

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

مریم جلیلی

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

تاریخ دریافت: 93/12/16

تاریخ پذیرش: 94/05/03

### واژه‌های کلیدی

آفلاتوکسین

ایمونوآفینیتی

فلفل

مولتی‌فانکشنال

### چکیده

هدف از انجام این مطالعه مقایسه دو روش خالص‌سازی با استفاده از ستون‌های ایمونوآفینیتی و مولتی فانکشنال (مایکوسپ)، برای اندازه‌گیری آفلاتوکسین‌های  $B_1$ ،  $B_2$ ،  $G_1$  و  $G_2$  توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) در فلفل سیاه، فلفل سفید و فلفل قرمز بود. نمونه‌های فلفل سیاه، سفید و قرمز عاری از سم تهیه و با مقادیر 1، 5 و 10 نانوگرم بر گرم از هر یک از سموم آلوده شدند. خالص‌سازی با استفاده از هر دو ستون ایمونوآفینیتی و مایکوسپ انجام و مقدار بازیابی سم به هر دو روش اندازه‌گیری شد. شش نمونه فلفل نیز از بازار تهیه و آفلاتوکسین‌ها در هر 6 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 ایمونوآفینیتی در محدوده  $6/6 \pm 69/8$  برای سم  $G_2$  و  $101/5 \pm 5/7$  برای سم  $B_1$  بود. برای ستون مایکوسپ نیز مقادیر بازیابی بین  $70/9 \pm 3/4$  برای سم  $G_2$  و  $97/0 \pm 8/8$  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 کارایی کافی برخوردارند.

### مقدمه

آفلاتوکسین‌ها متابولیت ثانویه کپک‌ها هستند که به‌ویژه 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 بر روی 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 می‌توانند 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. به‌همین دلیل هر ساله تحقیقات گسترده‌ای بر روی نحوه اندازه‌گیری این سموم در مواد غذایی انجام می‌شود. به‌طور کلی روش‌های اندازه‌گیری مایکوتوکسین‌ها به دو گروه تقسیم می‌شوند. گروه اول روش‌های ایمونولوژیکی مانند روش الیزا (ELISA) هستند که

ناخالصی از ستون خارج می‌شود. از آنجا که آنتی‌بادی-ها 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 ایمونوآفینیتی 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<sub>1</sub> و مجموع آفلاتوکسین‌ها در ادویه‌جات به ترتیب 5 و 10 نانوگرم بر گرم می‌باشد (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 ایمینوآفینیتی و ستون‌های مولتی فانکشنال برای اندازه‌گیری آفلاتوکسین‌ها (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>) در فلفل سیاه، فلفل سفید و فلفل قرمز مقایسه شدند.

### مواد و روش‌ها

#### مواد شیمیایی و معرف‌ها

محلول استاندارد اولیه سموم آفلاتوکسین (1000 نانوگرم در میلی‌لیتر از آفلاتوکسین‌های B<sub>1</sub> و G<sub>1</sub> و 300 نانوگرم در میلی‌لیتر از آفلاتوکسین‌های B<sub>2</sub> و

اساس آنها بر استفاده از آنتی‌بادی‌های خاص سموم استوار است (Riordan & Wilkinson, 2008). این روش‌ها کاربرد 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 کارایی بالا (HPLC) می‌باشند (Zheng *et al.*, 2005). سالاری و همکاران (1390) 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 فلوروسنتی 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 ایمونوآفینیتی (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، کاربرد 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 ایمونوآفینیتی کاملاً مشابه روش الیزا بوده و ستون حاوی آنتی‌بادی‌هایی است که روی یک سطح ژله‌ای تثبیت شده‌اند. در طی عمل خالص‌سازی مایکوتوکسین به آنتی‌بادی متصل شده و

### خالص‌سازی آفلاتوکسین‌ها با استفاده از ستون مایکوسپ #226

نمونه‌ها بر اساس روش ذکر شده در دستورالعمل استفاده از ستون مایکوسپ استخراج شدند. به این منظور نمونه‌ها ابتدا به دقت آسیاب شدند. 25 گرم از هر نمونه به دقت وزن شد و به یک بالن حجمی 200 میلی‌لیتری منتقل و به آن 100 میلی‌لیتر حلال مخلوط استونیتریل (84 درصد) و آب (16 درصد) افزوده و به مدت 3 دقیقه به خوبی مخلوط شد. این مخلوط سپس از کاغذ صافی واتمن (Whatman) شماره 934-AH عبور داده شده و 10 میلی‌لیتر از محلول زیر صافی از ستون مایکوسپ #226 با سرعت 2 میلی‌لیتر در دقیقه عبور داده شد. سپس عصاره خالص شده پس از عبور از ستون، با استفاده از جریان نیتروژن تبخیر و کاملاً خشک شد. به عصاره خشک شده مقدار 200 میکرولیتر متانول اضافه و به خوبی به هم زده شد تا سم خشک شده در متانول حل گردد. از این محلول 20 میکرولیتر به دستگاه کروماتوگرافی تزریق شد. محلول آماده قبل از تزریق به دستگاه از کاغذ صافی 0/45 میکرون عبور داده شد.

### خالص‌سازی آفلاتوکسین‌ها با استفاده از ستون ایمونوآفینیتی

25 گرم نمونه فلفل که کاملاً آسیاب شده با 2/5 گرم کلرید سدیم به یک بالن حجمی 250 میلی‌لیتری منتقل شد و 100 میلی‌لیتر محلول متانول 70 درصد به آن اضافه شده و با استفاده از مخلوط‌کن به مدت 3 دقیقه همگن شد. سپس محلول از کاغذ صافی چین-دار عبور داده شد. 5 میلی‌لیتر از آن به یک ارلن منتقل و 20 میلی‌لیتر نیز محلول فسفات بافر سالین به آن اضافه شد. محلول به مدت 10 دقیقه با سرعت 10000 دور در دقیقه سانتریفیوژ شده و سپس با استفاده از کاغذ صافی واتمن 934AH با الیاف شیشه-ای صاف شد. پس از آن 10 میلی‌لیتر از محلول صاف شده با سرعت 1 میلی‌لیتر در دقیقه از ستون ایمونو-افینیتی عبور داده شد. سپس 20 میلی‌لیتر آب مقطر یون‌زدایی شده نیز از ستون عبور داده شد. سم متصل شده به آنتی‌بادی در درون ستون توسط عبور 1/5 میلی‌لیتر متانول از داخل ستون شسته و درون یک

G<sub>2</sub>) در محلول 50٪ متانول از شرکت Bellefonte, Supelco آمریکا خریداری شد. برای تهیه محلول‌های کاری و محلول‌های استاندارد، حجم معینی از استاندارد اولیه با مقدار کافی متانول 50٪ رقیق شد. محلول فسفات بافر سالین، کاغذ صافی با الیاف شیشه‌ای 11 سانتی‌متری (934AH)، کاغذ صافی چین‌دار با قطر 24 سانتی‌متر، ستون ایمونوآفینیتی و مولتی‌فانکشنال (مایکوسپ #226 AflaZon) 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 کارایی بالا ( Waters 600, Milford, MA, USA). مجهز به پمپ (Waters<sup>TM</sup> 600E)، دستگاه گاززدا (AF)، تزریق کننده خودکار (waters 717) و یک آشکارساز فلورسانس (waters 2475) با طول موج تهییج 365 نانومتر و نشر 435 نانومتر در این آزمایش به کار گرفته شد. ستون کروماتوگرافی مایع (LC Purospher) C18 فاز معکوس با ابعاد 250×4/6 میلی‌متر و قطر ذرات 5 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 ایمونوآفینیتی شامل 17 درصد استونیتریل، 29 درصد متانول و 54 درصد آب بود (Jalili *et al.*, 2010) و برای نمونه‌های استخراج شده با ستون مایکوسپ شامل 8 درصد استونیتریل، 27 درصد متانول و 65 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 Sartorius AG, *et al.*, 2006). از دستگاه سانتریفیوژ (Waring, Goettingen, Germany) و مخلوط‌کن (Torrington, USA) نیز استفاده شد.

### نمونه برداری

برای اطمینان از کارایی روش‌های خالص‌سازی در اندازه‌گیری آفلاتوکسین‌ها در نمونه‌های فلفل که به طور طبیعی آلوده هستند، 6 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 13/2 (PA., State College, USA) انجام شد. در کلیه آزمون‌ها عدد  $P$  کمتر از 0/05 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 1 آورده شده است. مقادیر  $R^2$  در منحنی‌های کالیبراسیون نشان خطی بودن منحنی‌ها می‌باشد. مقادیر LOD بین 0/02 نانو-گرم بر گرم برای سموم  $B_1$  و  $B_2$  تا 0/08 نانوگرم بر گرم برای سم  $G_1$  متغیر بود. حداکثر LOQ نیز مربوط به سم  $G_1$  بود (0/24 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.

شیشه کوچک جمع‌آوری و با 1/5 میلی‌لیتر آب رقیق شد. از این محلول 20 میکرولیتر به دستگاه کروماتوگرافی تزریق شد. محلول آماده قبل از تزریق به دستگاه از کاغذ صافی 0/45 میکرون عبور داده شد (Zinedine *et al.*, 2006).

#### معتبرسازی روش

با استفاده از محلول‌های استاندارد یک منحنی کالیبراسیون شش نقطه‌ای در محدوده 20 - 1 نانو-گرم بر میلی‌لیتر برای هر یک از سموم رسم شد و خطی بودن 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 پیک با ارتفاع سه برابر ارتفاع بلندترین 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 نمونه‌های 25 گرمی از فلفل سیاه، سفید و قرمز عاری از سم تهیه و با مقادیر 1، 5 و 10 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 3 بار تکرار شد. مقادیر بازیابی و انحراف از معیار اندازه‌گیری شدند. تکرارپذیری روش با اندازه‌گیری درصد انحراف معیار نسبی (RSD%) نشان داده شد. به این ترتیب که 5 نمونه 25 گرمی از هر یک از فلفل‌ها با 2 نانوگرم بر گرم هر یک از سموم آلوده‌سازی شده و سپس 5 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.

جدول 1- معتبرسازی روش اندازه‌گیری آفلاتوکسین‌های B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> و G<sub>2</sub> با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و آشکارساز فلورسانس

%RSD (مایکوسپ)	%RSD (ایمونوفینیتی)	R <sup>2</sup>	LOQ (نانوگرم بر گرم)	LOD (نانوگرم بر گرم)	آفلاتوکسین
3/49	3/28	0/9998	0/06	0/02	B <sub>1</sub>
5/46	3/52	0/9995	0/06	0/02	B <sub>2</sub>
4/03	4/20	0/9992	0/24	0/08	G <sub>1</sub>
6/58	6/10	0/9997	0/15	0/05	G <sub>2</sub>

LOD: حداقل مقدار قابل تشخیص

LOQ: حداقل مقدار قابل اندازه‌گیری

%RSD: درصد انحراف از استاندارد نسبی

3/28 الی 6/10 و در روش استفاده از ستون مایکوسپ بین 3/49 و 6/58 به ترتیب برای سموم B<sub>1</sub> و G<sub>2</sub> بود (جدول 2).

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 ایمونوفینیتی 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 1). ترتیب خروج پیک‌ها از ستون کاملاً مشابه بود اما زمان بازداری کامل پیک‌ها در نمونه‌هایی که با ستون مایکوسپ تخلیص شده بودند حدود 4 دقیقه بیشتر از نمونه‌ها تخلیص شده با ستون ایمونوفینیتی بود که این موضوع احتمالاً ناشی از تفاوت در فاز متحرک مورد استفاده می‌باشد.

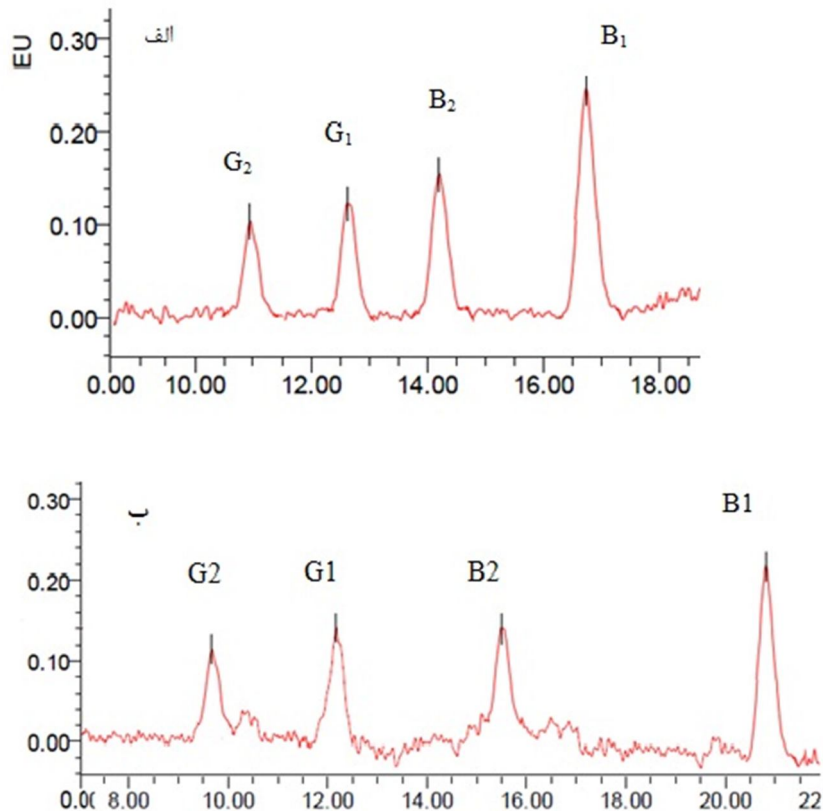
مقدار بازیابی برای نمونه‌های فلفل سیاه، سفید و قرمز که با مقادیر 1، 5 و 10 نانوگرم بر گرم آلوده شده بودند پس از خالص‌سازی با ستون مایکوسپ و ایمونو-افینیتی در جدول 2 نشان داده شده است. بازیابی سموم با استفاده از ستون ایمونوفینیتی در محدوده  $69/8 \pm 6/6$  درصد برای سم G<sub>2</sub> موجود در فلفل قرمز آلوده شده در سطح 5 نانوگرم بر گرم الی  $101/5 \pm 5/7$  درصد برای سم B<sub>1</sub> موجود در فلفل سیاه که با 10 نانوگرم بر گرم از این سم آلوده‌سازی شده بود، به‌دست آمد. برای ستون مایکوسپ نیز بازیابی بین مقادیر  $70/9 \pm 3/4$  درصد برای سم G<sub>2</sub> موجود در فلفل قرمز آلوده شده در سطح 5 نانو-گرم بر گرم و  $97/0 \pm 8/8$  درصد برای سم B<sub>1</sub> موجود در فلفل سیاه که با 10 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 (70-110%) به شماره 401 مطابقت داشت (EC, 2006). تکرارپذیری RSDr در روش استفاده از ستون ایمونوفینیتی بین

جدول 2- مقدار بازیابی سموم بر حسب درصد از سه نوع فلفل آلوده‌سازی شده با استفاده از دو ستون ایمونوآفینیتی و مایکوسپ (سه تکرار)

سطح آلوده - سازی عمدی (نانوگرم بر گرم)	آفلاتوکسین	فلفل سیاه		فلفل سفید		فلفل قرمز	
		ایمونوآفینیتی (mean ± SD)	مایکوسپ (mean ± SD)	ایمونوآفینیتی (mean ± SD)	مایکوسپ (mean ± SD)	ایمونوآفینیتی (mean ± SD)	مایکوسپ (mean ± SD)
1	B <sub>1</sub>	4/6 ± 101/5	5/8 ± 97	5/8 ± 77/5	6/4 ± 86/8	5/5 ± 83/4	6/4 ± 87/1
	B <sub>2</sub>	2/3 ± 95/2	4/6 ± 82/9	4/6 ± 82/6	4/1 ± 76/7	4/9 ± 78/4	6/0 ± 87/8
	G <sub>1</sub>	1/7 ± 84/3	3/9 ± 83/5	3/9 ± 75/2	5/8 ± 76/3	6/2 ± 74/5	2/5 ± 79/7
5	G <sub>2</sub>	1/6 ± 79/2	2/4 ± 79/1	4/5 ± 72/7	3/1 ± 72/3	5/1 ± 78/7	3/6 ± 76/1
	B <sub>1</sub>	5/8 ± 96/4	6/5 ± 85/5	3/0 ± 91/6	4/0 ± 84/1	4/1 ± 92/6	4/9 ± 84/5
	B <sub>2</sub>	4/8 ± 76/4	6/0 ± 76/0	5/2 ± 91/6	4/2 ± 77/3	2/8 ± 80/5	4/0 ± 80/3
10	G <sub>1</sub>	5/9 ± 83/7	3/0 ± 86/2	6/6 ± 75/1	3/6 ± 72/5	5/8 ± 77/0	5/3 ± 76/9
	G <sub>2</sub>	4/6 ± 74/0	3/1 ± 72/3	3/9 ± 72/1	3/4 ± 70/9	6/6 ± 69/8	3/7 ± 78/3
	B <sub>1</sub>	5/7 ± 101/5	7/0 ± 95/3	4/5 ± 93/8	3/9 ± 91/8	2/6 ± 90/3	5/7 ± 87/5
	B <sub>2</sub>	5/0 ± 77/1	4/0 ± 74/0	5/9 ± 95/0	5/2 ± 93/8	3/7 ± 87/6	3/6 ± 84/8
	G <sub>1</sub>	6/1 ± 84/6	5/5 ± 86/3	4/7 ± 73/5	3/6 ± 80/4	4/4 ± 77/9	6/4 ± 81/1
	G <sub>2</sub>	5/0 ± 82/1	4/0 ± 78/7	5/8 ± 73/6	3/9 ± 72/6	3/8 ± 77/0	5/4 ± 83/1

فلفل سیاه، سفید و قرمز اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ( $P < 0/05$ ) و هر دو روش خالص‌سازی و اندازه‌گیری برای هر سه نمونه فلفل مناسب بودند. این موضوع نشان می‌دهد که فرآیند استخراج و به دنبال آن خالص‌سازی با ستون مایکوسپ و یا ستون ایمونوآفینیتی اثر رنگ و یا سایر مداخله‌گرها را به خوبی حذف نموده است. بیشترین بازیابی مربوط به سموم B<sub>1</sub> و B<sub>2</sub> بود و کمترین مقدار بازیابی مربوط به سموم G<sub>1</sub> و G<sub>2</sub> بود. میانگین بازیابی در کلیه سطوح آلوده‌سازی برای سموم به ترتیب 87/6 درصد برای B<sub>1</sub>، 86/1 درصد برای B<sub>2</sub>، 75/5 درصد برای G<sub>1</sub> و 72/4 درصد برای G<sub>2</sub> محاسبه شد.

نتایج آماری نشان داد اثر نوع ستون معنی‌دار نبود ( $P < 0/05$ ). به عبارتی تفاوتی بین مقادیر بازیابی سموم B<sub>1</sub>، B<sub>2</sub>، G<sub>1</sub> و G<sub>2</sub> از فلفل سیاه، سفید و قرمز چه با استفاده از ستون مایکوسپ و چه با استفاده از ستون ایمونوآفینیتی وجود نداشت. میانگین بازیابی هر چهار نوع سم در سه غلظت آلوده‌سازی شده و برای هر سه نوع فلفل با سه تکرار (108 آزمون) با استفاده از ستون ایمونوآفینیتی برابر 81/18 درصد و برای ستون مایکوسپ 79/62 درصد به دست آمد. همچنین بر اساس یافته‌های آماری اثر نوع نمونه نیز در مقدار بازیابی بی‌تأثیر بود، به این مفهوم که بین بازیابی سموم B<sub>1</sub>، B<sub>2</sub>، G<sub>1</sub> و G<sub>2</sub> از



شکل 1- کروماتوگرام فلفل قرمز آلوده شده با 1 نانوگرم بر گرم از سموم آفلاتوکسین (الف) با استفاده از ستون ایمونوآفینیتی. (ب) با استفاده از ستون مایکوسپ

#### نتایج آنالیز نمونه‌های حقیقی

برای اطمینان از کیفیت هر دو روش در اندازه‌گیری سموم در نمونه حقیقی، 6 نمونه فلفل (از هر نوع فلفل 2 نمونه) از بازار تهیه شده و مقدار آفلاتوکسین‌ها در آنها با استفاده از هر دو روش اندازه‌گیری شد (جدول 3). 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 ( $11/73 \pm 0/55$  نانوگرم بر گرم). در 4 نمونه از 6 نمونه مورد آزمون مقدار آفلاتوکسین‌ها از حد مجاز اعلام شده بر اساس استاندارد اتحادیه اروپا (EC, 2002) بالاتر بود.

مقادیر بازیابی به‌دست آمده در این تحقیق با نتایج سایر محققین مطابقت داشت. Fazekas و همکاران در سال 2005 مقادیر 85/3، 81/25، 83/1 و 75 درصد را به ترتیب برای بازیابی سموم  $B_1$ ،  $B_2$ ،  $G_1$  و  $G_2$  از ادویه-جات و با استفاده از ستون ایمونوآفینیتی 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 10 نانوگرم بر گرم هر یک از سموم بین 80-85 درصد گزارش شد. در این روش از ستون مایکوسپ #228 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 محدوده 94/2 الی 107/6 درصد گزارش شد (Hong et al., 2010).

جدول 3- مقدار آفلاتوکسین‌ها در 6 نمونه فلفل تهیه شده از بازار مصرف اندازه‌گیری شده با روش HPLC (بر حسب نانوگرم بر گرم)

ستون ایمونوافینیستی				ستون مایکوسپ				نمونه
G <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>1</sub>	G <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>1</sub>	
<LOQ	2/49±0/21	1/62±0/43	3/35±0/1	<LOQ	2/61±0/18	1/27±0/09	3/20±0/22	فلفل سیاه 1
1/18±0/06	<LOQ	3/24±0/27	12/25±0/77	1/31±0/08	<LOQ	2/65±0/12	11/73±0/55	فلفل سیاه 2
<LOQ	1/18±0/18	3/15±0/17	7/14±0/25	<LOQ	1/29±0/07	3/0±0/1	7/42±0/17	فلفل سفید 1
<LOQ	<LOQ	4/50±0/07	5/59±0/46	<LOQ	<LOQ	4/50±0/14	5/89±0/59	فلفل سفید 2
1/63±0/19	1/33±0/11	2/54±0/23	4/51±0/14	1/38±0/06	1/41±0/17	2/68±0/11	4/55±0/06	فلفل قرمز 1
0/93±0/11	2/32±0/22	1/43±0/21	5/52±0/14	0/81±0/09	2/32±0/18	1/48±0/22	5/31±0/09	فلفل قرمز 2

## نتیجه‌گیری

ایمونوافینیستی بوده و علاوه بر آن پس از عبور محلول حاوی سم، ستون ایمونوافینیستی باید با 20 میلی‌لیتر آب یون‌زدایی شده شسته شود در حالی که ستون مایکوسپ به این مرحله نیز نیازی ندارد. از سوی دیگر ستون ایمونوافینیستی کروماتوگرام تمیزتری به دست می‌دهد. دقت هر دو روش یکسان است. در استفاده از ستون ایمونوافینیستی، بیشترین درصد بازیابی مربوط به سم B<sub>1</sub> بود. کمترین مقدار بازیابی نیز در هر دو ستون مربوط به سم G<sub>2</sub> بود. دو سم B<sub>1</sub> و B<sub>2</sub> کمترین مقدار LOD را نشان دادند.

یافته‌های این پروژه نشان داد که اندازه‌گیری آفلاتوکسین‌ها در سه نوع فلفل سیاه، سفید و قرمز با استفاده از ستون ایمونوافینیستی و ستون مایکوسپ به آسانی مقدور بوده و هر دو روش نیز از کارایی 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

## منابع

- 1- سالاری، ر.، حبیبی نجفی، م.، بروشکی، م.، مرتضوی، س.ع. و فتحی نجفی، م. 1390. مقایسه دو روش ELISA و HPLC در تعیین آفلاتوکسین B<sub>1</sub> و اکراتوکسین A در فلفل قرمز ایرانی. نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی، 21 (4): 481 تا 491.
- 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 B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> 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 M<sub>1</sub> 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 Analysis*, 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 & Bioanalytical 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. immunoaffinity 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 immunoaffinity column was applied, the recovery values ranged from  $69.8 \pm 6.6$  for  $G_2$  to  $101.5 \pm 5.7$  for  $B_1$ . By applying mycocep column the recovery was ranging from  $70.9 \pm 3.4$  for  $G_2$  to  $97 \pm 8.8$  for  $B_1$ . Data analysis showed that there were no significant differences between recovery values and mycotoxin content in real samples applying immunoaffinity or mycocep. Both methods were found effective.

**Keywords:** Aflatoxin, Immunoaffinity, Multifunctional, Pepper