www.rifst.ac.ir/jrifst.aspx
نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی
سال ۱۳۹٤، جلد ٤، شماره ۳، صفحات ۲۱۸ – ۲۰۹

JRIFST

ارزیابی تخلیص آفلاتوکسین‌ها از نمونه‌های فلفل با استفاده از ستون‌های مولتی فانکشنال و مقایسه آن با روش ستون‌های ایمونوافینیتی

مریم جلیلی

استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، پژوهشکده صنایع غذایی و کشاورزی، پژوهشگاه استاندارد، کرج
*نویسنده مسئول (jalili@standard.ac.ir)

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۲/۱۶
تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۵/۰۳

واژه‌های کلیدی
آفلاتوکسین
ایمونوافینیتی
فلفل
مولتی‌فانکشنال

چکیده

هدف از انجام این مطالعه مقایسه دو روش خالص‌سازی با استفاده از ستون‌های ایمینیوافینیتی و مولتی فانکشنال (مایکوسپ)، برای اندازه‌گیری آفلاتوکسین‌های B_1، B_2، G_1 و G_2 توسط کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC) در فلفل سیاه، فلفل سفید و فلفل قرمز بود. نمونه‌های فلفل سیاه، سفید و قرمز عاری از سم تهیه و با مقادیر ۱، ۵ و ۱۰ نانوگرم بر گرم از هریک از سموم آلوده شدند. خالص‌سازی با استفاده از هر دو ستون ایمونوافینیتی و مایکوسپ انجام و مقدار بازیابی سم به هر دو روش اندازه-گیری شد. شش نمونه فلفل نیز از بازار تهیه و آفلاتوکسین‌ها در هر ۶ نمونه به هر دو روش خالص‌سازی و اندازه‌گیری شدند. داده‌ها با استفاده از آنالیز واریانس تجزیه و تحلیل شد. بازیابی سموم با استفاده از ستون ایمونوافینیتی در محدوده ۶/۶ ±۶۹/۸ برای سم G_2 و ۵/۷±۱۰۱/۵ برای سم B_1 بود. برای ستون مایکوسپ نیز مقادیر بازیابی بین ۳/۴±۷۰/۹ برای سم G_2 و ۸/۸±۹۷/۰ برای سم B_1 بود. بررسی آماری نشان داد اختلاف معنی‌داری بین مقادیر بازیابی و سموم اندازه‌گیری شده در نمونه‌های حقیقی با هر دو روش وجود نداشته و هر دو روش نیز از کارآیی کافی برخوردارند.

مقدمه

آفلاتوکسین‌ها متابولیت ثانویه کپک‌ها هستند که به-ویژه توسط برخی گونه‌های *آسپرژیلوس فلاووس* و اغلب گونه‌های *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* تولید شده (Ali, 2014) و سبب آلودگی خوراک دام و مواد غذایی می‌شوند. عوامل متعددی از جمله موقعیت جغرافیایی، نوع فراورده غذایی، فرآیند تهیه مواد غذایی، شرایط انبارداری و غیره برروی تولید آفلاتوکسین و شدت آلودگی آن مؤثرند (Zinedin *et al.*, 2006). آفلاتوکسین‌ها به علت اثرات سرطان‌زایی، جهش‌زایی، قابلیت اتصال به DNA هسته و میتوکندری کبد و ایجاد مسمومیت حاد، نسبت به سایر سموم قارچی از اهمیت بیشتری برخوردار هستند (Khayoon *et al.*, 2012). چهار نوع مهم آفلاتوکسین‌ها عبارتند از B_1، B_2، G_1 و G_2 که در بین آنها B_1 از همه خطرناک‌تر است زیرا سرطان‌زایی آن در انسان و حیوان به اثبات رسیده است (Yilmaz & Aluc, 2014). مواد غذایی بسیاری از جمله غلات، فراورده‌های لبنی، ادویه جات، قهوه، خشکبار، انواع مغزها و خوراک دام می توانند به آفلاتوکسین آلوده گردند (Wacoo *et al.*, 2014). با توجه به اهمیت این سموم در سلامت انسان، کنترل منابع آلودگی با استفاده از روش‌های سریع، حساس، قابل اعتماد و ارزان قیمت اهمیت بسیاری دارد. به-همین دلیل هر ساله تحقیقات گسترده‌ای بر روی نحوه اندازه‌گیری این سموم در مواد غذایی انجام می-شود. به‌طور کلی روش‌های اندازه‌گیری مایکوتوکسین-ها به دو گروه تقسیم می‌شوند. گروه اول روش‌های ایمونولوژیکی مانند روش الایزا (ELISA) هستند که

اساس آنها بر استفاده از آنتی‌بادی‌های خاص سموم استوار است (Riordan &Wilkinson, 2008). این روش‌ها کابرد بسیاری دارد اما دقت آن به حد کافی بالا نبوده و عموماً باید با روش‌های تأییدی همراه باشند و علاوه بر آن به دلیل نیاز به گرمخانه‌گذاری طولانی مدت، عموماً وقت‌گیر هستند (Turner *et al*., 2009). گروه دوم روش‌های کروماتوگرافی مانند کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) و کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC) می‌باشند (Zheng *et al*., 2005). سالاری و همکاران (۱۳۹۰) عنوان نمودند که روش TLC دارای ضریب تغییرات بالایی بوده و بیشتر در مواردی که آلودگی از حد مجاز بالاتر باشد کاربرد دارد. به‌طور کلی آفلاتوکسین‌ها ترکیباتی هستند که خاصیت فلوئورسنتی دارند و بر اساس همین خاصیت بیشتر با روش HPLC همراه با آشکارساز فلورسانس اندازه‌گیری می‌شوند (Shephard, 2009). گرچه این روش‌ها نیز عموماً وقت‌گیر و گرانقیمت بوده و مراحل تهیه نمونه نیز پیچیده و طولانی است اما به دلیل دقت بسیار بالا، استفاده گسترده‌ای در اندازه‌گیری مایکوتوکسین‌ها دارند. در روش‌های کروماتوگرافی به دنبال استخراج سم از نمونه، از یک روش خالص‌سازی نیز برای تغلیظ سم استفاده می‌شود (Chen *et al*., 2005). خالص‌سازی نمونه‌ها بیشتر با استفاده از ستون‌های مولتی‌فانکشنال (Multifunctional) و ایمونوافینیتی (Immunoaffinity) انجام می‌شود. در ستون‌های مولتی فانکشنال، مایکوتوکسین از ستون عبور داده شده و مواد مداخله‌گر در ستون باقی می‌مانند. از این روش در گزارشات و مقالات به عنوان یک روش مناسب یاد شده و به‌عنوان یک روش مورد قبول در AOAC نیز پذیرفته شده است (Odhav & Naicker 2002). این ستون‌ها در خالص‌سازی مایکوتوکسین‌ها در نمونه‌های غذایی، به استثنای شیر، کابرد بسیاری دارند زیرا استفاده از آنها ساده بوده و در آنها از حلال‌های سمی مانند کلروفرم برای استخراج و یا خالص‌سازی استفاده نمی‌شود. اساس کار در ستون‌های ایمونوافینیتی کاملاً مشابه روش الایزا بوده و ستون حاوی آنتی‌بادی‌هایی است که روی یک سطح ژله‌ای تثبیت شده اند. در طی عمل خالص‌سازی مایکوتوکسین به آنتی‌بادی متصل شده و ناخالصی از ستون خارج می‌شود. از آنجا که آنتی‌بادی‌ها برای آنتی ژن میکروارگانیسم‌ها کاملاً اختصاصی هستند، بازیابی روش بالا بوده و بسیار قابل اعتماد هستند. اشکال عمده‌ای که در این روش‌ها وجود دارد این است که استفاده از ستون‌های ایمونوافینیتی وقت‌گیر بوده و به دقت زیادی نیاز دارند و در صورتی که از کنترل خارج شوند، بازیابی سموم متغیر خواهد بود. علاوه بر آن این ستون‌ها یک‌بار مصرف بوده و بسیار گران هستند و به همین دلیل در برخی از کارخانجات مواد غذایی، آزمون‌های اندازه‌گیری آفلاتوکسین‌ها انجام نمی‌شود.

ادویه‌جات یک گروه از افزودنی‌های مواد غذایی هستند که به دلیل فرآیند تهیه مانند خشک کردن در معرض آفتاب و هوای آزاد و همچنین نگهداری طولانی مدت در انبار، در معرض آلودگی به آفلاتوکسین‌ها قرار می‌گیرند. محققان گزارش نمودند آفلاتوکسین‌ها از طریق آلودگی ادویه‌جات سلامت انسان را تهدید می‌کنند (Colak *et al*., 2006). بر اساس استاندارد اتحادیه اروپا حد مجاز آفلاتوکسین B_1 و مجموع آفلاتوکسین‌ها در ادویه‌جات به ترتیب ۵ و ۱۰ نانوگرم بر گرم می باشد (EC, 2002).

در بین ادویه‌جات انواع فلفل استفاده گسترده‌تری داشته و معمولاً از گستره آلودگی میکروبی بالاتری نیز برخوردارند. این افزودنی‌ها معمولاً پس از طبخ و به غذای آماده مصرف افزوده شده و فرآیندهای حرارتی را تحمل نمی‌کنند، بنابراین کنترل آلودگی در آنها اهمیت دارد (Jalili *et al*., 2012). با توجه به اینکه این مواد حاوی ترکیبات رنگی هستند، روش‌های استخراج و خالص‌سازی آنها کمی مشکل است. لذا در این مقاله دو روش خالص‌سازی با استفاده از ستون ایمینیوافینیتی و ستون‌های مولتی فانکشنال برای اندازه‌گیری آفلاتوکسین‌ها (B_1, B_2, G_1, G_2) در فلفل سیاه، فلفل سفید و فلفل قرمز مقایسه شدند.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی و معرف‌ها

محلول استاندارد اولیه سموم آفلاتوکسین (۱۰۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر ازآفلاتوکسین‌های B_1 و G_1 و ۳۰۰ نانوگرم در میلی‌لیتر از آفلاتوکسین‌های B_2 و

(G_2) در محلول ۵۰٪ متانول از شرکت Bellefonte, Supelco آمریکا خریداری شد. برای تهیه محلول‌های کاری و محلول‌های استاندارد، حجم معینی از استاندارد اولیه با مقدار کافی متانول ۵۰٪ رقیق شد. محلول فسفات بافر سالین، کاغذ صافی با الیاف شیشه‌ای ۱۱ سانتی‌متری (۹۳۴AH)، کاغذ صافی چین‌دار با قطر ۲۴ سانتی‌متر، ستون ایمونوافینیتی و مولتی‌فانکشنال (مایکوسپ AflaZon #۲۲۶) از شرکت Vicam (Watertown, MA, USA) خریداری شدند. استونیتریل و متانول و سدیم کلراید با درجه خلوص مناسب برای کروماتوگرافی نیز از شرکت مرک (Darmstadt, Germany) تهیه شدند.

دستگاهوری

دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (Waters 600, Milford, MA, USA)، مجهز به پمپ (WatersTM 600E)، دستگاه گاززدا (AF)، تزریق کننده خودکار (waters 717) و یک آشکارساز فلورسانس (waters 2475) با طول موج تهییج ۳۶۵ نانومتر و نشر ۴۳۵ نانومتر در این آزمایش به کار گرفته شد. ستون کرماتوگرافی مایع (LC Purospher) C18 فاز معکوس با ابعاد ۴/۶×۲۵۰ میلی‌متر و قطر ذرات ۵ میکرومتر (Staffordshire, UK) نیز تهیه شد. مشتق‌ساز پس از ستون نیز از نوع فوتوشیمیایی مدل PHRED بود. ترکیب فاز متحرک برای نمونه‌های استخراج شده با ستون ایمینوافینیتی شامل ۱۷درصد استونیتریل، ۲۹ درصد متانول و ۵۴ درصد آب بود (Jalili *et al*., 2010) و برای نمونه‌های استخراج شده با ستون مایکوسپ شامل ۸ درصد استونیتریل، ۲۷ درصد متانول و ۶۵ درصد آب بود (Akiyama *et al*., 2001).

فاز متحرک ابتدا با استفاده از صافی میلی‌پور صاف و سپس با سرعت یک میلی‌لیتر در دقیقه از دستگاه کروماتوگرافی عبور داده شد. آفلاتوکسین‌ها با توجه به زمان بازداری شناسایی و با استفاده از رسم منحنی کالیبراسیون به دقت تعیین غلظت شدند (Zinedine *et al*., 2006). از دستگاه سانتریفیوژ (Sartorius AG, Goettingen, Germany) و مخلوط‌کن (Waring, Torrington, USA) نیز استفاده شد.

خالص‌سازی آفلاتوکسین‌ها با استفاده از ستون مایکوسپ #۲۲۶

نمونه‌ها بر اساس روش ذکر شده در دستورالعمل استفاده از ستون مایکوسپ استخراج شدند. به این منظور نمونه‌ها ابتدا به دقت آسیاب شدند. ۲۵ گرم از هر نمونه به دقت وزن شد و به یک بالن حجمی ۲۰۰ میلی‌لیتری منتقل و به آن ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال مخلوط استونیتریل (۸۴ درصد) و آب (۱۶ درصد) افزوده و به مدت ۳ دقیقه به خوبی مخلوط شد. این مخلوط سپس از کاغذ صافی واتمن (Whatman) شماره ۹۳۴-AH عبور داده شده و ۱۰ میلی‌لیتر از محلول زیر صافی از ستون مایکوسپ #۲۲۶ با سرعت ۲ میلی‌لیتر در دقیقه عبور داده شد. سپس عصاره خالص شده پس از عبور از ستون، با استفاده از جریان نیتروژن تبخیر و کاملا خشک شد. به عصاره خشک شده مقدار ۲۰۰ میکرولیتر متانول اضافه و به‌خوبی به هم زده شد تا سم خشک شده در متانول حل گردد. از این محلول ۲۰ میکرولیتر به دستگاه کروماتوگرافی تزریق شد. محلول آماده قبل از تزریق به دستگاه از کاغذ صافی ۰/۴۵ میکرون عبور داده شد.

خالص‌سازی آفلاتوکسین‌ها با استفاده از ستون ایمونوافینیتی

۲۵ گرم نمونه فلفل که کاملاً آسیاب شده با ۲/۵ گرم کلرید سدیم به یک بالن حجمی ۲۵۰ میلی‌لیتری منتقل شد و ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول متانول ۷۰ درصد به آن اضافه شده و با استفاده از مخلوط‌کن به مدت ۳ دقیقه همگن شد. سپس محلول از کاغذ صافی چین-دار عبور داده شد. ۵ میلی‌لیتر از آن به یک ارلن منتقل و ۲۰ میلی‌لیتر نیز محلول فسفات بافر سالین به آن اضافه شد. محلول به مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و سپس با استفاده از کاغذ صافی واتمن ۹۳۴AH با الیاف شیشه-ای صاف شد. پس از آن ۱۰ میلی‌لیتر از محلول صاف شده با سرعت ۱ میلی‌لیتر در دقیقه ازستون ایمونو-افینیتی عبور داده شد. سپس ۲۰ میلی‌لیتر آب مقطر یون‌زدایی شده نیز از ستون عبور داده شد. سم متصل شده به آنتی‌بادی در درون ستون توسط عبور ۱/۵ میلی‌لیتر متانول از داخل ستون شسته و درون یک

شیشه کوچک جمع‌آوری و با ۱/۵ میلی‌لیتر آب رقیق شد. از این محلول ۲۰ میکرولیتر به دستگاه کروماتوگرافی تزریق شد. محلول آماده قبل از تزریق به دستگاه از کاغذ صافی ۰/۴۵ میکرون عبور داده شد (Zinedine *et al*., 2006).

معتبرسازی روش

با استفاده از محلول‌های استاندارد یک منحنی کالیبراسیون شش نقطه‌ای در محدوده ۲۰ - ۱ نانو-گرم بر میلی‌لیتر برای هریک از سموم رسم شد و خطی‌بودن آن نیز با اندازه‌گیری مقدار R^2 تعیین شد. حداقل مقدار قابل تشخیص (LOD) و حداقل مقدار قابل اندازه‌گیری (LOQ) با استفاده از روش نسبت پیک به نویز شناسایی شدند. به این ترتیب که حداقل مقداری از سم که پیکی با ارتفاع سه برابر ارتفاع بلند-ترین نویز تولید نمود به عنوان LOD و سه برابر این مقدار به عنوان LOQ در نظر گرفته شد. با توجه به عدم دسترسی آسان به مواد مرجع گواهی‌دار (CRM)، برای اندازه‌گیری بازیابی هر دو روش، نمونه‌های فلفل عاری از سم با سموم آلوده‌سازی شده و سپس مقدار سم در آنها اندازه‌گیری شد. به این ترتیب که نمونه-های ۲۵ گرمی از فلفل سیاه، سفید و قرمز عاری از سم تهیه و با مقادیر ۱، ۵ و ۱۰ نانوگرم بر گرم از هر یک از سموم B_1، B_2، G_1 و G_2 آلوده‌سازی شدند. این نمونه‌ها سپس برای تعیین مقدار با هر دو روش خالص‌سازی به آزمایشگاه منتقل شدند. هر آزمون ۳ بار تکرار شد. مقادیر بازیابی و انحراف از معیار اندازه-گیری شدند. تکرارپذیری روش با اندازه‌گیری درصد انحراف معیار نسبی (%RSD) نشان داده شد. به این ترتیب که ۵ نمونه ۲۵ گرمی از هریک از فلفل‌ها با ۲ نانوگرم بر گرم هر یک از سموم آلوده‌سازی شده و سپس ۵ مرتبه در فواصل زمانی مشخص در طی یک ماه مقدار بازیابی آنها محاسبه شد. نتایج به‌دست آمده با مقدار استاندارد آن بر اساس استاندارد اتحادیه اروپا (EC, 2006) مقایسه شد.

نمونه‌برداری

برای اطمینان از کارآیی روش‌های خالص‌سازی در اندازه‌گیری آفلاتوکسین‌ها در نمونه‌های فلفل که به طور طبیعی آلوده هستند، ۶ نمونه (از هر نوع فلفل دو نمونه) فلفل از بازار تهیه شده و با استفاده از هر دو روش خالص‌سازی شده و سپس مقدار آفلاتوکسین‌ها در آنها اندازه‌گیری شد.

روش‌های آماری

نتایج آزمون‌ها با استفاده از آنالیز واریانس دو راهه تجزیه و تحلیل شد. اثر نوع ستون بر میزان بازیابی در هر سه نوع فلفل و اثر نوع فلفل بر میزان بازیابی بررسی شد. تجزیه و تحلیل آماری با استفاده از نرم افزار Minitab نسخه ۱۳/۲ (PA., State College, USA) انجام شد. در کلیه آزمون‌ها عدد P کمتر از ۰/۰۵ به عنوان اختلاف معنی‌دار در نظر گرفته شد.

نتایج و بحث

معتبرسازی روش

مقادیر LOD و LOQ بر حسب نانوگرم بر گرم و R^2 برای هر چهار نوع سم در جدول ۱ آورده شده است. مقادیر R^2 در منحنی‌های کالیبراسیون نشان خطی بودن منحنی‌ها می‌باشد. مقادیر LOD بین ۰/۰۲ نانو-گرم بر گرم برای سموم B_1 و B_2 تا ۰/۰۸ نانوگرم بر گرم برای سم G_1 متغیر بود. حداکثر LOQ نیز مربوط به سم G_1 بود (۰/۲۴ نانوگرم بر گرم). نتایج مشابه توسط سایر محققین نیز گزارش شده است (Cho *et al*., 2008). برای اطمینان از اختصاصی بودن روش، سه نمونه عاری از سم (نمونه شاهد) به دستگاه تزریق شد و هیچ پیکی در محدوده زمانی خروج پیک سموم مشاهده نشد به عبارتی پیک مداخله‌گر در این دو روش وجود نداشت.

جدول ۱- معتبرسازی روش اندازه‌گیری آفلاتوکسین‌های B_1، B_2، G_1 و G_2 با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا و آشکارساز فلورسانس

آفلاتوکسین	LOD (نانوگرم بر گرم)	LOQ (نانوگرم بر گرم)	R^2	%RSD (ایمونوافینیتی)	%RSD (مایکوسپ)
B1	۰/۰۲	۰/۰۶	۰/۹۹۹۸	۳/۲۸	۳/۴۹
B2	۰/۰۲	۰/۰۶	۰/۹۹۹۵	۳/۵۲	۵/۴۶
G1	۰/۰۸	۰/۲۴	۰/۹۹۹۲	۴/۲۰	۴/۰۳
G2	۰/۰۵	۰/۱۵	۰/۹۹۹۷	۶/۱۰	۶/۵۸

LOD: حداقل مقدار قابل تشخیص

LOQ: حداقل مقدار قابل اندازه گیری

RSD٪: درصد انحراف از استاندارد نسبی

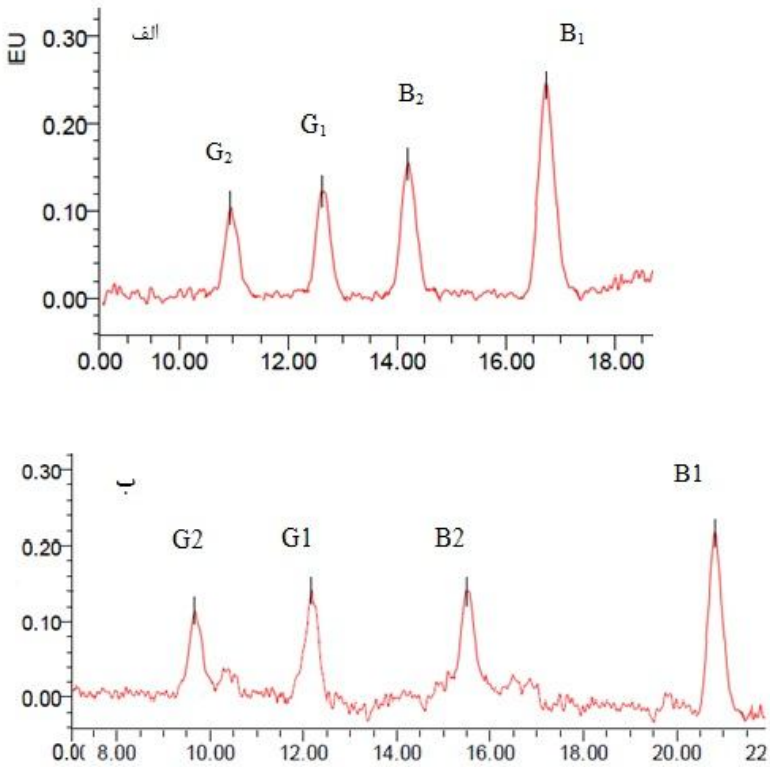
مقدار بازیابی برای نمونه‌های فلفل سیاه، سفید و قرمز که با مقادیر ۱، ۵ و ۱۰ نانوگرم بر گرم آلوده شده بودند پس از خالص‌سازی با ستون مایکوسپ و ایمونو-افینیتی در جدول ۲ نشان داده شده است. بازیابی سموم با استفاده از ستون ایمونوافینیتی در محدوده ۶/۶ ±۶۹/۸ درصد برای سم G_2 موجود در فلفل قرمز آلوده شده در سطح ۵ نانوگرم بر گرم الی ۵/۷±۱۰۱/۵ درصد برای سم B_1 موجود در فلفل سیاه که با ۱۰ نانوگرم بر گرم از این سم آلوده‌سازی شده بود، به‌دست آمد. برای ستون مایکوسپ نیز بازیابی بین مقادیر ۳/۴±۷۰/۹ درصد برای سم G_2 موجود در فلفل قرمز آلوده شده در سطح ۵ نانو-گرم بر گرم و ۸/۸±۹۷/۰ درصد برای سم B_1 موجود در فلفل سیاه که با ۱۰ نانوگرم بر گرم از این سم آلوده شده بود، به‌دست آمد. کلیه مقادیر بدست آمده برای بازیابی با حدود تعیین شده در استاندارد اتحادیه اروپا (۱۱۰-۷۰٪) به شماره 401 مطابقت داشت (EC, 2006). تکرارپذیری RSDr در روش استفاده از ستون ایمونوافینیتی بین ۳/۲۸ الی۶/۱۰ و در روش استفاده از ستون مایکوسپ بین ۳/۴۹ و ۶/۵۸ به ترتیب برای سموم B_1 و G_2 بود (جدول ۲).

در هر دو روش هر چهار نوع آفلاتوکسین هم در استانداردها و هم در نمونه‌ها به خوبی از هم جدا شدند. به‌طور کلی وقتی خالص‌سازی نمونه‌ها با استفاده از ستون ایمونوافینیتی انجام شد، تعداد پیک‌های مزاحم که توسط آشکارساز شناسایی می‌شدند کمتر بوده، کروماتوگرام تمیز و شناسایی پیک مربوط به هر یک از سموم نیز بسیار آسان‌تر بود (شکل ۱). ترتیب خروج پیک‌ها از ستون کاملاً مشابه بود اما زمان بازداری کامل پیک‌ها در نمونه‌هایی که با ستون مایکوسپ تخلیص شده بودند حدود ۴ دقیقه بیشتر از نمونه‌ها تخلیص شده با ستون ایمونوافینیتی بود که این موضوع احتمالاً ناشی از تفاوت در فاز متحرک مورد استفاده می‌باشد.

جدول ۲- مقدار بازیابی سموم بر حسب درصد از سه نوع فلفل آلوده‌سازی شده با استفاده از دو ستون ایمونوافینیتی و مایکوسپ (سه تکرار)

سطح آلوده-سازی عمدی (نانوگرم بر گرم)	آفلاتوکسین	فلفل سیاه		فلفل سفید		فلفل قرمز	
		ایمونوافینیتی (mean ± SD)	مایکوسپ (mean ± SD)	ایمونوافینیتی (mean ± SD)	مایکوسپ (mean ± SD)	ایمونوافینیتی (mean ± SD)	مایکوسپ (mean ± SD)
۱	B_1	۴/۶ ±۱۰۱/۵	۵/۸ ± ۹۷	۵/۸±۷۷/۵	۶/۴±۸۶/۸	۵/۵±۸۳/۴	۶/۴±۸۷/۱
	B_2	۲/۳ ±۹۵/۲	۴/۶±۸۲/۹	۴/۶±۸۲/۶	۴/۱±۷۶/۷	۴/۹±۷۸/۴	۶/۰±۸۷/۸
	G_1	۱/۷ ±۸۴/۳	۳/۹±۸۳/۵	۳/۹±۷۵/۲	۵/۸±۷۶/۳	۶/۲±۷۴/۵	۲/۵±۷۹/۷
	G_2	۱/۶ ±۷۹/۲	۲/۴±۷۹/۱	۴/۵±۷۲/۷	۳/۱±۷۲/۳	۵/۱±۷۸/۷	۳/۶±۷۶/۱
۵	B_1	۵/۸ ±۹۶/۴	۶/۵±۸۵/۵	۳/۰±۹۱/۶	۴/۰±۸۴/۱	۴/۱±۹۲/۶	۴/۹±۸۴/۵
	B_2	۴/۸ ±۷۶/۴	۶/۰±۷۶/۰	۵/۲±۹۱/۶	۴/۲±۷۷/۳	۲/۸±۸۰/۵	۴/۰±۸۰/۳
	G_1	۵/۹ ±۸۳/۷	۳/۰±۸۶/۲	۶/۶±۷۵/۱	۳/۶±۷۲/۵	۵/۸±۷۷/۰	۵/۳±۷۶/۹
	G_2	۴/۶ ±۷۴/۰	۳/۱±۷۲/۳	۳/۹±۷۲/۱	۳/۴±۷۰/۹	۶/۶±۶۹/۸	۳/۷±۷۸/۳
۱۰	B_1	۵/۷ ±۱۰۱/۵	۷/۰±۹۵/۳	۴/۵±۹۳/۸	۳/۹±۹۱/۸	۲/۶±۹۰/۳	۵/۷±۸۷/۵
	B_2	۵/۰ ±۷۷/۱	۴/۰±۷۴/۰	۵/۹±۹۵/۰	۵/۲±۹۳/۸	۳/۷±۸۷/۶	۳/۶±۸۴/۸
	G_1	۶/۱ ±۸۴/۶	۵/۵±۸۶/۳	۴/۷±۷۳/۵	۳/۶±۸۰/۴	۴/۴±۷۷/۹	۶/۴±۸۱/۱
	G_2	۵/۰ ±۸۲/۱	۴/۰±۷۸/۷	۵/۸±۷۳/۶	۳/۹±۷۲/۶	۳/۸±۷۷/۰	۵/۴±۸۳/۱

نتایج آماری نشان داد اثر نوع ستون معنی‌دار نبود (P <۰/۰۵). به‌عبارتی تفاوتی بین مقادیر بازیابی سموم B_1، B_2، G_1 و G_2 از فلفل سیاه، سفید و قرمز چه با استفاده از ستون مایکوسپ و چه با استفاده از ستون ایمونوافینیتی وجود نداشت. میانگین بازیابی هر چهار نوع سم در سه غلظت آلوده‌سازی شده و برای هر سه نوع فلفل با سه تکرار (۱۰۸ آزمون) با استفاده از ستون ایمونوافینیتی برابر ۸۱/۱۸ درصد و برای ستون مایکوسپ ۷۹/۶۲ درصد به‌دست آمد. همچنین بر اساس یافته‌های آماری اثر نوع نمونه نیز در مقدار بازیابی بی‌تأثیر بود، به این مفهوم که بین بازیابی سموم B_1، B_2، G_1 و G_2 از فلفل سیاه، سفید و قرمز اختلاف معنی‌داری وجود نداشت (P <۰/۰۵) و هر دو روش خالص‌سازی و اندازه-گیری برای هر سه نمونه فلفل مناسب بودند. این موضوع نشان می‌دهد که فرآیند استخراج و به دنبال آن خالص-سازی با ستون مایکوسپ و یا ستون ایمونوافینیتی اثر رنگ و یا سایر مداخله‌گرها را به خوبی حذف نموده است. بیشترین بازیابی مربوط به سموم B_1 و B_2 بود و کمترین مقدار بازیابی مربوط به سموم G_1 و G_2 بود. میانگین بازیابی در کلیه سطوح آلوده‌سازی برای سموم به ترتیب ۸۷/۶ درصد برای B_1، ۸۶/۱ درصد برای B_2، ۷۵/۵درصد برای G_1 و ۷۲/۴درصد برای G_2 محاسبه شد.



شکل ۱- کروماتوگرام فلفل قرمز آلوده شده با ۱ نانوگرم بر گرم از سموم آفلاتوکسین (الف) با استفاده از ستون ایمونوافینیتی. (ب) با استفاده از ستون مایکوسپ

مقادیر بازیابی به‌دست آمده در این تحقیق با نتایج سایر محققین مطابقت داشت. Fazekas و همکاران در سال ۲۰۰۵ مقادیر ۸۱/۲۵، ۸۵/۳، ۸۳/۱ و ۷۵ درصد را به ترتیب برای بازیابی سموم B_1، B_2، G_1 و G_2 از ادویه-جات و با استفاده از ستون ایمونوافینیتی گزارش نمودند (Fazekas *et al*., 2005). در یک تحقیق مشابه مقدار بازیابی سموم B_1، B_2، G_1 و G_2 از فلفل سیاه، سفید و قرمز آلوده شده با ۱۰ نانوگرم بر گرم هر یک از سموم بین ۸۵-۸۰ درصد گزارش شد. در این روش از ستون مایکوسپ ۲۲۸# برای خالص‌سازی استفاده شده بود (Akiyama *et al*., 2001). در پژوهش دیگری بازیابی دو سم آفلاتوکسین B_1 و B_2 از فرآورده ذرت و بادام زمینی با استفاده از ستون مایکوسپ در محدوه ۹۴/۲ الی ۱۰۷/۶ درصد گزارش شد (Hong *et al*., 2010).

نتایج آنالیز نمونه‌های حقیقی

برای اطمینان از کفایت هر دو روش در اندازه‌گیری سموم در نمونه حقیقی، ۶ نمونه فلفل (از هر نوع فلفل ۲ نمونه) از بازار تهیه شده و مقدار آفلاتوکسین‌ها در آنها با استفاده از هر دو روش اندازه‌گیری شد (جدول ۳). بررسی آماری نشان داد اختلاف معنی‌داری بین مقدار سموم اندازه‌گیری شده در نمونه‌های واقعی نیز با استفاده از دو روش وجود نداشت. کلیه نمونه‌ها به سم B_1 و B_2 آلوده بودند. حداکثر آلودگی به B_1 در یک نمونه فلفل سیاه مشاهده شد (۱۱/۷۳±۰/۵۵ نانوگرم بر گرم). در ۴ نمونه از ۶ نمونه مورد آزمون مقدار آفلاتوکسین‌ها از حد مجاز اعلام شده بر اساس استاندارد اتحادیه اروپا (EC, 2002) بالاتر بود.

جدول ۳- مقدار آفلاتوکسین‌ها در ۶ نمونه فلفل تهیه شده از بازار مصرف اندازه‌گیری شده با روش HPLC (بر حسب نانوگرم بر گرم)

نمونه	ستون مایکوسپ				ستون ایمونوافینیتی			
	B_1	B_2	G_1	G_2	B_1	B_2	G_1	G_2
فلفل سیاه ۱	۳/۲۰±۰/۲۲	۱/۲۷±۰/۰۹	۲/۶۱±۰/۱۸	< LOQ	۳/۳۵±۰/۱	۱/۶۲±۰/۴۳	۲/۴۹±۰/۲۱	< LOQ
فلفل سیاه ۲	۱۱/۷۳±۰/۵۵	۲/۶۵±۰/۱۲	< LOQ	۱/۳۱±۰/۰۸	۱۲/۲۵±۰/۷۷	۳/۲۴±۰/۲۷	< LOQ	۱/۱۸±۰/۰۶
فلفل سفید ۱	۷/۴۲±۰/۱۷	۳/۰±۰/۱	۱/۲۹±۰/۰۷	< LOQ	۷/۱۴±۰/۲۵	۳/۱۵±۰/۱۷	۱/۱۸±۰/۱۸	< LOQ
فلفل سفید ۲	۵/۸۹±۰/۵۹	۴/۵۰±۰/۱۴	< LOQ	< LOQ	۵/۵۹±۰/۴۶	۴/۵۰±۰/۰۷	< LOQ	< LOQ
فلفل قرمز ۱	۴/۵۵±۰/۰۶	۲/۶۸±۰/۱۱	۱/۴۱±۰/۱۷	۱/۳۸±۰/۰۶	۴/۵۱±۰/۱۴	۲/۵۴±۰/۲۳	۱/۳۳±۰/۱۱	۱/۶۳±۰/۱۹
فلفل قرمز ۲	۵/۳۱±۰/۰۹	۱/۴۸±۰/۲۲	۲/۳۲±۰/۱۸	۰/۸۱±۰/۰۹	۵/۵۲±۰/۱۴	۱/۴۳±۰/۲۱	۲/۳۲±۰/۲۲	۰/۹۳±۰/۱۱

نتیجه‌گیری

یافته‌های این پروژه نشان داد که اندازه‌گیری آفلاتوکسین‌ها در سه نوع فلفل سیاه، سفید و قرمز با استفاده از ستون ایمونوافینیتی و ستون مایکوسپ به آسانی مقدور بوده و هر دو روش نیز از کارآیی کافی برخوردار هستند. استفاده از ستون مایکوسپ زمان مورد نیاز برای خالص‌سازی نمونه‌ها را کاهش داده و کاربرد آن آسان‌تر است. زیرا در روش استخراج با استفاده از ستون مایکوسپ مرحله سانتریفیوژ حذف می‌شود. سرعت عبور محلول از ستون مایکوسپ دو برابر سریع‌تر از ستون ایمونوافینیتی بوده و علاوه بر آن پس از عبور محلول حاوی سم، ستون ایمونوافینیتی باید با ۲۰ میلی‌لیتر آب یون‌زدایی شده شسته شود در حالی که ستون مایکوسپ به این مرحله نیز نیازی ندارد. از سوی دیگر ستون ایمونوافینیتی کروماتوگرام تمیزتری به دست می‌دهد. دقت هر دو روش یکسان است. در استفاده از ستون ایمینوافینیتی، بیشترین درصد بازیابی مربوط به سم B_1 بود. کمترین مقدار بازیابی نیز در هر دو ستون مربوط به سم G_2 بود. دو سم B_1 و B_2 کمترین مقدار LOD را نشان دادند.

منابع

۱- سالاری، ر.، حبیبی نجفی، م.، بروشکی، م.، مرتضوی، س.ع. و فتحی نجفی، م. ۱۳۹۰. مقایسه دو روش ELISA و HPLC در تعیین آفلاتوکسین B_1 و اکراتوکسین A در فلفل قرمز ایرانی. نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی، ۲۱ (۴): ۴۸۱ تا ۴۹۱.

2- Ali, S. 2014. Detection of Aflatoxins- a Critical Review. Global Journal for Research Analysis, 3: 2277-8160.

3- Akiyama, H., Goda, Y., Tanaka, T. & Toyoda, M. 2001. Determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in spices using a multifunctional column clean-up. Journal of Chromatography A, 932: 153–157

4- Chen, C.Y., Li, W.G. & Peng, K.Y. 2005. Determination of aflatoxin M1 in milk and milk powder using high-flow solid-phase extraction and liquid chromatography tandem mass spectrometry. Agriculture Food Chemistry, 53: 8474-8480.

5- Cho, S.H., Lee, C.H., Jang, M.R., Son, Y.W., Lee, S.M., Choi, I.S., 2008. Aflatoxin contamination in spices and processed spice products commercialized in Korea. Food Chemistry, 107: 1283-1288.

6- Colak, H., Bingol, E.B., Hampikyan, H., & Nazli, B. 2006. Determination of aflatoxin contamination in red-scaled, red and black pepper by ELISA and HPLC. Journal of Food and Drug Analaysis, 14: 292−296.
7- European Commission. 2002. Commission Regulation (EC) No. 472/2002. Official Journal of the European Communities, 45:42–44.
8- European Commission. 2006. Commission Regulation (EC) No. 401/2006. Official Journal of the European Communities, L70:20−21.
9- Fazekas B, Tar A & Kovacs M. 2005. Aflatoxin and ochratoxin: a content of spices in Hungary. Food Additives and Contaminants, 22: 856−863.
10- Hong, L.S., Mohd Yusof, N.I. & Ling, H.M. 2010. Determination of Aflatoxins B1 and B2 in Peanuts and Corn Based Products. Sains Malaysiana, 39: 731–735.
11- Jalili, M., Jinap, S. & Adzahan, N. 2010. Effect of gamma radiation on reduction of mycotoxins in black pepper. Food Control, 21: 1388–1393.
12- Jalili, M., & Jinap, S. 2012. Natural occurrence of aflatoxins and ochratoxin A in commercial dried chili, Food Control, 24: 160–164, 2012.
13- Khayoon, W.S., Saad, B., Lee, T.P. & Salleh, B. 2012. High performance liquid chromatographic determination of aflatoxins in chilli, peanut and rice using silica based monolithic column. Food Chemistry, 133: 489–496.
14- Odhav, B. & Naicker, V. 2002. Mycotoxins in South African traditionally brewed beers. Food Additives and Contaminants, 19: 55–61.
15- Riordan, M.J. & Wilkinson, M.G. 2008. A survey of the incidence and level of aflatoxin contamination in a range of imported spice preparations on the Irish retail market. Food Chemistry, 107: 1429-1435.
16- Shephard, G.S. 2009. Aflatoxin analysis at the beginning of the twenty-first century. Analytical & Bioanalalytical Chemistry, 395: 1215–1224.
17- Turner, N.W., Subrahmanyam, S. & Piletsky, S.A. 2009. Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. Analytical Chimica Acta. 632: 168-180
18- Wacoo, A.P., Wendiro, D., Vuzi P.C. & Hawumba, J.F. 2014 Methods for Detection of Aflatoxins in Agricultural Food Crops. Journal of Applied Chemistry, 2014: 1-15.
19- Yilmaz, I. & Aluc, M. 2014. Determination of aflatoxin levels in Cashew on Turkish markets. Short communication, Food Table, 321-323.
20- Zheng, Z., Hanneken, J., Houchins, D., King, R. S., Lee, P. & Richard, J.L. 2005. Validation of an ELISA test kit for the detection of ochratoxin A in several food commodities by comparison with HPLC. Mycopathologia 159: 265–72.
21- Zinedine, A., Brera, C., Elakhdari, S., Catano, C., Debegnach, F., Angelini, S., De Santis, B., Faid, M., Benlemlih, M., Minardi, V. & Miraglia, M. 2006. Natural occurrence of mycotoxins in cereals and spices commercialized in Morocco. Food Control, 17: 868−874.

Evaluation of aflatoxins clean-up from pepper samples using multifunctional column and its comparison with immunoaffinity column

Maryam Jalili

Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Industries and Agricultural Research Center, Standard Research Institute (SRI), Karaj, Tehran, Iran
*Corresponding author (jalili@standard.ac.ir)

Abstract

The purpose of this study was to compare two clean-up methods i.e. immunoafinity and multifunctional (MycoSep) columns in determining aflatoxins (B_1, B_2, G_1 and G_2) in black, white and red pepper samples with high performance liquid chromatography (HPLC). Blank samples of black, white and red pepper were spiked with 1, 5 and 10 ng/g of the toxins. The spiked samples were cleaned up by applying MycoSep and immunoaffinity and recovery values were determined. Preparing six samples of pepper from the market, aflatoxins were measured by both of the clean-up methods in each of the afore mentioned samples. Data were analysed by analysis of variances. When the immuniaffinity column was applied, the recovery values ranged from 69.8±6.6 for G_2 to 101.5±5.7 for B_1. By applying mycocep column the recovery was ranging from 70.9±3.4 for G_2 to 97±8.8 for B_1. Data analysis showed that there were no significant differences between recovery values and mycotoxn content in real samples applying immunoaffinity or mycocep. Both methods were found effective.

Keywords: Aflatoxin, Immunoaffinity, Multifunctional, Pepper