NAISL
Volume 4, Number 1, 2020
Pages: 39-48
Print ISSN: 2588-6401
Online ISSN: 2588-641X
Website: shaajournal.msrt.ir
Article type: Scientific extension
Date Received: 2020/01/21
Acceptance date: 2020/03/31
Online publishing: 2020/04/18

Aflatoxin determination methods

Fahimeh Mahmoodi [1*], Javad Feizy[2*]

Abstract

Aflatoxin is a group of carcinogenic secondary metabolites produced by fungi Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus. These fungal species are contaminants of foodstuff as well as feeds and are responsible for aflatoxin contamination of these agro products. Aflatoxin contamination can occurr very widely. They can be found in over a hundred kinds of agro-products and foods, such as peanut, corn, rice, soy sauce, vinegar, vegetable oil, pistachio, tea, Chinese medicinal, egg, milk, feed, etc. The toxicity of aflatoxins makes them the primary health hazard as well as responsible for losses associated with contaminations of processed foods and feeds. Determination of aflatoxins concentration in foodstuff and feeds is thus very important. Various analytical methods have been developed and can be listed broadly under three categories: chromatographic, immunochemical, and spectroscopic. As each method of aflatoxin detection has its advantages and limitations, it is important to be informed about the currently available options during the selection of any application method. In addition to these methods, new technologies are being developed to make aflatoxin detection faster, more sensitive, and more reliable. With the increased availability of accurate aflatoxin detection technology, scientifically informed pretand postharvest measures can be taken to reduce human exposure to aflatoxins.

Key Words:

Aflatoxin, Measurement, Chromatography, Spectroscopy, Immunology

Authors:
1. Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran.
E-mail: fahime_mahmodi88@yahoo.com
Tel: 05135425317
2. Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran.
E-mail: j.feizy@rifst.ac.ir
Tel: 05135425371

*. Corresponding author

روش‌های اندازه‌گیری آفلاتوکسین‌ها

فهیمه محمودی[۱]، جواد فیضی[۲*]

نشریه رویکردهای نوین در آزمایشگاه‌های علمی ایران
سال چهارم، شماره ۱، ۱۳۹۹
صفحات: ۴۸-۳۹
شاپای چاپی: ۶۴۰۱-۲۵۸۸
شاپای الکترونیکی: ۶۴۱X-۲۵۸۸
وب‌سایت: shaajournal.msrt.ir
نوع مقاله: علمی -ترویجی
تاریخ ارسال: ۱۳۹۸/۱۱/۰۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۹/۰۱/۱۲
نشر آنلاین: ۱۳۹۹/۰۱/۳۰

چکیده

آفلاتوکسین‌ها متابولیت‌های ثانویه سرطان‌زا هستند که عمدتا توسط دوگونه قارچ به نام آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس تولید می‌شوند. این گونه‌های قارچی آلوده‌کننده مواد غذایی و همچنین خوراک دام و عامل آلودگی محصولات کشاورزی به آفلاتوکسین‌ها هستند. این سموم می‌توانند در سطح بسیار گسترده آلودگی ایجاد کنند. آفلاتوکسین‌ها را می‌توان در بیش از صد نوع محصولات زراعی و غذایی از جمله بادام زمینی، ذرت، برنج، سس سویا، سرکه، روغن گیاه، پسته، چای، گیاه دارویی چینی، تخم مرغ، شیر، خوراک دام و غیره مشاهده کرد. سمیت آفلاتوکسین‌ها خطر جدی برای سلامتی انسان‌ها و همچنین مسئول ضایعات و تلفات در محصولات غذایی و خوراک دام محسوب می‌شوند. تعیین غلظت آن‌ها در مواد غذایی و خوراک دام بسیار مهم است. روش‌های مختلف اندازه‌گیری آفلاتوکسین‌هابه طور گسترده در سه گروه قرار دارند: کروماتوگرافی، ایمونوشیمیایی و طیف‌سنجی. هرکدام از روش‌ها دارای مزایا و معایبی هستند که آگاهی از آن‌ها هنگام انتخاب روش حائز اهمیت می‌باشد. علاوه بر این‌ها فناوری‌های جدیدی راه‌اندازی شده‌اند تا بتوانند تشخیص آفلاتوکسین‌ها را سریع‌تر، با حساسیت بالاتر و قابل اطمینان‌تر کنند. با دسترسی بیشتر به فناوری‌های دقیق تشخیص آفلاتوکسین‌ها می‌توان اقدامات علمی و عملی جهت کاهش مواجهه انسان با آفلاتوکسین‌ها انجام داد. این مطالعه به بررسی مهم‌ترین روش‌های تشخیص آفلاتوکسین‌ها می‌پردازد.

فهمیه محمودی جواد فیضی

واژگان کلیدی:

آفلاتوکسین،
اندازه‌گیری،
کروماتوگرافی،
اسپکتروسکوپی،
ایمونولوژی

نویسندگان:
۱. کارشناس ارشد بهداشت و کنترل کیفی مواد غذایی، آزمایشگاه مرکزی موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران.
ایمیل: fahime_mahmodi88@yahoo.com
تلفن: ۰۵۱۳۵۴۲۵۳۱۷
۲. رئیس آزمایشگاه مرکزی و استادیار گروه ایمنی و کنترل کیفیت مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران.
ایمیل: j.feizy@rifst.ac.ir
تلفن: ۰۵۱۳۵۴۲۵۳۷۱

*. نویسنده مسئول

۱- مقدمه

مایکوتوکسین‌ها متابولیت‌های سمی قارچی هستند که به طور طبیعی مواد غذایی و خوراک دام را آلوده می‌کنند. آفلاتوکسین‌ها گروهی از مایکوتوکسین‌ها هستند که متابولیت ثانویه گونه‌هایی از قارچ آسپرژیلوس مانند آسپرژیلوس فلاووس[۱]، آسپرژیلوس پارازیتیکوس[۲] و به ندرت آسپرژیلوس نومیوس[۳] می‌باشند. این سموم بسیار سمی و سرطان‌زا هستند و در صورت مصرف محصولات آلوده عواقب جدی برای سلامتی انسان و حیوانات در پی دارند [۱-٤]. از میان ۱۸ نوع آفلاتوکسین شناخته شده آفلاتوکسین‌های B_1، B_2، G_1 و G_2 از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند که نامگذاری آن‌ها براساس رنگ‌های فلورسانسی است که این سموم زیر نور ماوراء بنفش ایجاد می‌کنند [٦،٥]. آفلاتوکسین‌های گروه B رنگ فلورسانس آبی دارند و دارای یک حلقه سیکلوپنتان در ساختار خود می‌باشند در حالی که آفلاتوکسین‌های گروه G رنگ فلورسانس زرد-سبز ایجاد می‌کنند و دارای حلقه لاکتون می‌باشند. قدرت سمیت، جهش‌زایی و سرطان‌زایی آن‌ها به ترتیب $G_2 < B_2 < G_1 < B_1$ است. آفلاتوکسین B توسط آسپرژیلوس فلاووس و آفلاتوکسین G توسط آسپرژیلوس پارازیتیکوس و نومیوس تولید می‌شوند. حدود ۷۵٪ آلودگی‌های مواد غذایی و خوراک دام مربوط به آفلاتوکسین B_1 است که رایج‌ترین نوع آفلاتوکسین‌ها است [۷]. آفلاتوکسین‌ها بر روی انواع دانه‌ها و آجیل‌ها، به عنوان مثال ذرت، سورگوم، دانه کتان، بادام زمینی، پسته، نارگیل، حبوبات، دانه‌های روغنی، میوه‌های خشک، کاکائو، ادویه‌جات و... در مزرعه و هنگام ذخیره‌سازی تولید می‌شوند [۹،۸]. دمای ۵۲-۵۳ درجه، رطوبت نسبی ۸۳٪-۸۸٪ و شرایط اسیدی برای رشد آن‌ها مناسب است. همچنین سطح مناسب اکسیژن و دی‌اکسیدکربن در تولید آفلاتوکسین نیز تاثیر می‌گذارد. به عنوان مثال وجود ۲۰٪ دی‌اکسیدکربن و ۱۰٪ اکسیژن در هوا تولید آفلاتوکسین‌ها را کاهش می‌دهد [۱۰]. در صورت مصرف خوراک آلوده به آفلاتوکسین B_1 توسط دام، این سم در کبد دام به فرم هیدروکسیله آن یعنی آفلاتوکسین M_1 و M_2 تبدیل می‌شود. این آفلاتوکسین‌ها در شیر دام حضور دارند و هنگام پاستوریزاسیون، نگهداری و تهیه فرآورده‌های لبنی نسبتا پایدار هستند [۱۱]. در میان بیش از ۳۰۰ مایکوتوکسین شناخته شده، آفلاتوکسین‌ها برای جهان تهدید جدی محسوب می‌شوند. بعد از سال ۱۹۷۵ نگرانی بیشتری در مورد احتمال حضور متابولیت‌های سرطان‌زا، به ویژه آفلاتوکسین‌ها در مواد غذایی و خوراک دام وجود دارد. اگرچه آفلاتوکسین‌ها در بیش از ۸۰ کشور جهان تحت کنترل است، اما هنوز قوانین آن‌ها در سطح بین‌المللی کاملاً هماهنگ نشده است [۱۲]. به همین دلیل، روش‌های مختلفی برای تشخیص و تعیین مقدار آفلاتوکسین ایجاد شده است. روش اصلی مبتنی بر سیستم ایمنولوژیکی، روش الایزا[٤] [۱۳] است. روش‌های دیگر بر اساس اصول الکتروشیمیایی و نوری از قبیل: کروماتوگرافی [۱٤]، طیف سنجی [۱۵] و همچنین سایر تست‌های ایمونوشیمیایی هستند. برخی از روش‌های ذکر شده به آزمایشگاه‌های مجهز، پرسنل آموزش دیده، استفاده از حلال‌های مضر و چندین ساعت زمان برای انجام آزمایش نیاز دارند. روش‌های نوین برای کشف آفلاتوکسین‌ها سعی در جلوگیری از این معایب دارند. از جمله این روش‌های جدید می‌توان به استفاده از حسگرهای زیستی [۱٦]، الکتروسینتیک [۱۷]، تشخیص آمپرومتری [۱۸] و ولتامتری [۱۹] اشاره کرد. هر یک از روش‌های ذکر شده با توجه به حساسیت، سهولت در استفاده و مقرون به صرفه بودن، مزایا و محدودیت‌های خاص خود را دارند. در این مقاله به مهم‌ترین روش‌های اندازه‌گیری آفلاتوکسین‌ها می‌پردازیم.

۲- کروماتوگرافی

کروماتوگرافی مایع[۵] با کارایی بالا یکی از روش‌های مهم در آنالیز مایکوتوکسین‌ها خصوصا آفلاتوکسین‌ها است. کروماتوگرافی براساس برهم‌کنش نمونه با فاز متحرک و فاز ثابت عمل می‌کند. اجزاء نمونه که باید از هم جدا شوند بین دو فاز توزیع می‌شوند. فاز متحرک معمولا سیال است و اجزا نمونه با سرعت متفاوت همراه آن در طول فاز ثابت (جامد یا مایع) حرکت می‌کنند [۲۰]. رایج‌ترین آن‌ها کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و کروماتوگرافی لایه نازک[٦] می‌باشند و بیشترین استفاده را در تحقیقات و آنالیز مرسوم نمونه‌های آفلاتوکسین دارند [۲۱]. این روش‌ها حساسیت بسیار خوبی دارند اما نیازمند اپراتور ماهر، تجهیزات گران قیمت و مراحل آماده‌سازی دقیق و پرزحمت هستند [۲۲].

۲-۱- کروماتوگرافی لایه نازک

TLC به عنوان کروماتوگرافی مسطح شناخته می‌شود و هنوز هم یکی از تکنیک‌های آزمایشگاهی پرکاربرد برای تجزیه و تحلیل آفلاتوکسین‌ها است. قبل از ظهور HPLC از تکنیک سریع و ارزان TLC استفاده می‌شد. در این روش یک فاز ثابت از جنس سیلیس، آلومینا یا سلولز وجود دارد که بر روی ماده‌ای بی اثر مانند شیشه، فلز یا پلاستیک سخت قرار گرفته است. پس از آماده‌سازی نمونه و استخراج سم به کمک ستون ایمونوافینیتی دارای آنتی‌بادی‌های ویژه آفلاتوکسین، با استفاده از محلول

[۱] Aspergillus
[۲] Aspergillus flavus
[۳] Aspergillus nomius
[٤] Enzyme-linked immunosorbent assays
[۵] Liquid chromatography
[٦] Thin- layer chromatography

لکه‌گذاری شامل استن، هگزان و متانول روی صفحات TLC لکه‌گذاری شده و سپس صفحه مورد نظر به صورت عمودی درون تانک دارای فاز متحرک قرار می‌گیرد. فاز متحرک شامل مخلوطی از دو تا چند حلال مانند ترشیو بوتیل متیل اتر، متانول و آب می‌باشد. به دلیل حساسیت آفلاتوکسین‌ها به نور، درب تانک TLC باید بسته باشد. پس از این که حلال تا مرز پیشروی تعیین شده بالا آمد صفحه را از داخل تانک حلال خارج کرده و پس از خشک شدن به اتاقک دارای لامپ ماوراء بنفش با طول موج ۳٦٦ نانومتر انتقال داده می‌شود. مرحله تشخیص به صورت چشمی و یا با استفاده از فلورودانسیتومتر صورت می‌گیرد. در نمونه‌هایی که شدت فلورسانس کم است با استفاده از پارافین رقیق شده به صورت اسپری کردن شدت فلورسانس افزایش می‌یابد. شدت فلورسانس پس از تبخیر حلال اسپری دو برابر می‌شود [۲۳]. از مزایای این روش ساده بودن، در دسترس بودن معرف‌های مورد نیاز، قابلیت تکرارپذیری و همچنین تجزیه و تحلیل مقرون به صرفه است چرا که می‌توان با استفاده از یک صفحه و مقدار کمی حلال در زمانی کمتر از کروماتوگرافی مایع آزمون را انجام داد. دقت پایین این روش به علت خطاهایی که در تفسیر صفحات ممکن است وجود داشته باشد و همچنین خطا در لکه‌گذاری باعث توسعه این روش به فرم اتوماتیک به نام کروماتوگرافی لایه نازک با کارایی بالا شده است. کروماتوگرافی لایه نازک با عملکرد بالا، فرم بهبود یافته کروماتوگرافی لایه نازک است که با انجام خودکار مراحل لکه‌گذاری و تفسیر نمونه باعث افزایش تفکیک‌پذیری و اندازه‌گیری کیفی و کمی با دقت و صحت بالاتری شده است [٤]. تفاوت روش TLC با HPTLC در اندازه قطر ذرات فاز ثابت، خودکار بودن و روش پردازش داده‌ها است [٢٤]. کمترین میزان آفلاتوکسین که با این روش گزارش شده است ۱ تا ۲۰ نانوگرم بر گرم بوده است [۲۵].

۲-۲- کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا[۷]

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، محبوب‌ترین روش کروماتوگرافی برای جداسازی و تعیین غلظت ترکیبات آلی می‌باشد. ۸۰ درصد ترکیبات آلی در جهان با استفاده از HPLC اندازه‌گیری می‌شوند [۲٦]. امروزه HPLC به دلیل عملکرد عالی و قابلیت اطمینان در مقایسه با TLC بسیار مورد استفاده قرار می‌گیرد. این روش شامل یک فاز ثابت که روی یک بستر جامد قرار گرفته است، پمپ که فازهای متحرک را از طریق ستون هدایت می‌کند و یک آشکارساز که زمان بازداری و مقدار هر آنالیت را نشان می‌دهد، می‌باشد [۲۷]. زمان بازداری به ماهیت آنالیت و ترکیب فازمتحرک و ثابت بستگی دارد [۲۸].

آشکارسازهایی که در تشخیص و شناسایی آفلاتوکسین‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند شامل ماوراء بنفش[۸]، آرایه دیود[۹] و فلورسانس[۱۰] می‌باشند که آشکارساز فلورسانس از حساسیت بالاتری برخوردار است و حد تشخیص آن در محدوده میکروگرم بر کیلوگرم است. انتخاب آشکارساز مناسب نیز به ماهیت نمونه بستگی دارد [۲۹]. همچنین از دو روش کروماتوگرافی فاز نرمال (فاز ثابت قطبی و فاز متحرک غیرقطبی) و فاز معکوس (فاز ثابت غیرقطبی و فاز متحرک قطبی) برای اندازه‌گیری آفلاتوکسین‌ها استفاده می‌شود که روش فاز معکوس متداول‌تر است و معمولا برای جداسازی آفلاتوکسین‌ها از فاز ثابت شامل ۱۸C استفاده می‌شود [۲۹-۳۱]. آماده‌سازی نمونه در HPLC گامی بسیار مهم است چرا که بدون تخلیص و استخراج سم از نمونه جداسازی و اندازه‌گیری آن کار دشواری است. استخراج فاز جامد (SPE) و استفاده از ستون‌های ایمونوافینیتی (IAC) روش‌های پرکاربردی جهت استخراج آفلاتوکسین‌ها هستند [۲۳]. گاهی اوقات، مشتق‌سازی شیمیایی آفلاتوکسین‌های B_1 و G_1 ممکن است برای افزایش حساسیت آشکارساز در طول اندازه‌گیری مورد نیاز باشد زیرا فلورسانس طبیعی آفلاتوکسین‌های B_1 و G_1 ممکن است به اندازه کافی زیاد نباشد تا به حد تشخیص مورد نیاز برسد. مشتق‌سازی باعث افزایش خاصیت فلورسانس و بهبود قابلیت تشخیص می‌شود. مشتق‌سازی می‌تواند قبل یا بعد از ستون انجام شود. برومین (Br_2)، تری‌فلورواستیک‌اسید برای مشتق‌سازی قبل از ستون استفاده می‌شوند. در مشتق‌سازی پس از ستون از یدید یا برومید با استفاده از کبراسل یا سلول الکتروشیمیایی و یا افزودن برومید یا پیریدینیوم هیدروبرومید به فاز متحرک استفاده می‌شود [۳٤،۳۳]. روش دیگری از مشتق‌سازی پس از ستون که معادل برم‌زنی و یدزنی می‌باشد روش فتوشیمیایی است که حاصل تشکیل همی استال ناشی از تابش نور UV است [۳٦،۳۵]. کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا در زمان کم، نتایج دقیق را ارائه می‌دهد و حساسیت تشخیص آن با دتکتور فلوئورسانس کمتر از ۰/۱ میکروگرم بر کیلوگرم گزارش شده است [۳۷]. عامل محدود کننده این روش نیاز خالص‌سازی شدید نمونه اولیه با استفاده از ستون ایمونوافینیتی است که هزینه بالایی در پی دارد. همچنین نیاز به مشتق‌سازی جهت افزایش حساسیت آفلاتوکسین‌ها دیگر عامل محدود کننده این روش است. استفاده از HPLC با طیف سنج جرمی می‌تواند نیاز به مشتق‌سازی را برطرف کند [۳۸] چرا که این روش نیازی به آشکارساز فلورسانس و ماوراء بنفش و جذب آنالیت‌ها ندارد در نتیجه نیاز به مشتق‌سازی از بین می‌رود. با این حال استفاده از HPLC-MS/MS نیز به دلیل تجهیزات گران قیمت نیازمند پرسنل آموزش دیده و ماهر است [۳۹].

[۷] High performance liquid chromatography
[۸] Ultraviolet
[۹] Diode array detector
[۱۰] Fluorescent detector

۳- سنجش ایمونولوژیکی

این روش‌ها به اتصال بین آنتی بادی‌ها و آنتی‌ژن‌ها متکی است. این ویژگی باعث توسعه روش‌های ایمونوشیمیایی شده است [٤٠]. تشکیل آنتی‌ژن-آنتی‌بادی را می‌توان با تغییری که در جذب فوتون‌های انرژی نور ایجاد می‌شود به وسیله اسپکتروفتومتری اندازه‌گیری کرد. در برخی موارد برای شناسایی بهتر سیگنال‌ها، اتصالات نیاز به تقویت دارند که این امر با استفاده از آنزیم‌ها، رادیوایزوتوپ‌ها و.. صورت می‌گیرد. محبوبیت این روش‌ها به علت حساسیت بالای آن‌ها به وجود آلاینده‌ها در مواد غذایی و دارویی است. همچنین در این روش‌ها در صورت بروز مشکل هنگام جداسازی نیاز به حضور پرسنل ماهر جهت عیب‌یابی نیست و زمان کمی صرف انجام آزمون می‌شود و به همین دلیل این روش‌ها نسبت به کروماتوگرافی و اسپکتروفتومتری ارجح هستند. از جمله روش‌های مهم که در تشخیص آفلاتوکسین‌ها به کار می‌روند رادیو ایمنو اسی[11] و الایزا را می‌توان نام برد [٤١].

۳ -۱-رادیوایمونواسی

اساس این روش رقابت بین آنتی‌ژن نشان‌دار و آنتی‌ژن موجود در نمونه براساس اتصال به آنتی‌بادی است. مقدار مشخصی آنتی‌ژن‌های نشان‌دار رادیواکتیو با مقدار نامعلوم از آنتی‌ژن‌های نمونه در اتصال به تعداد مشخصی از آنتی‌بادی‌ها رقابت می‌کنند [٤٢]. در تحقیقات وان ووناکس[12] و لانگون[13] رادیو ایمونواسی فاز جامد در تعیین آفلاتوکسین B_1 در بادام زمینی استفاده شد و حد تشخیص یک میکروگرم بر کیلوگرم بدست آمد [٤٣]. از مزایای این روش امکان انجام همزمان چند آنالیز با سطح بالای حساسیت است [٤٥،٤٤]. از معایب این روش می‌توان به لزوم وجود آنتی‌ژن در حالت خالص، نیاز به ایزوتوپ رادیواکتیو برای نشان‌دار کردن که خطرات زیادی برای سلامتی انسان دارد و همچنین مشکل دفع ضایعات رادیواکتیویته اشاره کرد. این معایب استفاده مکرر از این روش را برای تشخیص آفلاتوکسین‌ها محدود کرده است [٤٧،٤٦].

٤-الایزا[14]

خطراتی که روش رادیوایمونواسی برای سلامتی انسان دارد باعث جایگزین کردن روش‌های ایمن‌تر شده است. اساس این روش نیز بر پایه واکنش آنتی‌ژن-آنتی‌بادی است با این تفاوت که به جای ایزوتوپ‌های رادیواکتیو از آنزیم برای نشان‌دار کردن استفاده می‌شود. تلاش‌های اولیه اورامس[15] در سال ۱۹٦۹ برای نشان‌دار کردن آنتی‌ژن و آنتی‌بادی‌ها به وسیله آنزیم باعث توسعه روش الایزا شد [٤٨]. روش‌های الایزا که برای تشخیص آفلاتوکسین‌ها می‌توان استفاده نمود روش مستقیم و غیرمستقیم است که هر دو روش شامل جداسازی آفلاتوکسین‌های آزاد موجود در فاز مایع از سمومی که در بستر جامد حضور دارند، می‌باشد. در روش مستقیم آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی مورد نظر به طور مستقیم بر بستر جامد قرار می‌گیرند و سپس آنتی‌بادی یا آنتی‌ژن نشان‌دار شده با آنزیم مورد نظر آن به سیستم اضافه می‌شود میزان رنگ فلوئورسنت تولید شده تابعی از میزان آنتی‌ژن ردیابی شده خواهد بود. با بررسی سیگنال تولید شده می‌توان پیبه وجود آنتی‌ژن یا آنتی‌بادی مورد نظر در نمونه برد. برای اندازه‌گیری آفلاتوکسین‌ها روش مستقیم استفاده می‌شود [٤٩،٢٢]. در روش غیرمستقیم سرم رقیق شده به آنتی‌ژن‌های پوشش داده شده در فاز جامد اضافه می‌شود، سپس نمونه را به آن اضافه کرده و پس از گذشت زمان انکوباسیون و یک مرحله شستشو، آنتی هیومن گلوبولین نشاندار شده با آنزیم به چاهک اضافه می‌شود. این روش برای تعیین آنتی‌بادی اختصاصی یا تیتراسیون آنتی‌بادی در سرم استفاده می‌شود. آنزیم‌هایی که در جداسازی آفلاتوکسین‌ها جهت نشان‌دار کردن استفاده می‌شود آنزیم‌های پراکسیداز ترب کوهی (HRP) و آلکالین فسفاتاز (AP) می‌باشد [٥١،٥٠]. پال و همکاران در سال 2004 AFB_1 را در بادام زمینی، ذرت، گندم و فلفل قرمز با استفاده از روش الایزا تعیین کرد. درصد بازیافت از نمونه‌های مختلف غذایی بین 91 تا 104 درصد و حد تشخیص در این مطالعه ۰/۰۱ نانوگرم بر میلی لیتر بود [٥٢]. مزایای این روش شامل دسترسی آسان به کیت‌های الایزا و هزینه پایین این روش، امکان تشخیص همزمان چند آنالیت در ۹٦ چاهک موجود در کیت الایزا و همچنین بی‌خطر بودن این روش برای سلامتی انسان می‌باشد. اما به دلیل اینکه نیاز به چند مرحله شستشو دارد روش وقت‌گیری است و نیاز به صرف زمان دارد [٥٣]. همچنین ترکیبات مختلف موجود در بافت نمونه می‌تواند واکنش آنزیمی را تحت تاثیر قرار دهد [٥٤-٥٦].

٤- اسپکتروسکوپی

٤ -۱- فلوریمتری

در برخی مولکول‌ها روند جذب در پی انتشار نور در طول موج‌های مختلف انجام می‌گیرد. به عبارت دیگر، این ترکیبات خاصیت فلورسانس دارند. فلورسانس در مولکول‌هایی که انرژی را در طول موج‌های خاصی انتشار می‌دهند یا ساطع می‌کنند اهمیت فراوانی دارد و از آن برای تشخیص و اندازه‌گیری آفلاتوکسین‌ها در مواد غذایی استفاده می‌کنند [٥٧]. این روش می‌تواند مقادیر ۵ تا ۵۰۰۰ نانوگرم بر گرم را در کمتر

[11] Radioimmunoassay
[12] Van Vunakis
[13] Langone
[14] Elisa
[15] Avrameas

از ۵ دقیقه اندازه‌گیری کند [٤١]. آزمایش نور سیاه روشی توسط سازمان‌های دولتی برای نظارت بر آفلاتوکسین‌ها و برای تشخیص آفلاتوکسین‌ها در حجم زیاد استفاده می‌شود. آزمایش باید در محل تاریک و زیرنور ماوراءبنفش ٣٦٠ نانومتر انجام شود تا وضوح بهتری داشته باشیم. شدت فلورسانس با توجه به میزان ماده فلورسانس می‌تواند روشن یا کمرنگ باشد. نور فلورسانس ایجاد شده منحصر به آفلاتوکسین‌ها نیست و ممکن است متابولیت‌های فلورسانس غیرسمی دیگری توسط قارچ‌های تولید کننده آفلاتوکسین‌ها تولید شود. همچنین فلورسانس پایدار نیست و در طول ٤ تا ٦ هفته قرار گرفتن در معرض اشعه ماوراء بنفش ناپدید می‌شود درحالی که سم همچنان باقی است. بنابراین باید نمونه‌های تازه تهیه شود. این آزمایش در خوراک دام انجام می‌شود و یک آزمون تاییدیه اولیه است و برای اندازه‌گیری کمی نمونه‌های مثبت به آزمایش نور سیاه روش‌های دیگر لازم است [٥٨].

٤-٢-بیوحسگرها

حسگرهای کوچک، قابل حمل با قابلیت تحلیل داده‌ها هستند. این حسگرها به صورت انتخابی و با حساسیت بالا قادر به تشخیص مواد بیولوژیکی و شیمیایی هستند [٥٩]. هنگامی که آنالیت مورد نظر پیوند برقرار می‌کند برهم‌کنش‌های خاصی اتفاق می‌افتد که منجر به تغییر برخی خواص فیزیکی و شیمیایی مانند Hp، انتقال الکترون، جرم یا گرما می‌شود که توسط مبدل‌ها اندازه‌گیری می‌شود. با توجه به روش انتقال سیگنال‌ها حسگرهای زیستی به انواع مختلف تقسیم می‌شوند: الکتروشیمیایی، نوری، دماسنجی، پیزوالکتریک یا مغناطیسی. در خصوص تشخیص آفلاتوکسین حسگرهای الکتروشیمیایی و نوری رایج‌تر هستند [٦٠]. آفلاتوکسین‌ها دارای اثر مهاری بر روی استیل‌کولین استراز (AchE) هستند و تشخیص آن‌ها با کاهش فعالیت استیل‌کولین استراز همراه است که با استفاده از بیوسنسور آمپرومتریک کولین اکسیداز در زمان کوتاهی اندازه‌گیری می‌شود [٦١]. ایمونوحسگرها بیوحسگرهایی هستند که پاسخ‌های بیولوژیکی ناشی از تعامل بین آنالیت و یک عنصر بیولوژیکی را از طریق ردیاب به صورت سیگنال‌های الکتریکی ثبت می‌کند [٦٢]. ساده بودن استفاده از بیوحسگرها، عدم نیاز به آماده‌سازی‌های پیچیده و هزینه‌بر، حد تشخیص پایین و قابلیت حمل از مزایای استفاده از بیوحسگرها می‌باشد[٥٧].

٥- نتیجه‌گیری

روش‌های مختلفی برای تشخیص و اندازه‌گیری آفلاتوکسین‌ها وجود دارد که به برخی از آن‌ها اشاره کردیم. در طول زمان این روش‌ها بهبود می‌یابند و یا با روش‌های پیشرفته‌تر جایگزین می‌شوند. روش‌های کروماتوگرافی به طور گسترده در تشخیص و اندازه‌گیری آفلاتوکسین‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرند، اما برخی از آن‌ها به دلیل تجهیزات گران قیمت و مراحل دشوار محدود به آزمایشگاه‌های خاصی می‌شوند. به همین دلیل لازم است که روش‌های ساده‌تر و در دسترس‌تری جایگزین شود. در بین روش‌های موجود، استفاده از ستون‌های ایمونوافینیتی جهت استخراج سم و اندازه‌گیری آن به وسیله HPLC معمول‌ترین روش برای تشخیص و تعیین آفلاتوکسین‌ها است. روش‌های ایمونوشیمیایی و اسپکتروسکوپی پس از روش‌های کروماتوگرافی کشف شدند که روش ایمونواسی برای انجام آزمون‌های رایج و تشخیص آلودگی در محل گزینه مناسب‌تری می‌باشد. همچنین با توجه به پیشرفت‌های اخیر روش‌های مبتنی بر ایمونوشیمیایی محبوبیت بیشتری نیز پیدا کرده‌اند. البته در برخی موارد این روش‌ها نیاز به تایید نهایی توسط روش‌های قوی‌تر دارند. تحقیق روی روش‌های ساده‌تر، بدون نیاز به نشانه‌گذاری با حساسیت بالا برپایه ایمونو بیوحسگرها می‌تواند منجر به تولید ابزارهای پرکاربرد، حساس، قابل حمل و دقیق برای تشخیص آفلاتوکسین‌ها در محل آلودگی و با قابلیت کار میدانی باشد. در نتیجه، روش‌های تشخیص و تجزیه و تحلیل آفلاتوکسین‌ها نیز با گذشت زمان به پیشرفت خود ادامه می‌دهند.

٦- مراجع

[1]. Alcaide Molina, M., Ruiz-Jiménez, J., Mata-Granados, J., & Luque de Castro, M. (2009). High through-put aflatoxin determination in plant material by automated solidphase extraction on-line coupled to laser-induced fluorescence screening and determination by liquid chromatography-triple quadrupole mass spectrometry. Journal of Chromatography, 1216 (7), 1115–1125.

[2]. Ali, N., Hashim, N., Saad, B., Safan, K., Nakajima, M., & Yoshizawa, T. (2005). Evaluation of a method to determine the natural occurrence of aflatoxins in commercial traditional herbal medicines from Malaysia and Indonesia. Food and chemical toxicology, 43 (12), 1763–1772.

[3]. Fung, F., & Clark, R. F. (2004). Health effects of mycotoxins: a toxicological overview. Toxicol. Clin. Toxicol. 42, 217–234.

[4]. Payne, G. A., & Brown, M. P. (1998). Genetics and physiology of aflatoxin biosynthesis. Phytopathol. 36, 329–362.

[5]. Giniani Carla D, Sergiane C, Vivian F, Renata H. B, Helen C. d. S. H, Michele M. S, Melissa d. S. O, Jaqueline G.B, Ednei G. P, Eliana B.F. (2011). Aflatoxins: contamination, analysis

and control. Aflatoxins-Biochemistry and Molecular Biology, 415–438, InTech, Shanghai, China.

[6]. Weidenbörner, M. (2001). Encyclopedia of food mycotoxins. and analysis. Aflatoxins—Detection,Measurement and Control, 183–208. Springer-Verlag Berlin Heidelberg , ISBN 978-3-662-04464-3.

[7]. Ayub, M., & Sachan, D., (1997). Dietary factors affecting aflatoxin bi carcinogenicity. Malaysian Journal of Nutrition. 3, 161– 197.

[8]. Meritxell, V, Antonio, G, Ivan, A, Jordi, D, Francesc, B, Montserrat, A, & Lluís, C. (2004). Determination of aflatoxins B1, G1, B2 and G2 in medicinal herbs by liquid chromatography-tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1048(1),25–29.

[9]. Peter Z, & Bernhard M.H. (2006). Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionization mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1136(2),123–169.

[10]. Bankole S. A, & Adebanjo A. (2003). Mycotoxins in food in West Africa: current situation and possibilities of controlling it. Biotechnol, 2, 254-263.

[11]. Joerg S, & Elke A. (2002). New strategies for the screening and determination of aflatoxins and the detection of aflatoxin-producing moulds in food and feed.TrAC Trends in Analytical Chemistry, 21(2), 90–95.

[12]. Costanza C, Chiara D, Arnaldo D, & Roberto P. (2007). A portable fluorometer for the rapid screening of M1 aflatoxin. Sensors and Actuators B: Chemical, 126(2), 467–472.

[13]. Li, P.; Zhang, Q.; Zhang, W.; Zhang, J.; Chen, X.; Jiang, J.; Xie, L. & Zhang, D. (2009).Development of a class-specific monoclonal antibody-based ELISA for aflatoxins in peanut. Food Chemistry,115: 313–317.

[14]. asaru M, Tetsuhisa G, & Shinji M. (1978) High-performanceLiquid Chromatography of Aflatoxins with Fluorescence Detection, Agricultural and BiologicalChemistry, 42, 11.

[15]. Pranita J, Shyam N. J, & Jaspreet K. (2018). Detection of aflatoxin M1 in milk using spectroscopy and multivariate analyses. Food Chemistry,238, 209-214.

[16]. Carlson, M., Bargeron, C., Benson, R., Fraser, A., Phillips, T., Velky, J., Groopman, J., Strickland, P., & Ko, H. (2000). An automated, handheld biosensor for aflatoxin. Biosensors and Bioelectronics, 14(10-11),841–848.

[17]. Gilbert, J. & Vargas, E. (2003). Advances in sampling and analysis for aflatoxins in food and animal feed. Toxin Reviews, 22(2-3),381–422.

[18]. Elizalde-Gonzalez, M., Mattusch, J., & Wennrich, R. (1998). Stability and determination of aflatoxins by high-performance liquid chromatography with amperometric detection. Journal of Chromatography A, 828(1-2), 439–444.

[19]. Hajian, R. & Ensafi, A. (2009). Determination of aflatoxins B1 and B2 by adsorptive cathodic stripping voltammetry in groundnut. Food Chemistry,.115(3), 1034–1037.

[20]. Rajan, HV. (2015) Development and validation of HPLC method - A Review.International. Journal of current research in pharmacy.;1(2), 55-68.

[21]. Vosough, M., Bayat, M., & Salemi, A. (2010). Matrix-free analysis of aflatoxins in pistachio nuts using parallel factor modeling of liquid chromatography diodearray detection data. Analytica chimica acta, 663(1):11–18.

[22]. Sapsford K.E, Miriam M. N, Michael E. L, Lisa C. S.-L, Chris R. T, & Frances S. L. (2006). Rapid detection of foodborne contaminants using an array biosensor. Sensors and actuators B: chemical, 113 (2), 599–607.

[۲۳]. استاندارد ملی ایران ٦٩٦٦، (۱۸۳۱)، مواد غذايي تعيين آفلاتوكسين گروه¬هاي – G,B در مواد غذايي مختلف به وسيلة كروماتوگرافي صفحه نازك و تخليص بوسيلة ستون ايمونوافينيتي روش آزمون

[24]. Fuchs, B. et al. (2010). Lipid Analysis by Thin-Layer Chromatography-A Review of the current State. Journal of Chromatography A, 19,2754-74.

[25]. M. Trucksess,W. Brumley, & S.Neshei. (1984). Rapid quantitation and confirmation of aflatoxins in corn and peanut butter, using a disposable silica gel column, thin layer chromatography, and gas chromatography/mass spectrometry. Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 67, 973–975.

[26]. Li, P., Zhang, Q., & Zhang, D. (2011). Aflatoxin measurement

[27]. Malviya, R., Bansal, V., Pal, O.P, & Sharma, P.K. (2010). High performance liquid chromatography: a short review. Journal of Global Pharma Technology,2, 22–26.

[28]. Xiang, Y., Liu, Y., & Lee, M.L. (2006). Ultrahigh pressure liquid chromatography using elevated temperature, Journal of Chromatography A,1104, 198–202.

[29]. Hussain, I. (2011). Aflatoxin Measurement and Analysis, Aflatoxins - Detection, Measurement and Control, Dr Irineo Torres-Pacheco (Ed.), ISBN: 978-953-307-711-6

[30]. Rahmani, A., Jinap, S., & Soleimany, F. (2009). Qualitative and quantitative analysis of mycotoxins, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 202–251.

[31]. Li, P., Zhang, Q., & Zhang, D. (2011) Aflatoxin measurement and analysis, in Aflatoxins—Detection,Measurement and Control, 26, 183–208.

[32]. Zhang, L. (2018). A review of current methods for analysis of mycotoxins, herbal medicine Toxins, 10, 65.

[33]. Akiyama, H., Goda, Y., Tanaka, T., & Toyoda, M.(2001). Determination of aflatoxins B1, B2, G1and G2 in spices using a multifunctional column clean-up. Journal of Chromatography A, 932 ,153.

[34]. Stroka, J., von Holst, C., Anklam, E., & Reutter, M. (2003). Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography using post-column bromination for determination of aflatoxin B1 in cattle feed: collaborative study.J. AOAC Int. 86, 1179.

[35]. Joshua, H. (1993). Determination of aflatoxins by reversed-phase high performance Liquid

chromatography with post-column in-line photochemical derivatization and fluorescence detection. Journal of Chromatography, 654, 247-254

[36]. Waltking, A. E., & Wilson, D. (2006). Liquid chromatographic analysis of aflatoxin using postcolumn photochemical derivatization: collaborative study. Journal of AOAC International, 89, 678-692.

[37]. Herzallah, S.M. (2009). Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors, Food Chemistry, 114(3), 1141–1146.

[38]. Takino, M. & Tanaka, M. (2008). Determination of Aflatoxins in Food by LC-MS/MS, Agilent Technologies.

[39]. Rahmani,A., Jinap, S., & Soleimany, F. (2009). Qualitative and quantitative analysis of mycotoxins, Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 8(3), 202–251.

[40]. Sargent, A., & Sadik, O.A. (1999). Monitoring antibody-antigen reactions at conducting polymer-based immunosensors using impedance spectroscopy, Electrochimica Acta, 44(26), 4667–4675.

[41]. Alex, P., Wacoo, D. W, Peter, C. V., & Joseph, F. H. (2014). Methods for Detection of Aflatoxins in Agricultural Food

Development of a membrane-based immunofiltration assay for the detection of T-2 toxin. Analytical chemistry, 76 (14), 4237–4240.

[53]. Huybrechts, B. (2011). Evaluation of Immunoassay Kits for Aflatoxin Determination in Corn & Rice, CODA-CERVA National Reference Laboratory on Mycotoxins.

[54]. Schumacher, A., & Magnuson, T. (1997). Murine Polycomband trithorax-group genes regulate homeotic pathways and beyond. Trends in genetics, 13 (5), 167–170.

[55]. Josephs, R., Schuhmacher, R., & Krska, R. (2001). International interlaboratory study for the determination of the Fusarium mycotoxins zearalenone and deoxynivalenol in agricultural commodities. Food additives & contaminants, 18 (5), 417–430.

[55]. Krska, R., & Molinelli, A., (2006). Mycotoxin analysis: state--ofthe- art and future trends. Analytical and bioanalytical chemistry, 387 (1), 145–148.

[56]. Mustafa, M., Amran, G., Muttaquina, H.. Rezaul, I,, Shah Mohammad, F., & Tahmeed, A.(2018). General and advanced methods for the detection and measurement of aflatoxins and aflatoxin metabolites: a review. Toxin Reviews,5:1-15

[57]. Alejandro, E.C., Luis, M. C. M., Rafael, F. M.H., Jesṡ Roberto, M. A., Ramń G. G. G., & Irineo, T.P. (2011). Methods for detection and quantification of aflatoxins. In Aflatoxins—Detection, Measurement and Control, Intech: Rijeka, Croatia, 109–128.

[58]. Paddle, B. (1996). Biosensors for chemical and biological agents of defence interest. Biosensors and Bioelectronics, 11(11), 1079–1113.

[59]. Velasco-Garcia, M., & Mottram, T. (2003). Biosensor technology addressing agricultural problems.

Crops, Applied Chemistry, 2014:15-16.

[42]. Berson, S.A., & Yalow, R.S. (1968). General principles of radioimmunoassay, Clinica Chimica Acta, 22(1), 51–69.

[43]. Langone, J.J., & van Vunakis, H. (1976). Aflatoxin B1: specific antibodies and their use in radioimmunoassay, Journal of the National Cancer Institute, 56(3), 591–595.

[44]. Tsuboi, S., Nakagawa,T., &. Tomita, M. (1984). Detection of aflatoxin B1 in serum samples of male Japanese subjects by radioimmunoassay and high-performance liquid chromatography, Cancer Research, 44(3),1231–1234.

[45]. Matabaro, E. (2017). Current immunoassay methods for the rapid detection of aflatoxin in milk and dairy products. Comprehensive reviews in food science and food safety, 16, 808–820.

[46]. Twyman, R., Immunoassays, applications, 2005.

[47]. Hesterberg, L.K. & Crosby, M.A. (1996). An overview of rapid immunoassays. Laboratory medicine, 27 (1), 41–46.

[48]. Avrameas, S.(1969). Coupling of enzymes to proteins with glutaraldehyde. Use of the conjugates for the detection of antigens and antibodies, Immunochemistry, 6(1), 43–52.

[49]. Aycicek, H., Aksoy, A. & Saygi, S. (2005). Determination of aflatoxin levels in some dairy and food products which consumed in Ankara, Turkey. Food Control, 16(3), 263-266.

[50]. Pestka, J.J., Gaur, P.K., & Chu, F.S. (1980). Quantitation of aflatoxin B1 and aflatoxin B1 antibody by an enzyme-linked immunosorbent microassay. Applied and EnvironmentalMicrobiology, 40(6), 1027–1031.

[51]. Park, D.L., Miller, B.M, & Hart, L.P.. (1989). Enzyme-linked immunosorbent assay for screening aflatoxin B1 in cottonseed products and mixed feed: collaborative study, Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 72(2):326-32.

[52]. Pal, A., Acharya, D., Saha, D., & Dhar, T. K. (2004).

Biosystems engineering, 84(1), 1–12.

[60]. Velasco-Garcia, M., & Mottram, T. (2003). Biosensor technology addressing agricultural problems. Biosystems engineering, 84(1), 1–12.

[61]. Nayak, M., Kotian, A., Marathe, S., & Chakravortty, D. (2009). Detection of microorganisms using biosensors–A smarter way towards detection techniques. Biosensors and Bioelectronics, 25(4), 661–667.

[62]. Morgan, C.L., Newman, D.J., & Price, C. (1996). Immunosensors: technology and opportunities in laboratory medicine. Clinical chemistry, 42, 193–209.