

آلودگی به آفلاتوکسین ها و اکرآتوکسین A در فلفل قرمز ایرانی پس از برداشت

رزیتا سالاری^{۱*}، محمد باقر حبیبی نجفی^۲، محمد طاهر بروشکی^۳، سید علی
مرتضوی^۲، محسن فتحی نجفی^۴

- ۱- اداره نظارت بر مواد خوراکی و آشامیدنی، معاونت غذا و دارو، دانشگاه علوم پزشکی 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
(تاریخ دریافت: ۹۰/۷/۷ تاریخ پذیرش: ۹۰/۱۰/۲۸)

چکیده

مایکوتوکسین ها متابولیت های سمی تولید شده توسط برخی از گونه های جنس های قارچی از قبیل *آسپرژیلوس*، *پنیسیلیوم* و *فوزاریوم* می باشند. این ترکیبات در بسیاری از گونه های جانوری و انسان، سرطان زا، جهش زا، عامل ناقص الخلقه زایی و سرکوب کننده سامانه ایمنی هستند. انسان از طریق غذاهایی همچون شیر، غلات، حبوبات و ادویه های مختلف در معرض آفلاتوکسین و اکرآتوکسین قرار می گیرد. هدف از این مطالعه تعیین محتوای آفلاتوکسین (AF) و اکرآتوکسین A (OTA) موجود در فلفل قرمز ایران (سبزوار) توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) با آشکارساز فلورسانس و با استفاده از ستون خالص ساز ایمونوآفینیته می باشد. از فاز متحرک آب- استونیتریل - متانول (۶۰:۲۵:۱۵، v/v/v) در تعیین آفلاتوکسین ها و از فاز متحرک آب- استونیتریل- استیک اسید (۴۷:۵۱:۲، v/v/v) در تعیین اکرآتوکسین A با سرعت جریان ۱/۰ میلی لیتر در دقیقه استفاده گردید. حد تشخیص (LOD) و حد تعیین مقدار (LOQ) به ترتیب برای AFB1 و AFB2 ۰/۱ و ۰/۳ میکروگرم در کیلوگرم، برای AFG1 و AFG2 ۰/۱۴ و ۰/۴۵ میکروگرم در کیلوگرم و برای OTA ۰/۱۵ و ۰/۵ میکروگرم در کیلوگرم بدست آمد. مقادیر متوسط بازیافت مایکوتوکسین ها ۹۶/۲-۷۱/۱ درصد بود و محدوده بازیافت هنگامی که AFB1 و AFG1 در سطح ۱۰ میکروگرم در کیلوگرم، AFB2 و AFG2 در سطح ۲ میکروگرم در کیلوگرم و OTA در سطح ۵ میکروگرم در کیلوگرم به فلفل قرمز اضافه شده بود، برای AFB1، AFB2، AFG1 و AFG2 به ترتیب ۸۹/۲-۸۲/۷ درصد، ۱۱۴/۲-۷۹/۳ درصد، ۷۱/۹-۶۶/۵ درصد، ۹۲/۵-۶۶/۳ درصد و ۸۰-۶۱/۱ درصد به دست آمد. در این تحقیق، ۳۶ نمونه فلفل از سطح مزرعه جمع آوری و تا رسیدن به رطوبت استاندارد (حداکثر ۱۱ درصد) در آفتاب (با میانگین دمای روزانه 25 ± 5 درجه سانتیگراد و میانگین رطوبت نسبی محیطی 35 ± 5 درصد) خشک گردید. آفلاتوکسین کل در ۲۵ نمونه (۶۹/۴ درصد) از ۳۶ نمونه تحت آزمایش تشخیص داده شد و میزان این آلودگی ۱۵/۶-۰/۴ با انحراف معیار ۳/۹ میکروگرم بر کیلوگرم بود. از بین انواع آفلاتوکسین ها، آفلاتوکسین B1 بالاترین شیوع آلودگی را دارا بوده و در ۲۵ نمونه از مجموع ۳۶ نمونه یافت شد. از نمونه های مورد آزمایش، به ترتیب هفت نمونه (۱۹/۵ درصد) و سه نمونه (۸/۳۴ درصد) دارای میزان آفلاتوکسین بالاتر از محدودیت های نظارتی اتحادیه اروپا برای AFB1 (۵ میکروگرم بر کیلوگرم) و آفلاتوکسین کل (۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم) بود. میزان OTA نیز در شش نمونه (۱۶/۷ درصد) در مقادیر ۲/۱۷-۰/۷۴ با انحراف معیار ۰/۶۲ میکروگرم بر کیلوگرم شناسایی شد. مقادیر OTA در هیچ یک از نمونه ها بالاتر از محدودیت های قانونی مجاز نبود.

کلید واژگان: ادویه، فلفل قرمز، آفلاتوکسین، اکرآتوکسین، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا.

* مسئول مکاتبات: r_salari2001@yahoo.com

۱- مقدمه

کپک ها به طور گسترده ای به عنوان آلاینده های زیست محیطی مطرح بوده و تحت شرایط مطلوب دمایی و رطوبتی، بر روی بسیاری از مواد غذایی از جمله ادویه ها رشد پیدا می کنند. رشد کپک ها باعث کاهش کیفیت مواد غذایی و همچنین ایجاد خطری بالقوه برای سلامتی انسان به دلیل تولید متابولیت های سمی شناخته شده تحت عنوان مایکوتوکسین ها می شود. مایکوتوکسین ها در بسیاری از نقاط جهان در مواد غذایی مختلف شناسایی شده اند و در حال حاضر به عنوان یکی از خطرناک ترین آلاینده های مواد غذایی به حساب می آیند [۲ و ۱].

در میان ۴۰۰ مایکوتوکسین شناخته شده، آفلا توکسین به دلیل اثرات شدید سم زایی، سرطان زایی، نقص در جنین و جهش زایی آن، خطرناک ترین سم برای سلامتی انسان می باشد [۳ و ۴]. آفلاتوکسین B1 (AFB1) سمی ترین ترکیب از این گروه است و به طور کلی در بالاترین غلظت در مواد غذایی و علوفه دامی مشاهده می شود [۵]. این ترکیب در انسان سمیت کبدی ایجاد نموده و سرطان زا است. اکرآتوکسین A (OTA) نیز یکی از مهم ترین مایکوتوکسین ها با وقوع و سمیت وسیع در سراسر جهان است. این ترکیب در کبد و کلیه ایجاد سمیت می کند و این احتمال وجود دارد که در انسان توانایی سرطان زایی داشته باشد [۶]. هر دو گروه از این مایکوتوکسین ها به طور مشترک می توانند در طیف وسیعی از فراورده های غذایی از جمله ادویه ها مشاهده گردند [۲].

ادویه های تجاری به طور فزاینده ای در طیف گسترده ای از وعده های غذایی تهیه شده توسط مصرف کنندگان به منظور ارتقاء طعم و عطر و ایجاد تنوع در آشپزخانه گنجانده شده اند. در واقع، ادویه ها می تواند منبع انتقال آلودگی مایکوتوکسین ها به انسان باشند زیرا معمولاً یا به صورت خام مصرف می شوند و یا به غذاهای آماده مصرف اضافه می شوند. در سال های اخیر محققان مختلفی وقوع طبیعی آفلاتوکسین در ادویه ها و همچنین

آلودگی به اکرآتوکسین در ادویه، غلات، قهوه، انگور، کشمش و آجور را مورد مطالعه قرار دادند [۷-۱۴]. حدود قابل قبول آفلاتوکسین در ادویه در کشورهای مختلف متفاوت است. در اتحادیه اروپا، سطوح قابل قبول آفلا توکسین در ادویه ها، ۵ میکروگرم بر کیلوگرم برای آفلاتوکسین B1 و ۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم برای آفلا توکسین کل تنظیم شده است [۱۵]. اگرچه اتحادیه اروپا مقررات خاصی در مورد OTA در ادویه ها به طور عمومی و یا در فلفل قرمز به طور خاص ندارد ولیکن با توجه به حد قابل تحمل مصرف روزانه برای OTA می توان حداکثر میزان بین ۱۰ و ۲۰ میکروگرم بر کیلوگرم را در این مورد در نظر گرفت که در واقع، این حدود در تجارت بین المللی ادویه پذیرفته شده است [۱۶ و ۱۷].

فلفل نوعی گیاه از خانواده تاجریزی (*Solanaceae*) است. برخی از گونه های جنس فلفل کپسیکوم مانند فلفل قرمز به شکل پودر خشک شده مورد مصرف قرار می گیرد. خراسان رضوی (استان واقع در شمال شرق ایران) یکی از مهم ترین تولیدکننده های فلفل قرمز تند در ایران است که با توجه به شرایط آب و هوایی مرطوب و گرم این منطقه، احتمال آلودگی فلفل قرمز به مایکوتوکسین در طی برداشت، پس از برداشت و ذخیره سازی وجود دارد.

هدف از این مطالعه تعیین آلودگی آفلا توکسین و OTA در فلفل قرمز تولید شده در ایران (استان خراسان رضوی) بود. علاوه بر این، با توجه به مصرف بالای این ادویه در ایران، این مطالعه با هدف ارائه اطلاعات مفید در مورد میزان آفلا توکسین و OTA در فلفل قرمز به منظور دستیابی به برخی کنترل ها در ارزیابی خطر مصرف این محصول و همچنین مطالعه روش آلودگی زدایی فلفل قرمز قبل از عرضه انجام شده است. بررسی منابع، عدم پژوهش در زمینه تعیین مایکوتوکسین های در ادویه های بومی ایران را نشان می دهد و این مطالعه اولین تحقیق انجام شده در زمینه تایید وقوع آفلاتوکسین و OTA در فلفل قرمز ایران است.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- نمونه گیری

فلفل قرمز تند از شهرستان سبزوار (شهری در استان خراسان رضوی) انتخاب شد. این فلفل به عنوان ادویه بومی در این استان شناخته شده است. برداشت این نوع فلفل قرمز از اواخر فصل تابستان آغاز شده و تا اوایل پاییز ادامه می یابد. سی و شش نمونه خشک شده از آن (خشک شده در آفتاب و هوای آزاد) به صورت تصادفی در طی این دوره جمع آوری شد. با توجه به اینکه کل نمونه ها در طی شش چین و در طی حدود سه ماه برداشت گردید و خشک کردن نمونه های هر چین بلافاصله پس از برداشت آن چین و به صورت سستی در زیر نور آفتاب تا رسیدن به رطوبت حدود ۱۰ درصد انجام شد (طبق استاندارد ملی ایران به شماره ۱۷۲۶ تحت عنوان ویژگیهای کپسیکوم، حداکثر میزان مجاز رطوبت در فلفل قرمز خشک شده ۱۱ درصد می باشد)، لذا شرایط دمایی و رطوبتی در زمان خشک کردن هر چین با چین دیگر تا حدودی متفاوت بوده و بطور متوسط در طی این سه ماه، میانگین دمای روزانه 25 ± 5 درجه سانتیگراد و میانگین رطوبت نسبی محیط 35 ± 5 درصد بوده است. متوسط اندازه نمونه های جمع آوری شده در این بازه زمانی بین ۲۵۰ گرم و ۱ کیلوگرم بود. نمونه ها تحت شرایط دمایی محیط به آزمایشگاه منتقل گردید و پس از آن در کیسه های پلی اتیلن قرار داده شد و تا قبل از انجام آزمون ها در دمای -20 درجه سانتی گراد ذخیره شدند.

۲-۲- استاندارد ها و معرف ها

تمام مواد شیمیایی به استثناء متانول و استونیتریل (درجه HPLC) دارای درجه آزمایشگاهی بودند و از شرکت مرک خریداری شدند. همه محلول ها با آب دیونیزه تهیه شدند. استانداردهای AFG1, AFB2, AFB1, AFG2 و OTA از شرکت سیگما خریداری شد. محلوله ای استاندارد مادر آفلا توکسین در تولوئن - استونیتریل (۹۸:۲, v/v) و محلول های استاندارد مادر OTA با تولوئن - اسید استیک (۹۹:۱, v/v) آماده شد.

مجموعه ای از محلول های استاندارد کاری از طریق تبخیر حجم شناخته شده از محلول های ذخیره تحت جریان N_2 ، به دنبال انحلال در فاز متحرک LC آماده شد [۱۸] و غلظت آنها با استفاده از طیف نورسنج طبق روش AOAC کنترل گردید [۱۹]. این محلول ها به منظور رسم منحنی درجه بندی مورد استفاده قرار گرفتند. ستون ایمونوآفینیتی برای آفلاتوکسین (Aflatest P) و اکرآتوکسین (Ochrates TM) از (Vicom MA) Watertown تهیه شد.

۲-۳- آماده سازی نمونه ها

فلفل ها با استفاده از یک آسیاب آزمایشگاهی آسیاب شدند و پس از آن به منظور دستیابی به یک ترکیب یکنواخت توسط دستگاه مخلوط کن (Omni-Mixer, Sorwall, Newton) مخلوط شدند.

۲-۳-۱- استخراج و خالص سازی آفلاتوکسین

آفلا توکسین در ادویه ها با توجه به روش شرح داده شده توسط استروکا و همکاران (2000) و زینالدین و همکاران (2006) تجزیه شد [۱۸و۸]. در روش استخراج، ۵۰ گرم از نمونه آسیاب شده و ۵ گرم سدیم کلراید را به ۳۰۰ 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 کاغذ صافی واتمن شماره ۴ صاف گردید. سپس ۱۰ میلی لیتر از عصاره با ۶۰ میلی لیتر محلول phosphate (PBS) buffer saline رقیق گردیده و ۶۶ میلی لیتر از محلول صاف شده رقیق شده برای ستون ایمونوآفینیتی (Vicom Aflatest P) که قبلا با ۱۰ میلی لیتر PBS آماده شده است، بکار برده شد (سرعت جریان حدود ۳ میلی لیتر / دقیقه). ستون را با ۱۵ میلی لیتر آب شستشو داده و سپس خشک نمودیم. 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.

۲-۳-۲- استخراج و خالص سازی

اکراتوکسین A

اکراتوکسین A در فلفل قرمز با توجه به روش بکار برده شده توسط عبدالکادر و همکاران (۲۰۰۴) با برخی تغییرات، تجزیه شد [۲۰]. ۲۵ گرم از نمونه آسیاب شده و ۲/۵ گرم سدیم کلراید 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 با کاغذ صافی واتمن صاف گردید و سپس به مدت ۱۰ دقیقه در ۴ درجه سانتی گراد 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 Ochrates 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.

۲-۴- اندازه گیری آفلاتوکسین و

اکراتوکسین A با استفاده از HPLC

تعیین آفلاتوکسین ها و اکرآتوکسین A با استفاده از سیستم کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (Waters, Milford, MA, USA) و با ستون سیلیکاژل C18 فاز معکوس (طول ستون ۲۵۰ میلی متر، قطر ستون ۴/۶ میلی متر، اندازه ذرات ۵ میکرومتر (Purospher star) (column, Merck, Germany) مجهز به پمپ و تزریق خودکار (Waters 2695 Separation Module, Waters, Milford, MA, USA) آشکارساز فلورسانس (Waters 474 fluorescence detector, Waters, Milford, MA, USA) انجام شد. دمای ستون ۴۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. طول موج های تحریک و نشر به ترتیب برای

آفلاتوکسین در ۳۶۰ و ۴۴۰ نانومتر و برای اکرآتوکسین A در ۳۳۳ و ۴۶۰ نانومتر تنظیم شد. از فاز متحرک آب- استونیتریل - متانول (۶۰:۲۵:۱۵، V / V / V) در تعیین آفلاتوکسین ها و از فاز متحرک آب-استونیتریل -استیک اسید (۴۷:۵۱:۲، V / V / V) در تعیین اکرآتوکسین A با سرعت جریان ۱/۰ میلی لیتر در دقیقه و حجم تزریق ۱۰۰ میکرولیتر استفاده گردید.

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 شده است. اندازه گیری هر سم، از طریق اندازه گیری سطح زیر پیک آن در زمان بازداری و مقایسه آنها با منحنی درجه بندی استاندارد مربوطه انجام شد.

۲-۵- درجه بندی

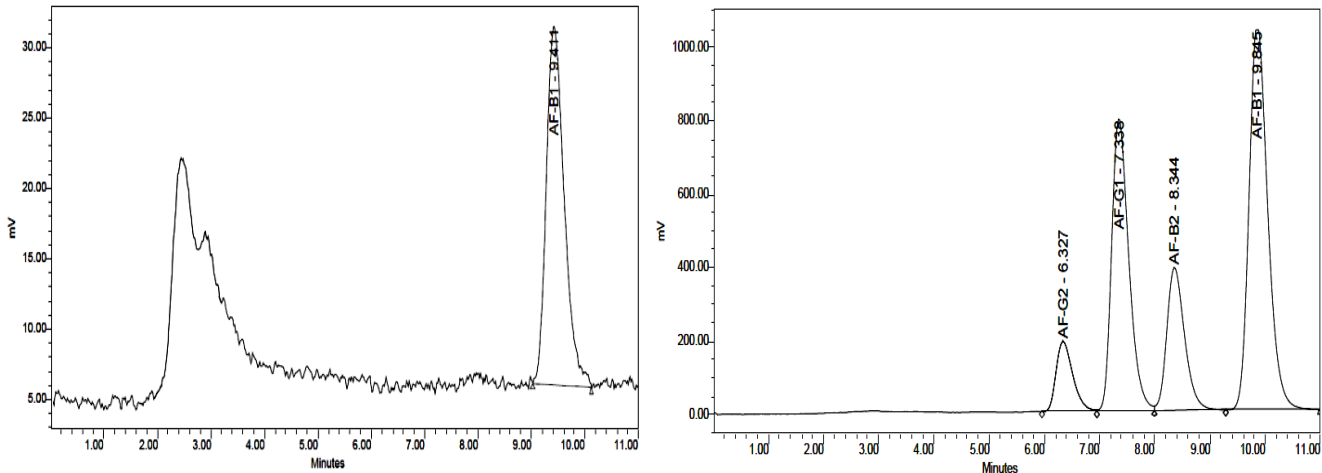
استانداردهای آفلاتوکسین ها و OTA به منظور آماده سازی محلول های کاری با فاز متحرک رقیق شد. منحنی درجه بندی با رسم سطح زیرپیک هر استاندارد در برابر میزان مایکروتوکسین های تزریق شده، به دست می آید. شیب و عرض از مبدا داده های منحنی درجه بندی به منظور محاسبه مقدار ترکیب مورد آزمون در عصاره نمونه، مورد استفاده قرار گرفت.

منحنی درجه بندی با استفاده از محلول های استاندارد درجه بندی با غلظت های ۰/۴، ۱/۲، ۲/۰، ۲/۸، ۳/۶، ۵/۶ و ۷/۲ نانوگرم بر میلی لیتر برای آفلاتوکسین B1 و G1 و ۰/۰۸، ۰/۲۴، ۰/۴، ۰/۵۶، ۰/۷۲، ۱/۱۲ و ۱/۴۴ نانوگرم بر میلی لیتر برای آفلاتوکسین B2 و G2 و ۰/۵، ۱/۰، ۲/۰، ۵/۰، ۱۰/۰ و ۱۵/۰ نانوگرم بر میلی لیتر برای اکرآتوکسین A تهیه شد.

۲-۶- حد تشخیص و حد تعیین مقدار

حد تشخیص (LOD)^۱ به کمترین غلظت قابل شناسایی از هر یک از مایکروتوکسین ها گفته می شود که مفهوم ریاضی آن، میانگین پاسخ (سیگنال)^۲ ایجاد شده توسط نمونه شاهد بعلاوه سه برابر انحراف معیار آن است.

1. Limit of Detection
2. Signal

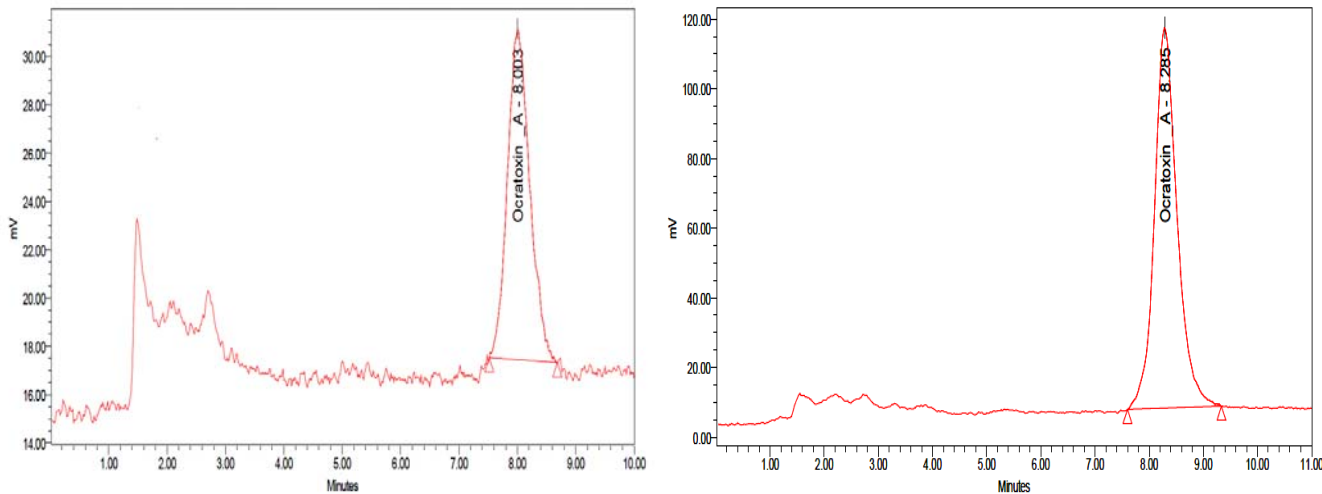


شکل ۱ کروماتوگرام های HPLC آفلاتوکسین

(الف) کروماتوگرام استاندارد آفلاتوکسین ها (زمان رانش تزریق: ۱۱ دقیقه، زمان بازداری: برای AFG2: ۶/۳۲ دقیقه، برای

AFG1: ۷/۳۳ دقیقه، برای AFB2: ۸/۳۴ دقیقه، برای AFB1: ۹/۸۴ دقیقه)

(ب) کروماتوگرام نمونه فلفل قرمز آلوده به آفلاتوکسین B1



شکل ۲ کروماتوگرام های HPLC اکرآتوکسین A

(الف) کروماتوگرام استاندارد اکرآتوکسین A (زمان رانش تزریق: ۱۱ دقیقه، زمان بازداری OTA: ۸/۲۸ دقیقه)

(ب) کروماتوگرام نمونه فلفل قرمز آلوده به اکرآتوکسین A

و در کنار آن دو نمونه فاقد آلودگی نیز به عنوان نمونه شاهد قرار داده شد. نمونه های آلوده شده و نمونه های شاهد به روش HPLC تجزیه شدند. میزان بازیافت با مقایسه مقدار آفلا توکسین و OTA افزوده شده با مقدار آفلا توکسین و OTA اندازه گیری شده تعیین شد.

۲-۸- تجزیه آماری

آمار توصیفی (میانگین، انحراف استاندارد، دامنه، حداکثر و متوسط) و تجزیه دو طرفه واریانس (ANOVA) با استفاده از نرم افزار Minitab (نسخه ۱۳/۲، PA) انجام شد.

حد تعیین مقدار (LOQ)^۳ به کمترین غلظتی از میکروتوکسین در نمونه که با صحت و دقت قابل قبول اندازه گیری شود، گفته می شود [۲۱].

۲-۷- اعتبار سنجی

آزمون های بازیافت از طریق آلوده سازی نمونه فلفل قرمز فاقد آفلاتوکسین و فاقد اکرآتوکسین A با مقادیر مشخصی از آفلا توکسین (۲ و ۱۰ ppb) و اکرآتوکسین A (۵ ppb) انجام شد. این عمل در سه تکرار انجام شد.

3. Limit of Quantification

۳- نتایج و بحث

۳-۱- ارزیابی روش آزمون

منحنی درجه بندی به دست آمده برای آفلاتوکسین در گستره ی غلظتی $0/08 - 7/2$ نانوگرم بر میلی لیتر خطی بود و ضریب همبستگی برای AFB2, AFB1, AFG1 و AFG2 به ترتیب $0/998$, $0/999$, $0/992$ و $0/992$ حاصل شد. منحنی درجه بندی OTA نیز با ضریب همبستگی $0/998$ در گستره ی غلظتی $15 - 0/5$ نانوگرم بر میلی لیتر خطی بود.

جدول ۱ اعتبار سنجی مقادیر آفلاتوکسین و اکرآتوکسین حاصله در HPLC

سموم (ppb)	LOD	LOQ	معادله خطی	R^2	درجه آزادی
AFB1	0/1	0/3	$y=9E+06x-171624$	0/998	84/6
AFB2	0/1	0/3	$y=2E+07x-34520$	0/999	96/2
AFG1	0/14	0/45	$y=6E+06x-25447$	0/992	71/1
AFG2	0/14	0/45	$y=6E+06x-44196$	0/992	90
OTA	0/15	0/5	$y=4E+06x-24569$	0/998	71/4

^۱ حد تشخیص

^۲ حد تعیین مقدار

^۳ $x =$ غلظت سم (میکروگرم بر کیلوگرم) و $Y =$ شدت

^۴ بازیافت از طریق تزریق 10 ppb آفلاتوکسین B1 و G1،

2 ppb آفلاتوکسین B2 و G2 و 5 ppb اکرآتوکسین A به

نمونه های فلفل قرمز به دست آمد.

جدول ۱ خلاصه ای از معادله خطی، حد تشخیص (LOD)، حد تعیین مقدار (LOQ) و میانگین بازیافت آفلاتوکسین ها و OTA اندازه گیری شده را نشان می دهد. LOD برای AFB1 و AFB2 $0/1$ میکروگرم در کیلوگرم، برای AFG1 و AFG2 $0/14$ میکروگرم در کیلوگرم و برای OTA $0/15$ میکروگرم در کیلوگرم بود. LOQ نیز برای AFB1 و AFB2 $0/3$ میکروگرم بر کیلوگرم، برای AFG1 و AFG2 $0/45$ میکروگرم بر

کیلوگرم و برای OTA $0/5$ میکروگرم بر کیلوگرم بدست آمد. این نتیجه با یافته های قبلی آزمون های انجام شده بر روی آفلا توکسین و اکرآتوکسین در فلفل قرمز برزیل هماهنگ است [۲۲]. مقادیر متوسط بازیافت مایکوتوکسین ها $96/2 - 71/1$ درصد بود و محدوده بازیافت هنگامی که AFB1 و AFG1 در سطح 10 میکروگرم در کیلوگرم، AFB2 و AFG2 در سطح 2 میکروگرم در کیلوگرم و OTA در سطح 5 میکروگرم در کیلوگرم به فلفل قرمز اضافه شده بود، برای AFB1 $89/2 - 82/7$ درصد، برای AFB2 $114/2 - 79/3$ درصد، برای AFG1 $71/9 - 66/5$ درصد، برای AFG2 $92/5 - 66/3$ درصد و برای OTA $80 - 61/1$ درصد به دست آمد. نمونه ای از کروماتوگرام های HPLC بدست آمده برای محلول استاندارد و نمونه فلفل قرمز آلوده به آفلاتوکسین و اکرآتوکسین در شکل ۱ و ۲ نشان داده شده است. زمان بازداری برای AFG2 $6/32$ دقیقه، برای AFG1 $7/33$ دقیقه، برای AFB2 $8/34$ دقیقه، برای AFB1 $9/84$ دقیقه و برای OTA $8/28$ دقیقه حاصل شد.

۳-۲- نتایج تحقیق

مقادیر آفلا توکسین و اکرآتوکسین شناسایی شده در فلفل قرمز ایرانی در جدول ۲ خلاصه شده است.

۳-۲-۱- آفلاتوکسین ها

از 36 نمونه مورد آزمون، 25 مورد ($69/4$ درصد) توسط آفلا توکسین در سطوح مقادیر $15/6 - 0/4$ با انحراف معیار $3/9$ میکروگرم بر کیلوگرم آلوده بودند. هر بیست و پنج نمونه ($4/69$ درصد) توسط AFB1 در سطوح $14/5 - 0/4$ میکروگرم بر کیلوگرم با انحراف معیار $3/6$ میکروگرم بر کیلوگرم آلوده شده بودند. متوسط غلظت برای AFB1 و آفلا توکسین کل به ترتیب $4/27$ و $4/49$ میکروگرم در کیلوگرم بود. از میان نمونه های مورد آزمایش تعداد هفت ($19/5$ درصد) و سه ($8/34$ درصد) نمونه دارای مقادیر بالاتر از حدود قانونی اتحادیه اروپا برای AFB1 (5 میکروگرم بر کیلوگرم) و آفلا توکسین کل (10 میکروگرم بر کیلوگرم) بودند. آلودگی به آفلاتوکسین B2 در محدوده $1/1 - 0/34$ میکروگرم بر

تحقیقات میزان آلودگی بالای OTA در انواع مختلف غذاها 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 [۲۳ و ۲۴ و ۲۵] درصد وقوع آلودگی OTA در مطالعه ما کمتر از میزان مشاهده شده در مطالعات دیگر بود (۴۶ درصد برای میوه رسیده فلفل قرمز و ۲۰ درصد برای فلفل، فازکاس و همکاران، ۲۰۰۵، ۶۷ درصد فلفل قرمز، هیرو و همکاران، ۲۰۰۸) که می تواند به علت تفاوت در شرایط دمایی و رطوبتی دوره ذخیره سازی آنها باشد [۷ و ۲۶]. علاوه بر این، آملو و همکاران (۲۰۰۷) میزان بسیار پایینی از OTA (به طور متوسط ۳-۴ میکروگرم در کیلوگرم) را در فلفل پاپریکا برزیل مشاهده کردند [۱۶].

۳-۳- بحث

نتایج مطالعه ما نشان می دهد که میزان آلودگی به آفلا توکسین در نمونه های مورد آزمون بالاتر از میزان اکرآتوکسین بوده است که نشان دهنده این است که وارپته 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. بدین معنی که هر یک از عوامل موثر شامل شرایط آب و هوایی گرم و مرطوب، شرایط نامناسب کاشت و شرایط بهداشتی نامناسب برداشت محصول می توانند نقش عمده ای در بالا بردن میزان این سموم دارا بوده باشند. از طرف دیگر، این محصول عمدتاً تحت شرایط نورخورشید و هوای باز طی فرآیند خشک کردن مکانیکی خشک می شود بنابراین احتمال آلودگی با آفلا توکسین و اکرآتوکسین به دلیل عدم مناسب بودن و عدم کفایت فرآیند خشک شدن نیز زیاد است در نتیجه به نظر می رسد فلفل قرمز محصولی کاملاً حساس نسبت به تشکیل آفلاتوکسین به دلیل شرایط نامناسب فراوری آن می باشد.

کیلوگرم با انحراف معیار ۰/۲۵ میکروگرم بر کیلوگرم بود که در ۹ نمونه (۲۵ درصد) یافت شد. آفلاتوکسین G1 و G2 در هیچ یک از نمونه ها (جدول ۳) تشخیص داده نشدند. این نتایج کاملاً نشان می دهد که آلودگی به آفلاتوکسین در این نوع ادویه قابل توجه است و در بین انواع مختلف آفلا توکسین، AFB1 شایع ترین نوع و با بالاترین میزان است.

سایر محققان نیز سطوح بالایی از آفلا توکسین را در پودر فلفل و فلفل گزارش کرده اند. در پرتغال، مارتینز و همکاران (۲۰۰۱) آلودگی ۴۰ درصد از پودر کاری را با AFB1 در طیف وسیعی از ۱-۵ میکروگرم در کیلوگرم نشان دادند [۱]. در قطر، عبدالکادر و همکاران (۲۰۰۴) گزارش دادند که چهار نمونه از شش نمونه پودر فلفل چیلی در طیف وسیعی از ۶۹/۲۸ - ۶۰/۵ میکروگرم بر کیلوگرم به آفلاتوکسین آلوده بودند [۲۰]. در ترکیه، آیدین و همکاران (۲۰۰۷) سطوح بالایی از آلودگی AFB1 را در پودر فلفل قرمز تا سطح آلودگی ۴۰/۹ میکروگرم در کیلوگرم گزارش کرده اند [۱۰]. در ایتالیا، روماگنولی و همکاران (۲۰۰۷) به آلودگی فلفل قرمز تند در طیف وسیعی از ۳۰/۷ - ۰/۵۷ میکروگرم بر کیلوگرم اشاره نمودند [۹]. به عنوان یک نتیجه گیری، نتایج حاصل از پژوهش حاضر در توافق با یافته های فوق هستند هر چند که درصد بروز و سطوح آفلا توکسین های یافت شده در این مطالعه در مقایسه با سطوح عنوان شده در منابع دیگر نسبتاً پایین بود.

۳-۲-۲- اکرآتوکسین A

OTA در ۶ نمونه از ۳۶ نمونه مورد آزمایش (۱۶/۷ درصد) در سطوح مختلف از ۰/۷۴ تا ۲/۱۷ میکروگرم بر کیلوگرم با انحراف معیار ۰/۶۲ میکروگرم بر کیلوگرم شناسایی شد. حدود قانونی میزان مجاز آلودگی OTA در ادویه ها در اتحادیه اروپا در حال بررسی است، اما در حال حاضر برای دیگر محصولات، مانند قهوه وجود دارد که ۱۰ میکروگرم در کیلوگرم است (کمسیون مقررات اتحادیه اروپا، شماره ۱۸۸۱/۲۰۰۶). غلظت OTA در هیچ یک از نمونه های مورد آزمایش بالاتر از ۱۰ میکروگرم در کیلوگرم نبود (جدول ۳). در بسیاری از

جدول ۲ حدود مقادیر آفلاتوکسین و اکرآتوکسین در نمونه های حاوی سم (نمونه های مثبت)

تعداد نمونه حاوی سم	AFB1 میانگین ± SD ^۱ (µg/kg)	AFB2 میانگین ± SD ^۱ (µg/kg)	AFG1 میانگین ± SD ^۱ (µg/kg)	AFG2 میانگین ± SD ^۱ (µg/kg)	AFs میانگین ± SD ^۱ (µg/kg)	OTA میانگین ± SD ^۱ (µg/kg)
۱	۳/۹۰±۰/۸	ND	ND	ND	۳/۹۰±۰/۱	ND
۲	۴/۲۱±۰/۲	۰/۳۸±۰/۱	ND	ND	۴/۵۹±۰/۸	ND
۳	۵/۷۷±۰/۶	۰/۳۴±۰/۰۹	ND	ND	۶/۱۱±۰/۴	ND
۴	۷/۰۰±۰/۳	۰/۴۰±۰/۱	ND	ND	۷/۴۰±۰/۳	ND
۵	۰/۴۰±۰/۲	ND	ND	ND	۰/۴۰±۰/۲	۰/۷۴±۰/۱
۶	۲/۰۶±۰/۵	ND	ND	ND	۲/۰۶±۰/۵	ND
۷	۰/۸۰±۰/۲	ND	ND	ND	۰/۸۰±۰/۲	۰/۹۲±۰/۲
۸	۱/۲۰±۰/۰۸	ND	ND	ND	۱/۲۰±۰/۰۸	۲/۰۸±۰/۴
۹	۱۰/۵۰±۲/۳	۰/۶۰±۰/۲	ND	ND	۱۱/۱۰±۱/۴	ND
۱۰	۰/۹۱±۰/۰۷	ND	ND	ND	۰/۹۱±۰/۰۷	۱/۱۵±۰/۱
۱۱	۴/۷۸±۰/۲	ND	ND	ND	۴/۷۸±۰/۲	ND
۱۲	۵/۶۰±۰/۶	ND	ND	ND	۵/۶۰±۰/۶	ND
۱۳	۱۴/۵۰±۲/۱	۱/۱۰±۰/۳	ND	ND	۱۵/۶۰±۱/۵	ND
۱۴	۶/۱۷±۰/۸	۰/۶۴±۰/۴	ND	ND	۶/۸۱±۰/۷	ND
۱۵	۳/۸۶±۰/۹	۰/۵۰±۰/۱	ND	ND	۴/۳۶±۰/۶	ND
۱۶	۴/۹۵±۰/۳	۰/۶۵±۰/۲	ND	ND	۵/۶۰±۰/۳	ND
۱۷	۴/۱۰±۰/۱	ND	ND	ND	۴/۱۰±۰/۱	ND
۱۸	۲/۲۱±۰/۴	ND	ND	ND	۲/۲۱±۰/۴	ND
۱۹	۳/۶۰±۱/۰	ND	ND	ND	۳/۶۰±۱/۰	ND
۲۰	۱/۹۰±۰/۰۸	ND	ND	ND	۱/۹۰±۰/۰۸	ND
۲۱	۱۲/۰۰±۱/۶	۰/۹۰±۰/۳	ND	ND	۱۲/۹۰±۱/۰	ND
۲۲	۰/۸۴±۰/۴	ND	ND	ND	۰/۸۴±۰/۴	۲/۱۷±۰/۵
۲۳	۲/۹۰±۰/۵	ND	ND	ND	۲/۹۰±۰/۵	ND
۲۴	۱/۷۰±۰/۳	ND	ND	ND	۱/۷۰±۰/۳	ND
۲۵	۱/۰۰±۰/۱	ND	ND	ND	۱/۰۰±۰/۴	۱/۸۶±۰/۳

SD^۱: انحراف معیار استاندارد

جدول ۳ میزان وقوع آفلاتوکسین ها و اکرآتوکسین A در ۳۶ نمونه از یک نوع فلفل قرمز ایرانی

سموم	نمونه های مثبت (%)	محدوده (µg/kg)	توزیع فراوانی نمونه ها (µg/kg)				
			ND	LOD-۵	۵-۱۰	۱۰-۱۵	≥۱۵
AFB1	۲۵ (۶۹/۴ %)	۰/۴-۱۴/۵	۴/۲۷±۳/۶				
AFB2	۹ (۲۵%)	۰/۳۴-۱/۱۰	۰/۶۱±۰/۲۵				
AFG1	-	-	-				
AFG2	-	-	-				
AFs	۲۵ (۶۹/۴ %)	۰/۴-۱۵/۶	۴/۴۹±۳/۹				
OTA	۶ (۱۶/۷ %)	۰/۷۴-۲/۱۷	۱/۴۸±۰/۶۲				

۱: میانگین آلودگی در نمونه های مثبت

بیشتری درمورد حضور و میزان آلودگی به آفلاتوکسین و OTA در مواد غذایی انسان مانند ادویه ها را نشان می دهد. به نظر می رسد روش و شرایط مورد استفاده در تولید فلفل قرمز منجر به حضور آلودگی آفلاتوکسین می شود که می تواند با آموزش های پایه ای بهبود یابد. بنابراین، تجزیه و تحلیل خطر نقاط کنترل بحرانی در تولید فلفل قرمز در ایران مناسب خواهد بود. پروتکل HACCP برای کنترل مایکوتوکسینهای در تعداد محدودی از دیگر کالاها وجود دارد.

۵- منابع

- [1] Martins, M. L., Martins, H. M., & Bernardo, F. (2001). Aflatoxins in spices marketed in Portugal. *Food Additives and Contaminants*, 18(4), 315–319.
- [2] Brera, C., Miraglia, M., & Colatosti, M. (1998). Evaluation of the impact of mycotoxins on human health: sources of errors. *Micro chemical Journal*, 5(1), 45–49.
- [3] Chu, F. S. (1997). Mode of action of mycotoxins and related compounds. *Advances in Applied Microbiology*, 40, 352–357.
- [4] Pariza, W. M. (1996). Toxic substances. In O. R. Fennema (Ed.), *Food chemistry* (3rd ed., pp. 825–841). New York: Marcel Dekker.
- [5] Eaton, D. L., Ramsdell, H. S., & Neal, G. E. (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.
- [6] 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.
- [7] Fazekas, B., Tar, A., & Kovacs, M. (2005). Aflatoxin and ochatoxin A cotent of spices in Hungary. *Food Additives and Contaminants*, 22(9), 856–863.
- [8] Zinedine, A., Brera, C., Elakhdari, S., Catano, C., Debegnach, F., Angelini, S., et al. (2006). Natural occurrence of

شدت میزان آلودگی مشاهده شده در نمونه ها در مراحل اولیه پس از برداشت گزارش شده که این میزان قطعاً 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 از 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. در واقع، نتایج این مطالعه برآورد صحیحی از مقادیر اولیه آفلاتوکسین و اکراتوکسین در فلفل قرمز ایران را نشان می دهد زیرا نمونه ها به طور مستقیم از زمین برداشت شده و پس از خشک کردن تحت شرایط مشابه در مزرعه، بدون سپری کردن دوره نگهداری در انبارها، مورد آزمایش گرفته است در حالی که بسیاری از مطالعات انجام شده توسط محققان دیگر بر روی نمونه های جمع آوری شده از سطح بازار که دوره نگهداری طولانی را گذرانده بودند، انجام شده است بنابراین تاثیر شرایط زمانی، دمایی و رطوبتی دوره نگهداری در آنها لحاظ نگردیده است.

۴- نتیجه گیری

آلودگی به آفلاتوکسین و اکراتوکسین در ادویه ها حتی در سطوح پایین می تواند یک مشکل جدی محسوب گردد زیرا معمولاً به صورت خام و یا در غذاهای آماده مصرف مورد استفاده قرار می گیرند. بنابراین، نظارت منظم بر ادویه ها به خصوص پودر فلفل قرمز به طور مداوم مورد نیاز خواهد بود زیرا این ادویه یکی از ادویه های مورد علاقه عموم می باشد که به طور مداوم در ایران مصرف می گردد.

این مطالعه اطلاعات مفیدی در مورد ریسک خطر مایکوتوکسین ها در ادویه ها فراهم می کند به امید اینکه آگاهی مصرف کنندگان، محققان، کشاورزان و تاجران را در مورد اهمیت بهبود روش های فرآوری شامل برداشت، خشک کردن، حمل و نقل و ذخیره سازی بالا ببرد و یک برنامه نظارت دقیق بر این محصولات ایجاد کند. همچنین ضرورت به دست آوردن اطلاعات خیلی

- 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.
- [19] AOAC International (1997). Natural toxins. In P. Cunniff (Ed.), *Official methods of analysis of association of official analytical chemists* (Vol. II, pp. 49/3-49/41). Gaithersburg, Maryland, USA.
- [20] Abdulkadar A. H. W., Al-Ali A. A., Al-Kildi A. M., Al-Jedah J. H. (2004). Mycotoxins in food products available in Qatar. *Food Control*, 15, 543-8.
- [21] Garfield, F. M., Klesta, E., & Hirsh, J. (2000). *Quality assurance principles for analytical laboratories* (AOAC International 3rd ed.). Gaithersburg, MD: Association of Official Analytical Chemists. pp. 87-88.
- [22] Shundo, L., Almeida, A. P., Alaburda, J., Lamardo, L. C. A., Navas, S.A., Ruvieri, V., & Sabino, M. (2009). Aflatoxins and ochratoxin A in Brazilian paprika. *Food Control*, 20, 1099-1102.
- [23] Patel, S., Hazel, C. M., Winterton, A. G. M., & Mortby, E. (1996). Survey of ethnic foods for mycotoxins. *Food Additives and Contaminants*, 13, 833-841.
- [24] El-Kady, I. A., El-Maraghy, S. S., & Eman-Mostafa, M. (1995). Natural occurrence of mycotoxins in different spices in Egypt. *Folia Microbiologica*, 40, 297-300.
- [25] Thirumala-Devi, K., Mayo, M. A., Reddy, G., Tangni, E. K., Larondelle, Y., & Reddy, D. V. (2001). Occurrence of ochratoxin A in black pepper, coriander, ginger and turmeric in India. *Food Additives and Contaminants*, 18(9), 830-835.
- [26] Hierro, J. M., Garcia-Villanova, R. J., Torrero, P. R., & Fonseca, I. M. T. (2008). Aflatoxins and ochratoxin A in red paprika for retail sale in Spain: Occurrence and evaluation of a simultaneous analytical method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(3), 751-756.
- mycotoxins in cereals and spices commercialized in Morocco. *Food Control*, 17, 868-874.
- [9] Romagnoli, B., Menna, V., Gruppioni, N., & Bergamini, C. (2007). Aflatoxins in spices, aromatic herbs, herb-teas and medicinal plants marketed in Italy. *Food Control*, 18, 697-701.
- [10] Aydin, A., Erkan, E. M., Baskaya, R., & Ciftcioglu, G. (2007). Determination of aflatoxin B1 levels in powdered red pepper. *Food Control*, 18, 1015-1019.
- [11] Marjerus, P., Cutka, I., Dreyer, A., El-Dessouki, S., Eyerich, W., Reusch, H., Schurer, B., & Wailblinger, H. U. (1993). Zur belastungssituation von Ochratoxin A in Lebensmitteln pflanzlichen Ursprungs. *Deutsche Lebensmittel Rundschau*, 89, 112-114.
- [12] Zimmerli, B., & Dick, R. (1996). Ochratoxin in table wine and grape juice: occurrence and risk assessment. *Food Additives and Contaminants*, 13, 647-654.
- [13] Trucksess, M. W., Giler, J., Young, K., White, K. D., & Page, S. W. (1999). Determination and survey of ochratoxin A in wheat, barley and coffee—1997. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, 82, 85-89.
- [14] Walker, R. (1999). Mycotoxin of growing interest, ochratoxin. In *Third joint FAO/WHO/UNEP international conference on mycotoxins*, Tunis, Tunisia. MYC-CONF/99/5b.
- [15] Anonymous. (2002). Commission Regulation (EC) No 472/2002. *Official Journal of European Communities*, 45, 42-44.
- [16] Almela, L., Rabe, V., Sanchez, B., Torrella, F., López-Pérez, J. P., Gabaldón, J. A. (2007). Ochratoxin A in red paprika: Relationship with the origin of the raw material. *Food Microbiology*, 24(4), 319-327.
- [17] FAO/WHO. (2001). Safety evaluation of certain mycotoxins in food. Fifty sixth report of the Joint FAO/WHO expert committee on food additives. WHO food additives series no. 47.
- [18] Stroka, J., Anklam, E., Jörissen, U. and Gilbert, J. (2000). Immuno-affinity column clean-up with liquid

Aflatoxins and ochratoxin a contamination in Iranian red pepper after harvesting

Salari, R.^{1*}, Habibi Najafi, M. B.², Boroushaki, M. T.³,
Mortazavi, S. A.², Fathi Najafi, M.⁴

1. Food and Drug organisation, Mashhad University of Medical Science

2. Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad 3-

3. Pharmacological Research Center of Medicinal Plants, Mashhad University of Medical Science

4. Razi Vaccines and Serum Research Institute, Mashhad

(Received: 90/7/7 Accepted: 90/10/28)

Mycotoxins are the toxic metabolites produced by some species of mould genera such as *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. Mycotoxins are carcinogenic, mutagenic, teratogenic and immunosuppressive for the most animal species and humans. Humans are exposed by aflatoxins and ochratoxin A via foods such as milk, cereals and various spices. The objective of this study was to determine the aflatoxin and ochratoxin A (OTA) contents of Iranian (Sabzevar) red pepper using high performance liquid chromatography (HPLC) with fluorescence detector and Immunoaffinity column clean-up. An isocratic mobile phase of water–acetonitrile–methanol (60:25:15, v/v/v), and acetonitrile–water–acetic acid (51:47:2, v/v/v) with a flow rate of 1.0 ml/min was used for aflatoxins and ochratoxin A determination, respectively. Limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were respectively, 0.1 and 0.3 µg/kg for AFB1 and AFB2, 0.14 and 0.45 µg/kg for AFG1 and AFG2, 0.15 and 0.5 µg/kg for OTA. The values of average recoveries of mycotoxins were 71.1–96.2%. When AFB1 and AFG1 were added to red pepper at the level of 10 µg/kg, AFB2 and AFG2 at the level of 2 µg/kg and OTA at the level of 5 µg/kg, the recovery ranges of 82.7–89.2% for AFB1, 79.3–114.2% for AFB2, 66.5–71.9% for AFG1, 66.3–92.5% for AFG2 and 61.1–80% for OTA were obtained. 36 samples of pepper were collected from the farm and were dried by sun up to standard moisture (Max 11%). Total aflatoxins (AFs) were detected in 25 out of 36 samples (69.4% of incidence) and the contamination levels were 0.4–15.6 µg/kg. The highest incidence of contamination was aflatoxin B1 and was found in 25 out of 36 samples. Seven (19.5%) and three (8.34%) out of 36 samples had levels above the regulatory limits according to the European Union for AFB1 (5 µg/kg) and total aflatoxins (10 µg/kg), respectively. OTA was detected in six samples (16.7%) at the ranging from 0.74–2.17 µg/kg. None of the samples had OTA levels higher than the legal acceptable limits.

Keywords: Red pepper; Aflatoxins; Ochratoxin A; High Performance Liquid Chromatography

* Corresponding Author E-Mail Address: r_salari2001@yahoo.com