مقایسه دو روش ELISA و HPLC در تعیین آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A در فلفل قرمز ایرانی

روزیتا سالاری[1*]، محمد باقر حبیبی نجفی[2]، محمد طاهر بروشکی[3]، سید علی مرتضوی[2] و محسن فتحی نجفی[4]

تاریخ‌دریافت: ۹۰/۹/۱۲ تاریخ‌پذیرش: ۹۰/۱۰/۱۳

۱- دانشجوی دکتری گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد
۲- استاد گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه فردوسی مشهد
۳- دانشیار مرکز تحقیقات فارماکولوژیکی گیاهان دارویی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
٤- استادیار مرکز تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی مشهد
*مسئول مکاتبه: E mail: r_salari2001@yahoo.com

چکیده

هدف از انجام این مطالعه، مقایسه دو روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) و الایزا (ELISA) در اندازه گیری آفلاتوکسین B1 (AFB1) و اکراتوکسین A (OTA) در ادویه فلفل قرمز می باشد. برای این منظور، ۳٦ نمونه فلفل قرمز از سطح مزرعه در شهرستان سبزوار (در استان خراسان رضوی) جمع آوری گردید و در برابر نور خورشید و هوای آزاد خشک شد. در میان مجموع ۳٦ نمونه، میزان حضور AFB1 و OTA در روش ELISA به ترتیب (۲۸ مورد) ۷۷/۸٪ و (۸ مورد) ۲۲/۲٪ و در محدوده ۱۵-۱/۱ میکروگرم بر کیلوگرم و ۲/۳۵-۰/۵۹ میکروگرم بر کیلوگرم بدست آمد. در مقایسه، در روش HPLC ، AFB1 و OTA به ترتیب در ۲۵ مورد (٦۹/٤٪) و٦ مورد (۱٦/۷٪) از نمونه ها در محدوده ۱٤/۵-۰/٤ میکروگرم بر کیلوگرم و ۲/۱۷-۰/۷٤ میکروگرم بر کیلوگرم، شناسایی شد. از نظر آماری ارتباط خوبی بین هر دو روش در آنالیز کمی AFB1 و OTA مشاهده شد (برای AFB1 r^2 =۰/۹۷۹ و برای OTA r^2 =۰/۹٤۷) اما همبستگی بدست آمده در اندازه گیری AFB1 دقیقتر و بالاتر از OTA بود. از طرف دیگر میزان AFB1 و OTA تعیین شده توسط ELISA بالاتر از میزان بدست آمده توسط HPLC حاصل شد. نتایج نشان داد که روش ELISA می تواند به عنوان یک روش غربالگری برای تعیین حضور AFB1 و OTA در پودر فلفل قرمز استفاده شود اما نتایج بدست آمده توسط این روش باید توسط روش HPLC تایید گردد.

واژه های کلیدی: ELISA ، HPLC ، آفلاتوکسین B1 ، اکراتوکسین A ، فلفل قرمز

A comparison between ELISA and HPLC for aflatoxin B1 and ochratoxin A detection in Iranian red pepper

R Salari[1*], M B Habibi Najafi[2], M T Boroushaki[3], S A Mortazavi[2] and M Fathi Najafi [4]

Received: December 03, 2011 Accepted: January 03, 2012

[1]PhD Student, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
[2]Professor, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Iran
[3]Associate Professor, Pharmacological Research Center of Medicinal Plants, Mashhad University of Medical Science, Iran
[4]Assistant Professor, Razi Vaccines and Serum Research Institute, Mashhad, Iran
[*]Corresponding author: E-mail: r_salari2001@yahoo.com

Abstract

The aim of this study was to compare high performance liquid chromatography (HPLC) and enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) methods for aflatoxin B1 (AFB1) and ochratoxin A (OTA) determination in red pepper spice. For this purpose, thirty six samples of red pepper were collected from farm in Sabzevar (a city in Razavi Khorasan province) and dried in the sun and open air. Among a total of 36 samples, the incidence of AFB1 and OTA was (28) 77.8% and (8) 22.2% within the range of 1.1-15.0 μg/kg and 0.59-2.35 μg/kg, respectively, as it was determined by ELISA. In comparison, HPLC detected AFB1 and OTA in 25 (69.4%) and 6 (16.7%) of samples within the range of 0.4-14.5 μg/kg and 0.74-2.17 μg/kg, respectively. Statistically, comparison of the quantitative analysis of AFB1 and OTA by ELISA and HPLC revealed a good correlation (for AFB1 r^2 = 0.979, for OTA r^2 = 0.947) between both methods but correlation obtained for AFB1 was more accurate and higher than OTA. On the other hand, the levels of AFB1 and OTA determined by ELISA were higher than those determined by HPLC. According to the obtained results, ELISA can be used as a reliable screening method, but the confirmation of positive results must be done by HPLC method.

Keywords: ELISA, HPLC, Aflatoxin B1, Ochratoxin A, Red pepper

مقدمه

اکثرادویه ها در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری تولید می شوند. آب و هوای گرم و مرطوب، زمان طولانی خشک کردن و دستورالعمل های اغلب ناکافی برای کشاورزان، ممکن است باعث مشکلات کیفی قابل توجهی در آنها گردد (جرارد ۱۹۹٤). گزارش شده است ۱۰-۵ درصد محصولات کشاورزی در جهان توسط قارچها آلوده می شوند تا حدی که قابل مصرف توسط انسان و حیوان نیستند. رشد قارچها در محصولات کشاورزی ممکن است خطر مهمی برای سلامتی انسان از طریق تشکیل متابولیت های سمی به نام مایکوتوکسین باشد (توپال ۱۹۹۳).

مطالعات متعددی نشان داده اند که ادویه ها با میکروارگانیسم های مختلف از جمله قارچهای مولد سم (به خصوص گونه های آسپرژیلوس) که دارای پتانسیل تولید مایکوتوکسین هستند، آلوده می شوند (گاریدو و همکاران ۱۹۹۲). بنابراین، مسائلی در زمینه مصرف ادویه ها از نظر سلامتی مطرح است زیرا اغلب بدون فرآوری به غذاها اضافه شده و یا خام خورده می شوند (پافومی ۱۹۸٦ و لولین و همکاران ۱۹۹۲).

آلودگی به مایکوتوکسین ها یکی از شایع ترین مشکلات مربوط به ایمنی مواد غذایی می باشد که

انواع گوناگونی از اثرات سمی را در انسان و حیوانات ایجاد می کند. یکی از ویژگی های نگران کننده مایکوتوکسینها، وقوع مکرر آنها در جیره غذایی از طریق ترکیبات مختلف می باشد که مصرف آن ممکن است درجه شدیدتری از آسیب را به سلامت انسان وارد کند (پریکا و همکاران ۱۹۹۹). در میان مایکوتوکسینهای مختلف، آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A ،از انواع کاملا رایج هستند که به طور مشترک می توانند در طیف گسترده ای از مواد غذایی از جمله ادویه ها رخ دهند. آسپرژیلوس ها و پنی سیلیوم ها مهمترین جنس های مولد این سموم هستند. آفلاتوکسین B1به عنوان عامل سرطان زا قوی در تعداد زیادی از گونه های جانوری از جمله انسان شناخته شده است. اکراتوکسین A نیز یک عامل نفروتوکسیک است و در وقوع بیماری کلیوی کشنده در انسان دخیل است (ایتون و همکاران ۱۹۹٤ و مرکز ین المللی تحقیقات سرطانی IARC ۱۹۹۳).

کمیته علمی اتحادیه اروپا حدود قانونی AFB1 را در ادویه ها 5 میکروگرم درکیلوگرم اعلام نموده است. هرچند که حدود قانونی دقیقی برای اکراتوکسین A وجود ندارد ولی اتحادیه اروپا میزان اکراتوکسین A را در ادویه ها ۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم پیشنهاد کرده است (٤٦٦/۲۰۰۱ (EC) No.).

روش هایی که به طور معمول در تعیین مایکوتوکسین ها مورد استفاده قرار می گیرند بر پایه کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC) و آزمون الایزا (ELISA) استوار هستند (ژنگ و همکاران ۲۰۰۵). روش TLC دارای ضرایب تغییرات نسبتا بالا می باشد و تنها درجایی که سطوح آلودگی مایکوتوکسین بالاتر از حدود کنترل فعلی باشد، کاربرد دارد. سایر روشهای کروماتوگرافی مانند HPLC تکنیک های بسیار گران قیمت و وقت گیر هستند. از طرف دیگر در روشهای TLC و HPLC نیاز به یک مرحله استخراج با فاز جامد یا ستون ایمونوافینیتی می باشد. بنابراین ، در مطالعات و آزمونهای معمول، روشهای ایمونولوژیک کنونی به روشهای کروماتوگرافی ترجیح داده می شود (سیدنهام و شفارد ۱۹۹٦). در حال حاضر علاقه به استفاده از کیت های تست ELISA بدلیل نیاز به حجم کم نمونه و روش ساده تر تخلیص نمونه نسبت به روش های مرسوم مانند TLC و HPLC بیشتر می باشد. این روشها سریع ، ساده ، خاص، حساس و قابل استفاده در بسیاری از موارد بوده و از متداول ترین روش های سریع برای تشخیص مایکوتوکسینها در غذاها و خوراک شناخته شده اند (تراکسس ۲۰۰۱). با این حال، از آنجا که آنتی بادی های تولید شده اغلب با ترکیبات مشابه مایکوتوکسینها واکنش متقاطع نشان می دهند و ممکن است گاهی اوقات در مقایسه با روش کروماتوگرافی، مقادیر بالاتری را نشان دهند در نتیجه، مطالعه گسترده ای در مورد صحت و دقت روش ELISA درطیف وسیعی از کالاها قبل از اینکه این روش به طور تجاری مورد استفاده قرار گیرد، ضروری است (بلی و همکاران ۲۰۰۲).

فلفل قرمز (*Capsicum annuum L.*) یکی از ادویه های مهم ایران است. منطقه سبزوار در استان خراسان رضوی، بزرگترین منطقه تولید فلفل قرمز در ایران است. پودر فلفل قرمز معمولا به عنوان طعم دهنده، ادویه و ایجاد رنگ و طعم درغذاها استفاده می شود. اگر چه برخی مطالعات در زمینه میزان مایکوتوکسین ها در انواع مختلف مواد غذایی که در ایران مصرف می شوند، در دسترس می باشد ولیکن مطالعات دقیقی برروی میزان حضور مایکوتوکسینها در ادویه ها انجام نشده است. بنابراین، این مطالعه به منظور تعیین میزان آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A در پودر فلفل قرمز که مصرف بالایی را در آشپزخانه ایران به خود اختصاص می دهد و همچنین مقایسه نتایج به دست آمده با حداکثر حدود قانونی آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A مورد تائید اتحادیه اروپا و

استانداردهای داخلی ایران در جهت نشان دادن اهمیت این آلودگی در ارتباط با بهداشت عمومی صورت گرفت. از طرف دیگر، در این مطالعه از روش ELISA برای تعیین میزان این سموم در ادویه ها استفاده شد که برای اولین بار انجام پذیرفت.

مواد و روش‌ها

نمونه ها

فلفل قرمز تند به عنوان ادویه بومی استان خراسان و از شهرستان عمده تولید کننده آن (سبزوار) انتخاب شد. برداشت این نوع فلفل قرمز از اواخر تابستان آغاز شده و تا اوایل پاییز ادامه می یابد (عمدتاً در طی شش چین) و سپس در آفتاب و هوای آزاد خشک می گردد. نمونه برداری در فصل برداشت این گیاه از تمامی چین ها صورت گرفت بدین صورت که تعداد شش نمونه از بین نمونه های خشک شده از هر چین (مخلوط شده از مزارع مختلف) به طور تصادفی جمع آوری گردید (مجموعاً سی و شش نمونه). متوسط اندازه نمونه های جمع آوری شده در این بازه زمانی بین ۲۵۰ گرم و ۱ کیلوگرم بود.

معرف ها و تجهیزات

تمامی مواد شیمیایی به استثناء متانول و استونیتریل (درجهHPLC) دارای درجه آزمایشگاهی بودند و از شرکت مرک آلمان خریداری شدند. همه محلول ها با آب دیونیزه تهیه شدند. استانداردهای AFB1 و OTA از شرکت شیمیایی سیگما خریداری شد که در تهیه منحنی های کالیبراسیون مورد استفاده قرار گرفت.

ستون ایمونوافینیتی برای آفلاتوکسین (Aflatest P) و اکراتوکسین (Ochratest TM) از شرکت Vicam تهیه شد. کیت آنزیمی ELISA برای آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A از شرکت Europroxima هلند خریداری گردید.

آنالیز آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A توسط ELISA

کیتهای آفلاتوکسین B1 (AFB1 ۵۱۲۱) و اکراتوکسین A (OTA ۵۱۲۱) شرکت Europroxima از نوع آنزیم ایمونواسی رقابتی برای تعیین مقادیر این سموم در مواد غذایی می باشند. روش های استخراج و آزمون مایکوتوکسینها در نمونه بر طبق دستورالعمل شرکت سازنده انجام شد.

آماده سازی نمونه

استخراج آفلاتوکسین B1

۳ گرم از نمونه هموژن شده پودر فلفل قرمز و ۹ میلی لیتر متانول ۸۰ ٪ با استفاده از مخلوط کن به مدت ۵ دقیقه مخلوط شدند. عصاره توسط کاغذ واتمن شماره ۱ فیلتر شد و سپس ۵۰ میکرولیتر از محلول صاف شده با ۱۵۰ میکرولیتر محلول بافر رقیق گردید. پنجاه میکرولیتر از عصاره رقیق شده برای هر چاهک در آزمون مورد استفاده قرار گرفت.

استخراج اکراتوکسین A

۵ گرم از نمونه هموژن شده پودر فلفل قرمز به یک لوله تمیز منتقل شد. ۱۰ میکرولیتراسید فسفریک ۰/۵ مولار به آن اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه مخلوط گردید. سپس ۲۰ میکرولیتر دی کلرومتان نیز افزوده شده و مخلوط گردید. پس از آن لایه بالایی خارج گردید و مجدداً به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد و با استفاده از کاغذ صافی صاف گردید. ۱۲ میکرولیتر از محلول صاف شده به یک لوله شیشه ای منتقل شده و در ۵۰ درجه سانتی گراد تبخیر و خشک گردید. محلول باقیمانده در ۱/۵ میکرولیتر بافر استخراج حل شد. ۲ میکرولیتر هگزان به آن اضافه کرده و به مدت ۵ دقیقه (۲۰۰۰ دور در دقیقه) سانتریفوژ شد. لایه هگزان فوقانی حذف شد و ۵۰ میکرولیتر از لایه زیرین با ۲۰۰ میکرولیتر محلول بافر رقیق شد. در نهایت پنجاه میکرولیتر از این عصاره برای هر چاهک در آزمون مورد استفاده قرار گرفت.

آزمون ELISA

دستور کار آزمون AFB1

۵۰ میکرولیتر از محلولهای استاندارد AFB1 (۰/۰۳۱۳، ۰/۰۶۲۵، ۰/۱۲۵ ، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ ng/ml) و ۵۰ میکرولیتر از نمونه های آماده شده برای آزمون، هر یک در دو تکرار به طور جداگانه در چاهک های پلیت میکروتیتر ریخته شد. پس از آن، ۲۵ میکرولیتر آنزیم کونژوگه (آفلاتوکسین – HRP) و ۲۵ میکرولیتر محلول آنتی بادی ضد آفلاتوکسین به هر چاهک افزوده شد و به مدت ۶۰ دقیقه در دمای اتاق در تاریکی گرمخانه گذاری گردید. سپس چاهک ها با بافر شستشو سه بار شستشو داده شدند. ۱۰۰ میکرولیتر از محلول سوبسترا به هر چاهک اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق گرمخانه گذاری شد. پس از آن ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده به هر چاهک اضافه شد و جذب در ۴۵۰ نانومتر در دستگاه خواننده ELISA اندازه گیری شد.

دستور کار آزمون OTA

۵۰ میکرولیتر از محلولهای استاندارد OTA (۰/۲۵، ۰/۵، ۱ ، ۲، ۵ و ۱۰ ng/ml) و از نمونه های آماده شده برای آزمون، هر یک در دو تکرار به چاهک ها اضافه شد. ۲۵ میکرولیتر آنزیم کونژوگه (اکراتوکسینA – HRP) و ۲۵ میکرولیتر محلول آنتی بادی به هر چاهک اضافه گردید. این مخلوط به آرامی برای چند ثانیه مخلوط شد و به مدت ۶۰ دقیقه در ۳۷ درجه سانتیگراد در تاریکی گرمخانه گذاری شد. محلولها از چاهک ها خارج گردید و چاهک ها با بافر شستشو ۳ بار شستشو داده شدند. پس از آن ۱۰۰ میکرولیتر سوبسترا به هر چاهک اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق گرمخانه گذاری گردید. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از محلول متوقف کننده به هر چاهک اضافه شد و جذب در ۴۵۰ نانومتر اندازه گیری شد.

آنالیز آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A توسط HPLC

آنالیز آفلاتوکسین در ادویه ها با توجه به روش شرح داده شده توسط استروکا و همکاران (۲۰۰۰) و زینالدین و همکاران (۲۰۰۶) و آنالیز اکراتوکسین A با توجه به روش بکار برده شده توسط عبدالکادر و همکاران (۲۰۰۴) صورت گرفت. محلولهای استاندارد ذخیره آفلا توکسین در تولوئن – استونیتریل (۹۸ :۲ , v / v) و محلولهای استاندارد ذخیره OTA با تولوئن– اسید استیک (۹۹ :۱ , v / v) آماده شد. این محلولهای استاندارد با استفاده از محلول فاز متحرک به منظور تهیه استانداردهای کاری رقیق گردید (استروکا و همکاران ۲۰۰۰).

آماده سازی نمونه

استخراج و تخلیص آفلاتوکسین B1

۵۰ گرم از نمونه آسیاب شده و ۵ گرم کلرید سدیم را به 300 میلی لیتر محلول متانول : آب (۸۰ :۲۰ , v / v) اضافه نموده ، محلول حاصل پس از اختلاط در یک مخلوط کن با سرعت بالا به مدت ۳ دقیقه از طریق یک کاغذ صافی واتمن شماره ۴ صاف گردید. سپس ۱۰ میلی لیتر از عصاره با ۶۰ میلی لیتر PBS رقیق گردید و ۶۶ میلی لیتر از محلول صاف شده رقیق شده برای ستون ایمونوافینیتی (Vicam Aflatest P) که قبلا با ۱۰ میلی لیتر PBS آماده شده است، بکار برده شد (سرعت جریان حدود ۳ میلی لیتر در دقیقه). ستون با ۱۵ میلی لیتر آب شستشو داده شد و سپس خشک گردید. آفلا توکسین با استفاده از ۱/۲۵ میلی لیتر متانول از ستون شسته شد و سپس با ۱/۷۵ میلی لیتر آب رقیق شد و در نهایت ۱۰۰ میکرولیتر از محلول به دستگاه HPLC تزریق گردید.

استخراج و تخلیص اکراتوکسین A

۲۵ گرم از نمونه آسیاب شده و ۲/۵ گرم کلرید سدیم به صد میلی لیتر محلول متانول: آب (۸۰ :۲۰ ، V / V) اضافه گردید. این ترکیب به مدت ۳ دقیقه در مخلوط کن مخلوط شد، پس از آن از طریق یک کاغذ صافی واتمن صاف گردید و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتیگراد با سرعت ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. ۱۰ میلی لیتر از محلول صاف

شده با ٤٠ میلی لیتر از PBS رقیق گردید و بار دیگر پس از آن از طریق یک کاغذ صافی واتمن صاف شد. مقدار ١٠ میلی لیتر از این محلول صاف شده از میان ستون ایمونوافینیتی Ochratest TM حاوی آنتی بادی های مونوکلونال تثبیت شده علیه OTA عبور داده شد. پس از شستن ستون با ١٠ میلی لیتر PBS و ١٠ میلی لیتر آب، OTAبا ١/٥ میلی لیتر متانول شسته شد. محلول شسته شده تحت جریان نیتروژن خشک تا خشک شدن تبخیر شده و سپس در ٥٠٠ میکرولیتر محلول متانول / آب (٥٠ :٥٠ , v / v) حل شد. در نهایت ٥٠ میکرولیتر از محلول به دستگاه HPLC تزریق گردید.

آزمون HPLC

آنالیز آفلاتوکسین B1

تعیین آفلاتوکسین توسط کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا با ستون سیلیکا ژل C18 فاز معکوس (٢٥٠×٤/٦ میلی متر، اندازه ذرات ٥ میکرومتر) مجهز به سیستم تشخیص با فلورسانس انجام شد. طول موج های تحریک و انتشار ٣٦٠ و ٤٤٠ نانومتر قرار داده شد. از فاز متحرک آب- استونیتریل – متانول (١٥:٢٥:٦٠ , v / v / v) با سرعت جریان ١/٠ میلی لیتر در دقیقه و حجم تزریق ١٠٠ میکرولیتر، استفاده گردید.

آنالیز اکراتوکسین A

اندازه گیری OTA توسط HPLC و مشابه با روشی که برای آفلاتوکسین شرح داده شد انجام گردید با این تفاوت که طول موج های تحریک و انتشار به ترتیب در ٣٣٣ و ٤٦٠ نانومتر قرار داده شد و فاز متحرک استونیتریل- آب- استیک اسید (٥١ :٤٧ :٢ , v / v / v) با سرعت جریان ١/٠ میلی لیتر در دقیقه و حجم تزریق ١٠٠ میکرولیتر مورد استفاده قرار گرفت.

تایید شناسایی هر یک از سموم در تمام نمونه های مورد آزمون از طریق تزریق پی در پی عصاره نمونه و مقایسه نسبت سطح پیک آنها با استاندارد مربوطه انجام شد. اندازه گیری هر سم، از طریق اندازه گیری سطح زیر پیک آن در زمان بازداری و مقایسه آنها با منحنی کالیبراسیون استاندارد مربوط به آنها انجام گردید.

تجزیه و تحلیل آماری

آمار توصیفی (میانگین، انحراف استاندارد، دامنه ، حداکثر و متوسط) با استفاده از نرم افزارMinitab (نسخه ١٣/٢ ، PA) حاصل شد و غلظت شناسایی شده AFB1 و OTA در نمونه ها توسط دو روش HPLC و ELISA، با استفاده از آزمون همبستگی برای به دست آوردن معادله ی رگرسیون خطی و ضریب همبستگی مورد مقایسه قرار گرفتند.

نتایج و بحث

نتایج حاصل از پژوهش حاضر در توافق با یافته های سایر محققان مبنی بر حضور مایکوتوکسین ها در ادویه ها می باشد هر چند که درصد بروز وسطوح AFB1 و OTA یافت شده در این مطالعه در مقایسه با سطوح عنوان شده برای فلفل در سایر منابع، نسبتا پایین بود که می تواند به علت تفاوت در شرایط دمایی و رطوبتی دوره ذخیره سازی آنها باشد. در ایران ، هیچ گونه مطالعاتی بر روی سطوح آفلاتوکسین و اکراتوکسین در ادویه ها انجام نشده است.

محققان مختلفی سطوح بالایی از آفلاتوکسین B1 را در ادویه ها گزارش نموده اند. در ترکیه ، آیدین و همکاران (٢٠٠٧). .سطوح بالایی از آلودگی AFB1 در پودر فلفل قرمز را تا سطح آلودگی ٤٠/٩ میکروگرم بر کیلوگرم عنوان کرده اند. مارتینز و همکاران (٢٠٠١) در پرتغال آلودگی پودر کاری را با AFB1 در طیف وسیع بین ٥-١ میکروگرم بر کیلوگرم اعلام نموده اند. در مراکش ، زینالدین و همکاران (٢٠٠٦) حضور AFB1 را در زنجبیل در سطح آلودگی متوسط ٠/٦٣ میکروگرم بر کیلوگرم بیان کردند . همچنین در بسیاری از تحقیقات میزان آلودگی بالای انواع مختلف غذاها به OTA عنوان

شده و برخی از مطالعات نیز نشان دهنده وجود آلودگی OTAدر ادویه ها مانند فلفل قرمز ، فلفل سیاه و فلفل سفید بوده است (الکادی و همکاران ۱۹۹۵، پتل و همکاران ۱۹۹٦، تیرومالا و همکاران ۲۰۰۱ و فازکاس و همکاران ۲۰۰۵).

آزمون ELISA

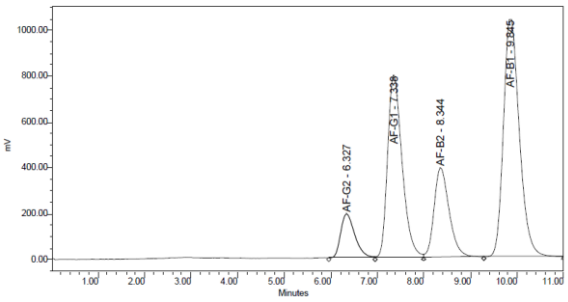
غلظت AFB1 وOTA از طریق مقایسه با استانداردهای ارائه شده توسط تولید کننده و با استفاده از نرم افزار مربوطه محاسبه گردید. منحنی کالیبراسیون استاندارد های AFB1 (۰/۰۳۱۳، ۰/۰٦۲۵، ۰/۱۲۵ ، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ng/ml) که توسط شرکت تولید کننده عرضه شده بود و استانداردهای OTA (۰/۲۵، ۰/۵، ۱، ۲، ۵ و ۱۰ ng/ml) که از طریق رقیق سازی محلولهای استاندارد ذخیره با بافر رقیق کننده آماده شده بود ، رسم گردید که یک رگرسیون غیر خطی حاصل شد. حد شناسایی برای AFB1، ۰/۳ و برای OTA، ۰/۵ میکروگرم بر کیلوگرم بود.

آزمون HPLC

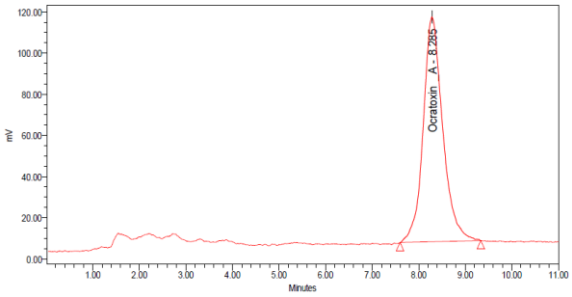
مجموعه ای از محلول های استاندارد کاری برای (AFB1 ۰/٤، ۱/۲، ۲ ، ۲/۸، ۳/٦، ٥/٦ و ۷/۲ ng/ml) و برای OTA (۰/۵، ۱، ۲ ، ۵، ۱۰ و ۱۵ ng/ml) ازطریق رقیق سازی محلولهای ذخیره استاندارد AFB1 و OTA بدست آمد و منحنی کالیبراسیون با استفاده از این استانداردها رسم گردید. منحنی کالیبراسیون به دست آمده توسط رگرسیون حداقل مربعات برای AFB1 و OTA ، خطی حاصل شد و ضریب همبستگی آن برای هر دو ۰/۹۹۸ بدست آمد. منحنی کالیبراسیون با رسم سطح پیک هر استاندارد در برابر میزان مایکوتوکسینهای تزریق شده، به دست می آید. شیب و عرض از مبدا داده های منحنی کالیبراسیون به منظور محاسبه مقدار ترکیب مورد آزمون در عصاره نمونه، مورد استفاده قرار گرفت. حد تشخیص برای AFB1 و OTA به ترتیب ۰/۱ و ۰/۱۵ بود. زمان بازداری برای AFB1 ، ۹/۸٤ و برای OTA ۸/۲۸ دقیقه بدست آمد. نمونه ای ازکروماتوگرام های حاصله از HPLC برای استاندارد های آفلا توکسین و اکراتوکسین A در شکل ۱ و ۲ نشان داده شده است.

مقایسه دو روش ELISA و HPLC

روشهای ELISA و کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC) برای تعیین میزان AFB1 و OTAدر پودر فلفل قرمز مورد مقایسه قرار گرفتند. در این مطالعه، آزمون تعیین AFB1 وOTA بر روی فلفل قرمز خشک طبیعی قبل از هر گونه فرآوری صورت پذیرفت.



شکل ۱- کروماتوگرام HPLC استانداردهای آفلاتوکسین



شکل ۲- کروماتوگرام HPLC استاندارد OTA

مقادیر AFB1 و OTA به دست آمده توسط دو روش HPLC و ELISA در پودر فلفل قرمز در جدول ۱ نشان داده شده است. نتایج نشان می دهد که حضورAFB1 در پودر فلفل قرمز یک خطر بالقوه محسوب می گردد. در طی آزمون ELISA، در میان مجموع ۳٦ نمونه، میزان بروز AFB1 و OTA به ترتیب (۲۸ مورد) ۷۷/۸٪ و (۸ مورد)

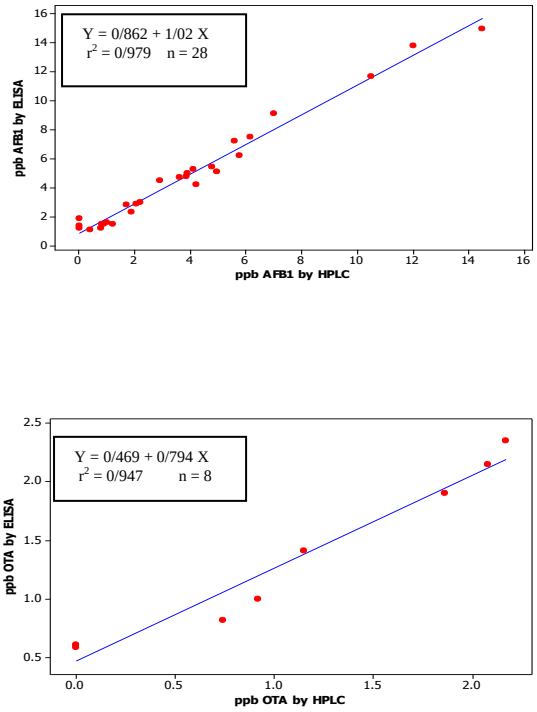
۲۲/۲٪ و در محدوده ۱۵-۱/۱ میکروگرم بر کیلوگرم و ۲/۳۵-۰/۵۹ میکروگرم بر کیلوگرم بدست آمد.

بر طبق حدود قابل قبول اتحادیه اروپا برای این سموم ، ۱۱ مورد (۳۰/۵٪) از نمونه ها دارای مقادیر AFB1 بیش از سطح ۵ µg/kg بود و سطح OTA در هیچ یک از نمونه ها بیش از ۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم مشاهده نشد. در مقایسه، در روش HPLC ، AFB1 و OTA به ترتیب در ۲۵ مورد (۶۹/۴٪) و ۶ مورد (۱۶/۷٪) از نمونه ها در محدوده ۱۴/۵-۰/۴ میکروگرم بر کیلوگرم و ۲/۱۷-۰/۷۴ میکروگرم بر کیلوگرم، شناسایی شدند. در این روش، ۱۹/۵ درصد از نمونه ها (۷ مورد) دارای مقادیر AFB1 بالاتر از محدودیت های قانونی اتحادیه اروپا بوده و در هیچ یک از نمونه های مورد آزمون، غلظت OTA بالاتر از ۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم وجود نداشت .این نتایج از یک طرف نشان می دهد که آلودگی AFB1 در این نوع ادویه به شدت مهم است و از طرف دیگر، میزان AFB1 و OTA تعیین شده توسط ELISA بالاتر از میزان بدست آمده توسط HPLC می باشد (جدول ۲و۳) .

جدول ۱- مقادیر غلظت آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A در نمونه های مثبت حاصل از HPLC و ELISA

ELISA		HPLC		
AFB1 (µg/kg)	OTA (µg/kg)	AFB1 (µg/kg)	OTA (µg/kg)	ردیف
٤/٢٢	ND	٤/٢١	ND	١
٦/٢٠	ND	٥/٧٧	ND	٢
٩/١٠	ND	٧/٠٠	ND	٣
٢/٩٠	ND	٢/٠٦	ND	۴
١/٢٠	١/٠٠	٠/٨٠	٠/٩٢	۵
١/٥٠	٢/١٥	١/٢٠	٢/٠٨	۶
١١/٧٠	ND	١٠/٥٠	ND	٧
١٥/٠٠	ND	١٤/٥٠	ND	٨
١٣/٨٠	ND	١٢/٠٠	ND	٩
١/٥٠	١/٤١	٠/٩١	١/١٥	١٠
٥/٤٦	ND	٤/٧٨	ND	١١
٧/٢٠	ND	٥/٦٠	ND	١٢
٧/٥٠	ND	٦/١٧	ND	١٣
٤/٨٠	ND	٣/٨٦	ND	١۴
٥/١٠	ND	٤/٩٥	ND	١۵
٥/٣٠	ND	٤/١٠	ND	١۶
٣/٠٠	ND	٢/٢١	ND	١٧
٤/٧٠	ND	٣/٦٠	ND	١٨
٢/٨٠	ND	١/٧٠	ND	١٩
١/٥٠	٢/٣٥	٠/٨٤	٢/١٧	٢٠
٤/٥٠	ND	٢/٩٠	ND	٢١
٥/٠٠	ND	٣/٩٠	ND	٢٢
١/١٠	٠/٨٢	٠/٤٠	٠/٧۴	٢٣
١/٦٠	١/٩٠	١/٠٠	١/٨۶	٢۴
٢/٣٠	ND	١/٩٠	ND	٢۵
١/٢٠	ND	ND	ND	٢۶
١/٩٠	٠/٥٩	ND	ND	٢٧
١/٤٠	٠/۶١	ND	ND	٢٨

ارتباط بین دو روش HPLC و ELISA در اندازه گیری سطوح AFB1 و OTA در شکل ۳ مورد بررسی قرار گرفت. از نظر آماری ارتباط خوبی بین هر دو روش در آنالیز کمی AFB1 و OTA مشاهده شد (برای AFB1 r^2 =۰/۹۷۹ و برای OTA r^2 =۰/۹٤۷) اما همبستگی بدست آمده در اندازه گیری AFB1 دقیق تر و بالاتر از OTA بود.



شکل ۳- همبستگی روشهای HPLC و ELISA در آنالیز آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A

از ۳۶ نمونه مورد آزمون، نتایج مثبت کاذب در روش ELISA در ۳ نمونه برای AFB1 و در ۲ نمونه برای OTA به دست آمد. نشان داده شده است که فلفل حاوی موادی است که به آفلا توکسین متصل می شوند (شانتا ۱۹۹۹) و همچنین در برآورد غیرمستقیم OTA توسط ELISA نیز دخالت دارند (تیرومالا و همکاران ۲۰۰۰).

ELISA بر پایه واکنش آنتی ژن با آنتی بادی استوار است اما آنتی بادی ها اغلب با ترکیبات مشابه با مایکوتوکسینها واکنش متقاطع نشان می دهند (ژنگ و همکاران ۲۰۰۵).

جدول ۲- محدوده آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A حاصل از HPLC و ELISA در ۳۶ نمونه مورد آزمون

مایکوتوکسین	روش آزمون	نمونه های مثبت (%)	محدوده (µg/kg)	میانگین±SD[a] (µg/kg)	میانه (µg/kg)
AFB1	HPLC	۲۵(%۶۹/۴)	۰/۴-۱۴/۵	۴/۲۷± ۳/۶۱	۳/۸۶
OTA	HPLC	۶ (%۱۶/۷)	۰/۷۴-۲/۱۷	۱/۴۸ ± ۰/۶۲	۱/۵۰
AFB1	ELISA	۲۸(%۷۷/۸)	۱/۱-۱۵/۰	۴/۷۷± ۳/۷۹	۴/۳۶
OTA	ELISA	۸(%۲۲/۲)	۰/۵۹-۲/۳۵	۱/۳۵±۰/۷۰	۱/۲۰

[a] SD: انحراف معیار

جدول ۳- توزیع آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A حاصل از HPLC و ELISA در ۳۶ نمونه مورد آزمون

مایکوتوکسین	روش آزمون	نمونه های مثبت (%)	توزیع فراوانی نمونه ها(µg/kg)				
			ND	LOD-۵	۵-۱۰	۱۰-۱۵	≥۱۵
AFB1	HPLC	۲۵(%۶۹/۴)	۱۱	۱۸	۴	۳	-
OTA	HPLC	۶(%۱۶/۷)	۳۰	۶	-	-	-
AFB1	ELISA	۲۸(%۷۷/۸)	۸	۱۷	۸	۲	۱
OTA	ELISA	۸(%۲۲/۲)	۲۸	۸	-	-	-

نتایج مثبت و منفی کاذب در استفاده از روش ELISA توسط محققان مختلفی که در ارتباط با روشهای ELISA و کروماتوگرافی فعالیت می کردند گزارش شده است (بیوار و همکاران ۱۹۹۱، بوش و همکاران ۱۹۹٤ و کرسکا و فریزنیوز ۲۰۰۱). واکنش مثبت کاذب در ELISA ممکن است ناشی از حضور ترکیبات شیمیایی مرتبط مانند پیش سازهای AFB1 وOTA، سایر متابولیت های قارچی و ترکیبات موجود در ماتریس مواد غذایی باشد (سیدنهام و شفارد ۱۹۹٦) و نتایج منفی کاذب ممکن است مربوط به حد تشخیص پایین تر HPLC در مقایسه با روش ELISA باشد (اونو و همکاران ۲۰۰۰).

نتایج ارائه شده در اینجا نشان داد که ELISA می تواند به عنوان یک روش غربالگری برای تعیین وقوع AFB1 و OTA در پودر فلفل قرمز استفاده شود زیرا این روش قادر به تجزیه و تحلیل تعداد زیادی از نمونه ها در یک دوره نسبتا کوتاه زمانی می باشد اما به منظور از بین بردن نتایج مثبت و منفی کاذب حاصله ، نتایج بدست آمده توسط این روش باید توسط روشهای کروماتوگرافی مانند HPLC تایید گردد.

همچنین نتایج مطالعه ما نشان می دهد که میزان آلودگی به آفلا توکسین در نمونه های مورد آزمون

بالاتر ازمیزان آلودگی به اکراتوکسین بوده است بنابراین نشان می دهد که واریته و شرایط زیست محیطی این نوع از فلفل قرمز برای رشد قارچ های مولد آفلاتوکسین مناسب تر از قارچ های مولد اکراتوکسین است. همچنین ، آلودگی بالای فلفل قرمز به آفلاتوکسین می تواند در نتیجه عدم کنترل بهداشتی در برداشت محصول و مراحل خشک کردن آن باشد. این شدت میزان آلودگی مشاهده شده در نمونه ها در مراحل اولیه برداشت بوده که قطعاً میزان آن در مراحل بعدی شامل فرآوری و ذخیره سازی افزایش خواهد یافت. بنابراین ، هر چه میزان آلودگی اولیه پایین تر باشد، ایمنی محصول نهایی بالاتر خواهد بود.

به طور کلی ، نتایج پژوهش حاضر در تائید برخی گزارش های دیگر، حضور آفلاتوکسین و اکراتوکسین را در ادویه ها نشان می دهد، هرچند که بر خلاف مطالعه ما، بیشتر مطالعات دیگر بر روی نمونه های جمع آوری شده از سطح بازار انجام شده است و نتایج اعلام شده توسط آنها بدلیل اینکه تاثیر شرایط زمانی، دمایی و رطوبتی دوره نگهداری پس از برداشت در آنها لحاظ نگردیده است، برآورد دقیقی از احتمال و میزان حضور مایکوتوکسین ها در ادویه ها را در مراحل ابتدایی برداشت نشان نمی دهد.

نتیجه گیری

کشت و برداشت بیشتر ادویه ها در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری در شرایط بد بهداشتی صورت می گیرد. این شرایط نامناسب برای سنتز آفلاتوکسین B۱ و اکراتوکسین A مستعد است بنابراین ، شرایط رشد، برداشت و روش فرآوری، شرایط ذخیره سازی و مراحل پس از برداشت باید به منظور جلوگیری از خطر حضور مایکوتوکسینها در ادویه ها به دقت کنترل گردد. علاوه بر این ، برنامه های آموزشی نیز باید برای تولید کننده ارائه گردد . از طرف دیگر، روش ELISA همبستگی خوبی با HPLC نشان داد در نتیجه روش ELISA (به دلیل سادگی ، سرعت، قابلیت اطمینان، مقرون به صرفه بودن و غیره) می تواند در تعیین آلودگی مایکوتوکسینها در ادویه مورداستفاده قرار گیرد.

منابع مورد استفاده

Abdulkadar AHW, Al-Ali AA, Al-Kildi AM and Al-Jedah JH. 2004. Mycotoxins in food products available in Qatar. Food Control 15: 543–8.

Aydin A, Erkan EM, Baskaya R and Ciftcioglu G. 2007. Determination of aflatoxin B1 levels in powdered red pepper. Food Control 18: 1015–1019.

Beaver RW, James MA and Lin TY. 1991. Comparison of an ELISA-based screening test with liquid chromatography for the determination of aflatoxins in corn. Journal of the Association of Official Analytical Chemists 74: 827–829.

Belli N, Marin S, Sanchis V and Ramos AJ. 2002. Review: Ochratoxin A (OTA) in wines, musts and grape juices: Occurrence, regulations and methods of analysis. Food Science and Technology International 8: 325–335.

Bosch H, Tessin N, Bellmer HG and Bassler HMS. 1994. Evaluation of the suitability of enzyme linked immunosorobent assays (ELISAs) for mycotoxin analysis in the brewing industry. Monatsschrift fur Brauerei 47: 196–202.

Eaton DL, Ramsdell HS and Neal GE. 1994. Biotransformation of aflatoxins. In D. L. Eaton & J. D. Groopman (Eds.), The toxicology of aflatoxins: Human health, veterinary, and agricultural significance (pp. 45–72). London: Academic Press.

El-Kady IA, El-Maraghy SS and Eman-Mostafa M. 1995. Natural occurrence of mycotoxinsin different spices in Egypt. Folia Microbiologica 40: 297–300.

European Commission, Commission regulation 472/2002 of March 12, 2002 amending regulation (EC) No. 466/201 setting maximum levels for certain contaminants in foodstuffs, Official Journal of European Communication. 75: 18–20.

European Commission, Commission regulation 123/2005 of January 26, 2005 amending regulation (EC) No. 466/2001 as regards ochratoxin A, Official Journal of European Communication. 25: 3–5.

Fazekas B, Tar A and Kovacs M. 2005. Aflatoxin and ochatoxin A cotent of spices in Hungary. Food Additives and Contaminants 22: 856–863.

Garrido D, Jodral M and Pozo R. 1992. Mould flora and aflatoxin producing strains of *Aspergillus* flavus in spices and herbs. Journal of Food Protection 55: 451-452.

Gerhard U, 1994. Gewürze in der Lebensmittelindustrie: Eigenschaften-Technologien-Verwendung. Behr’s-Verlag: Hamburg.

International Agency for Research on Cancer (IARC), 1993. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans (Vol. 56). Lyon: IARC.

Krska R and Fresenius JR. 2001. The state-of-the-art in the analysis of estrogenic mycotoxins in cereals. Journal of Analytical Chemistry 369: 469–476.

Llewellyn G C, Mooney R L, Cheatle T F and Flannigan B, 1992. Mycotoxin contamination of spices— An update. International Biodeterioration and Biodegradation 29: 111-121.

Martins ML, Martins HM and Bernardo F. 2001. Aflatoxins in spices marketed in Portugal. Food Additives and Contaminants 18: 315–319.

Ono EYS, Kawamura O, Ueno Y, Hirooka EYO, 2000. A comparative study of indirect competitive ELISA and HPLC for fumonisin detection in corn of the State of Parana-Brazil. Food and Agricultural Immunology 12: 5-14.

Pafumi J, 1986. Assessment of the microbiological quality of spices and herbs. Journal of Food Protection 49: 985-963.

Patel S, Hazel CM, Winterton AGM and Mortby E. 1996. Survey of ethnic foods for mycotoxins. Food Additives and Contaminants 13: 833–841.

Peraica M, Radic B, Lucic A and Pavlovic M. 1999. Toxic effects of mycotoxins in humans. Bulletin World Health Organization 77: 754-766.

Shantha T. 1999. Critical evaluation of methods available for the estimation of aflatoxin B1 in chilli powder. Journal of Food Science and Technology 36: 163-165.

Stroka J, Anklam E, Jörissen U and Gilbert J. 2000. Immuno-affinity column clean-up with liquid chromatography post column bromination for determination of aflatoxins in peanut butter, pistachio paste, fig paste and paprika powder: collaborative study. Journal of AOAC International 83: 320-340.

Sydenham EW and Shephard GS. 1996. Chromatographic and allied methods of analysis for selected mycotoxins. In-*Progress in Food Contaminants Analysis*, ed. J. Gilbert. Blackie Academic and Professional, London, pp. 65-146.

Thirumala-Devi K, Mayo MA, Delfosse P, Gopal Reddy SV and Reddy DVR, 2000. Production of polyclonal antibodies for ochratoxin A and its detection in chillies by ELISA. Journal of Agricultural and Food Chemistry 48: 5079-5082.

Thirumala-Devi K, Mayo MA, Reddy G, Tangni EK, Larondelle Y and Reddy DV. 2001. Occurrence of ochratoxin A in black pepper, coriander, ginger and turmeric in India. Food Additives and Contaminants 18: 830–835.

Topal S. 1993. Gıdalarda küf kontaminasyon riskleri ve önlemleri (124). Kocaeli: Tübitak-Mam. Press pp. 174–187.

Trucksess MW. 2001. Rapid analysis (thin layer chromatographic and immunochemical methods) for mycotoxins in foods and feeds. In: Mycotoxins and Phycotoxins in perspective at the turn of the millennium. Wageningen, The Netherlands: Ponsen & Looyen, pp. 29–40.

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.

Zinedine A, Brera C, Elakhdari S, Catano C, Debegnach F, Angelini S, 2006. Natural occurrence of mycotoxins in cereals and spices commercialized in Morocco. Food Control 17: 868–874.