ORIGINAL ARTICLE

Survey of aflatoxins in non-alcoholic beers sold in Lorestan Province, Iran, by high-performance liquid chromatography

Firuzeh Nazari[1],
Mojtaba Moeini[2],
Reza Solgi[3],
Mir-Jamal Hosseini[4]

[1] PhD, Student Research Committee, School of Pharmacy, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2] MSc, Department of Nutrition, School of Health, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran
[3] PhD Student in Toxicology, Department of Toxicology and Pharmacology, School of pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[4] Assistant Professor, Department of Toxicology and Pharmacology, Zanjan Applied Pharmacology Research Center, School of Pharmacy, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

(Received October 24, 2013; Accepted January 5, 2014)

Abstract

Background and purpose: Aflatoxins are of the most important groups of mycotoxins recognized to be teratogen, mutagen, and carcinogen. Aflatoxins have been detected in a number of foods including cereals and cereal products. Beers are often derived from malted cereal grain; most commonly malted barley and malted wheat. Contaminated cereals to aflatoxins results in malt and beers consumption with them.

Materials and methods: This study was carried out to evaluate the content of aflatoxins in 100 non-alcoholic beers collected randomly from supermarkets of Lorestan province, Iran, in first six-month of 2013. Aflatoxins were cleaned up with immune affinity column, separated by reversed-phase high-performance liquid chromatography (HPLC) and detected using florescence detector.

Results: No aflatoxin contamination was observed in any of the samples.

Conclusion: According to the results, it seems there is no concern for aflatoxin contamination in beer. This is the first survey on aflatoxin contamination in non-alcoholic beers in Iran.

Keywords: Aflatoxins, non- alcoholic beer, high-performance liquid chromatography (HPLC)

J Mazand Univ Med Sci 2014; 23(110): 137-44 (Persian).

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره بیست و سوم شماره ۱۱۰ اسفند سال ۱۳۹۲ (۱۴۴-۱۳۷)

تعیین میزان آلودگی به آفلاتوکسین در ماءالشعیرهای توزیع شده در استان لرستان با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارکرد عالی

فیروزه نظری[۱]
مجتبی معینی[۲]
رضا سلگی[۳]
میرجمال حسینی[۴]

چکیده

سابقه و هدف: آفلاتوکسین‌ها یکی از مهم‌ترین مایکوتوکسین‌ها می‌باشند که دارای اثرات جهش‌زایی، سرطان‌زایی و ناقص‌الخلقه‌زایی هستند. این سموم در انواع مختلف مواد غذایی از جمله غلات و فراورده‌های آن یافت می‌شوند. ماءالشعیر فراورده‌ای است که از عصاره مالت تولید می‌شود. چناچه جو استفاده شده به آفلاتوکسین آلوده باشد، عصاره مالت تولید می‌شود و در نهایت، ماءالشعیر به دست آمده به آفلاتوکسین آلوده خواهد بود. از آن جایی که مصرف ماءالشعیر در جامعه رو به افزایش است و با توجه به مستعد بودن این فراورده به آلودگی سموم قارچی، در این تحقیق به ارزیابی میزان آفلاتوکسین‌ها در ماءالشعیر پرداخته شد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه، ۱۰۰ نمونه ماءالشعیر از شهرهای مختلف استان لرستان در ۶ ماهه اول سال ۱۳۹۲ جمع‌آوری شد و مقادیر آفلاتوکسین‌های B_1، B_2، G_1 و G_2 در نمونه‌ها اندازه‌گیری گردید. جهت خالص‌سازی سموم از ستون‌های ایمونوافینیتی و برای شناسایی و تعیین مقدار از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی عالی و دتکتور فلورسانس استفاده گردید.

یافته‌ها: در بازه‌ی زمانی جمع‌آوری نمونه‌های ماءالشعیر، هیچ یک از نمونه‌ها به آفلاتوکسین آلوده نبودند.

استنتاج: از آن جایی که آفلاتوکسین‌ها در هیچ یک از نمونه‌های مورد بررسی یافت نشدند، به نظر می‌رسد مصرف این نمونه‌ها مشکلی برای سلامتی مصرف کنندگان ایجاد نمی‌کند. این مطالعه، اولین مطالعه‌ای است که در ایران به منظور تعیین میزان آفلاتوکسین در ماءالشعیر انجام شده است.

واژه های کلیدی: آفلاتوکسین‌ها، ماءالشعیر، کروماتوگرافی مایع با کارایی عالی

مقدمه

مایکوتوکسین‌ها یا سموم قارچی (Mycotoxins)، سموم طبیعی هستند که توسط گونه‌های متعددی از قارچ‌ها تولید می‌شوند و موجبات بیماری و مرگ و میر در انسان، حیوانات و گیاهان را فراهم می‌آورند. این ترکیبات ساختمان شیمیایی متفاوتی دارند و اغلب، دارای وزن مولکولی پایین می‌باشند و در تعداد زیادی از محصولات کشاورزی و مواد غذایی در مناطق مختلف دنیا یافت می‌شوند. این قارچ‌ها می‌توانند سبب آلوده شدن غذای انسان و حیوان در فرایندهای تولید، انتقال و ذخیره‌سازی مواد غذایی شوند. وجود این قارچ‌ها به یک آب و هوای ویژه و ناحیه جغرافیایی یا کشور خاص مربوط نیست؛ بلکه هر جا که شرایط لازم برای رشد گونه قارچ و تولید سم فراهم باشد، سم تولید می‌شود (۱).

آلودگی مواد غذایی به مایکوتوکسین‌ها، یک مشکل

این مقاله حاصل طرح با شماره ۱۲۲۲ مصوب دانشگاه علوم پزشکی لرستان می باشد.

مولف مسئول: میرجمال حسینی- زنجان: شهرک کارمندان، انتهای بلوار مهدوی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، دانشکده داروسازی. E-mail: jamal_hossini@yahoo.com

۱. دکترای سم‌شناسی، کمیته پژوهشی دانشجویان، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۲. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه تغذیه، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، خرم‌آباد، ایران
۳. دانشجوی دکترای سم‌شناسی، گروه سم‌شناسی/فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
۴. استادیار، گروه سم‌شناسی/فارماکولوژی، دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات فارماکولوژی کاربردی زنجان، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۷/۲۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۲/۹/۱۷ تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۱۰/۱۵

جهانی محسوب می‌شود و مطابق با آمار سازمان کشاورزی و غذای سازمان ملل متحد حدود ۲۵ درصد محصولات غذایی جهان آلوده به مایکوتوکسین‌ها هستند. طبق گزارش WHO (World Health Organization)، مایکوتوکسین‌ها به ویژه آفلاتوکسین یکی از عوامل مؤثر در بروز بیماری‌های ناشی از غذا می‌باشند (۲).

آفلاتوکسین‌ها مهم‌ترین گروه مایکوتوکسین‌ها می‌باشند که توسط گونه‌های مختلف قارچ آسپرژیلوس به ویژه گونه‌های آسپرژیلوس فلاوس، آسپرژیلوس پارازیتیکوس و آسپرژیلوس نومیوس تولید می‌شوند (۳).

در میان آفلاتوکسین‌های شناخته شده، آفلاتوکسین B_1 قدرت و سمیت بیشتری دارد (۴) و توسط IARC (International Agency for Research on Cancer) در لیست عوامل سرطان‌زای انسان (گروه ۱) قرار گرفته است. آفلاتوکسین B_1 تراتوژن و موتاژن نیز می‌باشد (۵). آفلاتوکسین‌ها نسبت به روش‌های متداول حرارتی مانند پاستوریزاسیون و اتوکلاو مقاوم می‌باشند و این روش‌ها در کاهش سمیت آن‌ها مؤثر نیستند (۶).

آفلاتوکسین‌ها در طیف وسیعی از مواد غذایی نظیر غلات از جمله جو، برنج، ذرت، گندم و فراورده‌های آن‌ها، مغزهای درختی، انجیر خشک، شیر، تخم مرغ، پنیر، ماست، سوسیس‌های تخمیری، گوشت‌های عمل‌آوری شده و ... مشاهده شده‌اند (۷، ۲).

با توجه به اثرات سمی و بیماری‌زای آفلاتوکسین‌ها، سازمان‌های بین‌المللی و بسیاری از کشورها حد مجازی را برای وجود این مواد در مواد غذایی مختلف وضع کرده‌اند. به عنوان مثال، در ایران حد مجاز تعیین شده آفلاتوکسین B_1 برای غلات مانند گندم و برنج ۵ ng/g و برای جو ۱۰ ng/g تعیین شده است (۸).

ماءالشعیر فراورده‌ای گازدار غیر الکلی است که از شیره رقیق شده جو به دست می‌آید و به آن مواد افزودنی مجاز و در صورت لزوم، مواد نگهدارنده اضافه می‌نمایند. از آن جایی که جو بعد از زمان برداشت تا زمان مصرف برای مدتی در انبار نگهداری می‌شود، در صورت مناسب نبودن محل و شرایط نگهداری مستعد آلودگی به آفلاتوکسین‌ها می‌باشد. چنانچه جو استفاده شده در تولید ماءالشعیر به آفلاتوکسین آلوده باشد، عصاره مالت تولید می‌شود و در نهایت ماءالشعیر به دست آمده به آفلاتوکسین آلوده خواهد بود (۹).

از آن جایی که مصرف این فراورده درجامعه رو به افزایش است و با توجه به مستعد بودن این فراورده به آلودگی به آفلاتوکسین‌ها، در این مطالعه به تعیین میزان آفلاتوکسین‌ها در ماءالشعیرهای جمع‌آوری شده از سطح استان لرستان پرداخته شد.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه ۱۰۰ نمونه ماءالشعیر از برندهای مختلف (داخلی و خارجی) از شهرهای استان لرستان در ۶ ماه اول سال ۱۳۹۲ به روش تصادفی جمع‌آوری گردید. ماءالشعیرهای جمع‌آوری شده دارای طعم‌های مختلف (از جمله کلاسیک، انار، انگور، سیب، هلو، لیمو و استوایی) و سری ساخت متفاوت بودند. نمونه‌ها تا زمان انجام آنالیز در یخچال نگهداری می‌شدند. پس از آماده‌سازی نمونه‌ها، میزان سموم آفلاتوکسین در نمونه‌های جمع‌آوری شده تعیین گردید.

مواد و تجهیزات مورد نیاز

آفلاتوکسین B_1، B_2، G_1 و G_2 استو نیتریل، متانول از شرکت سیگما، برمید پتاسیم جامد، کلرید پتاسیم، فسفات دی هیدروژن پتاسیم، فسفات هیدروژن دی سدیم، فسفات هیدروژن دی سدیم و کلرید سدیم از شرکت Merck تهیه گردید.

به منظور آنالیز و تعیین مقدار آفلاتوکسین، دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC یا) با اجزای زیر مورد استفاده قرار گرفت: پمپ (Controller waters ۶۰۰)، اتوسمپلر (Waters۷۱۷ plus)، دتکتور (Waters ۷۴۷ scanning flourcence detector)، نرم‌افزار Millenium ۳۲ با ستون (C ۱۸، ۱۵ cm، ۵ µm، ۴/۶ d) CAPITAL HPLC Silica reverse phase.

روش کار

آنالیز سموم آفلاتوکسین B_1، B_2، G_1 و G_2 در نمونه‌ها، با استفاده از روش قید شده در استاندارد ملی ایران شماره ۶۸۷۲ استاندارد انجام گرفت. جهت خالص‌سازی سموم از ستون‌های ایمونوافینیتی و برای شناسایی و تعیین مقدار، از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی عالی و دتکتور فلورسانس استفاده گردید. در ابتدا روش کار تحت آزمایش‌های اعتبار سنجی (Validation) قرار گرفت. این کار با انجام آزمایش‌های آلوده‌سازی عمدی (Spiking) سطوح مختلف سم آفلاتوکسین B_1، B_2، G_1 و G_2 صورت گرفت و پارامترهای کارایی روش نظیر محدوده خطی بودن، صحت، دقت و حد تعیین مقدار روش محاسبه گردید. پس از حصول نتایج در محدوده قابل قبول علمی، آنالیز نمونه‌های اصلی با استفاده از روش مربوط آغاز گردید.

آنالیز محلول‌های استاندارد کاری آفلاتوکسین B_1، B_2، G_1 و G_2 با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارکرد عالی و رسم منحنی کالیبراسیون

بدین منظور ابتدا با حل کردن ۱ mg پودر خالص هر یک از آفلاتوکسین‌های مورد آنالیز در ۵ ml حلال تولوئن: استونیتریل (۹۰:۱۰) یک محلول ذخیره استاندارد با غلظت ۲۰۰ µg/ml تهیه گردید. پس از رقیق‌سازی، محلول استاندارد ثانویه با غلظت ۱۰ µg/ml تهیه شد که غلظت دقیق آن‌ها با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر ماوراء بنفش در طول موج ۳۵۰ nm تعیین گردید (۱۰). سپس ۵ محلول استاندارد کاری مورد نیاز برای رسم منحنی کالیبراسیون، از محلول استاندارد ثانویه ساخته شد و ۱۰۰ µl به دستگاه کروماتوگرافی مایع تزریق گردید. به منظور تهیه حلال فاز متحرک کروماتوگرافی مایع، ۶ حجم آب، ۲ حجم استو نیتریل و ۳ حجم متانول با یکدیگر مخلوط شد و به ازای هر لیتر فاز متحرک، ۳۵۰ µl اسید نیتریک ۴ مولار و ۱۲۰ mg برمید پتاسیم اضافه گردید.

شرایط کار و فعالیت با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

طول موج تحریکی و نشر ۴۳۵ nm و ۳۶۵، سرعت فاز متحرک ۱ ml/min، حجم تزریق ۱۰۰ µl، ستون (۴/۶ d، ۵ µm، ۱۵ cm، C ۱۸ CAPITAL HPLC Silica reverse phase) و مشتق‌ساز کبراسل بود. در نهایت، از رسم منحنی کالیبراسیون و روش استاندارد خارجی جهت آنالیز آفلاتوکسین‌ها، استفاده گردید.

بررسی اعتبار سنجی روش آنالیز آفلاتوکسین در ماءالشعیر

برای انجام آزمایش‌های اعتبار سنجی، پس از یافتن نمونه‌های شاهد فاقد آلودگی به سموم آفلاتوکسین، نمونه‌ها با سطوح مختلف سموم آفلاتوکسین B_1 و G_1 (۱ ng/g، ۲/۵ و ۵) و B_2 و G_2 (۰/۲ ng/g، ۰/۵ و ۱) آلوده‌سازی عمدی شد و در هر سطح سه بار تکرار گردید.

اندازه‌گیری میزان آفلاتوکسین‌ها در نمونه‌ها

پس از اطمینان از حصول نتایج علمی قابل قبول در زمینه صحت و دقت روش، آنالیز نمونه‌های اصلی انجام گرفت. برای آنالیز سم در این نمونه‌ها، از روش آنالیز آفلاتوکسین‌ها برگرفته از استاندارد ملی ایران شماره ۶۸۷۲ چاپ سال ۱۳۹۰، استفاده گردید (۹). استخراج نمونه‌ها به وسیله ۲۰۰ ml حلال متانول ۸۰ درصد و نمک به میزان ۵ گرم با استفاده از دستگاه شیکر برای مدت سه دقیقه انجام شد. پس از صاف کردن مخلوط پیش‌گفته، به ۲۰ ml از عصاره صاف شده، ۱۳۰ ml آب اضافه گردید تا ۱۵۰ ml عصاره رقیق شده به دست آید.

برای خالص‌سازی نمونه‌ها، از روش بسیار اختصاصی ستون‌های ایمونوافینیتی (IAC یا Immunoaffinity columns) که حاوی آنتی بادی بر علیه سموم آفلاتوکسین B_1، B_2، G_1 و G_2 می‌باشد و از دستگاه Manifold vacuum استفاده گردید. بدین منظور ابتدا ۷۰ ml از محلول فوق از ستون عبور داده شد و سپس ستون با آب دو بار تقطیر، شستشو داده شد. پس از خشک کردن ستون، سموم آفلاتوکسین B_1، B_2، G_1 و G_2 توسط ۱۵۰۰ µl متانول از ستون ایمونوافینیتی جدا گردید و پس از رقیق‌سازی با ۱۵۰۰ µl آب مقطر، ۱۰۰ µl به دستگاه کروماتوگرافی مایع تزریق شد.

در هر روز کاری نیز، برای بررسی صحت و دقت روش، یک نمونه شاهد در سطح ۵ ppb از سم آفلاتوکسین B_1، آلوده‌سازی عمدی شد و همراه نمونه‌های اصلی آنالیز گردید. لازم به ذکر است که در هر روز کاری، یک منحنی کالیبراسیون با استفاده از ۵ استاندارد کاری مختلف رسم می‌شد و پس از اطمینان از حصول یک منحنی کالیبراسیون، اقدام به تزریق نمونه‌ها و تعیین غلظت آفلاتوکسین‌های مورد نظر در آن‌ها می‌گردید.

یافته‌ها

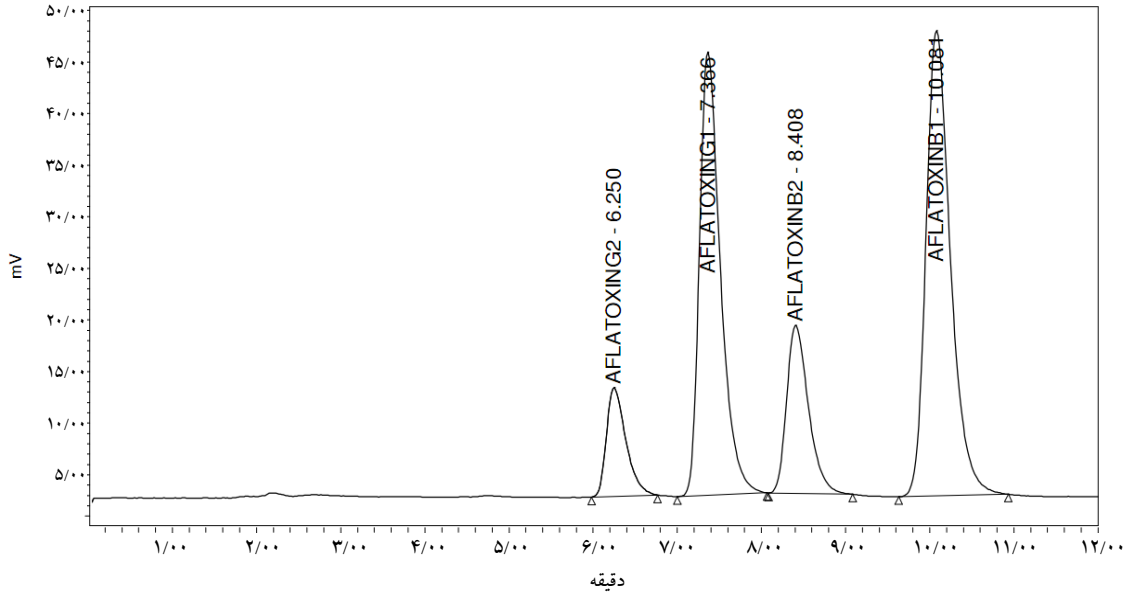
آنالیز محلول‌های استاندارد کاری آفلاتوکسین B_1، B_2، G_1 و G_2 با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارکرد عالی و رسم منحنی کالیبراسیون

برای آنالیز سموم آفلاتوکسین B_1، B_2، G_1 و G_2 از ۵ محلول استاندارد کاری در محدوده آفلاتوکسین‌های B_1 و G_1 (۰/۴-۳/۶ ng/ml) آفلاتوکسین‌های G_2 و B_2 (۰/۰۸-۰/۷۲ ng/ml) استفاده شد. یک نمونه از کروماتوگرام‌های به دست آمده در تصویر شماره ۱ نمایش داده شده است. همان‌طور که در این تصویر ملاحظه می‌شود، پیک به دست آمده دارای شکل مناسبی بود و زمان بازداری آن (Retention time) کوتاه و حدود ۶ دقیقه بود. نتایج حاصل از رسم منحنی کالیبراسیون نشان داد که ارتباط خطی بسیار عالی بین غلظت‌های مختلف آفلاتوکسین B_1، B_2، G_1 و G_2 و سطح زیر منحنی وجود دارد و در همه منحنی‌های کالیبراسیون به دست آمده، ضریب همبستگی (r) برابر یا بالاتر از ۰/۹۹۸ بوده است.

حد تعیین مقدار (LOQ یا Limit of quantitation) روش برای آفلاتوکسین‌های B_1 و G_1 ۱ ng/g و برای آفلاتوکسین‌های B_2 و G_2 ۰/۲ ng/g به دست آمد. به علاوه، حد تشخیص (LOD یا Limit of detection) روش برای آفلاتوکسین‌های B_1 و G_1 ۰/۳ ng/g و برای آفلاتوکسین‌های B_2 و G_2 ۰/۰۷ ng/g تعیین گردید که نشان دهنده حساسیت روش مورد استفاده است.

بررسی اعتبار سنجی روش آنالیز آفلاتوکسین B_1، B_2، G_1 و G_2

نتایج حاصل از بررسی اعتبار سنجی (بررسی صحت و دقت روش) با استفاده از روش آلوده‌سازی عمدی نمونه‌های ماءالشعیر با آفلاتوکسین‌های B_1، B_2، G_1 و G_2 انجام شد و نتایج آن در جدول شماره ۱ آمده است.



تصویر شماره ۱: کروماتوگرام‌های حاصل از تزریق محلول استاندارد مخلوط آفلاتوکسین‌ها (آفلاتوکسین‌های B_1 و G_1 غلظت ۲ ng/ml آفلاتوکسین‌های G_2 و B_2 غلظت ۰/۴ ng/ml) به دستگاه کروماتوگرافی مایع با شناساگر فلورسانس

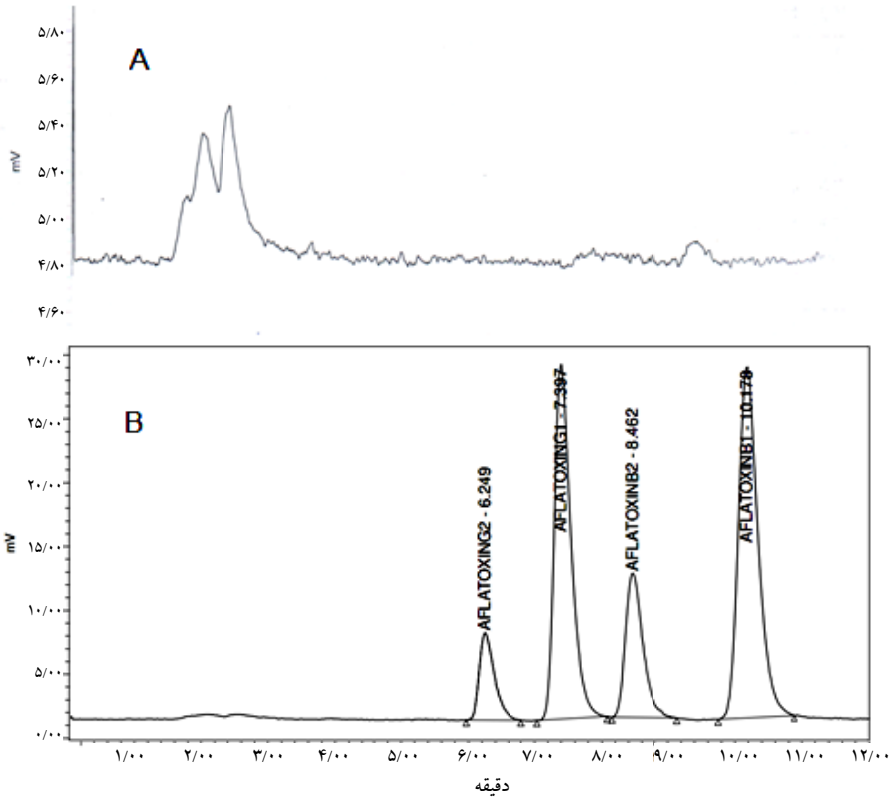
جدول شماره ۱: میزان بازیافت آفلاتوکسین‌های گروه‌های B و G در نمونه‌های ماءالشعیر غنی شده با سطوح مختلف سموم آفلاتوکسین B_1، B_2، G_1 و G_2 (n = ۳)

نام سم	سطح آلوده‌سازی عمدی (ng/g)	میزان بازیافت (درصد)	ضریب تغییرات (درصد)
	۱/۰	۸۱/۳	۹/۹
آفلاتوکسین B_1	۲/۵	۸۰/۰	۱/۴
	۵/۰	۷۸/۷	۱/۵
	۰/۲	۸۲/۰	۸/۶
آفلاتوکسین B_2	۰/۵	۸۱/۷	۰/۷
	۱/۰	۷۹/۰	۱/۳
	۱/۰	۸۰/۷	۱۰/۷
آفلاتوکسین G_1	۲/۵	۸۲/۰	۰/۷
	۵/۰	۷۶/۳	۳/۰
	۰/۲	۷۷/۷	۱۱/۵
آفلاتوکسین G_2	۰/۵	۷۷/۰	۲/۶
	۱/۰	۷۴/۰	۴/۹

آنالیز آفلاتوکسین‌ها در نمونه‌های ماءالشعیر

یک نمونه از کروماتوگرام‌های حاصل از آنالیز آفلاتوکسین B_1، B_2، G_1 و G_2 در نمونه‌های شاهد و آلوده شده عمدی در تصویر شماره ۲ نمایش داده شده است. بررسی کروماتوگرام‌ها نشان می‌دهد که کروماتوگرام‌ها بسیار تمیز هستند و ترکیبات مداخله‌گر در آن‌ها مشاهده نمی‌شوند که این مسأله ناشی از استفاده از ستون‌های ایمونوافینیتی در مرحله خالص‌سازی نمونه‌ها و آنالیز آفلاتوکسین B_1، B_2، G_1 و G_2 با روش حساس کروماتوگرافی مایع و شناساگر فلورسانس می‌باشد. در هر روز کاری، یک نمونه شاهد و یک نمونه آلوده شده عمدی نیز آنالیز می‌شدند.

نتایج حاصل از آنالیز نمونه‌های ماءالشعیر جمع‌آوری شده از برندهای مختلف داخلی و خارجی از شهرهای مختلف استان لرستان، در ۶ ماه اول سال ۱۳۹۲ نشان داد که هیچ آلودگی در هیچ یک از نمونه‌های مورد بررسی یافت نشد؛ یا به عبارت بهتر، سطح آلودگی در نمونه‌های جمع‌آوری شده در این بازه زمانی پایین‌تر از حد تعیین مقدار و حد تشخیص دستگاه می‌باشد.



تصویر شماره ۲: کروماتوگرام‌های حاصل از آنالیز آفلاتوکسین‌ها در نمونه‌های شاهد (A) و آلوده شده عمدی (در سطح ۵ ng/g) (B) با دستگاه کروماتوگرافی مایع با شناساگر فلورسانس

بحث

آفلاتوکسین‌ها یکی از مهم‌ترین آلاینده‌های محصولات کشاورزی و مواد غذایی می‌باشند. این سموم دارای اثرات جهش‌زایی، سرطان‌زایی و ناقص‌الخلقه‌زایی هستند و سبب آسیب به اعضای مختلف از جمله کبد و کلیه می‌گردند. تماس طولانی مدت با مقادیر اندک این ترکیبات می‌تواند ضایعات غیر قابل جبرانی در سلامت انسان بر جای بگذارد. با توجه به اثرات سمی و عوارض این سموم در غذای آلوده، سازمان‌ها و ارگان‌های جهانی و ملی، برای این سموم در تعدادی از مواد غذایی و خوراک دام حدودی را تعیین نموده‌اند. به منظور اعمال این حدود در مواد غذایی و در نتیجه تأمین سلامت مصرف کنندگان، به روش‌های پیشرفته و معتبر جهت اندازه‌گیری این سموم نیاز است.

در انجام این تحقیق، از روش‌های معتبر جهانی و از ستون‌های ایمونوافینیتی که به علت دارا بودن آنتی بادی بر علیه آفلاتوکسین‌های گروه B و G، از روش‌های مناسب خالص‌سازی نمونه‌ها می‌باشد، استفاده گردید. نتایج حاصل از آنالیز محلول‌های استاندارد کاری آفلاتوکسین‌های گروه B و G با HPLC (High-performance liquid chromatography)، نشان دهنده ضریب همبستگی عالی بین غلظت‌های مختلف آفلاتوکسین‌های گروه B و G و سطح زیر منحنی پیک‌ها می‌باشد. برای ارزیابی صحت روش، از محاسبه میزان بازیافت آفلاتوکسین‌های B_1، B_2، G_1 و G_2 در نمونه‌های مختلف استفاده گردید. بررسی نتایج نشان می‌دهد که میزان بازیافت سم آفلاتوکسین‌های B_1، B_2، G_1 و G_2 در سطوح مختلف با توجه به استاندارد ۶۸۷۲ مناسب است و این مسأله حکایت از صحت خوب روش آنالیز دارد (جدول شماره ۱).

در مورد دقت روش نیز، ضریب تغییرات (RSD یا Reflex sympathetic dystrophy) به دست آمده برای سم آفلاتوکسین B_1، B_2، G_1 و G_2 در نمونه‌های ماءالشعیر کمتر از ضریب تغییرات محاسبه شده از مقادیر قید شده در استاندارد ۶۸۷۲ می‌باشد که خود، مؤید دقت کافی روش مورد استفاده می‌باشد (جدول شماره ۱). حد تعیین مقدار به دست آمده برای آنالیز آفلاتوکسین B_1 و G_1 در نمونه‌های مورد بررسی ۱ ppb و برای آنالیز آفلاتوکسین G_2 و B_2 به میزان ۰/۲ppb بود که خود نشانه حساسیت بالای روش برای تعیین مقدار آفلاتوکسین‌های گروه B و G در نمونه‌ها دارد (جدول شماره ۱).

این مطالعه اولین مطالعه‌ای بود که در ایران به منظور تعیین میزان آفلاتوکسین در ماءالشعیر انجام شد. سایر بررسی‌های انجام شده در سایر کشورها نیز بیشتر بر روی ماءالشعیر حاوی الکل (آبجو) می‌باشد و می‌توان گفت این مطالعه، از این لحاظ منحصر به فرد می‌باشد.

همان‌طور که ذکر شد، آنالیز نمونه‌های جمع‌آوری شده نشان داد که آلودگی به آفلاتوکسین B_1، B_2، G_1 و G_2 در هیچ یک از نمونه‌ها بالاتر از حد تشخیص مشاهده نگردید. با توجه به نتایج مقدماتی، می‌توان نتیجه‌گیری کرد که احتمال آلودگی به آفلاتوکسین‌ها و اثرات بیماری‌زایی آن‌ها برای مصرف کنندگان ماءالشعیر در ۶ ماهه اول سال ۱۳۹۲ در ایران ضعیف بوده است.

در مطالعه‌ای که توسط Nakajima و همکاران بر روی ۹۴ نمونه ماءالشعیر حاوی الکل وارداتی از کشورهای مختلف و ۲۲ نمونه ماءالشعیر حاوی الکل تولیدی در ژاپن انجام گرفت، گزارش گردید که ۱۱ نمونه از ۹۴ نمونه وارداتی به آفلاتوکسین B_1 در سطح ۸۳/۱-۰/۵ ppb آلوده می‌باشند. از ۲۲ نمونه ماءالشعیر حاوی الکل تولید شده در ژاپن نیز آلودگی به آفلاتوکسین در ۲ نمونه (۰/۵ ppb و ۰/۸ ppb) مشاهده گردید (۱۱). در تحقیقی که بر روی ۱۰۶ نمونه ماءالشعیر حاوی الکل جمع‌آوری شده از کشورهای مختلف اتحادیه اروپا انجام شد، آفلاتوکسین در هیچ کدام از نمونه‌ها یافت نشد (۱۲).

Mably و همکاران در کانادا ۳۰۴ نمونه ماءالشعیر حاوی الکل جمع‌آوری شده (تولید شده در کشورهای مختلف) را از نظر آلودگی آفلاتوکسین مورد بررسی قرار دادند. در ۱۲ نمونه آلودگی به آفلاتوکسین مشاهده گردید و از این ۱۲ نمونه، ۵ نمونه از کشور مکزیک، ۲ نمونه از کشور اسپانیا، یک نمونه از کشور پرتغال و ۴ نمونه از کشور هند بودند (۱۳). بر اساس گزارش Odhav و Naicker در افریقای جنوبی، از ۶ نمونه

ماءالشعیر حاوی الکل مورد مطالعه، ۲ نمونه به آفلاتوکسین آلوده بودند (g/µl ۲۰۰ و ۴۰۰) (۱۴).

Benesova و همکاران مطالعه‌ای را در مورد میزان آفلاتوکسین در ۱۱۷ نمونه ماءالشعیر حاوی الکل جمع‌آوری شده بین سال‌های ۲۰۱۱-۲۰۰۸ انجام دادند. در ۵/۱ درصد نمونه‌های آنالیز شده (۶ نمونه) آفلاتوکسین مشاهده شد. میانگین غلظت آفلاتوکسین در این نمونه‌ها ng/l ۳۱ گزارش شد (۱۵).

Mbugua و Gathumbi گزارش کردند که در ۷۵ نمونه ماءالشعیر حاوی الکل جمع‌آوری شده در کشور کنیا، هیچ نمونه‌ای به آفلاتوکسین آلوده نبود (۱۶). در بررسی انجام شده توسط Matumba و همکاران در کشور مالاوی، تمامی نمونه‌های آنالیز شده به آفلاتوکسین آلوده بودند و میانگین غلظت آفلاتوکسین g/µl ۲۲/۳۲ به دست آمد (۱۷).

با وجود این که در این تحقیق، آلودگی به آفلاتوکسین‌ها در بازه زمانی ذکر شده در هیچ یک از نمونه‌ها یافت نشد، نتایج حاصل از تحقیقات مختلف نشان می‌دهد که ماءالشعیر می‌تواند یکی از منابع تماس با آفلاتوکسین‌ها باشد.

از طرف دیگر، این مطالعه اولین مطالعه‌ای بود که به ارزیابی میزان آفلاتوکسین‌ها در نمونه‌های ماءالشعیر اسلامی و عاری از الکل می‌پردازد و موارد اشاره شده در بالا در کشورهای دیگر که محدود به ۷-۶ مورد در کل دنیا است، در نمونه‌های ماءالشعیر الکلی انجام شده است؛ به همین منظور ارزیابی بیشتر نمونه‌های ماءالشعیر در فواصل زمانی مختلف و حتی در فصول مختلف سال جهت اطمینان از عاری بودن این فراورده از آفلاتوکسین‌ها و تأمین سلامت مصرف کنندگان ضروری به نظر می‌رسد. از طرفی، چند مطالعه اخیر پیشنهاد داده‌اند که در طی تخمیر فراورده‌های ماءالشعیر، میزان آفلاتوکسین‌ها به ویژه آفلاتوکسین B_1 به طور معنی‌داری تجزیه می‌شود و کاهش می‌یابد (۲۰-۱۸).

قابل ذکر است حد مجازی برای وجود آفلاتوکسین در نمونه‌های ماءالشعیر در استاندارد غذایی ایران وجود ندارد و با توجه به این که حد تعیین مقدار به دست آمده برای آنالیز آفلاتوکسین B_1 و G_1 در نمونه‌های مورد بررسی ۱ ppb و برای آنالیز آفلاتوکسین B_2 و G_2 ۰/۲ ppb بوده است و این مقدار از نصف حد مجاز این سم در مواد پر مصرف (برنج و گندم) در ایران ۵ ppb کمتر است. به نظر می‌رسد این حدود قابل قبول می‌باشند و روش اخیر به کار رفته در این آزمایش، از حساسیت مناسبی برخوردار است و می‌تواند به عنوان یک راهنما در پیشبرد روش‌های دیگر راه‌اندازی در این زمینه پاسخگو باشد. متأسفانه آمار دقیق و حتی تقریبی میزان مصرف این فراورده وجود ندارد.

علاوه بر این، از آن جایی که در این مطالعه در هیچ نمونه‌ای آفلاتوکسین بالاتر از حد تعیین مقدار یافت نشد، نمی‌توان میزان ایجاد مخاطره برداشت سم را محاسبه نمود. از این رو توصیه می‌شود مطالعات تکمیلی در این زمینه با استفاده از تعداد بیشتر نمونه‌ها و در شهرهای مختلف ایران برای ارزیابی خطر آفلاتوکسین‌های احتمالی موجود در نمونه‌های ماءالشعیر انجام گیرد تا بتوان میزان ایجاد مخاطره برداشت سم را محاسبه نمود.

سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله مراتب تشکر و سپاس خود را از مسؤولان محترم دانشگاه علوم پزشکی لرستان و حمایت مالی این دانشگاه در اجرای مطالعه اعلام می‌دارند.

References

1. Murphy PA, Hendrich S, Landgren C, Bryant CM. Food Mycotoxins: An Update. Journal of Food Science 2006; 71(5): R51-R65.
2. Williams JH, Phillips TD, Jolly PE, Stiles JK, Jolly CM, Aggarwal D. Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions. Am J Clin Nutr 2004; 80(5): 1106-22.
3. Moss MO. Recent studies of mycotoxins. Symp Ser Soc Appl Microbiol 1998; 27: 62S-76S.
4. Oancea S, Stoia M. Mycotoxins: a review of toxicology, analytical methods and health risks. Acta Universitatis Cibiniensis Series E: Food Technology 2008; 12(1): 19-36.
5. World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, IARC Monographs on the

Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Volume 56 Some Naturally Occurring Substances: Food Items and Constituents, Heterocyclic Aromatic Amines and Mycotoxins. Geneva, Switzerland: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer; 1993.
6. Park JW, Scott PM, Lau BP, Lewis DA. Analysis of heat-processed corn foods for fumonisins and bound fumonisins. Food Addit Contam 2004; 21(12): 1168-78.
7. Institute of Standard and Industrial Research of I.R.Iran. Maximum tolerated limits of mycotoxins in foods and feeds, No. 5925. Tehran, Iran: Institute of Standard and Industrial Research of I.R. Iran; 2002. (Persian).
8. Maghsoodi Sh. Production technology of soft drinks. 1st ed. Tehran, Iran: Publications of Agricultural Sciences; 2003. (Persian).
9. Institute of Standard and Industrial Research of I.R.Iran. Food and feed stuffs Determination of aflatoxins B&G by HPLC method using immunoaffinity column clean up-Test method. No.6872. Tehran, Iran: Institute of Standard and Industrial Research of I.R.Iran; 2011. (Persian).
10. Stroka J, Anklam E, Jorissen U, Gilbert J. Immunoaffinity column cleanup with liquid chromatography using post-column bromination for determination of aflatoxins in peanut butter, pistachio paste, fig paste, and paprika powder: collaborative study. J AOAC Int 2000; 83(2): 320-40.
11. Nakajima M, Tsubouchi H, Miyabe M. A survey of ochratoxin A and aflatoxins in domestic and imported beers in Japan by immunoaffinity and liquid chromatography. J AOAC Int 1999; 82(4): 897-902.
12. Bertuzzi T, Rastelli S, Mulazzi A, Donadini G, Pietri A. Mycotoxin occurrence in beer produced in several European countries. Food Control 2011; 22(12): 2059-64.
13. Mably M, Mankotia M, Cavlovic P, Tam J, Wong L, Pantazopoulos P, et al. Survey of aflatoxins in beer sold in Canada. Food Addit Contam 2005; 22(12): 1252-7.
14. Odhav B, Naicker V. Mycotoxins in South African traditionally brewed beers. Food Addit Contam 2002; 19(1): 55-61.
15. Benesova K, Belakova S, Mikulikova R, Svoboda Z. Monitoring of selected aflatoxins in brewing materials and beer by liquid chromatography/mass spectrometry. Food Control 2012; 25(2): 626-30.
16. Mbugua SK, Gathumbi JK. The Contamination of Kenyan Lager Beers with Fusarium Mycotoxins. Journal of the Institute of Brewing 2004; 110(3): 227-9.
17. Matumba L, Monjerezi M, Khonga EB, Lakudzala DD. Aflatoxins in sorghum, sorghum malt and traditional opaque beer in southern Malawi. Food Control 2011; 22(2): 266-8.
18. Inoue T, Nagatomi Y, Uyama A, Mochizuki N. Fate of mycotoxins during beer brewing and fermentation. Biosci Biotechnol Biochem 2013; 77(7): 1410-5.
19. Inoue T, Nagatomi Y, Uyama A, Mochizuki N. Degradation of aflatoxin B1 during the fermentation of alcoholic beverages. Toxins (Basel) 2013; 5(7): 1219-29.
20. Khan MR, Alothman ZA, Ghfar AA, Wabaidur SM. Analysis of aflatoxins in nonalcoholic beer using liquid-liquid extraction and ultraperformance LC-MS/MS. J Sep Sci 2013; 36(3): 572-7.