ردیابی و تشخیص مایکوتوکسین‌ها

عارف مرادپور
دانشجوی دکتری بیماری‌شناسی گیاهی، پردیس کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه تهران
moradpour.aref93@ut.ac.ir

۱. قارچ‌های عمده‌ی توکسین‌زا و مایکوتوکسین‌های آن‌ها

۱-۱ تاریخچه

واژه‌ی Mycotoxin از واژه‌ی یونانی "Mykes" به معنای "قارچ" و کلمه‌ی لاتین "Toxicum" معنی "سم" گرفته شده است. مایکوتوکسین‌ها مولکول‌هایی با وزن مولکولی پایین بوده که به‌عنوان متابولیت‌های ثانویه توسط قارچ‌ها به‌خصوص جنس‌های آسپرژیلوس (Aspergillus)، پنیسیلیوم (Penicillium) و فوزاریوم (Fusarium) تولید می‌شوند. ایجاد بیماری توسط آلکالوئیدهای Ergot در گندم، مسمومیت غذایی Aleukia ناشی از سموم T2 در طول جنگ جهانی دوم در روسیه، شیوع بیماری X بوقلمون در انگلیس در اثر تغذیه از بادام‌زمینی آلوده به قارچ Aspergillus و سم آفلاتوکسین در دهه‌ی ۱۹۶۰، شیوع هپاتیت در سال ۱۹۷۴ و مرگ‌ومیر براثر اختلال در دستگاه گوارش در سال ۱۹۸۷ در هند به دلیل مصرف ذرت‌های آلوده به سموم گونه‌های دو جنس قارچ آسپرژیلوس و فوزاریوم و مرگ ۱۲۵ نفر در کنیا به دلیل وجود سم آفلاتوکسین در محصول مصرفی در سال ۲۰۰۴ ازجمله مثال‌هایی از ایجاد بیماری و مرگ‌ومیر ناشی از مایکوتوکسین‌ها در انسان‌ها و حیوانات است.

۱-۲ اثرات مایکوتوکسین‌ها

مایکوتوکسین‌ها در انسان و حیوانات باعث بروز آسیب به کبد و کلیه، ایجاد جهش، سرطان و اثرات سرکوب‌کننده‌ی سیستم ایمنی و سایر آثار منفی می‌شوند.

۱-۳ مایکوتوکسین‌های عمده‌ی موجود در مواد غذایی

۱-۳-۱- Aflatoxins (M2 ,M1 ,G2 ,G1 ,B2 ,B1)

در محصولات بادام‌زمینی، ذرت، گندم، برنج و شیر یافت می‌شود که توسط A. parasiticus، A. nominus، A. tamari و A. flavus تولید می‌شوند.

۱-۳-۲- Patulin

در محصولات سیب و آب‌میوه‌های با اسیدیته‌ی پایین یافت می‌شود که توسط P. patulum و P. expansum تولید می‌شوند.

۱-۳-۳- Citrinin

در محصولات گندم، جو، ذرت و برنج که توسط P. citrinum و P. viridicatum تولید می‌شوند.

۱-۳-۴- Ochratoxin A

در محصولات غلات، حبوبات، بادام‌زمینی، پنیر، قهوه، شراب انگور و میوه‌های خشک‌شده توسط A. flavus, P. viridicatum و A. ochraceus تولید می‌شوند.

۱-۳-۵- Fumonisin

در محصولات ذرت و گندم، توسط F. verticillioides و F. proliferatum تولید می‌شوند.

۱-۳-۶- Deoxynivalenol (Trichothecenes)

در محصولات ذرت، جو وگندم و توسط F. culmorum و F. graminearum تولید می‌شوند.

۱-۳-۷- T-2 toxin (Trichothecenes)

در محصولات گندم، جو، ذرت و بلوط و توسط F. roseum، F.sporotrichoides و F. poae تولید می‌شوند.

۱-۳-۸- Zearalenone

در محصولات ذرت و یونجه که توسط F. graminearum، F. tricinctum و F. Culmorum تولید می‌شوند.

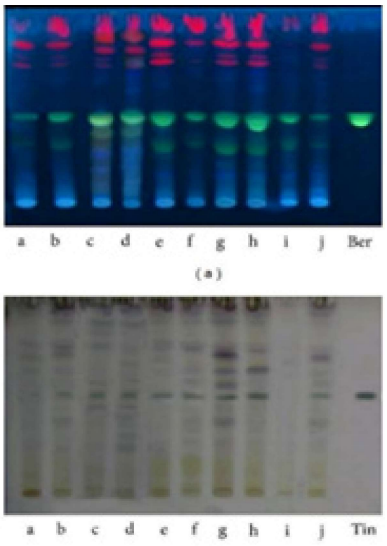
۲. ردیابی مایکوتوکسین‌ها

مایکوتوکسین‌ها به‌طور طبیعی و مکرر در مواد و جیره‌ی غذایی ایجاد می‌شوند. به دلیل ماهیت سمی مایکوتوکسین‌ها تشخیص آن‌ها یک امر ضروری است. تعدادی از روش‌های تشخیص توسعه داده شده و در میان آن‌ها کروماتوگرافی (Chromatography) تکنیکی است که به‌طور گسترده استفاده می‌شود.

عملکرد روش‌های مختلف تشخیص مایکوتوکسین‌ها برای مواد غذایی مختلف، متفاوت است. مراحل روش کار برای تشخیص مایکوتوکسین‌ها به ترتیب شامل استخراج از مواد نمونه، تصفیه و یا خالص‌سازی، تجزیه‌وتحلیل کیفی و کمی آن است. متداول‌ترین روش‌های مورداستفاده حال حاضر در اینجا شرح داده شده است.

۲-۱ کروماتوگرافی لایه‌نازک
(TLC) Thin Layer Chromatography

TLC یکی از روش‌های سنتی تشخیص مایکوتوکسین‌ها است. این روش شناسایی و غربالگری تعداد زیادی نمونه را به‌صورت آسان و مقرون‌به‌صرفه امکان‌پذیر می‌کند. در این روش یک لایه سیلیکاژل استفاده می‌شود. بااین‌حال، فنیل با پیوندغیرقطبی (Phenyl non-polar bonded) و پلی آمید (Polyamide) نیز وجود دارند استفاده می‌شوند.



لکه‌های قابل‌رؤیت روی کاغذ TLC

مایکوتوکسین‌ها روی صفحه‌ی TLC بارگذاری شده و در زیر نور UV یا با پاشش مواد شیمیایی که با مایکوتوکسین‌ها واکنش می‌دهند و باعث تقویت دیدن آن می‌شوند، به‌صورت فلورسانس یا تولید محصولات رنگی مشاهده می‌شوند.

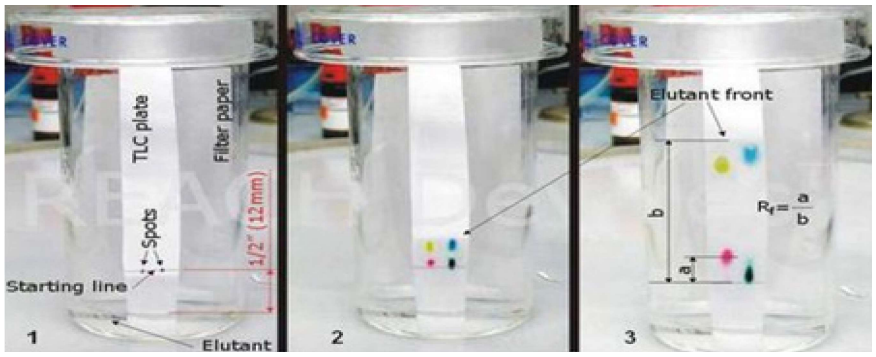
آفلاتوکسین‌ها، سیترینین و اوکراتوکسین به‌طور طبیعی ترکیبات فلورسانس هستند؛ ازاین‌رو آن‌ها بر اساس خواص فلورسانس خود شناسایی می‌شوند. به‌عنوان‌مثال، آفلاتوکسین‌های B و G به ترتیب توسط فلورسانس آبی و سبز از هم متمایز هستند درحالی‌که سیترینین توسط فلورسانس زرد مشخص می‌شود.

آفلاتوکسین‌ها با اسپری معرف شیمیایی تری فلوئوراستیک (Trifluoroacetic Acid) و اسیدسولفوریک (Sulfuric Acid) روی صفحه TLC مشخص‌شده‌اند. تجزیه‌وتحلیل نیمه کمی برای مایکوتوکسین‌ها توسط TLC انجام شده است. بااین‌حال، این روش حساسیت زیادی ندارد.

برخی محققین پیشنهاد کردند که اسپری کردن اسیدسولفوریک میزان تشخیص آفلاتوکسین M۱ را از µg/kg ۰/۵ به µg/kg ۰/۳ بهبود می‌بخشد.

افزایش وضوح و دقت روش TLC در کروماتوگرافی با لایه‌نازک عمل‌کرد بالا (HPTLC= High-Performance Thin Layer Chromatography) بهبود یافته است. از HPTLC برای تعیین آفلاتوکسین‌ها در محصولات بادام‌زمینی استفاده شده است.

دستگاه TLC



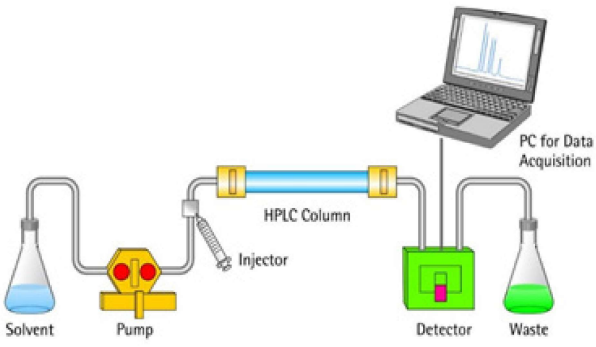
تانک TLC

۲-۲ کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا
High-Performance Liquid Chromatography (HPLC)

HPLC حساسیت و دقت بیشتری در تعیین مایکوتوکسین فراهم می‌کند. در HPLC از فاز معمولی و فازمعکوس با انواع سیستم‌های تشخیص استفاده می‌شود. آشکارسازهای پرتوی فرابنفش (UV) و فلورسانس بیشتر مورداستفاده قرار می‌گیرند.

تشخیص دقیق و حساس همه‌ی آفلاتوکسین‌ها در سطح ۰/۳-۱ µg/kg امکان‌پذیر است. آفلاتوکسین B1 و B2 توسط ردیاب UV در طول‌موج ۳۶۰-۳۶۵ nm و G1 و G2 توسط فلورسانس تشخیص داده می‌شوند. مایکوتوکسین‌ها و فومونیزین‌های غیر فلورسنت به‌واسطه‌ی فلورسانس شدن با استفاده از مشتق کردن با Postcolumn O-Pthalaldehyde، شناسایی و تشخیص داده می‌شوند. حد تشخیص فومونیزین با این روش ۱۰ µg/kg در ذرت گزارش شده است.

اوکراتوکسین A در شراب توسط HPLC، با روش تصفیه‌ی ایمونوافینیتی (Immunoaffinity) با حد ۰/۰۱ n/ml شخیص داده شده است. در برنج با استفاده از HPLC با ردیاب فلورسانس تشخیص آفلاتوکسین B1، سیترینین و اوکراتوکسین به ترتیب با حد تشخیص ۰/۰۷، ۰/۱۱ و ۰/۰۸ میکروگرم در کیلوگرم (µg/kg) صورت گرفته است.



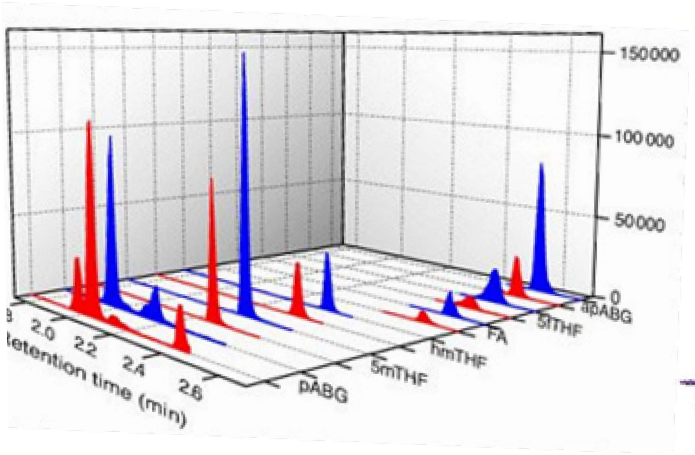
مراحل کار با HPLC

۲-۳ کروماتوگرافی مایع-طیف‌سنجی جرمی
Liquid Chromatography-Mass Spectrometry (LC-MS)

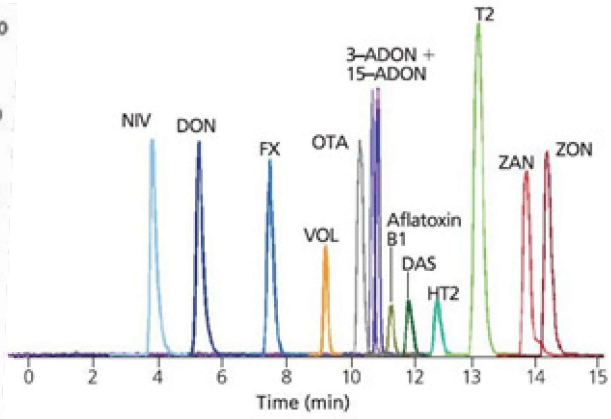
کروماتوگرافی مایع همراه با طیف‌سنجی جرمی یا LC-MS نیاز به مشتق شدن نمونه با مواد فلورسنت را از بین می‌برد. LC-MS روشی بسیار انتخابی و حساس در شناسایی و تعیین مایکوتوکسین‌ها است. محققین یک دستگاه کروماتوگراف مایع‌طیف‌سنج جرمی متوالی (Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry) LC-MS / MS برای شناسایی ۳۳ مایکوتوکسین به‌طور هم‌زمان در مواد غذایی مختلف نیز ایجاد کرده‌اند. مایکوتوکسین‌های مورد ارزیابی در این سیستم شامل آفلاتوکسین B1، B2، G1 و G2 و اوکرواتوکسین A با حد تشخیص ۱ µg/kg و برای Deoxynivalenol ۵۰ µg/kg بود. LC-MS / MS ترکیبی از کروماتوگرافی مایع با طیف‌سنج جرمی متوالی که از جفت کردن یک طیف‌سنج جرمی به طیف‌سنج جرمی دوم تشکیل می‌شود، است.

LC-MS / MS برای تشخیص و تعیین مایکوتوکسین‌ها در نمونه‌های خون و ادرار استفاده شده است. UHPLC-ESIMS/MS (Ultra-High-Performance Liquid Chromatography Combined With Electrospray Ionization Triplequadrupole Mass Spectrometry (Tandem) یا کروماتوگرافی مایع فوق‌العاده با کارایی بالا به همراه الکتروسپایر یونیزاسیون سه‌گانه با طیف‌سنجی جرمی چهارضلعی پشت سر هم برای تعیین آفلاتوکسین M1، اکراتوکسین A، زرآلنون و آلفا-Zearalenol در شیر مورداستفاده واقع می‌شود.

دستگاه LC-MS



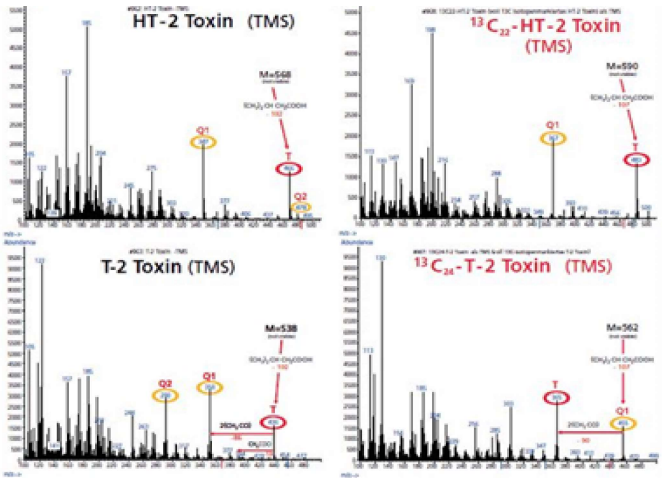
نمودار UHPLC-ESIMS/MS



نمودار تشخیص مایکوتوکسین LC-MS / MS

۲-۴ کروماتوگرافی گازی Gas Chromatography (GC)

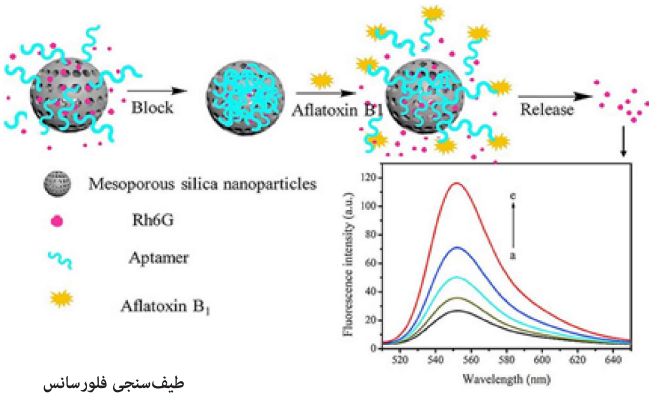
این روش برای تشخیص مایکوتوکسین‌ها به‌ویژه تریکوتسن‌ها (Trichothecenes) در نمونه‌های مواد غذایی استفاده می‌شود. بیشتر مایکوتوکسین‌ها غیرفرار هستند و ازاین‌رو برای تشخیص مشتق می‌شوند. آشکارساز ربایش الکترون (ECD)، طیف‌سنجی جرمی (MS) و یونیزاسیون شعله، آشکارسازهای متداول مورداستفاده در GC هستند. آنالیز تریکوتسن‌ها در ذرت به‌واسطه‌ی GC انجام شده است. مایکوتوکسین‌های تریکوتسن مشتق شده با Anhydride Heptafluorobutyric با استفاده از ECD شناسایی شدند. حد کمی شناسایی در ذرت ۲۰۰-۵۰ µg/kg است. در گزارشی دیگر، تریکوتسن‌ها در ذرت توسط آشکارساز MS با حد تشخیص ۴۰-۳۰ µg/kg و حد کمی از ۲۰۰-۷۰ µg/kg مشخص شدند. روش GC نیز برای تجزیه‌وتحلیل چند مایکوتوکسین مانند پاتولین، Zearalenone و Trichothecenes در گندم مورداستفاده بوده است. در این روش معایبی مانند نیاز به مشتقات و پایداری حرارتی مایکوتوکسین‌ها که در آن گرما نمونه‌ها را تخریب می‌کند وجود دارد.



نمودار GC چند تریکوتسن

۲-۵ طیف‌سنجی فلورسانس Fluorescence Spectrometry

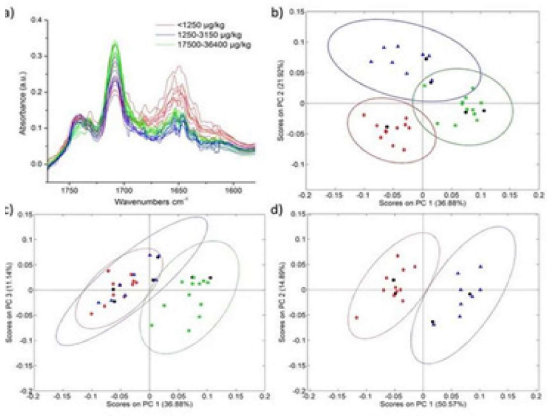
خاصیت فلورسانس چند مایکوتوکسین مشخصه‌ی مهم برای تشخیص آن‌ها است. یک حسگر زیستی جدید مبتنی بر سطح Plasmon-Enhanced طیف‌سنجی فلورسانس است که برای شناسایی آفلاتوکسین M1 در شیر با حد تشخیص کمتر از ۰/۶ pg/ml توسعه داده شده است.



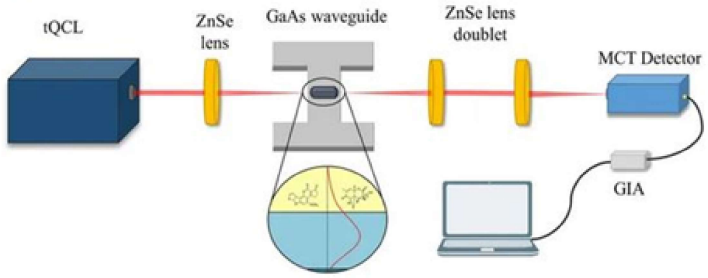
طیف‌سنجی فلورسانس

۲-۶ طیف‌سنج مادون‌قرمز Fourier Transform Infrared Spectroscopy

استفاده از طیف‌سنجی مادون‌قرمز، تکنیک امیدوارکننده برای تشخیص سریع و بی‌خطر مایکوتوکسین‌ها در غلات است. Deoxynivalenol در نمونه‌ی دانه‌ی گندم با استفاده از طیف‌سنجی مادون‌قرمز در غلظت‌های بالاتر از ۴۰۰ µg/kg مشاهده شد. در یک مطالعه‌ی مشابه، از Midinfrared برای تشخیص Deoxynivalenol در غلظت کم‌تر از ۳۱۰ µg/kg در نمونه‌های ذرت استفاده شد. همچنین از این روش طیف‌سنجی مادون‌قرمز برای کشف آفلاتوکسین B1 و اوکرواتوکسین A در فلفل قرمز در اسپانیا استفاده شد.



نمودار حاصل از ردیابی مایکوتوکسین

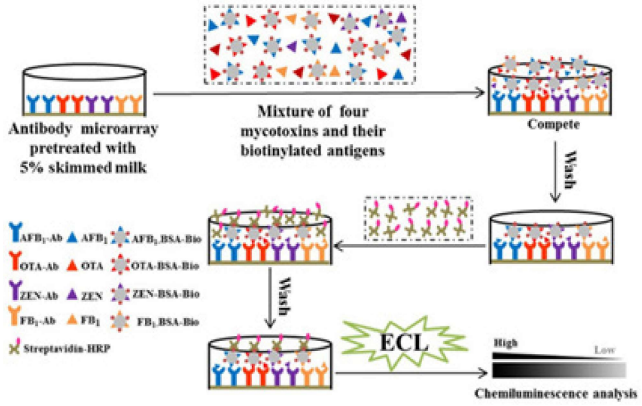


Schematic of the MYCOSPEC sensor system comprising a tunable quantum cascade laser, ZnSe lenses, a GaAs/AlGaAs thin-film waveguide slab, and a TE-cooled MCT detector.

مراحل ردیابی مایکوتوکسین

۲-۷ الایزا Enzyme–Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

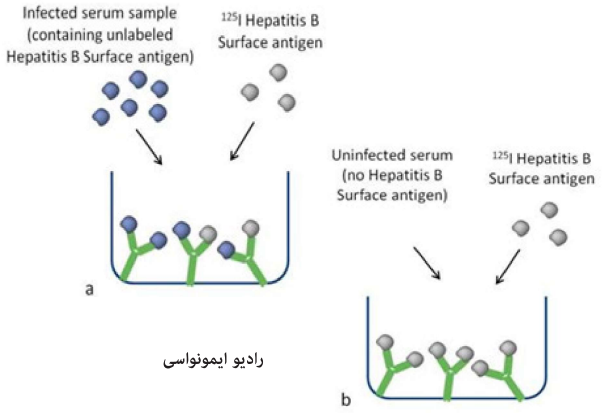
از روش الایزا برای تعیین آفلاتوکسین در تعداد زیادی از غذاها استفاده شده است. االایزا به‌صورت روش رقابتی مستقیم و غیرمستقیم است. از ELISA برای شناسایی Deoxynivalenol و Zearalenone در ذرت به‌صورت رقابتی غیرمستقیم استفاده شده است. از ELISA رقابتی غیرمستقیم برای تشخیص آفلاتوکسین B1 در برنج با حد تشخیص ۰/۰۲ ng/kg استفاده کرده‌اند. همچنین با استفاده از این روش وجود مایکوتوکسین‌های دیگر مانند فومونیزین با حد تشخیص ۳ ng/ml در آبجو تعیین شده است. از مزایای این روش امکان غربالگری تعداد نمونه‌های زیاد و مخلوط شده است.



مراحل الایزا

۲-۸ رادیو ایمونواسی Radio Immuno Assay (RIA)

RIA از روش‌های دیگر ایمونولوژیک (Immunological) برای تشخیص مایکوتوکسین است. یک RIA فاز جامد توسعه‌یافته برای تشخیص آفلاتوکسین B1 در ذرت و گندم نیز معرفی شده است. کیت تجاری RIA برای تعیین اوکرواتوکسین A در مواد غذایی و خوراکی با حد قابل‌تشخیص ۱ µg/kg وجود دارد. RIA همچنین برای تشخیص Nivalenol در جو استفاده‌شده که نتایج مطابق با تجزیه‌وتحلیل کروماتوگرافی گازی گزارش شده است.

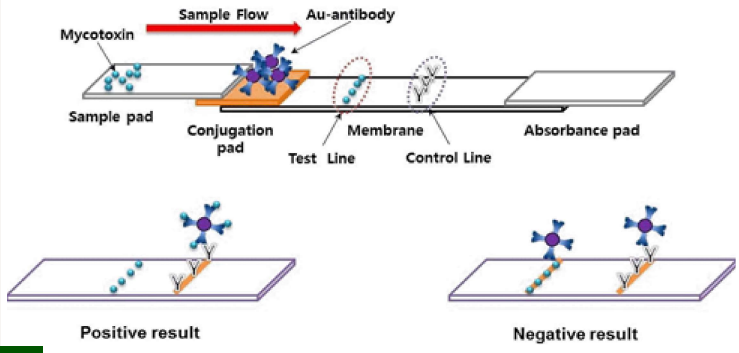


رادیو ایمونواسی

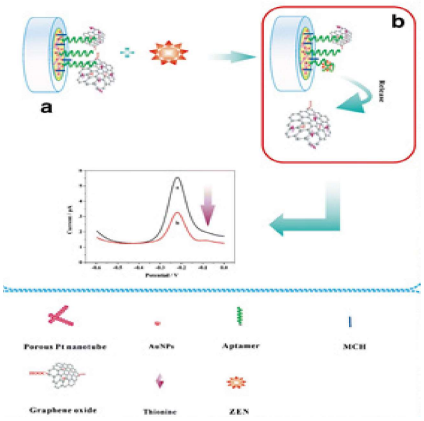
۲- ۹ دستگاه‌های جریان جانبی Lateral flow devices

جریان‌های جانبی یا Dipstick immunoassay، درواقع یک طراحی پیشرفته از الایزا است که برای شناسایی مایکوتوکسین‌ها با موفقیت استفاده شده است. این تکنیک برای ردیابی Aflatoxin B1 و Ochratoxin A به‌طور همزمان در یک نمونه فلفل به ترتیب با حد تشخیص ۲ µg/kg و ۱۰ µg/kg استفاده شده است. مایکوتوکسین‌های Deoxynivalenol و Zearalenone در نمونه گندم با استفاده

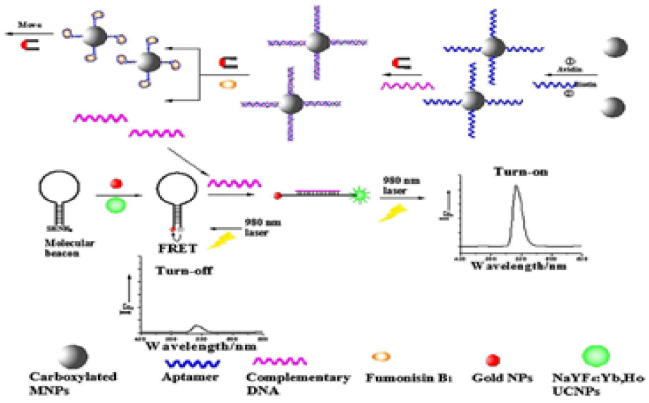
از کلوئیدهایی با پایه‌ی طلا به روش جریان جانبی ایمونواسی به میزان ۱۰۰ µg/kg و ۱۵۰۰ µg/kg تشخیص داده شدند. مطالعات دیگر شامل تشخیص Aflatoxin B1 در خوراک خوک، T2 در گندم و بلوط و Aflatoxin M1 در شیر هستند. این روش بسیار ساده و سریع است که در مدت ۱۰ دقیقه، نتایج مشخص می‌شود و برای بسیاری از موارد قابل‌استفاده است.



دستگاه جریان جانبی



مراحل روش تشخیص سیگنال



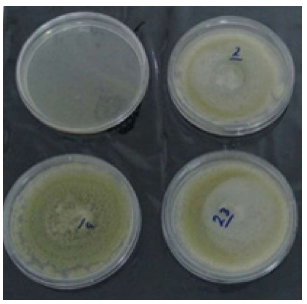
مراحل روش تشخیص سیگنال

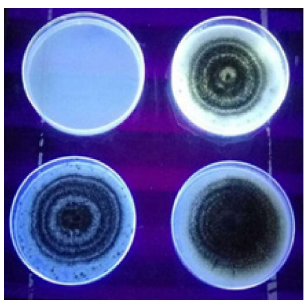
۲-۱۰ روش وابسته (تشخیص) سیگنال
Signal Amplification Method

با پیشرفت فنّاوری، غلظت بسیار پایین مایکوتوکسین را می‌توان با استفاده از روش تشخیص سیگنال شناسایی کرد. از این روش برای بررسی وجود Aflatoxin B1 در بادام‌زمینی، ذرت، گندم، پنیر و فلفل استفاده و تا حد تشخیص ۰/۱ ng/ml از آن گزارش شده است. در مطالعه‌ی دیگری، یک تراشه با نانو ذرات حساس طلا روی سطح Plasmon طراحی شده بود تا با استفاده از آن برای شناسایی چندین مایکوتوکسین به روش ایمونواسی رقابتی (Competitive Immunoassay) استفاده شود. آن‌ها اختصاصی بودن و حساسیت بالای این تراشه را در تشخیص Aflatoxin B1، A Ochratoxin و Zearalenone به ترتیب با حد تشخیص پایین ۸ pg/mL، ۳۰ pg/mL و ۱۵ pg/mL گزارش داده‌اند.

۲-۱۱ محیط کشت نارگیل آگار
Coconut Cream Agar (CCA)

این محیط کشت موجب تحریک تولید آفلاتوکسین توسط گونه‌های توکسین‌زای جنس آسپرژیلوس می‌شود. معمولاً بعد از گذشت هفت روز در صورت وجود آفلاتوکسین در محیط و با توجه به خاصیت فلورسانس بودن آن، هنگامی‌که تشتک کشت در اتاقک فرابنفش با طول‌موج ۳۶۵ nm باشد، مشخص می‌شود. این روش برای مایکوتوکسین سیتریتین هم استفاده می‌شود.





محیط کشت نارگیل آگار

منبع

Aiko, V. and Mehta, A. 2015. Occurrence, detection and detoxification of mycotoxins. Journal of biosciences. 954-943 .(5)40.