей про видачу патенту: 25.09.2014, Бюл.№ 18 | (73) Власник(и): НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ БІОРЕСУРСІВ І ПРИРОДОКОРИСТУВАННЯ УКРАЇНИ, вул. Героїв Оборони, 15, м. Київ-41, 03041 (UA) |

(54) СПОСІБ ВИЗНАЧЕННЯ КІЛЬКОСТІ ОХРАТОКСИНУ А У ТКАНИНАХ ПТИЦІ

(57) Реферат:

Спосіб визначення кількості охратоксину А у тканинах птиці включає відбирання зразків тканин органів, отримання гомогенату тканин, проведення екстракції зразка, упарювання органічної фази і відновлення у рухомій фазі, визначення за допомогою рідинного хроматографа. Для гомогенізації використовують зразки тканин масою 4 г, які гомогенізують із 1 мл 1 М розчину ортофосфорної кислоти. Охратоксин А екстрагують з 2,5 г гомогенату двічі 5 мл етилацетату, органічні фази упарюють до 3 мл, екстрагують 3 мл 0,5 М розчину гідрокарбонату натрію, для утримання використовується імуноафінна колонка, через яку пропускають розведений об'єм зразка, після чого промивають 10 мл фосфатного буфера та 10 мл деіонізованої води. Елюювання проводять 1,5 мл метанолу та 1,5 мл деіонізованої води, аналізують на рідинному хроматографі з флуоресцентним детектором та оберненофазовою хроматографічною колонкою.

UA 93342 U

Корисна модель належить до галузі ветеринарної медицини, зокрема до способів досліджування біологічного матеріалу і може бути використана при визначенні мікрокількостей охратоксину А у тканинах птиці.

Відомий аналог (R. Matrella, L. Monaci, M.A. Milillo // Food Control, 2006. - 17. - P. 114-117), до складу якого входить: відбирання зразків тканин органів, отримання гомогенату 20 г тканин, проведення подвійної екстракції 2,5 г гомогенату з 5 мл етилацетату, екстракції 3 мл органічної фази 3 мл 0,5 М розчину гідрокарбонату натрію (pH 8,4), екстракція 3 мл етилацетату, упарювання органічної фази і відновлення в 150 мкл рухомої фази ацетонітрil / вода / 1 % оцтова кислота (49,5:49,5:1, v/v), та визначення охратоксину А за допомогою рідинного хроматографа.

Недоліками відомого аналога є: недостатній ступінь вимивання з проби, тривала процедура екстракції, малий об'єм кінцевого елюату.

В основу корисної моделі поставлено задачу створити спосіб, який буде високочутливим та адаптованим до сучасних способів визначення охратоксину А за допомогою використання імуноафінної колонки, збільшення ступеня вимивання з проби, зменшення часу аналізу, збільшення відновлення, та збільшення об'єму кінцевого елюату.

Поставлену задачу здійснюють шляхом створення способу визначення охратоксину А у тканинах птиці, у якому для гомогенізації використовуються зразки тканин масою 4 г, які гомогенізують із 1 мл 1 М розчину ортофосфорної кислоти, охратоксин А екстрагують з 2,5 г гомогенату двічі 5 мл етилацетату, органічні фази упарюють до 3 мл, екстрагують 3 мл 0,5 М розчину гідрокарбонату натрію, для утримання використовується імуноафінна колонка, через яку пропускають розведений об'єм зразка, після чого промивають 10 мл фосфатного буфера та 10 мл деіонізованої води, елювання проводять 1,5 мл метанолу та 1,5 мл деіонізованої води, аналіз елюату проводять на рідинному хроматографі з флуоресцентним детектором та оберненофазовою хроматографічною колонкою.

Визначення охратоксину А у тканинах птиці згідно з заявленим способом здійснюють за наступною схемою:

Екстракція здійснюється таким чином: до 4 г зразка додають 1 мл 1 М розчину ортофосфорної кислоти та гомогенізують в гомогенізаторі протягом 5 хв. Переносять 2,5 г гомогенату у центрифугальну пробірку та двічі екстрагують 5 мл етилацетату центрифугуючи протягом 5 хв при 3500 об/хв. Органічні фази об'єднують. Об'єднаний екстракт упарюють рідким азотом або на роторному упарювачі при температурі 30-40 °С до 3 мл. Повторно екстрагують 3 мл 0,5 М розчину гідрокарбонату натрію (pH 8,4).

Для утримання використовують імуноафінну колонку. Перед використанням потрібно відкрити пробку на дні імуноафінної колонки, після повного проходження наповнювача колонки пропускають зразок зі швидкістю потоку 1 мл/хв. Повільний постійний тиск є визначним фактором для "закріплення" охратоксину А на антитілах. Ця процедура може бути виконана вручну насосом або з використанням вакуумної елювальної системи, що придатна для аналізу великої кількості зразків.

Відмивання проводять таким чином: промивають колонку 10 мл фосфатного буфера (pH 7,4) зі швидкістю потоку 2-3 мл/хв. Повторюють процедуру промивання 10 мл деіонізованої води.

Елювання проводять таким чином: поміщають віалу під колонкою та пропускають 1,5 мл метанолу, зі швидкістю потоку 1 крапля за секунду. Рекомендується повторення проходження потоку крізь колонку (змінюю напрямку потоку) тричі, щоб переконатись у повній денатурації моноклональних антитіл і послідовному звільненні охратоксину А у розчин. Потім пропускають крізь колонку 1,5 мл деіонізованої води та збирають у віалу до загального об'єму 3 мл.

Визначення кількості охратоксину А за допомогою рідинного хроматографа, шляхом порівняння висоти піків з калібрувальною кривою стандарту. Віали з пробами поміщають у тримач автосамплера рідинного хроматографа з флуоресцентним детектором та оберненофазовою хроматографічною колонкою - довжина 250 мм; внутрішній діаметр 4,6 мм; розмір часток 5,0 мкм і у відповідній програмі створюють методику з умовами аналізу, вказаними нижче: швидкість потоку - 1 мл/хв, об'єм введення - 20 мкл, температура термостата - 40 °С, флуоресцентний детектор, довжина хвиль - $\lambda_{ex} = 333$ нм, $\lambda_{em} = 443$ нм, рухома фаза - ацетонітрil / вода / кислота оцтова 49,5:49,5:1 (%).

Приклад. Визначення кількості охратоксину А у тканинах птиці.

Випробування способу визначення охратоксину А проводили в тканинах (нирки, печінка, м'язи), взятих від курчат-бройлерів семитижневого віку. Зразки тканин масою 4 г гомогенізували. До гомогенату тканин внесли стандартний розчин охратоксину А, в кількостях, указаних у таблиці 1. Після цього повторно гомогенізували із 1 мл 1 М розчину ортофосфорної кислоти.

Перенесли 2,5 г гомогенату в центрифужну пробірку та двічі екстрагували 5 мл етилацетату центрифугуючи протягом 5 хв при 3500 об/хв. Об'єднані органічні фази упарювали на роторному упарювачі до 3 мл. Повторно екстрагували 3 мл 0,5 М розчину гідрокарбонату натрію (рН 8,4). Пропустили зразок через імуноафінну колонку зі швидкістю потоку 1 мл/хв, потім промили колонку 10 мл фосфатного буфера (рН 7,4) зі швидкістю потоку 2-3 мл/хв, після чого повторили процедуру промивання 10 мл деіонізованої води. Віалу помістили під колонкою та елюювали охратоксин А пропусканням 1,5 мл метанолу. Потім пропустили крізь колонку 1,5 мл деіонізованої води. Зразок загальним об'ємом 3 мл зібрали у віалу й аналізували на рідинному хроматографі.

Після цього вираховується концентрація охратоксину А у кожному проаналізованому зразку і визначено середню концентрацію, стандартне відхилення, повернення та коефіцієнт варіації. Результати визначення правильності та відтворюваності запропонованого способу наведені в таблиці 2.

Таблиця 1

Визначення кількості охратоксину А у тканинах курчат-бройлерів

| Показники | Додано охратоксину А, мкг/кг | | |
|------------------------|------------------------------|-------|-------|
| | 1,5 | 3 | 4,5 |
| Червоні м'язи (стегно) | | | |
| X1 | 1,367 | 2,736 | 4,273 |
| X2 | 1,483 | 2,597 | 4,319 |
| X3 | 1,079 | 2,871 | 3,769 |
| Середнє | 1,310 | 2,735 | 4,120 |
| СВ | 0,21 | 0,14 | 0,30 |
| П, % | 87,31 | 91,16 | 91,56 |
| CV, % | 15,89 | 5,01 | 7,40 |
| Білі м'язи (грудинка) | | | |
| X1 | 1,362 | 2,267 | 4,361 |
| X2 | 1,182 | 2,956 | 3,657 |
| X3 | 1,488 | 2,896 | 4,376 |
| Середнє | 1,344 | 2,706 | 4,131 |
| СВ | 0,15 | 0,38 | 0,41 |
| П, % | 89,60 | 90,20 | 91,80 |
| CV, % | 11,46 | 14,11 | 9,94 |
| Печінка | | | |
| X1 | 1,237 | 2,846 | 4,426 |
| X2 | 1,383 | 2,853 | 3,969 |
| X3 | 1,468 | 2,527 | 4,308 |
| Середнє | 1,363 | 2,742 | 4,234 |
| СВ | 0,12 | 0,19 | 0,24 |
| П, % | 90,84 | 91,39 | 94,10 |
| CV, % | 8,55 | 6,80 | 5,61 |
| Нирки | | | |
| X1 | 1,092 | 2,589 | 4,304 |
| X2 | 1,411 | 2,617 | 3,944 |
| X3 | 1,487 | 2,790 | 4,227 |
| Середнє | 1,330 | 2,665 | 4,158 |
| СВ | 0,21 | 0,11 | 0,19 |
| П, % | 88,66 | 88,84 | 92,40 |
| CV, % | 15,77 | 4,08 | 4,56 |

де: Кс - середнє значення отриманої концентрації аналізу; СВ - стандартне відхилення; П - повернення ($P = (K_s \times 100) / \text{доданий вміст, \%}$); CV - коефіцієнт варіації ($CV = (СВ / K_s) \times 100, \%$).

Таблиця 2

Загальне повернення охратоксину А із тканин курчат-бройлерів при різних рівнях додавання

| Кількість доданого охратоксину А, мкг/кг | Червоні м'язи (стегно) | Білі м'язи (грудинка) | Печінка | Нирки |
|--|------------------------|-----------------------|---------|-------|
| 1,5 | 87,31 | 89,60 | 90,84 | 88,66 |
| 3 | 91,16 | 90,20 | 91,39 | 88,84 |
| 4,5 | 91,56 | 91,80 | 94,10 | 92,40 |
| Середнє | 90,01 | 90,53 | 92,11 | 89,97 |
| СВ | 2,35 | 1,14 | 1,74 | 2,11 |
| CV, % | 2,61 | 1,26 | 1,89 | 2,34 |

де: СВ - стандартне відхилення; CV - коефіцієнт варіації ($CV = (СВ / Кс) \times 100, \%$).

5 Повернення було обраховано для визначення критерію правильності і становить: для червоних м'язів - $90,01 \pm 2,35 \%$; білих м'язів - $90,53 \pm 1,14 \%$; печінки - $92,11 \pm 1,74 \%$; нирок - $89,97 \pm 2,11 \%$, що відповідає мінімально допустимим значенням.

Коефіцієнт варіації характеризує внутрішню лабораторну відтворюваність і становить: для червоних м'язів - 2,61 %; білих м'язів - 1,26 %; печінки - 1,89 %; нирок - 2,34 %.

10 Технічним рішенням запропонованої корисної моделі - за допомогою способу визначення кількості охратоксину А у тканинах птиці є підтвердження діагнозу та встановлення ступеня тяжкості захворювання, що значно підвищить ефективність пошуку способів нейтралізації мікотоксинів та збільшить ефективність заходів і засобів профілактики та лікування мікотоксикозів, дасть змогу вирішити проблеми, пов'язані із вивченням механізму токсичної дії мікотоксинів на організм птиці.

15 ФОРМУЛА КОРИСНОЇ МОДЕЛІ

20 Спосіб визначення кількості охратоксину А у тканинах птиці, що включає відбирання зразків тканин органів, отримання гомогенату тканин, проведення екстракції зразка, упарювання органічної фази і відновлення у рухомій фазі, визначення за допомогою рідинного хроматографа, який **відрізняється** тим, що для гомогенізації використовуються зразки тканин масою 4 г, які гомогенізують із 1 мл 1 М розчину ортофосфорної кислоти, охратоксин А екстрагують з 2,5 г гомогенату двічі 5 мл етилацетату, органічні фази упарюють до 3 мл, екстрагують 3 мл 0,5 М розчину гідрокарбонату натрію, для утримання використовується імуноафінна колонка, через яку пропускають розведений об'єм зразка, після чого промивають 25 10 мл фосфатного буфера та 10 мл деіонізованої води, елювання проводять 1,5 мл метанолу та 1,5 мл деіонізованої води, аналізують на рідинному хроматографі з флуоресцентним детектором та оберненофазовою хроматографічною колонкою.

Комп'ютерна верстка Л. Ціхановська

Державна служба інтелектуальної власності України, вул. Урицького, 45, м. Київ, МСП, 03680, Україна

ДП "Український інститут промислової власності", вул. Глазунова, 1, м. Київ – 42, 01601