

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

روزیتا سالاری<sup>\*</sup>، محمد باقر حبیبی نجفی<sup>۲</sup>، محمد طاهر بروشکی<sup>۳</sup>، سید علی مرتضوی<sup>۲</sup> و محسن فتحی نجفی<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت: ۹۰/۹/۱۲ تاریخ پذیرش: 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

۴- استادیار مرکز تحقیقات واکسن و سرم سازی رازی مشهد

\*مستول مکاتبه: E mail: r\_salari2001@yahoo.com

### چکیده

هدف از انجام این مطالعه، مقایسه دو روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) و الیزا (ELISA) در اندازه گیری آفلاتوکسین B1 (AFB1) و اکراتوکسین A (OTA) در ادویه فلفل قرمز می باشد. برای این منظور، ۳۶ 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 ۳۶ 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 (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 شد. از نظر آماری ارتباط خوبی بین هر دو روش در آنالیز کمی AFB1 و OTA مشاهده شد (برای AFB1  $r^2 = 0.979$  و برای OTA  $r^2 = 0.947$ ) 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<sup>1\*</sup>, M B Habibi Najafi<sup>2</sup>, M T Boroushaki<sup>3</sup>, S A Mortazavi<sup>2</sup> and M Fathi Najafi<sup>4</sup>

Received: December 03, 2011

Accepted: January 03, 2012

<sup>1</sup>PhD Student, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

<sup>2</sup>Professor, Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Iran

<sup>3</sup>Associate Professor, Pharmacological Research Center of Medicinal Plants, Mashhad University of Medical Science, Iran

<sup>4</sup>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

مطالعات متعددی نشان داده اند که ادویه‌ها با میکروارگانیزم‌های مختلف از جمله قارچهای مولد سم (به خصوص گونه‌های آسپرژیلوس) که دارای پتانسیل تولید مایکوتوکسین هستند، آلوده می‌شوند (گاریدو و همکاران ۱۹۹۲). بنابراین، مسائلی در زمینه مصرف ادویه‌ها از نظر سلامتی مطرح است زیرا اغلب بدون فرآوری به غذاها اضافه شده و یا خام خورده می‌شوند (پافومی ۱۹۸۶ و لولین و همکاران ۱۹۹۲).

آلودگی به مایکوتوکسین‌ها یکی از شایع‌ترین مشکلات مربوط به ایمنی مواد غذایی می‌باشد که انواع گوناگونی از اثرات سمی را در انسان و

اکثر ادویه‌ها در مناطق گرمسیری و نیمه گرمسیری تولید می‌شوند. آب و هوای گرم و مرطوب، زمان طولانی خشک کردن و دستورالعمل‌های اغلب ناکافی برای کشاورزان، ممکن است باعث مشکلات کیفی قابل توجهی در آنها گردد (جرارد ۱۹۹۴). گزارش شده است ۱۰-۵ درصد محصولات کشاورزی در جهان توسط قارچها آلوده می‌شوند 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 متابولیت‌های سمی به نام مایکوتوکسین باشد (توپال ۱۹۹۳).

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 در طیف وسیعی از کالاهای 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 معمولاً به عنوان طعم دهنده، ادویه و ایجاد رنگ و طعم در غذاها 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 بر روی 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 تأیید 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.

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 شدیدی از آسیب را به سلامت انسان وارد کند (پریکا و همکاران ۱۹۹۹). در میان مایکوتوکسینهای مختلف، آفلاتوکسین B1 و اکراتوکسین A، از انواع کاملاً 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 B1 به 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 ۱۹۹۴ و مرکز بین المللی تحقیقات سرطانی IARC ۱۹۹۳).

کمیته علمی اتحادیه اروپا حدود قانونی AFB1 را در ادویه ها 5 میکروگرم در کیلوگرم 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 (۴۶۶/۲۰۰۱) (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 کارایی بالا (HPLC) و آزمون الایزا (ELISA) استوار هستند (ژنگ و همکاران ۲۰۰۵). روش TLC دارای ضرایب تغییرات نسبتاً 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 ایمونوآفینیته می باشد. بنابراین، در مطالعات و آزمونهای معمول، روشهای ایمونولوژیک کنونی به روشهای کروماتوگرافی ترجیح داده می شود (سیدنهام و شفارد ۱۹۹۶). در حال حاضر علاقه به استفاده از کیت های تست ELISA بدلیل نیاز به حجم کم نمونه و روش ساده تر

**مواد و روش‌ها****نمونه‌ها**

لفل 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 می‌یابد (عمدتاً در طی شش چین) و سپس در آفتاب و هوای آزاد خشک می‌گردد. نمونه برداری در فصل برداشت این گیاه از تمامی چین‌ها صورت گرفت بدین صورت که تعداد شش نمونه از بین نمونه‌های خشک شده از هر چین (مخلوط شده از مزارع مختلف) به طور تصادفی جمع‌آوری گردید (مجموعاً سی و شش نمونه). متوسط اندازه نمونه‌های جمع‌آوری شده در این بازه زمانی بین ۲۵۰ گرم و ۱ کیلوگرم بود.

**معرف‌ها و تجهیزات**

تمامی مواد شیمیایی به استثناء متانول و استونیتریل (درجه HPLC) دارای درجه آزمایشگاهی بودند و از شرکت مرک آلمان خریداری شدند. همه محلول‌ها با آب دی‌یونیزه تهیه شدند. استانداردهای AFB1 و OTA از شرکت شیمیایی سیگما خریداری شد که در تهیه منحنی‌های کالیبراسیون مورد استفاده قرار گرفت.

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

**آنالیز آفلاتوکسین B1 و اکرآتوکسین A توسط ELISA**  
کیت‌های آفلاتوکسین B1 (AFB1 ۵۱۲۱) و اکرآتوکسین A (OTA ۵۱۲۱) شرکت Europroxima از نوع آنزیم ایمونواسی رقابتی برای تعیین مقادیر این سموم در مواد غذایی می‌باشند. روش‌های 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 اکرآتوکسین A**

۵ گرم از نمونه هموژن شده پودر فلفل قرمز به یک لوله تمیز منتقل شد. ۱۰ میکرولیتر اسید 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 شیشه‌ای منتقل شده و در ۵۰ درجه سانتی‌گراد 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 نمونه‌های آماده شده برای آزمون، هر یک در دو تکرار به طور جداگانه در چاهک‌های 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 چاهک‌ها با بافر شستشو سه بار شستشو داده

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 ایمونوآفینیتی (Vicam Aflatest P) که قبلاً 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. آفلاتوکسین 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 (۲۰:۸۰)،  $V/V$  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 ۴۰ میلی لیتر از PBS رقیق گردید و بار دیگر پس از آن از طریق یک کاغذ صافی واتمن صاف شد. مقدار ۱۰ میلی لیتر از این محلول صاف شده از میان ستون ایمونوآفینیتی Ochratest TM حاوی آنتی بادی های مونوکلونال تثبیت شده علیه OTA عبور داده شد. پس از شستن ستون با ۱۰ میلی لیتر PBS و ۱۰ میلی لیتر آب، OTA با ۱/۵ میلی لیتر متانول شسته شد. محلول شسته شده تحت جریان نیترژن خشک تا خشک شدن تبخیر شده و سپس در ۵۰۰ میکرولیتر محلول متانول / آب (۵۰:۵۰،  $V/V$ ) حل شد. در نهایت ۵۰ میکرولیتر از محلول به دستگاه HPLC تزریق گردید.

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 (اکراتوکسین A - 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 آفلاتوکسین در تولوئن - استونیتریل (۲:۹۸،  $V/V$ ) و محلولهای استاندارد ذخیره OTA با تولوئن - اسید استیک (۱:۹۹،  $V/V$ ) 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 ۳۰۰ میلی لیتر محلول متانول: آب (۲۰:۸۰،  $V/V$ ) اضافه نموده، محلول حاصل پس از اختلاط در یک مخلوط کن با سرعت بالا به مدت ۳ دقیقه از طریق یک کاغذ صافی

## آزمون HPLC

### آنالیز آفلاتوکسین B1

می باشد هر چند که درصد بروز و سطوح AFB1 و OTA یافت شده در این مطالعه در مقایسه با سطوح عنوان شده برای فلفل در سایر منابع، نسبتاً 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 اکرآتوکسین در ادویه ها انجام نشده است.

محققان مختلفی سطوح بالای از آفلاتوکسین B1 را در ادویه ها گزارش نموده اند. در ترکیه، آیدین و همکاران (۲۰۰۷). سطوح بالای از آلودگی AFB1 در پودر فلفل قرمز را تا سطح آلودگی ۴۰/۹ میکروگرم بر کیلوگرم عنوان کرده اند. مارتینز و همکاران (۲۰۰۱) در پرتغال آلودگی پودر کاری را با AFB1 در طیف وسیع بین ۵-۱ میکروگرم بر کیلوگرم اعلام نموده اند. در مراکش، زینالدین و همکاران (۲۰۰۶) حضور AFB1 را در زنجبیل در سطح آلودگی متوسط ۰/۶۳ 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 OTA در ادویه ها مانند فلفل قرمز، فلفل سیاه و فلفل سفید بوده است (الکادی و همکاران ۱۹۹۵، پتل و همکاران ۱۹۹۶، تیرومالا و همکاران ۲۰۰۱ و فازکاس و همکاران ۲۰۰۵).

### آزمون ELISA

غلظت AFB1 و OTA 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، ۰/۰۶۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵ و ۱ ng/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.

تعیین آفلاتوکسین توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با ستون سیلیکا ژل C18 فاز معکوس (۴/۶×۲۵۰ میلی متر، اندازه ذرات ۵ میکرومتر) مجهز به سیستم تشخیص با فلورسانس انجام شد. طول موج های تحریک و انتشار ۳۶۰ و ۴۴۰ نانومتر قرار داده شد. از فاز متحرک آب- استونیتریل - متانول (۱۵:۲۵:۶۰، v/v/v) با سرعت جریان ۱/۰ میلی لیتر در دقیقه و حجم تزریق ۱۰۰ میکرولیتر، استفاده گردید.

### آنالیز اکرآتوکسین 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 ۳۳۳ و ۴۶۰ نانومتر قرار داده شد و فاز متحرک استونیتریل- آب- استیک اسید (۲:۴۷:۵۱، v/v/v) با سرعت جریان ۱/۰ میلی لیتر در دقیقه و حجم تزریق ۱۰۰ میکرولیتر مورد استفاده قرار گرفت.

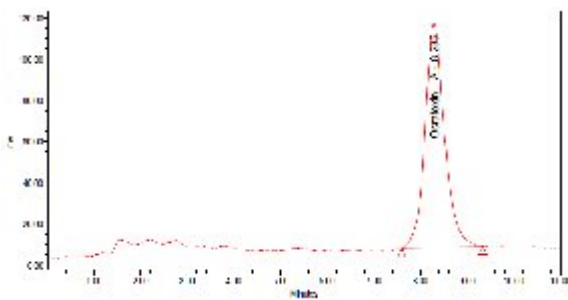
تایید شناسایی هر یک از سموم در تمام نمونه های مورد آزمون از طریق تزریق پی در پی عصاره نمونه و مقایسه نسبت سطح پیک آنها با استاندارد مربوطه انجام شد. اندازه گیری هر سم، از طریق اندازه گیری سطح زیر پیک آن در زمان بازداری و مقایسه آنها با منحنی کالیبراسیون استاندارد مربوط به آنها انجام گردید.

### تجزیه و تحلیل آماری

آمار توصیفی (میانگین، انحراف استاندارد، دامنه، حداکثر و متوسط) با استفاده از نرم افزار Minitab (نسخه PA، ۱۳/۲) 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



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 حضور AFB1 در پودر فلفل قرمز یک خطر بالقوه محسوب می گردد. در طی آزمون ELISA، در میان مجموع ۲۶ 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  $\mu\text{g}/\text{kg}$  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 ۲ و ۳).

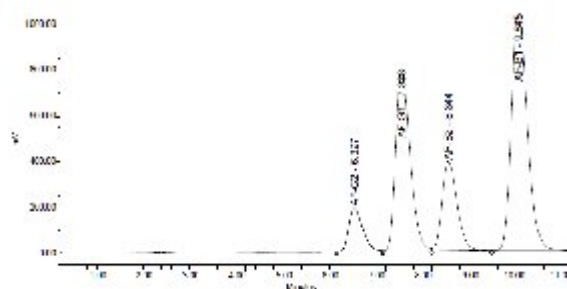
حد شناسایی برای AFB1، ۰/۳ و برای OTA، ۰/۵ میکروگرم بر کیلوگرم بود.

### آزمون HPLC

مجموعه ای از محلول های استاندارد کاری برای (AFB1 ۰/۴، ۱/۲، ۲، ۲/۸، ۳/۶، ۵/۶ و ۷/۲ ng/ml) و برای OTA (۰/۵، ۱، ۲، ۵، ۱۰ و ۱۵ ng/ml) از طریق 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، ۹/۸۴ و برای OTA ۸/۲۸ دقیقه بدست آمد. نمونه ای از کروماتوگرام های حاصله از HPLC برای استاندارد های آفلاتوکسین و اکرآتوکسین A در شکل ۱ و ۲ نشان داده شده است.

### مقایسه دو روش ELISA و HPLC

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

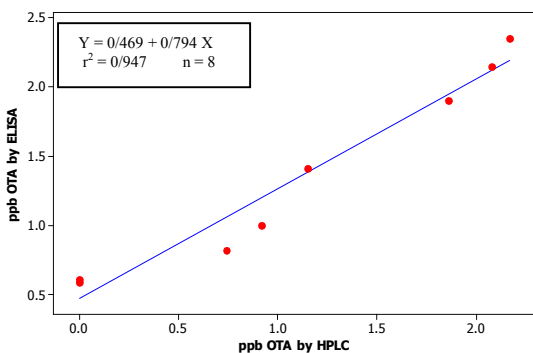
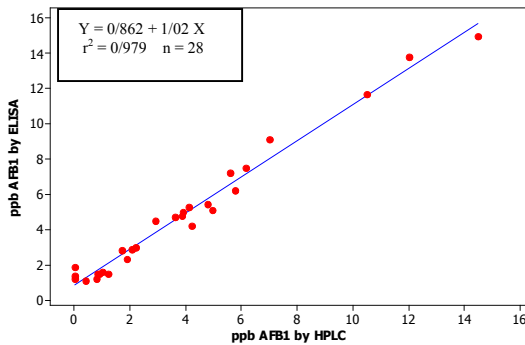


شکل ۱- کروماتوگرام HPLC استانداردهای آفلاتوکسین

آمده در اندازه‌گیری AFB1 دقیق تر و بالاتر از OTA بود.

جدول ۱- مقادیر غلظت آفلاتوکسین B1 و اکرانتوکسین A در نمونه‌های مثبت حاصل از HPLC و ELISA

ELISA		HPLC		ردیف
AFB1 (µg/kg)	OTA (µg/kg)	AFB1 (µg/kg)	OTA (µg/kg)	
۴/۲۲	ND	۴/۲۱	ND	۱
۶/۲۰	ND	۵/۷۷	ND	۲
۹/۱۰	ND	۷/۰۰	ND	۳
۲/۹۰	ND	۲/۰۶	ND	۴
۱/۲۰	۱/۰۰	۰/۸۰	۰/۹۲	۵
۱/۵۰	۲/۱۵	۱/۲۰	۲/۰۸	۶
۱۱/۷۰	ND	۱۰/۵۰	ND	۷
۱۵/۰۰	ND	۱۴/۵۰	ND	۸
۱۳/۸۰	ND	۱۲/۰۰	ND	۹
۱/۵۰	۱/۴۱	۰/۹۱	۱/۱۵	۱۰
۵/۴۶	ND	۴/۷۸	ND	۱۱
۷/۲۰	ND	۵/۶۰	ND	۱۲
۷/۵۰	ND	۶/۱۷	ND	۱۳
۴/۸۰	ND	۳/۸۶	ND	۱۴
۵/۱۰	ND	۴/۹۵	ND	۱۵
۵/۳۰	ND	۴/۱۰	ND	۱۶
۳/۰۰	ND	۲/۲۱	ND	۱۷
۴/۷۰	ND	۳/۶۰	ND	۱۸
۲/۸۰	ND	۱/۷۰	ND	۱۹
۱/۵۰	۲/۳۵	۰/۸۴	۲/۱۷	۲۰
۴/۵۰	ND	۲/۹۰	ND	۲۱
۵/۰۰	ND	۳/۹۰	ND	۲۲
۱/۱۰	۰/۸۲	۰/۴۰	۰/۷۴	۲۳
۱/۶۰	۱/۹۰	۱/۰۰	۱/۸۶	۲۴
۲/۳۰	ND	۱/۹۰	ND	۲۵
۱/۲۰	ND	ND	ND	۲۶
۱/۹۰	۰/۵۹	ND	ND	۲۷
۱/۴۰	۰/۶۱	ND	ND	۲۸



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

از ۲۶ 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 آفلاتوکسین متصل می‌شوند (شاننا 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 بادی‌ها اغلب با ترکیبات مشابه با مایکوتوکسینها واکنش متقاطع نشان می‌دهند (ژنگ و همکاران ۲۰۰۵).

ارتباط بین دو روش HPLC و ELISA در اندازه‌گیری 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  $r^2 = 0/979$  و برای OTA  $r^2 = 0/947$ ) اما همبستگی بدست



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

میانگین	محدوده	نمونه های مثبت (%)	روش آزمون	مایکوتوکسین
۳/۸۶	۰/۴-۱۴/۵	۲۵(۶۹/۴)	HPLC	AFB1
۱/۵۰	۰/۷۴-۲/۱۷	۶(۱۶/۷)	HPLC	OTA
۴/۳۶	۱/۱-۱۵/۰	۲۸(۷۷/۸)	ELISA	AFB1
۱/۲۰	۰/۵۹-۲/۳۵	۸(۲۲/۲)	ELISA	OTA

انحراف معیار: SD<sup>a</sup>

جدول ۳- توزیع آفلاتوکسین B1 و اکرآتوکسین 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	-	-	-

همچنین نتایج مطالعه ما نشان می دهد که میزان آلودگی به آفلاتوکسین در نمونه های مورد آزمون بالاتر از میزان آلودگی به اکرآتوکسین 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 اکرآتوکسین 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 اکرآتوکسین را در ادویه ها نشان می دهد، هرچند که بر خلاف مطالعه ما، بیشتر مطالعات دیگر بر روی نمونه های جمع آوری شده از

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 ۱۹۹۴ و کرسکا و فریزنیوز ۲۰۰۱). واکنش مثبت کاذب در ELISA ممکن است ناشی از حضور ترکیبات شیمیایی مرتبط مانند پیش سازهای AFB1 و OTA، سایر متابولیت های قارچی و ترکیبات موجود در ماتریس مواد غذایی باشد (سیدنهام و شفارد ۱۹۹۶) 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 نسبتاً 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.

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 مورد استفاده قرار گیرد.

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 B<sub>1</sub> و

### 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 B<sub>1</sub> 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 immunosorbent 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 mycotoxins in different spices in Egypt. *Folia Microbiologica* 40: 297–300.
- European Commission, Commission regulation 472/2002 of March 12, 2002 amending regulation (EC) No. 466/2001 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 ochratoxin A content 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 nlemleri (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.