بسم الله الرحمن الرحیم

پایان نامه

دوره کارشناسی ارشد در رشته سم شناسی

عنوان

مقایسه‌ای بین روش‌های ایمونوکروماتوگرافی و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا جهت تعیین آفلاتوکسین M1 در شیر در شهر تهران

استاد راهنما

دکتر بهرام دارایی

استاد مشاور

دکتر محمد جواد رسائی

نگارش

الهه السادات علوی رضوی راوری

تقدیم به:

تشکر و قدردانی

چکیده

شیر و محصولات لبنی منبع سرشاری از ترکیبات مغذی همچون پروتئین و کلسیم هستند برای انسان‌ها و به خصوص کودکان هستند و از طرفی شیر و این محصولات می‌توانند یکی از منابع بالقوه‌ی آفلاتوکسین‌ها باشند. آفلاتوکسین‌ها ترکیباتی به شدت سرطانزا هستند که در بسیاری از نقاط دنیا وجود دارند.. آفلاتوکسین M1 مشتق مونو هیروکسیله‌ی آفلاتوکسین B1 می‌باشد که به دنبال بلع غذای آلوده به AFB1 در شیر حیوان ترشح می شود.

اهداف: با توجه به پایداری AFM1 در برابر پروسه‌های پاستوریزاسیون و استرلیزاسیون و اینکه تهدید جدی برای سلامت انسان به شمارمی‌رود، هدف اصلی از انجام این تحقیق معرفی یک روش سریع بر پایه‌ی خواص ایمونوکروماتوگرافی در سطح حد مجاز ایران، به منظور تعیین حضور AFM1 به جای روش HPLC که هم نیازمند فرایند استخراج و خالص سازی با ستون ایمونوافینیتی و هزینه‌ی بالای اجرای روش آنالیزی است، می‌باشد. در این تحقیق پس از اعتبارسنجی هر دو روش غربالگری و تاییدی به منظور تعیین حضور AFM1 در نمونه‌های شیر موجود در بازار شهر تهران، تعداد ۳۰ نمونه شیر استرلیزه و پاستوریزه از برندهای متفاوت و همچنین تعداد ۱۰ نمونه شیر خام گاو از شیرفروشی‌های سطح شهر جمع آوری و توسط هر دو روش آنالیز شدند.

نتایج: بر اساس نتایج به دست آمده منحنی کالیبراسیون در محدوده‌ی 0/05 -2/5 ng/ml خطی بوده و ضریب همبستگی برابر.....بوده است. میانگین درصد بازیافت در دامنه بین.............. بوده است. حدشناسایی (LOD) و حد کمی سازی (LOQ) به ترتیب برابر ....و ...... بوده است. نتایج حاصل از اعتبارسنجی روش سریع از نظر صحت و تکرارپذیری نتایج به خوبی توسط روش تاییدی HPLC تایید شدند. پس از اعتبارسنجی دو روش به منظور تعیین حضور AFM1 تعداد ۳۰ نمونه شیر استرلیزه و ۱۰ نمونه شیر پاستوریزه بررسی شدند که نتایج نشان داد......

کلمات کلیدی: شیر، آفلاتوکسین M1، ایمونوکروماتوگرافی، HPLC .

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

۱-1 مقدمه 12

۱-2 مایکوتوکسین‌ها........ Error! Bookmark not defined.

۱-۳-1 طبقه بندی مایکوتوکسین‌ها........ 13

۱-۲-2 مایکوزیز و مایکوتوکسیکوزیز 15

۱-3 آفلاتوکسین‌ها........ 15

۱-۳-1 آفلاتوکسین B1 16

۱-۳-2 آفلاتوکسین G1 16

۱-۳-3 آفلاتوکسین‌های B2 و G2........ 17

۱-۳-4 آفلاتوکسین M1 18

۱-۳-5 عوامل موثر در تولید آفلاتوکسین‌ها 19

۱-4 قوانین و حدود مجاز مربوط به آفلاتوکسینAFM1........ 19

۱-5 عوارض ناشی از مصرف آفلاتوکسین 20

۱-۵-1 سمیت حاد 20

۱-۵-2 سمیت مزمن 20

۱-۵-3 سرطانزایی و جهش‌زایی ناشی از آفلاتوکسین‌ها........ 20

۱-۵-4 تقابل آفلاتوکسین با DNA........ 20

۱-۵-5 جلوگیری آفلاتوکسین از سنتز DNA 20

۱-۵-6 آفلاتوکسین و کاهش سنتز RNA........ 20

۱-۵-7 آفلاتوکسین و کاهش سنتز پروتئین 21

۱- ۶ روش‌های حذف و غیر فعال کردن آفلاتوکسین‌ها 21

۱-۶-۱حذف فیزیکی.. 21
۱-۶-۲ روش اشعه دهی.. 21
۱-۶-۳ حذف شیمیایی.. 22
۱-۶-۴ حذف بیولوژیکی.. 22
۱-۷ شیر.. 22
۱-۷-۱ ارزش غذایی شیر 22
۱-۷-۲ پاستوریزاسیون و استرلیزاسیون شیر.. 24
۱-۸ روش‌های آنالیز آفلاتوکسین‌ها.. 26
۱-۸-۱ روش کروماتوگرافی با لایه‌ی نازک 26
۱-۸-۲ روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا.. 26
۱-۸-۳ روش اسپکتومتری جرمی.. 27
۱-۹ استفاده از روش‌های سریع و نحوه‌ی عملکردشان 28
۱-۱۰ روش‌های سریع برای آنالیز مایکوتوکسین‌ها.. 28
۱-۱۰-۱ روش ایمونوکروماتوگرافی 28
۱-۱۱ اجزای Lateral Flow Assay.. 29
۱-۱۱-۱ Sample application pad.. 29
۱-۱۱-۲ Conjugate pad.. 29
۱-۱۱-۳ Nitrocellulose membrane 29
۱-۱۱-۴ Adsorbent pad 29
۱-۱۲ انواع فرم‌های LFA 30
۱-۱۲-۱ فرم ساندویچ 30
۱-۱۲-۲ فرم رقابتی 31
۱-۱۳ معتبرسازی روش‌های آنالیز.. 32

۱-۱۳-۱ پارامترهای معتبرسازی 32
۱-۱۳-۲ انتخابی بودن 32
۱-۱۳-۳ خطی بودن 33
۱-۱۳-۴ دقت 33
۱-۱۳-۵ دقت در یک روز 33
۱-۱۳-۶ دقت بین روزها 33
۱-۱۳-۷ تجدیدپذیری 33
۱-۱۳-۸ صحت 33
۱-۱۳-۹ روش تعیین صحت 33
۱-۱۳-۱۰ حد آشکارسازی 34
۱-۱۳-۱۱ حد تعیین مقدار 34
۱-۱۴ اهداف تحقیق 34
۲-۱ لوازم و مواد مورد نیاز 37
۲-۱-۲ دستگاه‌های مورد نیاز 37
۲-۱-۲مواد مورد نیاز 38
۲-۲ روش کار 39
۲-۲-۱ آماده کردن استانداردهای آفلاتوکسینM1 39
۲-۲-۲ جداسازی پیک آفلاتوکسینM1 توسط HPLC 40
۲-۲-۳ رسم منحنی استاندارد 40
۲-۲-۴ تهیه‌ی استانداردهای کاری جهت معتبرسازی کیت آفلاتوکسینM1 40
۲-۲-۵ معتبرسازی کیت تست آفلاتوکسینM1 40
۲-۲-۶ مراحل انجام کار با کیت تست آفلاتوکسینM1 40
۲-۲-۷ مراحل انجام استخراج و clean up نمونه‌ی شیر 42

۲-۳ جمع آوری نمونه .... Error! Bookmark not defined.

چکیده ؟؟؟؟

فصل اول

مقدمه و مروری بر مقالات گذشته

۱-۱. مقدمه

از آنجایی که شیر و محصولات لبنی منابع مناسبی برای کلسیم و پروتئین‌ها هستند، نقش مهمی را در یک رژیم غذایی سالم ایفا می‌کنند[1, 2]. با توجه به مصرف بالای شیر در تمام گروه های سنی و از طرفی احتمال حضور آفلاتوکسین M1 در شیر در نتیجه‌ی تغذیه‌ی دام از علوفه‌ی آلوده به آفلاتوکسین B1، شناسایی این سموم قارچی اهمیت بسیاری پیدا کرده است. آفلاتوکسین‌ها به‌طور عمده توسط دو دسته قارچ آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس در شرایط دمایی بین ۲۴-۳۴ درجه سانتیگراد و رطوبت بالای ۷٪ تولید می‌شوند[3, 4]. این سموم به چهار گروه B1، B2، G1 و G2 طبقه بندی می‌شوند که از بین آن‌ها آفلاتوکسین B1 بیشترین شیوع و سمیت را داشته و اثرات جهش زایی، تراتوژنی، سرطانزایی خصوصاً روی کبد و سرکوب سیستم ایمنی دارد. آفلاتوکسین B1 پس از متابولیزه شدن در کبد توسط سیتوکروم‌های میکروزومال P450 به مشتقات مختلفی تبدیل می‌شود. آفلاتوکسین M1 مشتق مونوهیدروکسیله‌ی آفلاتوکسین B1 می‌باشد و از آنجا که اولین‌بار در شیر دام آلوده شده با آفلاتوکسین یافت شده است آفلاتوکسین M نامگذاری شده است. که در واقع این سم از طریق اتصال به کازئین شیر در شیر ترشح می شود[5, 6].

با وجود روش‌های مرجعی چون HPLC که علی رغم برخورداری از دقت و صحت بالا به دلایلی چون زملن‌بر بودن و هزینه‌ی بالا نیاز به روشی سریع و ارزان به شدت دیده می‌شود . به همین دلیل استفاده از rapid test ها در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه حیطه‌های آنالیزی قرار گرفته است. از جمله روش‌های سریع میتوان به روش‌های ایمونوکروماتوگرافی اشاره کرد که در این روش اساس شناسایی آنالیت، واکنش بین آنتی بادی و آنتی‌ژن می‌باشد که منظور از آنتی‌ژن در این روش همان آنالیت و سم مورد نظر می‌باشد. از مزایای این روش میتوان به سرعت بالا، ارزان بودن و آسانی آن اشاره کرد. که این روش قادر به تعیین حضور و یا عدم حضور آفلاتوکسبن M1 در غلظت‌های بالا و یا پایین حد مجاز AFM1 در شیر که برابر ppb ۰/۱ است، می‌باشد[7, 8]

۱-۲. مایکوتوکسین‌ها

مایکوتوکسین‌ها قدمتی به اندازه‌ی دانه‌های غلات دارند اما شناسایی آن‌ها به عنوان مواد شیمیایی مشخص تولید شده توسط قارچها که به بدن انسان و دیگر جانوران آسیب می‌رساند به دهه‌های اخیر بازمی‌گردد. واژه مایکوتوکسین از لغت یونانی Myke به معنی قارچ و لغت لاتین Toxicum به معنی سم گرفته شده است.

متابولیت‌های اولیه، ترکیبات شیمیایی هستند که برای زنده ماندن و عملکرد نرمال ارگانیسم ضروری هستند در حالی‌که متابولیت‌های ثانویه ترکیباتی غیرضروری می‌باشند[9].

مدت زمان زیادی است که بشر دانسته است برخی از گونه‌های قارچهای بزرگ پس از خورده شدن می‌توانند به عنوان یک خطر برای سلامتی انسان مطرح باشند، اما حتی تا زمان‌های اخیر نیز چنین می‌پنداشتند که وقوع کپک زدگی بر روی غذا فقط یک مشکل زیبا شناختی است و خطری برای سلامتی محسوب نمی شود. علی‌رغم مطالعات فراوان طی نیمه اول قرن گذشته، واژه‌ی مایکوتوکسین اولین بار در سال ۱۹۶۲ پس از بحران دامی ایجاد شده در لندن ایجاد شد که طی این واقعه نزدیک به ۱۰۰ هزار بوقلمون آلوده از بین رفتند، که علت آن را بادام زمینی آلوده به متابولیت ثانویه‌ی قارچ آسپرژیلوس فلاووس (آفلاتوکسین) عنوان کردند[10, 11]. این مسئله محققان را نسبت به امکان مرگ بار بودن متابولیت‌های دیگر قارچها نیز حساس کرد. از فاصله‌ی زمانی بین سال‌های ۱۹۶۲ تا ۱۹۷۵ میتوان به عنوان دوره‌ی طلایی مایکوتوکسین یاد کرد[12]. زیرا که محققان بسیاری در این دوره مشغول تحقیق و شناسایی این سموم قارچی شدند. امروزه حدود ۳۰۰ الی ۴۰۰ ترکیب به عنوان مایکوتوکسین شناخته شده‌اند که نزدیک به ۱۲ گروه از آنها برای سلامت انسان و حیوان تهدید به شمار می‌روند. با وجود اینکه تمام مایکوتوکسین‌ها منشا قارچی دارند اما همه‌ی ترکیبات سمی تولید شده توسط قارچها مایکوتوکسین نامیده نمی‌شوند در این امر هم هدف و هم غلظت متابولیت هردو مهم می‌باشند. محصولات قارچی که برای باکتری‌ها سمی هستند همچون پنیسلین، آنتی بیوتیک نامیده می‌شوند. محصولات قارچی که برای گیاهان سمی هستند فیتوتوکسین می‌نامند، واژه‌ی فیتوتوکسین به سموم تولید شده توسط گیاهان هم مربوط می‌شود و اما مایکوتوکسین‌ها توسط قارچها تولید می‌شوند و در غلظت پایین برای گروه‌های حیوانی سمی هستند[13].

۱-۲-۱. طبقه بندی مایکوتوکسین‌ها

آلودگی به مایکوتوکسین‌ها هم می‌تواند در اثر رشد قارچ در مزرعه طی مراحل مختلف کاشت، داشت و برداشت محصول و هم در انبار بر روی محصولات ذخیره شده رخ دهد. اکثر مایکوتوکسین‌هایی که منجر به آلوده‌سازی محصولات برداشت و انبار شده همچون غلات و علوفه می‌شوند سبب اثرات سوء بر سلامت انسان و حیوان هستند. البته تمامی قارچهای رشد یافته بر روی گیاهان، تولید کننده‌ی متابولیت‌های سمی نیستند. از میان مایکوتوکسین ها تعداد معدودی حاصل فعالیت متابولیکی قارچ های خاصی می‌باشند، این در حالی است که سایر مایکوتوکسین‌ها توسط طیف وسیعی از قارچها ایجاد می‌شوند. تا کنون تقریبا 400 نوع مایکوتوکسین که توسط 100 نوع مختلف از گونه های مختلف قارچی تولید می شوند، گزارش شده‌اند.

معیارهای متفاوتی برای تقسیم بندی وجود دارد

طبقه بندی بر مبنای ساختار شیمیایی

طبقه بندی بر مبنای منشا بیوسنتزی

طبقه بندی بر مبنای اثرات بیولوژیک

و طبقه‌بندی بر مبنای گونه قارچی تولید کننده، از میان مایکوتوکسین‌هایی که به خوبی شناخته شده‌اند و مهم‌ترین گروه‌ها از نظر ایجاد خطر برای انسان و سایر حیوانات و همچنین ایجاد آلودگی در مواد غذایی می‌توان به آفلاتوکسین‌ها، داکسی نیوالنول، فومینیسن، زیرالنون، T2 توکسین، اکراتوکسین‌ها، تریکوتسن‌ها و آلکالوئیدهای ارگوت اشاره کرد[14].

سایر مایکوتوکسین‌ها شامل پاتولین(Patulin) ، سیکلوپیازونیک‌اسید(Cyclopiazonic acid) و سیترینین(Citrinin) می باشند که جزء گروه‌های مهم سمیت‌زا دسته بندی می‌شوند[15]. در کل تماس با مایکوتوکسین‌ها در مناطقی از جهان که روش‌های نگهداری و ذخیره سازی مناسب نمی‌باشد رخ می‌دهد در مناطقی که سو تغذیه یک مشکل محسوب می‌شود و قوانین زیادی برای حدود تماس وجود ندارند[14].

۱-۲-۲. خواص عمومی مایکوتوکسین‌ها

ویژگی‌های عمومی مایکوتوکسین‌ها به شرح ذیل می‌باشد:

- متابولیت‌های ثانویه قارچ‌های رشته‌ای می‌باشند که تحت شرایط مناسب بر روی محصولات غذایی انسان و حیوانات تولید می‌شوند.
- از نظر ساختمان غالباً هیدروکربن‌های حلقوی هستند و به ندرت هیدروکربن‌های خطی می‌باشند.
- اکثراً وزن مولکولی پایینی دارند و به همین دلیل به تنهایی فاقد خاصیت آنتی‌ژنیک بوده از اینرو قادر به تحریک سیستم ایمنی میزبان نیستند.
- بر اساس تمایل به بافت هدف، تحت عناوین مختلفی نظیرهپاتوتوکسین، نوروتوکسین، نفروتوکسین، ژنیتوتوکسین، درماتوکسین، گاستروانتستینال توکسین و غیره نام گذاری شده‌اند.
- در مقابل عوامل فیزیکی مانند حرارت، آسیاب کردن و سایر اعمالی که بر روی مواد غذایی خام تا مراحل بسته بندی اعمال می گردد، مقاوم می‌باشند.
- جزء مسمومیت‌زاهای بالقوه هستند، زیرا تحت شرایط مختلف باعث آلودگی مواد غذایی می‌شوند.
- گروهی از آنها اثرات چندگانه دارند و علاوه بر مسمومیت قادر به ایجاد اختلالات مختلف می‌باشند. بطور کلی قارچ‌های مولد سم به 4 گروه اصلی شامل جنس آسپرژیلوس، جنس پنی سیلیوم، جنس فوزاریوم و جنس آلترناریا قرار می‌گیرند[16].

۱-۲-۳. مایکوزیز و مایکوتوکسیکوزیز

رشد مستقیم قارچ بر روی میزبان حیوانی سبب ایجاد بیماری‌هایی می شود که مجموعا مایکوزیز نامیده می‌شود در حالی که انواع تماس‌های خوراکی، تنفسی و پوستی و.. با متابولیت‌های سمی قارچها سبب ایجاد بیماری‌هایی می‌شود که مجموعا مایکوتوکسیکوزیز نامیده می شود.

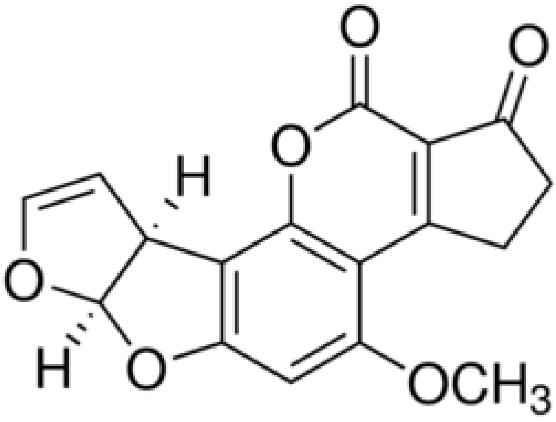
طیف علائم مایکوزیز از علائم صرفا آزاردهنده تا تهدید کننده‌ی حیات را شامل می‌شوند. قارچهایی که منجر به مایکوزیز می‌شوند به دو گروه پاتوژن‌های اولیه و پاتوژن‌های فرصت طلب تقسیم می‌شوند. پاتوژن‌های اولیه بدون تاثیر بر روی سیستم ایمنی بر روی سلامتی فردی اثر میگذارند در حالی که پاتوژن‌های فرصت طلب از طریق تضعیف سیستم ایمنی منجر به ایجاد بیماری می‌شوند. اکثر مایکوزیزهای انسانی توسط پاتوژن‌های فرصت طلب ایجاد می شوند، از طرف دیگر علائم مایکوتوسیکوزیز وابسته به نوع مایکوتوکسین، مقدار و مدت زمان تماس با مایکوتوکسین، سن سالم بودن و جنسیت شخص تماس یافته و بسیاری عوامل تشدید کننده همچون ژنتیک و رژیم غذایی و تداخلات با دیگر ترکیبات سمی می باشد.

مطمئنا اصلی‌ترین اثرات تماس با مایکوتوکسین بر روی انسان و حیوانات وابسته به تماس مزمن مانند ایجاد سرطان، سمیت کلیوی و سرکوب سیستم ایمنی می‌باشد، اگر چه شناخته شده ترین اثرات مایکوتوکسین‌ها را اثرات حاد همچون سندروم X بوقلمون، ارگوتیسم انسان و stachybotryotoxicosis می‌باشد. تماس انسان با مایکوتوکسین‌ها از طریق سنجش محیطی و بیولوژیک میسر می‌باشد. در سنجش محیطی مایکوتوکسین‌ها در غذا، هوا و دیگر نمونه‌ها و در سنجش بیولوژیک حضور باقیمانده‌ها و متابولیت ها مستقیما در بافت‌ها، مایعات و مدفوعات اندازه گیری می شوند.[17, 18].

۱-۳. آفلاتوکسین‌ها

آفلاتوکسین‌ها از جمله مهمترین متابولیت‌های ثانویه قارچها (مایکوتوکسین‌ها) می‌باشند که پس از مرگ ۱۰۰ هزار بوقلمون در اثر مصرف بادام زمینی آلوده به قارچ، شناسایی شدند. آفلاتوکسین‌ها عمدتا توسط گونه‌های مختلف آسپرژیلوس به ویژه آسپرژیلوس فلاووس و پارازیتیکوس تولید می‌شوند. تولید این گروه از سموم قارچی برای اولین بار در آسپرژیلوس فلاووس شناسایی شده است به همین علت آفلاتوکسین نام گرفته‌اند. کلمه‌ی اول آفلاتوکسین از حروف اول اسم قارچ آسپرژیلوس (A) و از گونه‌ی تولید کننده آن فلاووس (Fla) و با پسوند توکسین به معنای سم گرفته شد است. آفلاتوکسین‌ها دارای خاصیت فلورسانس می‌باشند و در معرض نور فرابنفش با طول موج ۳۶۵ نانومتر از خود نور ساطع می‌کنند.

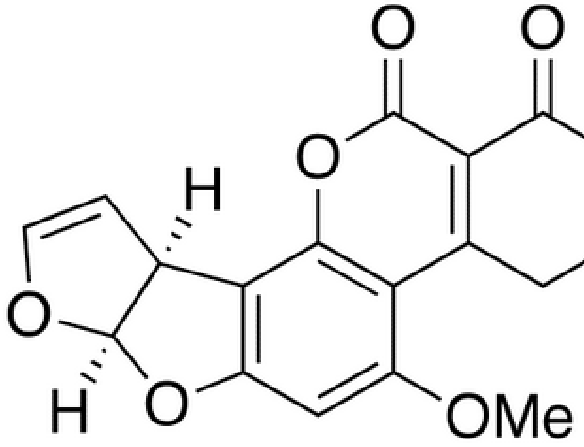
۱-۳-۱. آفلاتوکسین B1



شکل ۱-۱ ساختار شیمیایی آفلاتوکسین B1

AFB1 با وزن مولکولی ۳۱۲/۲۸ و با فرمول C17H12O6 در مقابل نور ماورای بنفش، فلورسانس آبی نسبتاً قوی از خود نشان می‌دهد این ترکیب به شکل بلورهای کریستالی بیرنگی مشاهده می‌شود و در درجه حرارت ذوب خود یعنی ۲۶۸-۲۶۹ درجه سانتیگراد تجزیه می گردد. (۲۴۳) میزان LD50 خوراکی برای موش رت بالغ نر برابر با ۷/۲ میلی‌گرم، در سگ بالغ برابر با ۰/۵ میلی‌گرم در هر کیلوگرم از وزن بدن است.

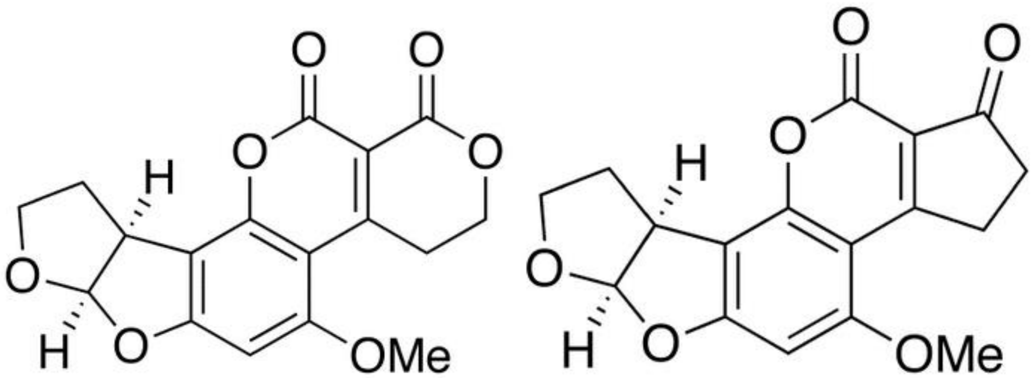
۱-۳-۲. آفلاتوکسین G1



شکل ۱-۲ ساختار شیمیایی آفلاتوکسینG1

AFG1 با وزن مولکولی ۳۲۸ و با فرمول مولکولی $C_{17}H_{12}O_7$ در برابر اشعه فرابنفش ساطع کننده نور فلورسانس سبز است. شواهد اخیر نشان می‌دهد که فلورسانس نور سبز AFG1 احتمالا به دلیل ناخالصی زردرنگی است که میتوان آن را جدا نمود این بدان معنی است که در واقع AFG1 خالص فلورسانس آبی از خود نشان می‌دهد. نقطه ذوب این ترکیب برابر ۲۴۴-۲۴۶ درجه سانتی گراد است. AFG1 سمیت کمتری از AFB1 و سمیت بیشتری ازAFB2 دارد. میزان LD50 آن در موش رت دو برابر این میزان در مقایسه با AFB1 است.

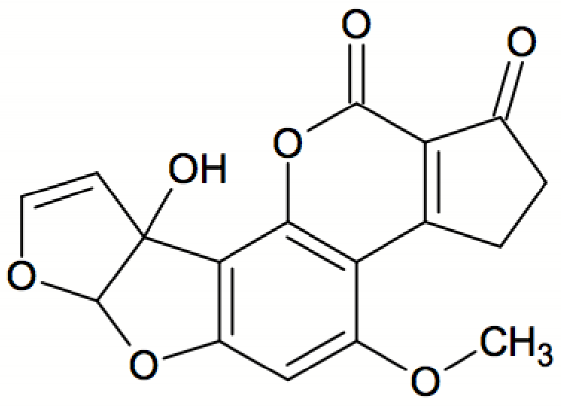
۱-۳-۳. آفلاتوکسین‌های B2 و G2



شکل ۱-۳ ساختار شیمیایی آفلاتوکسین‌های B2 و G2

AFB2 با وزن مولکولی ۳۱۴ و فرمول $C_{17}H_{14}O_6$ و AFG2 با وزن مولکولی ۳۳۰ و فرمول $C_{17}H_{14}O_7$ می‌باشد. این آفلاتوکسین‌ها به ترتیب در برابر نور فرا بنفش، فلورسانس آبی وسبز از خود ساطع می‌کنند. نقطه ذوب آن‌ها نیز به ترتیب برابر ۲۸۹-۲۸۶ و ۲۴۷-۲۴۰ درجه سانتی‌گراد است. AB2 و AFG2 را به ترتیب میتوان از هیدروژناسیون AFB1 و AFG1 به دست آورد. خواص سمی AFB2 مشابه AFB1 است هرچند قدرت و سمیت آن به طور محسوسی کمتر از AFB1 می‌باشد. AFG2 کمترین سمیت حاد را در بین چهار آفلاتوکسین اصلی دارا می‌باشد[15].

۱-۳-۴. آفلاتوکسین M1

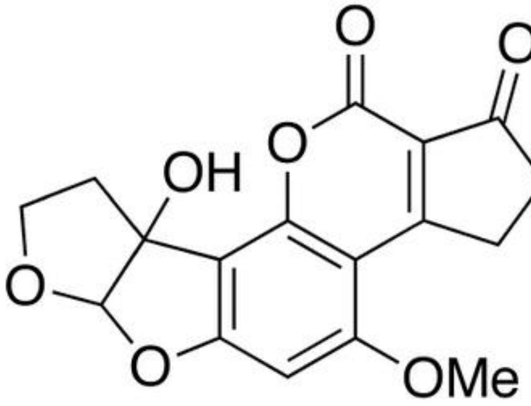


شکل ۱-۴ ساختار شیمیایی آفلاتوکسینM1

آفلاتوکسین M1 دارای نقطه ذوب ۲۹۹ درجه سانتی گراد و فرمول مولکولی C17H12O7 می باشد. شیر را میتوان به عنوان یک منبع غیر مستقیم آفلاتوکسین نام برد، زمانی که گاو علوفه‌ی آلوده به آفلاتوکسین B1 را مصرف می‌کند، AFB1 در کبد توسط سیتوکروم‌های میکروزومال متابولیزه شده و به مشتقات مختلفی تبدیل می‌شود که آفلاتوکسین M1 مشتق مونوهیدروکسیله‌ی آن می‌باشد و از آنجایی که اولین بار در شیر دام آلوده شده با آفلاتوکسین یافت شده است، آفلاتوکسین M (Milk) نامگذاری شده است. بر اساس مطالعات انجام شده، بین غلظت AFM1 موجود در شیر و AFB1 مصرف شده از طریق علوفه، یک رابطه‌ی خطی وجود دارد و میزان تبدیلAFB1 به AFM1 بین ۰/۵ تا ٪۶ تخمین زده شده است. ۱۲ تا ۲۴ ساعت پس از دریافت جیره‌ی غذایی آلوده به AFB1 ، AFM1 را میتوان در شیر شناسایی کرد که میزان آن در شیر ۷۲ ساعت پس از قطع دریافت منبع غذایی آلوده به یک سطح غیرقابل شناسایی می‌رسد.

AFM1 نسبت به حرارت و شرایط اسیدی ملایم استفاده شده در تهیه‌ی شیر و دیگر محصولات لبنی (ماست، پنیر، خامه، کره) مقاوم است، بنابراین اگر شیر آلوده شده باشد به احتمال قویAFM1 در محصولات لبنی نیز وجود خواهد داشت (۱۰-۹).

۱-۳-۵. آفلاتوکسین M2



شکل ۱-5 ساختار شیمیایی آفلاتوکسینM2

آفلاتوکسین M2 مشتق ۴-هیدروکسیله‌ی آفلاتوکسین B1 است و دارای نقطه ذوبی برابر با ۲۹۹ درجه‌سانتی‌گراد و فرمول مولکولی C17H14O7 می باشد. طیف مادون قرمز و ماورا بنفش آن مشابه AFM1 ست و خاصیت فلئورسانس هر دوی آنها سه برابر AFB1 است[19].

۱-۳-6. عوامل موثر در تولید آفلاتوکسین‌ها

شرایط ایده‌آل به منظور تولید آفلاتوکسین‌ها شامل رطوبت بین۱۸-۲۰٪،PH بین ۸/۵-۳، دمای محیط بین ۴۰-۱۲ با حد دمایی مطلوب بین۳۰-۲۵ می‌باشد و همچنین فاکتورهای تغذیه‌ای همچون کربوهیدرات، منابع نیتروژن، فسفات، روی و دیگر فلزات کمیاب در تولید آفلاتوکسین‌ها تاثیر می‌گذارند[12, 20].

۱-۴ قوانین و حدود مجاز مربوط به آفلاتوکسین AFM1

تا سال ۲۰۰۲، AFM1 به عنوان سرطانزای گروه 2B طبقه بندی شده بود[21]، که بر اساس مطالعات انجام شده در گروه 1 قرار گرفته است[22].

حداکثر میزان مجاز در شیر خام در کشورهای مختلف بسته به ارزیابی ریسک و ملاحظات اقتصادی متغیر است. در کمیته‌ی اروپایی حداکثر سطح مجاز AFM1 در شیر مایع ۵۰ ng/L تعیین شده است، در حالی‌که برای ایالات متحده و اغلب کشورهای آسیایی سطح مجاز AFM1، ۵۰۰ ng/L است که بالاتر از حد مجاز ۱۰۰ng/L که توسط موسسه‌ی استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران تعیین شده است، می باشد[23, 24].

۱-۵ عوارض ناشی از مصرف آفلاتوکسین‌ها

عوارض ناشی از مصرف آفلاتوکسین‌ها به دو صورت سمیت حاد و مزمن(سرطانزایی) بروز می‌نماید. به بیماری ایجاد شده در نتیجه‌ی مصرف آفلاتوکسین ، آفلاتوکسیکوزیز گفته می شود. آفلاتوکسیکوزیز حاد منجر به مرگ می‌شود در حالیکه آفلاتوکسیکوزیز مزمن منجر به سرکوب سیستم ایمنی، سرطان و اختلالات تولید مثلی می گردد. غلظت‌های بالای آفلاتوکسین ممکن است باعث سمیت حاد و نهایتا مرگ گردد در حالیکه آلودگی با غلظت های کمتر برای مدت زمان طولانی سرطانزا می باشد.

۱-۵-۱ سمیت حاد

سمیت حاد به دنبال بلع مقادیر بالای آفلاتوکسین در مدت زمانی کوتاه ایجاد می‌شود. اندام هدف آفلاتوکسین‌ها کبد می‌باشد که منجر به نکروز یا مرگ هپاتوسیت‌ها می‌شوند. علائم آفلاتوکسیکوز حاد تهوع، اسهال، تب، بی‌اشتهایی ،کما و در نهایت مرگ است.

۱-۵-۲ سمیت مزمن

سمیت مزمن به دنبال تماس طولانی مدت با غلظت‌های پایین آفلاتوکسین ایجاد می‌شود که عوارضی همچون سرطان کبد، هپاتیت مزمن و سیروز کبدی می باشد.

۱-۵-۳ سرطانزایی و جهش‌زایی ناشی از آفلاتوکسین‌ها

سرطانزایی و جهش‌زایی آفلاتوکسین‌های B1، G1، M1 در نتیجه‌ی تشکیل فرم فعال ۹- ۸ اپوکسی و پیوند کووالانسی آن به نوکلئیک اسیدها ایجاد می‌شود. که تنوع وسیعی در پاسخ سرطانی ایجاد شده در بین گونه‌های مختلف حیوانات وجود دارد. اثرات آفلاتوکسین B1 به نوع گونه، سن، جنس، رژیم غذایی، تماس با دیگر عوامل عفونی و حضور دیگر مایکوتوکسین‌ها و ترکیبات سمی بستگی دارد.

۱-۵-۴ تقابل آفلاتوکسین با DNA

آفلاتوکسین می‌تواند به DNA متصل شود و در ساختمان مولکولی آن تغییر ایجاد کند. آفلاتوکسین B1 از لحاظ بیولوژیکی فعال‌ترین نوع آفلاتوکسین است و قویتر از AFG1 وAFG2 وارد واکنش می‌شود.

۱-۵-۵ جلوگیری آفلاتوکسین از سنتز DNA

جلوگیری از سنتز دزوکسی ریبونوکلئیک اسید از طریق مهار سیستم‌های سازنده‌ی آنزیم پلیمراز و یا به این علت که DNA های آسیب دیده دیگر نمی‌توانند مدل خوبی برای همانندسازی باشند.

۱-۵-۶ آفلاتوکسین و کاهش سنتز RNA

آفلاتوکسین‌ها می‌توانند از طریق واکنش با DNA از نسخه‌برداری DNA توسط RNA پلیمراز ممانعت کرده و به این صورت از بیوسنتز RNA جلوگیری کنند.

۱-۵-۷ آفلاتوکسین و کاهش سنتز پروتئین

آفلاتوکسین B1 توسط سیتوکروم P450 تبدیل به فرم فعال۹،۸-اپوکسی می‌شود که قابلیت اتصال به DNA و پروتئین‌ها را دارد سرعت مهار سنتز پروتئین‌ها توسط AFB1 از سرعت و میزان مهار سنتز DNA و RNA کمتر است[25, 26].

۱ - ۶ روش‌های حذف و غیر فعال کردن آفلاتوکسین‌ها

به منظور کاهش ریسک تماس با آفلاتوکسین‌ها، پایش این سموم باید پیش از برداشت و پس از برداشت محصول به هنگام ذخیره سازی صورت گیرد. از آنجایی که آفلاتوکسینM1 به دنبال مصرف علوفه‌ی آلوده به آفلاتوکسین B1 در شیر تولید می‌شود، آلودگی شیر میتواند به صورت مستقیم با کاهش محتوای AFM1 و یا به صورت غیر مستقیم از راه کاهش آلودگی غذای دام با AFB1، کاهش یابد. روش‌های بسیاری به منظور کاهش آلودگی AFM1 انجام گرفته است که از آن جمله میتوان به روش‌های مناسب پیش از برداشت و پس از برداشت (شامل نگهداری)، روش‌های فیزیکی و شیمیایی برای سم زدایی اشاره کرد. امروزه به کمک مواد جاذب نظیر بنتونیت توانسته‌اند آفلاتوکسین موجود در شیر را حذف نمایند. البته بنتونیت روی محتوای پروتئین شیر تأثیر می گذارد همان طوریکه ثابت شده است با مصرف 2 درصد بنتونیت، 5 درصد (یا کمتر) از کل پروتئین شیر کاسته می‌شود

۱-۶-۱حذف فیزیکی

درجه حرارت حساسیت آفلاتوکسین ها ، در برابر حرارت تابع شرایط محیطی است. برای مثال وجود رطوبت در موادغذایی باعث افزایش درصد تجزیه و از بین رفتن آفلاتوکسین ها در برابر حرارت می شود و این کار تحت تأثیر هیدرولیز حلقه لکتونی در غلظت های مؤثر رطوبت و درجه حرارت انجام می گیرد. یا اینکه حضور رطوبت در محیط سبب تحریک وکنش های شیمیایی در موقعیت های مختلف بعضی مایکوتوکسین ها شده و در نتیجه سمیت آنها را تغییر می دهد. یا حضور پروتئین ها و سایر ترکیبات غذایی در محیط باعث حفظ و ثبات آفلاتوکسین ها در موادغذایی حرارت دیده می شوند که اینکار ناشی از کاهش نفوذ حرارت و تثبیت توکسین به وسیله اتصال با پروتئین ها و سایر اجزای تشکیل دهنده نمونه غذایی است.

۱-۶-۲ روش اشعه دهی

اشعه های یونیزه کننده نظیر اشعه گاما اغلب برای حذف میکروارگانیسم های بیماریزا از موادغذایی مختلف و انواع خورک دام استفاده می‌شوند. این اشعه در مقایسه با اشعه مرئی و یا UV تأثیر بیشتری دارد، چون قابلیت نفوذ آن در انواع جامدات و مایعات بیشتر از سایر اشعه‌ها می‌باشد. اما مولکول‌های آلی با ساختمان پیچیده نظیر انواع آفلاتوکسین‌ها در برابر اشعه گاما آب را تجزیه کرده و سبب آزاد شدن رادیکال‌ها می گردد و در نتیجه شرایط لازم برای تخریب و تجزیه آفلاتوکسین‌ها ایجاد می شود.

۱-۶-۳ حذف شیمیایی

روش‌های شیمیایی که برای غیرفعال کردن انواع آفلاتوکسین در محصولات کشاورزی استفاده می‌شوند، باید بتوانند آفلاتوکسین‌ها را به طور کامل به یک ترکیب غیر سمی تبدیل کنند، بدون اینکه تغییری در کیفیت و ماهیت مواد اولیه ایجاد نمایند. حلقه لکتونی در ساختمان انواع آفلاتوکسین ها بیشترین تأثیر را در برابر عوامل شیمیایی می پذیرند. عوامل کلرینه کننده همچون کلریت سدیم، ترکیبات اکسیده کننده همچون پرکسید هیدروژن، عوامل هیدرولیتیک چون آمونیاک از انواع عوامل شیمیایی هستند که برای حذف و غیرفعال کردن آفلاتوکسین ها**.** به کار برده می شوند.

۱-۶-۴ حذف بیولوژیکی

در سال 1966 دانشمندان توانستند از میکروارگانیسم‌هایی مانند مخمرها، کپک‌ها، باکتری‌ها و اکتینومیسس‌ها جهت از بین بردن آفلاتوکسین استفاده نمایند. که می توان به باکتری فلاووباکتریوم اشاره نمود که عمل سم‌زدایی این میکروارگانیسم در شیر، روغن، ذرت، کره بادام‌زمینی، سبوس و بادام به اثبات رسیده است که البته نیازمند تحقیقات بیشتر است. از خاصیت جذب آفلاتوکسین توسط باکتریهای اسیدلاکتیک میتوان بعنوان اختصاصی ترین روش سمیت زدایی محصولات غذایی بویژه لبنی استفاده کرد[27].

۱-۷ شیر

تهیه‌ی شیر از دام در حدود ۶۰۰۰ سال قبل، توسط انسان آغاز شده است. شیر یکی از مهم‌ترین ترکیبات مورد مصرف انسان بوده و مهم‌ترین دام شیری جهان، گاو می‌باشد که از آن در اغلب کشورها برای تهیه‌ی شیر استفاده می‌نمایند البته نباید نقش دیگر حیوانات شیرده را در دیگر نقاط جهان از یاد برد. شیر تنها غذای نوزاد پستانداران، در ابتدای دوره زندگی می‌باشد و در آن مواد لازم برای تامین انرژی رشد جانور وجود دارد، همچنین شیر حاوی مقداری پادتن برای حفاظت نوزاد شیرخوار در برابر بیماری‌هاست.

شیر و فراورده‌های لبنی برای سلامت جامعه ضروری می‌باشند و میزان مصرف آنها به عنوان یکی از مهم‌ترین شاخص‌های سلامت هر جامعه‌ای محسوب می‌شود. اهمیت مصرف شیر و فراورده های لبنی سالم، به ویژه در بین گروه های سنی آسیب پذیر جامعه یعنی افراد در حال بلوغ و سالمندان حائز اهمیت است[28].

۱-۷-۱ ارزش غذایی شیر :

در میان غذاهای مختلفی که روزانه به مصرف انسان می‌رسند، شیر را میتوان یکی از مناسب ترین ترکیبات غذایی در دوران سالمندی دانست. ترکیبات موجود در شیر سبب رشد و نمو بافت ها و اندام‌ها در دوران کودکی و نوجوانی و همچنین افزایش هوش و قدرت فراگیری می‌شود و همینطور در دوران بلوغ و کهنسالی منجر به افزایش توان کاری و افزایش طول عمر می‌گردد.

چربی و اسیدهای چرب ضروری شیر

چربی شیر حاوی میزان نسبتا بالایی (۱۰تا ۱۵ درصد) از اسیدهای چرب با زنجیره‌ی کوتاه و متوسط می‌باشد که به همین علت قابلیت هضم چربی شیر نسبت به دیگر چربی‌های غذایی بیشتر است. اسیدهای چرب ضروری شیر اسید لینولئیک و آراشیدونیک اسید می‌باشند که برای رژیم غذایی ضروری هستند. اسید لینولئیک تبدیل به آراشیدونیک اسید می‌شود که این ترکیب خود پیش‌ساز پروستاگلاندین‌ها می‌باشد.

پروتئین‌ها

شیر یکی از منابع مهم پروتئین حیوانی می‌باشد. شیر به لحاظ داشتن اسیدآمینه‌های ضروری جایگاه ویژه‌ای در تامین پروتئین‌های مورد نیاز بدن دارد.

لاکتوز

به دی ساکارید موجود در شیر لاکتوز گفته می‌شود. در صورت وجود لاکتوز در رژیم غذایی، جذب کلسیم به طور قابل توجهی بهبود می یابد که علت آن را به اسید لاکتیک حاصل از فعالیت میکروب‌ها بر روی لاکتوز روده نسبت داده‌اند که اسید تولید شده باعث افزایش حلالیت املاح کلسیم و در نتیجه افزایش جذب آن می‌شود.

مواد معدنی

مهمترین مواد معدنی شیر، کلسیم و فسفر هستند. بقیه ترکیبات معدنی شیر به صورت فسفات، سیترات و کلروپتاسیم، کلسیم و منیزیم وجود دارند. شیر حاوی مقادیر جزئی آهن، مس، منگنز و ید می باشد.

ویتامین‌ها

شیر منبع مهمی از ویتامین ها است. شیر و فراورده‌های لبنی سهم مهمی در تامین ویتامین‌های A، B1، B2، B6، B12، D6 و اسید پنتوتنیک رژیم غذایی را دارا می‌باشند. همچنین شیر حاوی نیاسین، اسید فولیک، بیوتین و ویتامین C می‌باشد.

آنزیم‌ها

شیر حاوی آنزیم‌هایی همچون فسفاتاز، لیپاز، گالاکتاز، آمیلاز، پراکسیداز و ردوکتاز می‌باشد.

اسیدهای آلی شیر

شیر حاوی اسید سیتریک می‌باشد که این ترکیب تجمع مواد معدنی را بهبود می‌بخشد[29].

۱-۷-۲ پاستوریزاسیون و استرلیزاسیون شیر :

به دلیل ارزش غذایی بالای شیر، این ماده محیط کشت بسیار مناسبی برای رشد میکروارگانیسم‌ها می‌باشد. میکروارگانیسم‌هایی که وارد شیر می‌شوند، می‌توانند سبب بروز مشکلات بهداشتی برای مصرف کننده شوند. به کمک پاستوریزاسیون میتوان با استفاده‌ی صحیح از اثر گرما تقریباً تمامی میکروب‌های غیر بیماری‌زا و تمامی میکروب‌های بیماری‌زای آن را در صورت وجود از بین برده و همچنین با این روش ماندگاری آن را افزایش داد. این فرایند حرارتی باید به گونه‌ای انجام شود که بر طعم، ظاهر، خواص تغذیه‌ای شیر اثر نامطلوبی نداشته باشد. پاستوریزاسیون شیر به دو روش کند و تند انجام می‌گیرد، که در روش کند شیر درون مخازن بزرگ با درجه حرارت ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه حرارت می‌بینند سپس به سرعت، دمای شیر را به ۴ درجه سلسیوس می رسانند تا از تکثیر احتمالی باکتری ها جلوگیری گردد. این روش چندان برای پاستوریزاسیون مناسب نیست زیرا راندمان تولید کم بوده و از طرفی ویتامین های حساس به حرارت که ویتامین های گروه B و C هستند نیز کاهش می یابند. در روش تند در مدت زمان کوتاه از دمای حداقل ۷۲ درجه سانتی گراد به مدت ۱۵ ثانیه استفاده می شود. استرلیزاسیون (Sterilization) به معنای ار بین بردن تمام پاتوژن های شیر است.

روش های استریلیزاسیون:

1. روش یک مرحله ای که محصول بسته بندی شده را در اتوکلاو در دمای 110 یا 120 درجه و مدت زمان ۱۰ تا ۴۰ دقیقه قرار می دهند.
2. روش UHT یا : Ultra High Temperature دما 135 تا 150 درجه سانتی گراد و زمانی 4 الی 5 ثانیه سپس به طریقه غیرسترون در ظروفی چون بطری های شیشه ای پرشده ، آنگاه توسط یک اتوکلاو استریل می گردد.
3. استریلیزاسیون مداوم ، با استفاده از اتوکلاو و یا فرایند UHT مجهز به پرکن اسپتیک انجام می شود.

در فرایند UHT شیر ، دو نوع عملیات حرارتی به کار برده می شود :

۱- حرارت مستقیم که بر اختلاط شیر و بخار بنا نهاده شده است . در این روش ، با شیر به داخل بخار (پالاریزاسیون) یا بخار به داخل شیر (اوپریزاسیون) تزریق می گردد .

۲ - حرارت غیر مستقیم که به کمک برخی از انواع مبدل های حرارتی انجام می پذیرد. ود..

با انجام استریلیزاسیون عمر ماندگاری شیر به 6 ماه می رسد. برای بسته بندی شیر از کاغذهای چند لایه با مواد پلی اتیلن یا ورقه های آلومینیومی استفاده می شود که مانع جذب رطوبت و هوا هستند[30].

در انتهای این بخش لازم بود رابطه مایکوتوکسین و شیر را مینوشتید

در ابتدا باید عنوان و دسته بندی اندازه گیری را بنویسید ؟؟؟؟

تقسیم بندی روش های دستگاهی

روشهای دستگاهی را می توان به دو دسته زیر تقسیم نمود:

روشهای شیمی فیزیکی

مانند اکثر روشهای تجزیه نوری و الکتروشیمیایی، که در این روشها از پدیده های شیمیایی و فیزیکی می توان استفاده کرد. در این روشها برای تعیین غلظت مواد معمولا از منحنی های استانداردی که با نمونه های با غلظت معلوم تهیه شده است استفاده می شود.

روشهای فیزیکی

مانند تجزیه به وسیله اشعه ایکس و رفرکتومتری، که در آنها واکنش شیمیایی وجود ندارد و روشهای مربوطه فیزیکی می باشند. نکته قابل توجه این است که در واقع امکان دارد در هر یک از روشهای بکار برده شده، از هر دو روش فیزیکی و فیزیکوشیمیایی با نسبت های متفاوت استفاده شود و به همین دلیل عده ای تقسیم بندی روشهای دستگاهی را بر مبنای استفاده از نام پدیده ای که روش مذبور بر مبنای آن طراحی گردیده است بنا نهاده اند.

روشهای نوری

اساس روشهای طیف سنجی نوری یا اسپکتروسکوپی بر اندازه گیری میزان جذب و یا نشر پرتوهای الکترومغناطیسی قرار دارد و چگونگی آن به تاثیر متقابل اشعه نورانی بر روی مواد مختلف بستگی دارد. از این

روشها در اندازه گیری کمی و کیفی ترکیبات آلی و معدنی استفاده فراوان می شود . بر حسب طول موجهای نوری که مورد استفاده قرار می گیرند نام خاصی دارند (مادون قرمز، ماورای بنفش و ...)

روشهای الکتروشیمیایی

در این روش پتانسیل، جریان و مقاومت سه عامل مهم هستند که معمولا دو عامل از سه عامل را کنترل می نمایند و سومی را اندازه می گیرند. بسته به این که چه پارامترهایی را ثابت نگه دارند و بقیه را اندازه گیری نمایند، روشها نام های خاصی خواهند داشت. از این روشها در شناسایی ترکیبات آلی و همچنین در تجزیه در محیط های غیر مایی استفاده فراوان می شود.

روشهای کروماتوگرافی

اساس این روشها بر جداسازی ترکیبات از یکدیگر به وسیله دو فاز مختلف است که پس از جداسازی مقدار آنها را تعیین می نمایند. دو فاز، یکی ساکن و دیگری متحرک است و اساس جداسازی مواد از یکدیگر بر توزیع آنها بر روی دو فاز مختلف قرار دارد. روش کروماتوگرافی به تعدادی از روشهای جداسازی از قبیل کروماتوگرافی کاغذی، روی لایه نازک، ستونی، کروماتوگرافی مایع و گاز کروماتوگرافی تنوع یافته است.

۱-۸ روش‌های آنالیز آفلاتوکسین‌ها

چندین روش به منظور آنالیز مایکوتوکسین‌ها در دسترس می‌باشد. محبوب‌ترین روش‌ها به منظور آنالیز مایکوتوکسین‌ها کروماتوگرافی لایه‌ی نازک(TLC) ، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) و کروماتوگرافی مایع جفت شده با طیف سنج جرمی (LC/MS) می‌باشند.

۱-۸-۱ روش کروماتوگرافی با لایه‌ی نازک

محبوب‌ترین روش به منظور آناالیز مایکوتوکسین‌ها و همینطور آفلاتوکسین‌ها TLC می‌باشد که به ما اجازه‌ی آنالیز طیف وسیعی از نمونه‌ها را هم به صورت کمی و نیمه کمی به دلیل هزینه‌ی پایین اجرا، تشخیص آسان ترکیب هدف با استفاده از طیف سنج UV-Vis را می‌دهد[31].

۱-۸-۲ روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

HPLC به علت حساسیت و دقت بیشتر در مقایسه با روش کروماتوگرافی لایه نازک کاربرد گسترده‌تری در آنالیز مایکوتوکسین‌ها یافته است. این سیستم کروماتوگرافی شامل ستون‌هایی با قطر کم و تقریباً بلند است که از ماتریکس‌هایی پر می شود که تحمل فشار زیاد را داشته باشند و در فشارهای بالا کاملاً فشرده

نشوند. ماتریکس از ذرات پلاستیکی و یا از جنس شیشه ای یا سیلیکا است که با لایه نازکی از فاز ثابت پوشیده شده است. فاز ثابت مایع یا جامد است. فاز متحرک که مایع است با فشار پمپ از ستون عبور می‌کند و در طول ستون ادامه می‌یابد تا به شناساگر برسد. هر کدام از اجزای نمونه در طی عبور از شناساگر تغییری در جریان خروجی دستگاه ایجاد می‌کنند که این تغییر به صورت کروماتوگرام به نمایش در می‌آید. زمان عبور از ستون برای هر ترکیب تحت شرایط مشخص همواره ثابت است و اصطلاحاً به آن زمان بازداری گفته می‌شود. آنالیز کیفی اجزای نمونه نیز بوسیله مقایسه زمان بازداری آن‌ها با زمان بازداری نمونه های استاندارد صورت می گیرد. سطح زیر هر پیک بر روی کروماتوگرام با غلظت جزء مربوط متناسب است، بنابراین آنالیز کمی نمونه‌ها نیز با این روش امکان پذیر خواهد بود. از مزایای این روش کم شدن زمان کروماتوگرافی، قدرت تفکیک بالا، حساسیت بالا و قابلیت اتوماتیک شدن است. حساسیت روش HPLC به قدری است که مقادیر پیک و مول از یک ترکیب نیز در این روش قابل شناسایی و بررسی است.

به طور کلی اجزاء دستگاه HPLC عبارتند از:

1-فاز متحرک 2-پمپ 3-تزریق کننده(Injector) 4-ستون 5-آشکارساز

آنالیز مدرن آفلاتوکسین‌ها به شدت وابسته به HPLC با به کارگیری فاز نرمال و معکوس ستون‌ها به منظور تخلیص و جداسازی سموم ، بسته به میزان قطبیتشان می‌باشد. شناسایی توسط HPLC بر پایه‌ی خاصیت فلئورسانس سموم تحت نور فرا بنفش می‌باشد. اگرچه آفلاتوکسین‌های B1 و G1 به منظور افزایش خاصیت فلئورسانسشان برای اینکه به سطح مشابهی همچون آفلاتوکسین‌های B2 و G2 برسند، نیاز به مشتق ساز دارند. مزیت اصلی HPLC علاوه بر جداسازی با کیفیت بالا و حد تشخیص پایین ، امکان ترکیب کردن چندین سیستم شناسایی می‌باشد(فلئورسانس، UV، diode array) این تکنولوژی به ما اجازه‌ی شناسایی چندین جز از یک نمونه را می‌دهد. همچنین درHPLC امکان اتومیزاسیون وجود دارد که پیشرفت بزرگی نسبت به دیگر تکنیک‌ها همچون TLC و ELISA می باشد. مزایا ومعایب؟؟؟؟

۱-۸-۳ روش اسپکترومتری جرمی

LC/MS یک روش با اختصاصیت بالا و به طرز گسترده‌ای قابل اجرا می‌باشد که اطلاعات کمی و کیفی را به صورتی سریع، انتخابی، صحیح و دقیق در اختیار می‌گذارد. روشLC/MS به اندازه‌ی روش HPLC جفت شده با فلئورسانس حساس نمی‌باشد. روش LC/MS گزینه ای برای تست‌های تاییدی می‌باشد.

در اغلب روش‌هایی که در بالا ذکر شد جهتClean up از ستون فاز جامد و ستون ایمونوافینیتی به منظور حذف ناخالصی‌ها و بهبود اندازه‌گیری مایکوتوکسین‌ها استفاده می‌شود. نتایج حاصل از این روش‌های آنالیزی بر روی مواد غذایی پس از چندین ساعت و چندین روز حاصل می‌شوند[32].

روشهای دیگر ؟؟؟ الیزا رادیو ایمنو اسی ؟؟ رفرانسهای ما ؟؟؟

۱-۹ استفاده از روش‌های سریع و نحوه‌ی عملکردشان

روش‌های سریع ارزان، قابلیت استفاده‌ی آسان و قابلیت حمل در محیط را دارند همچنین این روش‌ها درتعیین ارزیابی موثر بودن سلامت مواد غذایی، تعیین مطلوبیت قانونی، توزیع سریع محصولات غذایی در شبکه‌های بازاریابی، صرفه جویی در زمان و هزینه و همچنین صرفه جویی در سرمایه‌گذاری بر روی تجهیزات پیچیده‌ی آنالیزی و استخدام نیروی کاری که به میزان کمتری آموزش فنی دیده است، نتایج حاصل از اکثر روش‌های سریع کیفی و نیمه کمی می‌باشند که برای آنالیز اولیه‌ی نمونه‌ها پیشنهاد می‌شوند[33].

۱-۱۰ روش‌های سریع برای آنالیز مایکوتوکسین‌ها

عبارت rapid methods معمولا به روشی گفته می‌شود که سریعتر از روش آنالیزی رفرنس می‌باشد و علاوه بر این منجر به پیشرفت روش می‌شود. روش‌های سریعی که به منظور آنالیز مایکوتوکسین‌ها استفاده می‌شوند باید دارای خصوصیات مشترکی چون آسانی و سادگی روش جهت استفاده، نسبتا سریع و قابل استفاده در محیط بودن را دارا باشند.

از روش‌های سریع مورد استفاده جهت آنالیز مایکوتوکسین‌ها میتوان به الایزا، lateral flow test یا strip test و... اشاره کرد. روش ELISA امروزه به دلیل کاربرد آسان و قیمت پایین بسیار محبوب شده است. کیت‌های تجاری الایزا به منظور شناسایی مایکوتوکسین‌ها که اساس آن بر پایه‌ی یک واکنش رقابتی با استفاده از آنتی بادی اختصاصی مولکول هدف و کونژوگه آنزیم و هدف مورد نیاز می‌باشد[8].

۱-۱۰-۱ روش ایمونوکروماتوگرافی

و اما روش سریعی که در این تحقیق مورد استفاده قرار می‌گیرد lateral flow test می‌باشد. Strip testها در کنترل کیفی مواد غذایی خصوصاَ سنجیدن مایکوتوکسین‌ها به تازگی مورد توجه قرار گرفته اند. اساس روش ایمونوکروماتوگرافی در نوار تست، یک واکنش رقابتی بین Ag و Ab می‌باشد.

۱-۱۱ اجزای Lateral Flow Assay

اجزای مختلف یک LFA شامل sample application pad، conjugate pad، Nitrocellulose membrane، Adsorbent pad می‌باشد.

۱-۱۱-۱ Sample application pad

این بخش از جنس سلولز و یا الیاف شیشه‌ای می‌باشد که به منظور آغاز تست، نمونه بر روی این بخش قرار داده می‌شود. نقش این بخش انتقال نمونه به دیگر اجزا LFTS می‌باشد. sample pad باید قادر به انتقال روان، مداوم و همگن نمونه باشد.

۱-۱۱-۲ Conjugate pad

این بخش محلی است که مولکول‌های زیست شناختی لیبل دار شده قرار گرفته‌اند. ترکیبات conjugate pad باید به سرعت کونژوگه لیبل دار شده را در مواجهه با نمونه‌ی مایع در حال حرکت آزاد نمایند. کونژگه لیبل دار شده باید در تمام طول عمر Lateral flow strip پایدار بماند . هر گونه تغییر در dispensing، خشک شدن و یا آزادسازی کونژوگه ممکن است سبب تغییرات معناداری در نتایج شوند. از الیاف شیشه‌ای، سلولز، پلی استر و دیگر ترکیبات جهت تولید پد کونژوگه LFA استفاده می‌شود. جنس ترکیبات پد کونژوگه بر روی آزادسازی کونژوگه لیبل‌دار شده و حساسیت روش موثر می‌باشد.

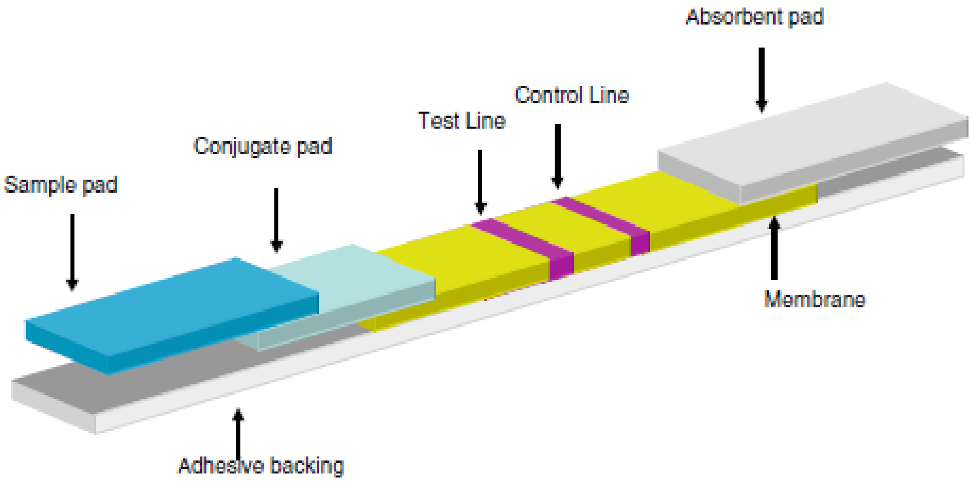
۱-۱۱-۳ Nitrocellulose membrane

غشای نیتروسلولزی در تعیین حساسیت LFA بسیار تعیین کننده می‌باشد. غشاهای نیتروسلولزی در انواع مختلف در دسترس می‌باشند. این غشاها جهت استفاده آسان، ارزان و تمایل بالا برای پروتئین‌ها و بیوملوکول‌ها دارند.

۱-۱۱-۴ Adsorbent pad

این بخش مثل یک sink در انتهای نوار عمل می‌کند و همچنین به تعدیل سرعت جریان نمونه و جلوگیری از جریان رو به عقب نمونه در طول غشا جلوگیری می‌کند. گنجایش adsorbent جهت نگهداری نمونه نقش مهمی را در نتایج روش دارد.

تمام این اجزا بر روی یک backing card قرار گرفته اند که جنس ترکیبات این پشته انعطاف پذیر می‌باشد که این پشته یک سطحی را برای اجزا و راحتی کار کردن با نوار(strip) فراهم کرده است.



شکل ۱-۴ نمایی از اجزا Lateral Flow Assay

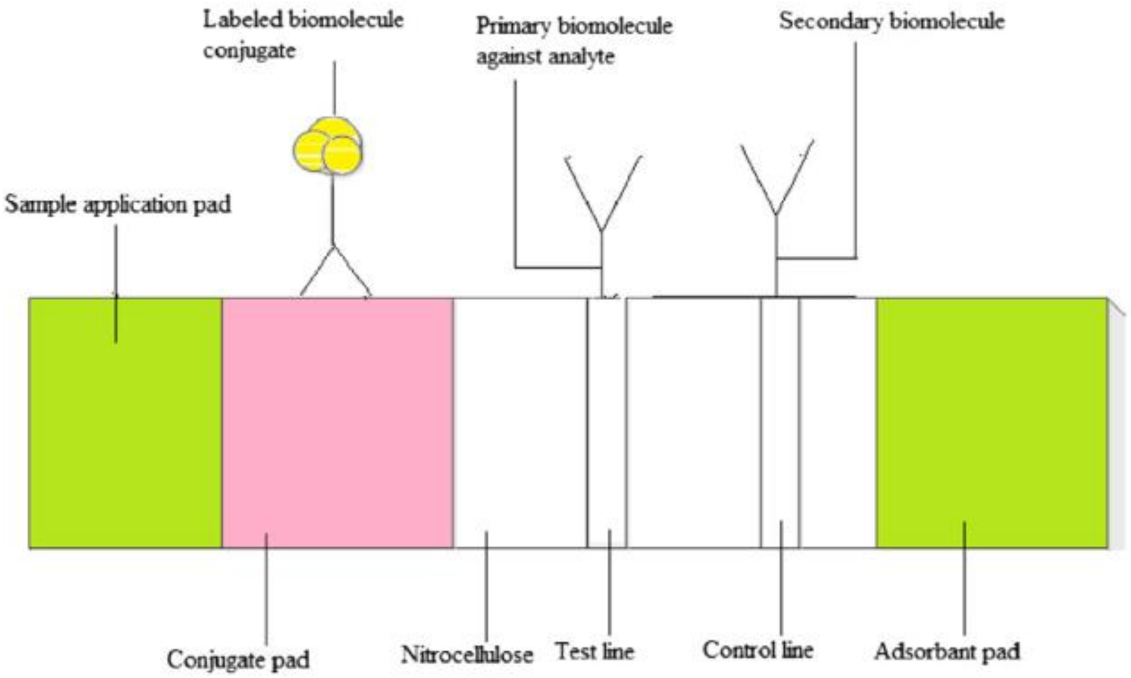
۱-۱۲ انواع فرم‌های LFA

۱-۱۲-۱ فرم ساندویچ

در فرم رایج لیبل (آنزیم‌ها یا نانوپارتیکل‌ها یا رنگدانه‌های فلئورسنس) به آنتی بادی یا آپتامر در محل پد کونژوگه coat می‌شوند. این اتصال موقت می‌تواند توسط جریان حلال بافر شسته شود. یک آنتی‌بادی اولیه علیه آنالیت هدف در ناحیه‌ی تست تثبیت شده است. یک آنتی بادی ثانویه علیه کونژوکه آنتی‌بادی لیبل دار در ناحیه‌ی کنترل تثبیت شده است.

نمونه حاوی آنالیت بر روی پد نمونه قرار داده می‌شود و به دنبال آن به دیگر قسمت‌ها مهاجرت می‌کند. آنالیت هدف در پد کونژوگه توسط کونژوگه آنتی بادی لیبل داربه دام می افتد و منجر به تشکیل کمپلکس کونژوگه آنتی‌بادی لیبل دار/ آنالیت می‌شود. این کمپلکس به غشای نیتروسلولزی می‌رسد و تحت خاصیت موییںگی حرکت می‌کند. در ناحیه‌ی تست کمپلکس کونژوگه آنتی‌بادی لیبل دار/ آنالیت توسط یک آنتی بادی که برای آنالیت اولیه می‌باشد به دام می‌افتد. در نتیجه آنالیت بین دو آنتی بادی لیبل دار و اولیه ساندویچ می‌شود و کمپلکس کونژوگه آنتی‌بادی لیبل دار/ آنالیت/ آنتی‌بادی اولیه تشکیل می‌شود. در ناحیه‌ی کنترل کونژوگه‌های آنتی بادی لیبل دار اضافی توسط آنتی بادی ثانویه به دام می افتند. بافر و یا حلال های اضافی به adsorption pad

می‌روند. ظهور رنگ در ناحیه‌ی تست معرف وجود آنالیت در نمونه است و مرئی بودن ناحیه‌ی کنترل معرف معتبر بودن تست است.

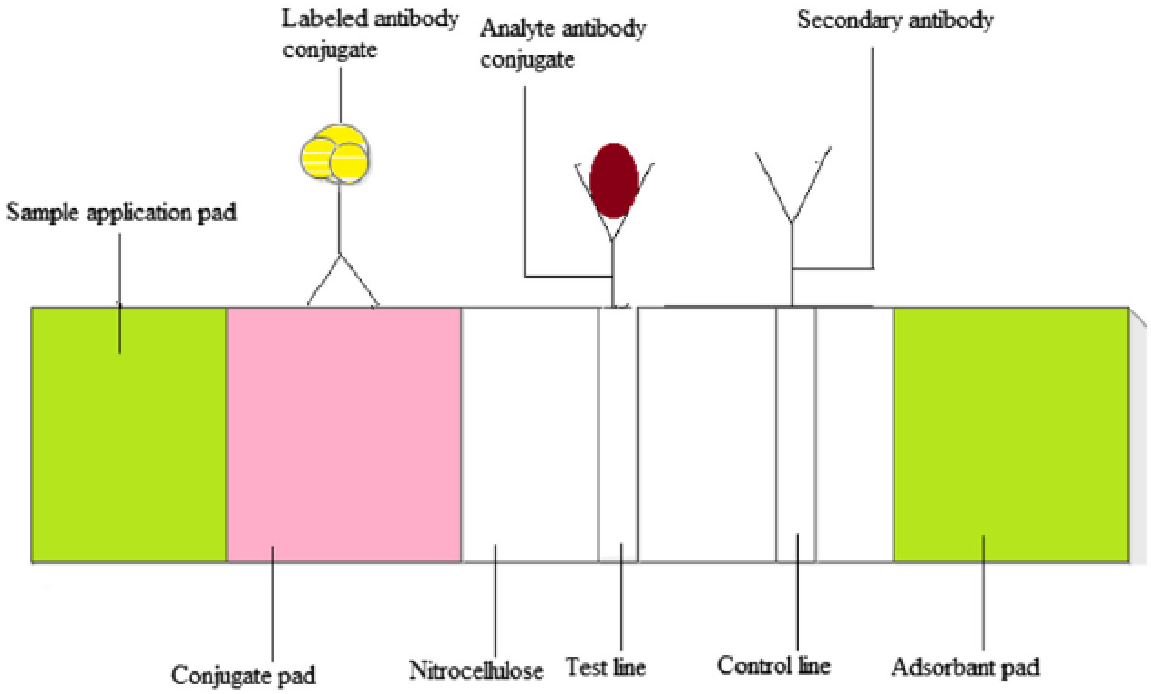


شکل ۱-۵ نمایی از فرم رقابتی Lateral Flow Assay

۱-۱۲-۲ فرم رقابتی

این فرمت برای ترکیبات با وزن مولکولی پایین مناسب است که قابلیت اتصال همزمان به دو آنتی‌بادی را ندارند. عدم حضور رنگ درناحیه‌ی تست نشاندهنده ی حضور آنالیت در نمونه و حضور رنگ در دو ناحیه‌ی تست و کنترل بیانگر نتیجه‌ی منفی است. فرم رقابتی شامل دو حالت می‌شود که در حالت اول محلول حاوی آنالیت هدف بر روی Sample pad قرار داده شده و کونژوگه آپتامر/ آنتی‌بادی‌از قبل تثبیت شده بر ناحیه کونژوگه به همراه محلول بر روی غشا حرکت می‌کند. ناحیه تست شامل آنتی‌ژن (مشابه آنالیت مورد بررسی) می‌شود که اختصاصا با کونژوگه باند می‌شود و ناحیه‌ی کنترل شامل آنتی‌بادی‌های ثانویه می‌شود که توانایی اتصال به کونژوگه آنتی‌بادی را دارد. هنگامی که نمونه به ناحیه‌ی تست می‌رسد آنتی‌ژن در صورت عدم حضور و یا حضور آنالیت در مقادیر پایین که در این صورت محل‌های اتصال کونژوگه آنتی‌بادی آزاد است به آن اتصال می‌یابد. در واقع آنتی‌ژن و آنالیت نمونه با یکدیگر بر سر اتصال به کونژوگه لیبل دار رقابت می‌کنند. در حالت دیگر فرم رقابتی کونژوگه آنالیت

لیبل دار شده بر روی Conjugate pad و آنتی‌بادی اولیه‌ی آنالیت در ناحیه‌ی تست تثبیت شده است. پس از به کارگیری محلول حاوی آنالیت رقابتی بین آنالیت و کونژوگه آنالیت لیبل دار بر سر اتصال به آنتی‌بادی اولیه ایجاد می‌شود[34].



شکل ۱-۶ نمایی از اجزا فرم رقابتی Lateral Flow Assay

۱-۱۳ معتبرسازی روش‌های آنالیز

تعریف معتبرسازی: فرایندی است که طی آن اثبات می‌گردد که شاخص‌های عملکرد منطبق بر الزامات مربوطه می‌باشد.

۱-۱۳-۱ پارامترهای معتبرسازی

پارامترهایی که در معتبرسازی مورد استفاده قرار میگیرند عبارتند از : انتخابی بودن، خطی بودن و دامنه ، دقت، صحت ، حد آشکار سازی ، حد تعیین مقدار ، توانمندی روش ، استحکام روش و آزمایش تناسب سیستم[35].

۱-۱۳-۲ انتخابی بودن

انتخابی بودن روش به معنای توانایی روش در ارزیابی صریح و آشکار آنالیت در حضور مواد متشکله دیگر می باشد. برای تعیین انتخابی بودن، پیک حاصل از استاندارد با پیک حاصل از نمونه فاقد آنالیت، مقایسه می‌گردد. بدین ترتیب که در زمان خروج پیک استاندارد، نمونه فاقد آنالیت تداخلی نداشته باشد.

۱-۱۳-۳ خطی بودن

توانایی روش در نشان دادن تناسب مستقیم بین غلظت نمونه و سیگنال حاصله را خطی بودن روش می‌نامند. روش تعیین خطی بودن : حداقل ۵ غلظت از نمونه استاندارد تهیه و هرکدام ۳ مرتبه مورد آنالیز قرار می‌گیرد . نمودار سیگنال حاصله (جذب، سطح زیر منحنی) در مقابل غلظت رسم می‌شود. معادله خط رگرسیون (y=ax+b) و ضریب همبستگی (r2) با استفاده از برنامه اکسل محاسبه میشود. در مورد خط رگرسیون r2 بالای ۰/۹۹۷ نشان از خطی بودن ارتباط غلظت و پاسخ می‌باشد.

۱-۱۳-۴ دقت

میزان نزیکی نتایج به یکدیگر، زمانی که آن روش آنالیز بر روی چند نمونه از یک جسم هموژن انجام می‌شود. دقت در یک روش آنالیز در دو سطح بررسی می‌شود:

۱-۱۳-۵ دقت در یک روز

تکرار پذیری در آزمایشگاه با یک دستگاه در طول یک زمان کوتاه(زمان متداول برای چند تزریق) روش تعیین دقت در یک روز : غلظتی از نمونه در کل دامنه تهیه و حداقل ۳ مرتبه و حداکثر ۱۰ مرتبه آنالیز می‌شوند. سپس Mean و انحراف معیار (SD) و انحراف معیار نسبی (RSD یا CV%) محاسبه می‌شود.

پارامتر شاخص دقت RSD است.

۱-۱۳-۶ دقت بین روز ها

دقت بین روزها برای بیان دقت در یک آزمایشگاه و توسط یک فرد در روزهای مختلف بررسی می‌شود.

روش تعیین دقت بین روزها : حداقل ۳ غلظت از نمونه در کل دامنه تهیه شده و حداقل در سه روز مختلف آنالیز می‌شود. (هر روز ۳ غلظت، هر کدام حداقل ۳ مرتبه آنالیز می‌گردد) در مورد هر غلظت میانگین، انحراف معیار و انحراف معیار نسبی برای ۳ روز محاسبه می‌گردد.

۱-۱۳-۷ تجدیدپذیری

دقت هنگام استفاده از روش آنالیز در آزمایشگاه‌های مختلف را بررسی می‌نماید.

۱-۱۳-۸ صحت

نزدیکی نتایج به دست آمده با مقدار واقعی را صحت می‌نامند.

۱-۱۳-۹ روش تعیین صحت

الف) اضافه کردن مقدار معلومی از استاندارد به بافت در محدوده‌ی دامنه و محاسبه صحت از مقدار به دست آمده به مقدار واقعی.

ب) نمونه با حداقل ۳ غلظت مشخص از استاندارد در محدوده دامنه اسپایک می‌شود و هرکدام حداقل ۳ مرتبه آنالیز شود و میانگین سیگنال‌ها محاسبه می‌شود سپس با استفاده از معادله خط رگرسیون (y=ax+b) حاصل از

منحنی استاندارد اولیه، غلظت‌ها محاسبه می‌شود. صحت طبق معادله زیر محاسبه می‌شود. اگر نمونه از قبل آلوده باشد و به اصطلاح ارگانیک نباشد مقدار آن باید در نظر گرفته شود.

Relative Recovery =

دامنه قابل قبول صحت برای نمونه‌ها بین ۷۰ تا ۱۱۰ درصد می‌باشد.

۱-۱۳-۱۰ حد آشکارسازی

کمترین غلظت آشکارسازی نمونه در یک روش را حد آشکارسازی می‌نامند.

یک نمونه استاندارد با کمترین غلظت و یک نمونه از شاهد تهیه شده و هرکدام(حداقل ۳ مرتبه) آنالیز می‌شوند و از مقایسه سیگنال‌های جسم با شاهد جهت تعیین LOD طبق معادله زیر استفاده می‌شود. در واقع کمترین مقدار قابل مشاهده، مقداری است که پیکی معادل ۳ برابر نویز دستگاه را داشته باشد.

LOD=

۱-۱۳-۱۱ حد تعیین مقدار

کمترین مقدار جسم در یک نمونه که بتوان آن را با صحت و دقت قابل قبول تعیین مقدار نمود را حد تعیین مقدار می‌نامند.

الف) یک نمونه استاندارد با غلظت کم و یک نمونه از شاهد تهیه شده و هر کدام حداقل ۳ مرتبه آنالیز می‌شود. و از مقایسه سیگنال‌های جسم با شاهد جهت تعیین LOQ با استفاده از معادله زیر استفاده می‌شود. کمترین غلظت قابل تعیین غلظتی است که پیکی معادل ۱۰ برابر نویز دستگاه را داشته باشد[35, 36].

LOQ=

۱-۱۴ اهداف تحقیق

به دلیل اهمیت ویژه‌ای که شیر و محصولات لبنی در رژیم غذایی انسان به خصوص کودکان و سالمندان دارند شناسایی سموم موجود در آن‌ها بسار اهمیت یافته است. از این رو هدف از انجام این تحقیق علاوه بر اندازه گیری غلظت آفلاتوکسین M1 موجود در نمونه‌های شیر بازار تهران، تایید روشی سریع، دقیق و آسان جهت استفاد به جای روشی پرهزینه، وقت گیر و گران قیمت همچون برای یک بار بنویسید کروماتوگرافی با کارایی بالا دیگر انگلیسی را ننویسید HPLC می‌باشد. به این منظور پس از تایید معتبر بودن کیت تست آفلاتوکسین تمام نمونه‌ها

را قبل از اندازه گیر گیری توسط HPLC ، به کمک این کیت اندازه گیری شدند و سپس صحت ودقت این کیت توسط روش مرجع که HPLC می باشد تعیین می گردد.

فرضیات ؟؟؟

فصل دوم

مواد و روش‌ها

۲-۱ لوازم و مواد مورد نیاز

۲-۱-۲ دستگاه‌های مورد نیاز

- دستگاه HPLC مدل 600 با دتکتور فلوئورسانس مدل 473 (wave lengths 365 nm excitation and 435 nm cut off emission) از شرکت واترز خریداری شده است.
- ستون جداسازی C18 با طول 10 cm و قطر
- فریزر آزمایشگاهی
- یخچال آزمایشگاهی
- سانتریفیوژ (SIGMA آمریکا)
- هود بیولوژیک
- دستگاه ورتکس مدل Heidolph
- سونیکیتور
- دستگاه آب دیونیزه ساز
- دستگاه خلا چند شاخه‌ای(منیفولد خلا) جهت استقرار ستون‌های ایمونوافینیتی مجهز به پمپ هوای فشار مثبت
- ستون ایمونوافینیتی Aflatest
- بسته‌های آلومینیومی حاوی تست AFM1
- ۲۰ میکروتیوب حاوی آنتی‌بادی کونژوگه شده با طلای کلوییدی
- ۲۰ قطره چکان
- سمپلر ۱۰،۱۰۰،۱۰۰۰ و سر سمپلر
- کاغذ صافی (واتمن شماره ۴)
- دستگاه فیلتراسیون حلال
- سرنگ

- ارلن

- فیلتر سرسرنگی

-فیلتر معمولی

- بشر

-بالون ژوژه با حجم‌های ۵ ml، ۱۰ml

- استوانه مدرج ۲۵ ml

- استوانه مدرج ۵۰ ml

- استوانه مدرج ۱۰۰ ml

- ویال ۵ ml، ۲ ml

- قیف شیشه‌ای

- قاشقک چوبی

- مگنت

- دماسنج

- فالکون ۵۰ ml

- دستکش

- پنبه استریل

- کیت ایمنو کروماتوگرافی خریداری شده از شرکت پژوهشی تولیدی روژان آزما (ایران-البرز)

۲-۱-۲مواد مورد نیاز

- استاندارد آفلاتوکسین M1

- استونیتریل با درجه خلوص HPLC (Merck آلمان)

- متانول با درجه خلوص HPLC (Merck آلمان)

- آب دیونیزه

- کپسول گاز نیتروژن

۲-۱-۳ نکات ایمنی

- به علت وجود خطرات ناشی از حلال‌ها و مایکوتوکسین‌ها در کلیه مراحل آزمایش استفاده از هود، ماسک و دستکش الزامی است.
- به علت حساس بودن مایکوتوکسین‌ها به نور، بهتر است کلیه ظروف با کاغذ آلومینیوم پوشانده شوند.
- حلال های کار شده در ظرف مخصوص جمع آوری شوند.
- ظروف آلوده به مایکوتوکسین را جهت شستشو به مدت ۲۴ ساعت در هیپوکلریت سدیم ۵٪ و پس از آن۲۴ ساعت در اسید سولفوریک ۱۰٪ قرار داده شوند و پس از آن ۱۲ بار آب‌شویی شوند.

۲-۱-۴ جمع آوری نمونه

تهیه‌ی انواع نمونه‌های شیر موجود در بازار تهران و همچنین تهیه‌ی ۱۰ نمونه شیر گاو از شیرفروشی‌های سنتی موجود در سطح شهر تهران انجام شد.

۲-۲ روش کار:

۲-۲-۱ تهیه‌ی استاندارد آفلاتوکسین M1

محلول استاندارد مادر

این استاندارد با غلظت ۱µg/ml از استاندارد پودر افلاتوکسین تهیه شده است. حلال مورد استفاده استونیتریل می باشد. به منظور اطمینان از اینکه غلظت محلول تهیه شده ۱ppm می‌باشد، غلظت آنرا توسط دستگاه اسپکتروفتومتری می‌سنجیم. غلظت بر اساس فرمول زیر بدست می آید:

$$C = (MW .1000. A_{max}) / \varepsilon$$

$$C = (328 . 1000 . 0.064) / 19000$$

$$C = 1.1 \mu g/ml$$

C= غلظت

A= شدت جذب خوانده شده توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر

MW=وزن مولکولی

ε= ضریب مربوط به حلالی که برای رقیق سازی سم از آن استفاده می شود.

هر بار قبل از استفاده، استانداردها به مدت یک ساعت در دمای محیط نگهداری می‌شوند. استانداردهای کاری مورد نیاز از طریق رقیق سازی محلول استاندارد مادر توسط استونیتریل به صورت روزانه تهیه می‌شود.

محلول استانداردهای واسط

الف) ساخت استاندارد با غلظت ۲۰۰ng/ml جهت ساخت استانداردهای کاری و Spike با غلظت ۱۰۰ ng/ml که حلال مورد استفاده استونیتریل می‌باشد

ب) جهت تهیه استانداردهای کاری با غلظت‌های 100 -75 -50 -25 -10 -5 – 2- 1- 0/5- 0/25ng/ml در ابتدا تهیه‌ی استاندارد ۱۰۰ng/ml از استاندارد ppb ۲۰۰ و سپس ساخت دیگر غلظت‌ها به صورت رقیق سازی از استاندارد قبلی انجام می‌گیرد که حلال مورد استفاده آب دیونیزه ٪ ۷۵ و استونیتریل ۲۵٪ می‌باشد.

۲-۲-۲ جداسازی پیک آفلاتوکسین M1 توسط HPLC

به منظور جداسازی و اندازه‌گیری پیک آفلاتوکسین M1 از یک ستون C18 با طول ۱۰cm ، قطر داخلی ۴/۶mm و اندازه ذرات ۵ میکرومتر استفاده شد و آب (٪۸۰) و استونیتریل (٪۲۰) به عنوان فاز متحرک انتخاب شد و از دتکتور فلئورسانس با طول موج برانگیختگی ۳۶۵ و نشر ۴۳۵ نانومتر استفاده شد.

۳-۲-۲ رسم منحنی استاندارد

برای تهیه‌ی منحنی استاندارد غلظت‌های ۱ تا ۵۰ نانوگرم بر میلی لیتر از آفلاتوکسین M1 تهیه و اندازه‌گیری آن توسط دستگاه HPLC انجام گرفت.

۴-۲-۲ تهیه‌ی استانداردهای کاری جهت معتبرسازی کیت آفلاتوکسین M1

به منظور تهیه‌ی استانداردهای کاری از استاندارد مادر با غلظت ۲۰۰ppb استفاده شد. که تهیه‌ی غلظت‌های بعدی به صورت رقیق سازی متوالی از غلظت اولیه انجام شد. برای رقیق سازی از شیر کم چرب به عنوان حلال استفاده شد. غلظت‌های تهیه شده برابر این چیه؟؟؟ ۰/۰۵ -۰/۱ -۰/۲ -۰/۵ -۳ نانوگرم بر میلی لیتر می‌باشند.

۵-۲-۲ تعیین اعتبارروش کیت تست آفلاتوکسین M1

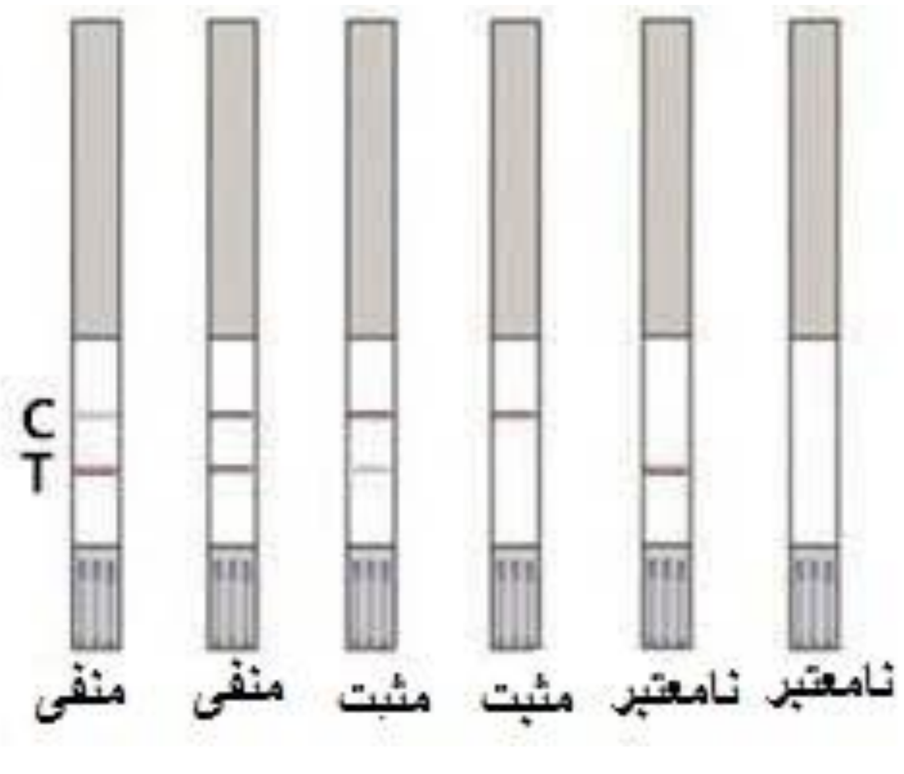
به منظور معتبرسازی تست‌های سریع AFM1، تهیه‌ی غلظت‌های بالا و پایین حد مجاز AFM1 در شیر، که برابر ppb ۰/۱ می‌باشد انجام گرفت. انجام تست‌ها به صورت چهار بار تکرار و در سه روز مختلف کاری انجام شد.

۶-۲-۲ مراحل انجام کار با کیت تست آفلاتوکسین M1

1. از قبل تمام معرف‌ها باید در دمای محیط قرار داده شوند.
2. خارج کردن نوارهای تست از بسته‌های آلومینیومی و قرار دادن آن ها به صورت افقی بر روی میز کار و حداکثر تا یک ساعت این نوارها استفاده شوند.

3. اضافه کردن دو قطره شیر از نمونه‌ی شیر کاملا همزده شده به میکروتیوب (اضافه کردن به قسمت مرکزی تیوب)، بستن درپوش میکروتیوب و انکوبه کردن آن به مدت ۵ دقیقه در حالیکه گاهی و به آرامی Shake می‌شود.
4. خارج کردن محتوای میکروتیوب (۲ قطره) و اضافه کردن به نوار (Well S).
5. به مدت ۵ دقیقه صبر می‌کنیم تا نتیجه ظاهر شود و تفسیر نتیجه پس از ۱۰ دقیقه انجام می‌گیرد.

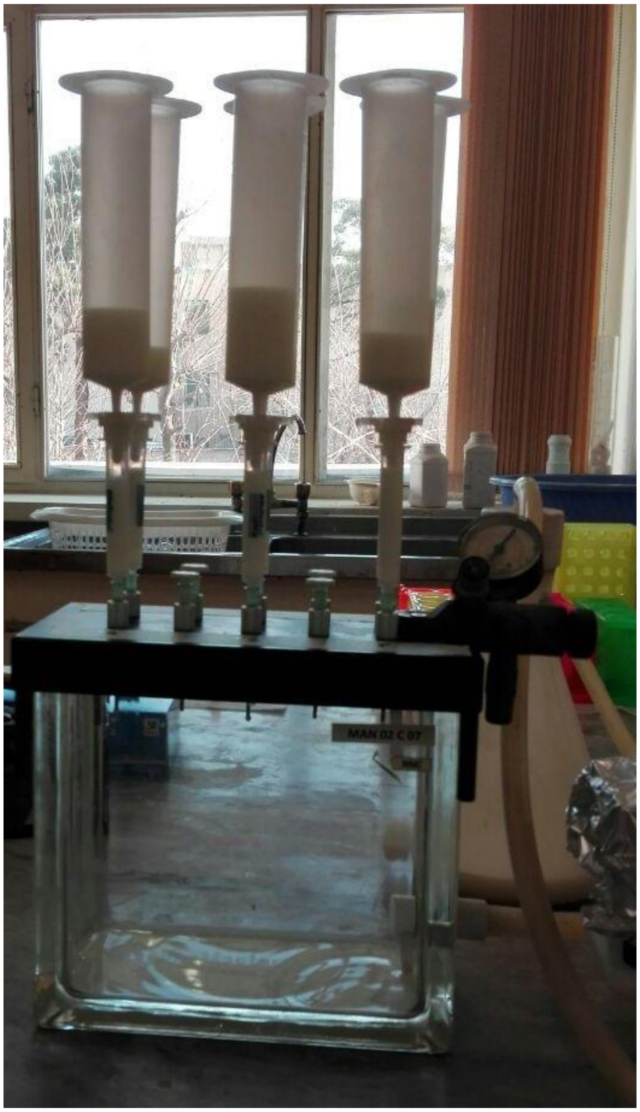
مولکول‌های آفلاتوکسین M1 در نمونه و AFM1-BSA تثبیت شده بر روی غشا (ناحیه‌ی تست) با یکدیگر بر سر ترکیب شدن با آنتی‌بادی‌های اختصاصی ایمونوگولد AFM1 رقابت می‌کنند. نتایج به صورت دیداری با مشاهده‌ی تشکیل باندهای رنگی به دست می‌آیند. ناحیه‌ی کنترل تحت تاثیرAFM1 موجود در شیر نمی‌باشد و باید در تمام موارد ظاهر شود از این رو که نشاندهنده‌ی معتبر بودن تست می‌باشد. ناحیه‌ی تست در غیاب AFM1 در نمونه کاملا مرئی می‌باشد و اگر AFM1 در غلظت بالاتر از ppb ۰/۱ باشد، ناحیه‌ی تست غیر مرئی و یا خیلی کمرنگ خواهد.



شکل ۲-۱ نمایی از تست سریع آفلاتوکسین

۲-۲-۷ مراحل انجام استخراج و clean up نمونه‌ی شیر

1. ۸۰ ml نمونه‌ی شیر را درون بشر ریخته و آن را درون حمام آب گرم روتاری قرار داده و به دمای ۳۷ درجه سانتی گراد می‌رسانیم. (دمای روتاری را روی ۴۲-۴۰ درجه سانتی‌گراد تنظیم می کنیم)
2. بعد از آن به بشر حاوی نمونه مگنت اضافه می‌کنیم و آن را به مدت ۳ دقیقه بر روی همزن مغناطیسی قرار می‌دهیم.
3. به منظور تهیه‌ی نمونه‌های اسپایک در سطح حد مجاز که 0/1 ppb می‌باشد، به ۸۰ میلی لیتر نمونه شیر بلانک (یا نمونه‌ای که کمترین میزان آلودگی را دارد) میزان ۸۰ میکرولیتر از استاندارد ۱۰۰ ppb را اضافه کرده و به مدت ۳۰ ثانیه آن را کاملا shake می کنیم.
4. سپس نمونه‌ها را به طور مساوی جهت سانتریفیوژ درون دو فالکون ۵۰ml ریخته و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۵ درجه سانتی‌گراد و با دور ۴۲۰۰ g سانتریفیوژ می کنیم.
5. در مرحله‌ی بعد به کمک قاشقک چوبی لایه‌ی چربی تشکیل شده بر روی نمونه را برمیداریم.
6. و بعد از آن ۵۰ml از نمونه‌ی بدون چربی را از کاغذ صافی واتمن شماره ۴ عبور می‌دهیم.
7. ستون‌های ایمونوافینیتی اختصاصی آفلاتوکسین M1 را که از قبل در محیط قرار داده‌ایم تا به دمای محیط برسد را به سرنگ متصل کرده ابتدا ۵۰ml نمونه‌ی شیر را به درون سرنگ ریخته و سپس ستون را به منیفولد وصل میکنیم . ستون ایمنوافینیتی Aflatest حاوی آنتی بادی‌های آفلاتوکسین M1 می‌باشند که سبب می‌شود که AFM1 به این آنتی بادی‌ها متصل شوند و در پایان توسط استونیتریل جدا و جمع‌آوری می‌شوند.



شکل ۲-۲ نمایی از ستون ایمونوافینیتی

8. پس از عبور شیر، ۲۰ml آب دیونیزه را به منظور شستشوی ناخالصی‌ها از ستون عبور می دهیم.
9. در این مرحله با روشن کردن پمپ فشار هوا ستون را کاملا خشک می‌کنیم و ظرف منیفولد را شسته و خشک می‌کنیم.
10. سپس ml ۴ استونیتریل به منظور جداسازی AFM1 از آنتی بادی‌های خود، از ستون عبور داده و در ویالml ۵ جمع آوری می‌کنیم.
11. در این مرحله ورتکس کردن نمونه‌ها به مدت ۱ دقیقه صورت می‌گیرد.

12. خشک کردن نمونه‌ها به طور کامل توسط گاز نیتروژن انجام می‌گیرد.

شکل۲- نمایی از خشک کردن نمونه‌ها با گاز ازت

13. افزودن ۴۰۰ میکرولیتر از فاز متحرک (آب ۸۰٪ و استونیتریل ۲۰٪) به نمونه‌ی خشک شده.
14. به مدت ۳ دقیقه نمونه ورتکس می‌شود.
15. در این مرحله نمونه را به مدت ۱ دقیقه در حمام اولتراسونیک قرار می‌دهیم.
16. و بعد از آن مجددا نمونه را به مدت ۱ دقیقه ورتکس می کنیم.
17. و در آخر نمونه جهت تزریق به دستگاه آماده می‌باشد.

۲-۳ شناسایی وتعیین مقدار

۲-۳-۱ آماده سازی دستگاه HPLC

شستشوی اولیه مسیر ها و ستون در ابتدای تزریق :

1. شستشو با متانول HPLC grade به مدت 30 دقیقه
2. شستشو با فاز متحرک به مدت ۱۵ دقیقه

- آماده سازی فاز متحرک

۸۰۰میلی لیتر آب دیونیزه را میلی‌پور می‌کنیم و به آن ۲۰۰ میلی‌لیتر استونیتریل اضافه می‌کنیم و به ظرف مخصوص فاز متحرک دستگاه HPLC منتقل می کنیم.

۲-۳-۲ تزریق به دستگاه HPLC

در ابتدا شش استاندارد کاری و سپس نمونه ها و اسپایک ها را به حجم ۱۰۰ میکرولیتر به دستگاه تزریق می کنیم.

۲-۳-۳ شستشوی نهایی دستگاه

1. شستشو با فاز متحرک به مدت 15 دقیقه
3. شستشو با متانول به مدت ۳۰ دقیقه

لطفا بنویسید کلیه مراحل چقدر طول میکشد

3-5. بررسی اعتبار روش (Validation of method)

اعتبارسنجی روش بر اساس ، روش های اعتبارسنجی و کنترل کیفی طبق استاندارد ملی ایران انجام می شود. در این راستا پارامترهایی چون، بررسی خطی بودن روش، صحت و دقت روش، تعیین حدود تشخیص (LOD) و تعیین مقدار(LOQ) مورد بررسی قرار می گیرد(49).

جهت اعتبارسنجی روش باید تکرارپذیری و تجدیدپذیری روش، مورد آزمون قرار گیرد.

تکرارپذیری: نزدیکی نتایج حاصل از آزمایشات مکرر به وسیله یک روش آزمون، تحت شرایط مساوی از نظر آزمایشگاه، دستگاه و فرد آزمایش کننده.

جهت سنجش تکرار پذیری[1]، در یک روز از هرکدام از سه سطوح اسپایک ng/ml ۰/۰۲، ۰/۱ و ۰/۲، سه سری نمونه ها را آلوده کرده و یک نمونه را بعنوان بلانک جدا می کنیم. (جمعاً 10 نمونه در پایان یک روز)

جهت سنجش تجدیدپذیری[2]، در سه روز متوالی از هر کدام از سه سطوح ng/ml ۰/۰۲، ۰/۱ و ۲/، ۰اسپایک، سه سری نمونه ها را آلوده کرده و یک نمونه را بعنوان بلانک جدا می کنیم. (جمعاً 30 نمونه در پایان سه روز)

3-5-1. تعیین درصد بازیافت و مطالعات صحت و دقت روش

برای بررسی درصد بازیافت و مطالعات صحت و دقت روش نمونه های بلانک در سه سطح و برای هر سطح سه نمونه(جمعاً 27 نمونه) اسپایک شده سپس با استفاده از روش گفته شده در این فصل بر روی آن ها استخراج صورت می گیرد. این نمونه ها آنالیز شده و درصد بازیافت تعیین گردیده است. این کار در سه روز متوالی انجام شده و میانگین درصد بازیافت و میزان انحراف استاندارد نسبی (RSD% or CV%) جهت مطالعات صحت و دقت تعیین شده است(50).

3-5-2. LOD و LOQ

LOD[3]: غلظتی است که می تواند ارتفاعی از پیک را مشخص کند.(ارتفاع نمونه نسبت به Noise).

LOQ[4]: LOQ عبارت است از پایین ترین سطح اسپایک معتبر شده که در آن معیارهای صحت و دقت یعنی میانگین بازیافت و RSD تعیین شود(49).

اگر ارتفاع پیک نمونه ای بین مقادیر LOD و LOQ باشد، فقط می توان گفت وجود دارد ولی نمی توان آن را تعیین مقدار کرد.

هر چه خالص سازی ضعیف تر باشد Noise بیشتر است، حد تشخیص نامناسب تر است، یعنی مقادیر کم را اندازه گیری نمی کند. پس خالص سازی و آماده سازی نمونه در میزان LOD وLOQ اندازه گیری بسیار مهم است.

---

1 . Repeatability

2 .Reproducibility

3 .Limit of Detection(LOD)

4 Limit of Quantification(LOQ)

فصل سوم

نتایج و یافته‌ها

۳-۱ اعتبارسنجی روش HPLC

۳-۱-۱ بررسی خطی بودن

نتایج بدست آمده از رسم منحنی کالیبراسیون نشان می دهد که منحنی کالیبراسیون برای آفلاتوکسین M1 در محدوده ng/ml ۵- 0/1خطی است. ضریب همبستگی (r^2) با احتساب سه رقم اعشار 0/99۹ می باشد. معادله خط و ضریب همبستگی مربوط به آفلاتوکسین M1 در (جدول۳-1) آورده شده است.

منحنی کالیبراسیون رسم شده جهت آفلاتوکسین M1 در (نمودار ۳-1) ارائه شده است. پس از تزریق استانداردها منحنی کالیبراسیون رسم می شود. منحنی کالیبراسیون با محاسبه سطح زیر منحنی استانداردها و در نظر گرفتن ضریب رقت رسم می شود.

$$Y = ax + b$$

X = مقدار آفلاتوکسین M1

$$X = (y - b) / a$$

a = شیب خط منحنی کالیبراسیون

b = عرض از مبدا

g = سطح زیر منحنی

C/x = ضریب رقت

C = غلظت آفلاتوکسین M1 استخراج شده (ppb)

Recovery(%) = C/D

D = غلظت آفلاتوکسین M1 اسپایک شده (ppb)

جدول۳-۱ نتایج مربوط به منحنی‌های کالیبراسیون رسم شده

DAY	Compound	Equation	Regression Coefficient
1	AFM1		0.999
2			0.999
3			0.998
4			

جدول (۳-2) :مساحت سطح زیر منحنی (AUC) مربوط به کالیبراسیون استاندارد آفلاتوکسین M1

Amount (ng)	AUC
0.1	9011
0.2	17583
0.5	47894
1	89278
2.5	221167
5	470032

نمودار (۳-1): منحنی کالیبراسیون آفلاتوکسین M1

۳-1-2 تعیین LOD و LOQ

با بررسی انجام شده ، حدود تشخیص (LOD) و حدود تعیین مقدار (LOQ) آفلاتوکسین M1 در جدول ۳-3 آورده شده است.

جدول(۳-3): میزان LOQ و LOD آفلاتوکسین M1

Compound	LOQ(ng/ml)	LOD(ng/ml)
AFM1	0.02	0.006

۳-۱-۳ تعیین درصد بازیافت و بررسی صحت و دقت روش

در رفرنس های معتبر جهت بیان نتایج و ارزیابی تکرارپذیری و دقت میانی روش آزمون از انحراف معیار نسبی (RSD) استفاده میکنند.

انحراف معیار نسبی برای تکرارپذیری (RSD_r) و تجدیدپذیری (RSD_R) با فرمول زیر محاسبه می شود:

$$RSD_R, RSD_r \,\% = (SD / \text{Mean-Recovery}) \times 100$$

SD = انحراف معیار

Mean-recovery = میانگین ریکاوری ها در هر سطح

جدول(۳-4)میانگین ریکاوری و انحراف معیار نسبی برای تکرارپذیری و تجدیدپذیری سم اسپایک شده به نمونه شیر بلانک

Spiking solution (ng/ml)	Compound	Mean Recovery%	RSD_R%	RSD_r%
0.02	AFM1			
0.1				
0.2				

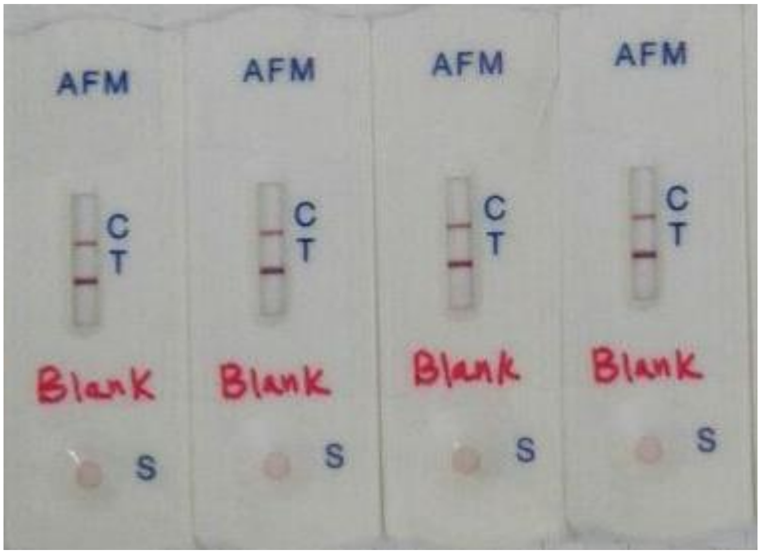
حد تعیین مقدار برای این روش ۰/۰۲ نانوگرم بر میلی لیتر و حد تشخیص برای این روش 0/006 نانوگرم بر میلی لیتر برای آفلاتوکسین M1 تعیین شده است.

۳-۵ نتایج حاصل ازاعتبارسنجی کیت تست آفلاتوکسین M1

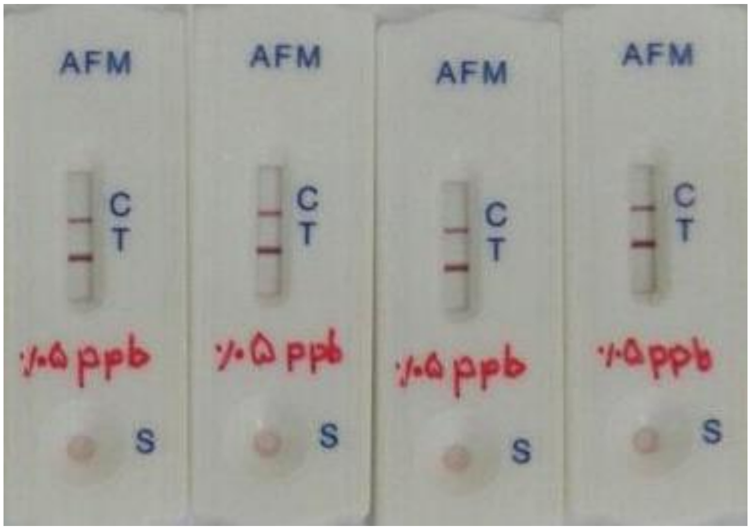
اعتبارسنجی کیت تست AFM1 به صورت چهار بار تکرار به منظور تعیین تکرارپذیری و در سه روز کاری مختلف انجام شد. که نتایج در جداول زیر ارائه شده‌اند.

جدول شماره

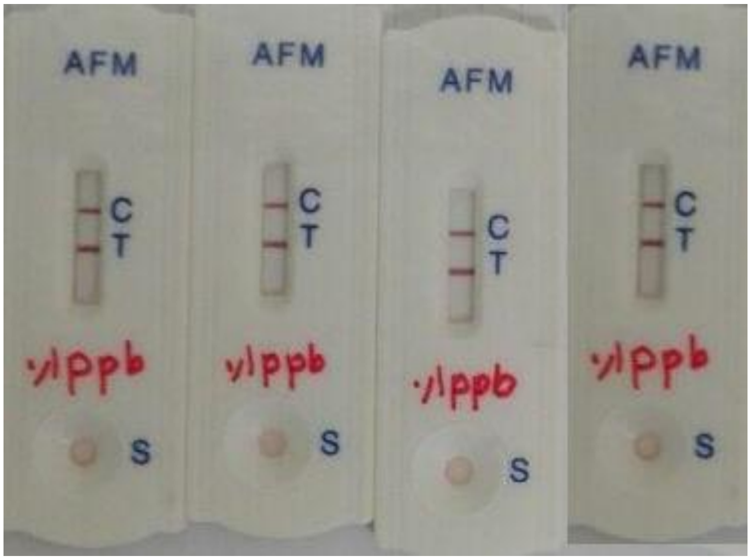
Day	Spiked AFM1 (ng/ml)	Resault (n=4)
1	Blank	-, -, -, -
	0.05	-, -, -, -
	0.1	-, -, -, -
	0.3	+, +, +, +
	0.5	+, +, +, +
	3	+, +, +, +
2	Blank	-, -, -, -
	0.05	-, -, -, -
	0.1	-, -, -, -
	0.2	-, -, -, -
	0.3	+, +, +, +
	0.5	+, +, +, +
	3	+, +, +, +
3	0.1	+, +, +, +
	0.3	+, +, +, +
	0.5	+, +, +, +



شکل تست سریع AFM1 در غلظت بلانک

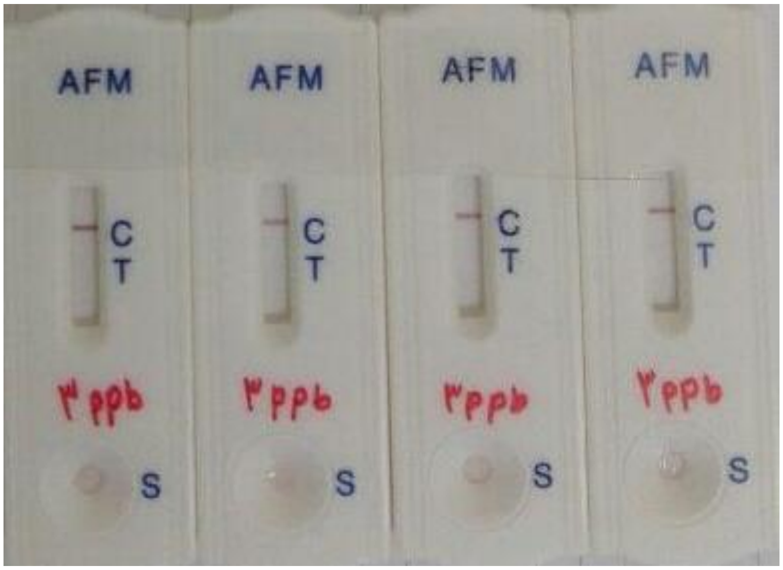


شکل تست سریع AFM1 در غلظت ۰/۰۵ ppb



شکل تست سریع AFM1 در غلظت ۰/۱ ppb

شکل تست سریع AFM1 در غلظت ۰/۵ ppb

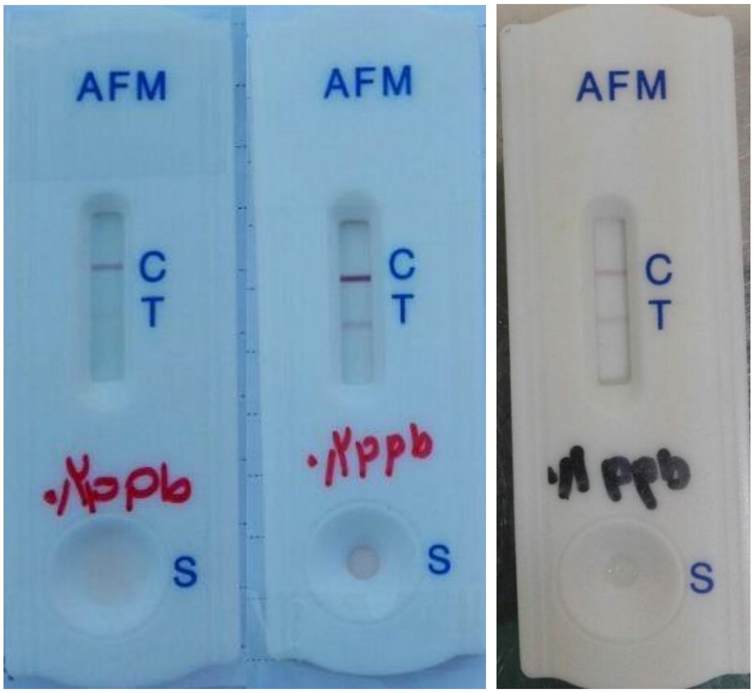


شکل تست سریع AFM1 در غلظت ۳ ppb

شکل تست سریع AFM1 در غلظت ۰/۲ ppb

بهینه سازی تست سریع AFM1

با توجه به جداول و تصاویر تست‌های سریع آفلاتوکسین M1 در غلظت‌های ppb ۰/۱و ۰/۲ نتایج مطلوب حاصل نشد بنابراین به منظور بهبود این وضعیت حجم نمونه شیر افزایشی به درون میکروتیوب و همچنین چاهک **S** را به جای ۱۰۰ میکرولیتر به میزان ۲۰۰ میکرولیتر افزایش دادیم که با اینکار در ناحیه‌ی تست خطوط کمرنگی به جای خطوط پررنگ قبلی ایجاد شد که با توجه به پروتکل شرکت سازنده (شرکت روژان آزما) خط کمرنگ را میتوان نتیجه‌ی مثبت در نظر گرفت.



شکل تست سریع AFM1 در غلظت 0/1ppb و 0/2

آنالیز نمونه های شیر

پس از اعتبار سنجی روش‌های آنالیزی مورد استفاده در این پژوهش تعداد 30 نمونه شیر از سوپرمارکت و تعداد 10 نمونه از لبنیات فروشی‌های سنتی سطح شهر تهران جمع آوری شدند. که نمونه‌ها به منظور تست اولیه بر روی کیت تست آفلاتوکسین M1 آزمایش شدند و پس از آن هر دوی نمونه‌های شیر مثبت (بالاتر از غلظت ۰/۱ ppb) و منفی (پایین‌تر از غلظت ppb ۰/۱) آزمایش شده توسط کیت آفلاتوکسین M1 به منظور تایید نتایج به دست آمده، پس از انجام مراحل استخراج و تغلیظ سازی به دستگاه HPLC تزریق شدند که نتایج به دست آمده در جدول زیر ارائه شده‌اند.

جدول نتایج تعیین حضور آفلاتوکسین M1 در شیر به روش تست سریع AFM1 و HPLC

Brand	Type	HPLC Concentration (ng/ml)	Strip test (n=3)
A	1	0.05	-, -, -
	2	ND	-, -, -
	3	0.01	-, -, -
B	4	0.02	-, -, -
	5	0.02	-, -, -
C	6	ND	-, -, -
	7	0.04	-, -, -
D	8	0.005	-, -, -
	9	0.02	-, -, -
	10	0.02	-, -, -
E	11	0.02	-, -, -
	12	0.026	-, -, -
	13	0.01	-, -, -
F	14	0.007	-, -, -
G	15	0.22	+, +, +
	16	0.03	-, -, -
H	17	ND	-, -, -

	18	ND	-, -, -
I	19 20	0.017 0.04	-, -, - -, -, -
J	21 22	ND ND	-, -, - -, -, -
K	23 24	0.04 0.04	-, -, - -, -, -
L	25 26 27	0.11 0.04 0.12	+, +, + -, -, - +, +, +
M	28	0.02	-, -, -
N	29	0.01	-, -, -
O	30	ND	-, -, -
P			
Q			
R			
S			
T			
U			
V			
X			
W			
Y			

جدول (4-5): معادله خط و ضریب همبستگی مربوط به آنالیز نمونه های مختلف شیر

DAY	Compound	Equation	Regression Cofficient
1	AFM1	Y=88975x+859.9	0.999
2		Y=93495x-2422	0.999
3		Y=94050x-6389	0.999

4			0.999

جدول (4-6): حضور آفلاتوکسین M1 در نمونه های شیر(جدول)

شگل(4-1). کروماتوگرام مربوط به نمونه بلانک

شکل(4-2).کروماتوگرام مربوط به نمونه اسپایک شده با آفلاتوکسین M1 در سطح ppb

شکل(4-3). کروماتوگرام مربوط به استاندارد آفلاتوکسین M1

شکل(4-4). کروماتوگرام مربوط به نمونه شیر آلوده به آفلاتوکسین **M**

فصل چهارم
بحث و نتیجه‌گیری

۴-۱ بحث

یکی از مهم ترین چالش های پیش رو جامعه بشری، مساله امنیت و سلامت غذا است. آلودگی مواد غذایی بوسیله ی استفاده روزافزون مواد شیمیایی مثل آفت کش ها و داروهای دامپزشکی، نگرانی‌های عمده‌ای در امر بهداشت عمومی در سراسر جهان بوجود آورده است. در این زمینه آلودگی مواد غذایی در نتیجه‌ی سموم طبیعی مثل مایکوتوکسین‌ها، هم می‌تواند سلامت مواد غذایی و خوراک دام را به خطر اندازد، که اثرات کارسینوژنیسیته، موتاژنیسیته و تراتوژنیسیته‌ی این سموم بر سلامت انسان و حیوانات مورد توافق محققان و نهادهای رسمی است. در حال حاضر تخمین زده می‌شود که بیش از 25 درصد محصولات مزارع جهان به مایکوتوکسین‌ها آلوده باشند[37].

از میان مایکوتوکسین‌هایی که بخوبی شناخته شده اند و مهمترین گروه ها از نظر ایجاد خطر برای انسان و سایر حیوانات و همچنین ایجاد آلودگی در مواد غذایی می توان از آفلاتوکسین ها(Aflatoxins) نام برد(۴)

آفلاتوکسین M1 توسط دو گونه آسپرژیلوس فلاوس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس وM2 توسط آسپرژیلوس فلاوس تولید می شود . آفلاتوکسین M1 و M2 مشتقات منوهیدروکسیله آفلاتوکسین B1 و B2 هستند که در شیر انسان وحیوانات که از منابع غذایی آلوده به آفلاتوکسین B2 وB1 تغذیه کرده‌اند، تشکیل و ترشح می شود. AFB1 در کبد توسط سیتوکروم‌های میکروزومال متابولیزه شده و به مشتقات مختلفی تبدیل می‌شود که آفلاتوکسین M1 مشتق مونوهیدروکسیله‌ی آن می‌باشد از جمله عوارض آفلاتوکسین M1 موجد در شیر میتوان به سرطانزایی خصوصا روی کبد ، جهش زایی و اتصال با DNA اشاره کرد(۲۶۷)

شیر مهم‌ترین منبع تامین کلسیم و فسفر بدن می‌باشد و به لحاظ داشتن اسیدآمینه‌های ضروری جایگاه ویژه‌ای در تامین پروتئین‌های مورد نیاز بدن دارد با توجه به جایگاهی که شیر و محصولات لبنی در رژیم غذایی انسان دارند به ویژه اهمیت مصرف آن در کودکان و سالمندان شناسایی سموم موجود در آن اهمیت بسیار می‌یابد. امروزه به علت رقابت موجود در صنایع غذایی و علاوه بر این به علت افزایش پیچیدگی‌های آنالیزی، در صنایع غذایی نیازمند یک روش سریع جهت گزارش آلاینده‌های غذایی می‌باشیم به همین علت روش‌های سریع به منظور آنالیز مایکوتوکسین‌ها بسیار حائز اهمیت می‌باشند.

با توجه به اثرات و عوارض ذکر شده به دنبال مصرف طولانی مدت محصولات آلوده با آفلاتوکسین M1 و ارزش غذایی بالای شیر، وجود روشی کارآمد و به صرفه به منظور پایش و کنترل میزان این سم به شدت احساس می‌شود. به منظور کنترل موثر آلودگی شیر با AFM1 از روش‌های آنالیزی معمول میتوان به HPLC و ELISA اشاره کرد که در حال حاضر HPLC (کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا) روش رفرنس و معتبر جهت اندازه‌گیری

M1 می‌باشد. AFM1 موجود در نمونه‌های آلوده پس ازاستخراج و Clean-up توسط ستون‌های ایمونوافینیتی، توسط دستگاهHPLC تعیین غلظت می شود(۱۷-۱۶پرو). از مهم‌ترین مزایای HPLC میتوان به حساسیت بالا، تعیین مقدار کمی با صحت بالا، قابلیت آنالیز نمونه‌های غیرفرار و حساس به دما اشاره نمود(۱۸). البته HPLC با وجود صحت و دقت و اعتبار فراوان دارای محدودیت‌هایی از جمله زمان طولانی آزمایش، هزینه‌ی بالای تجهیزات و مواد مصرفی، پیچیدگی‌های نرم افزاری، تفسیر نتایج و نیاز به وجود تکنسین آموزش دیده نیز می‌باشد. به همین دلیل استفاده از rapid test ها در سال‌های اخیر بسیار مورد توجه حیطه‌های آنالیزی قرار گرفته است. از ویژگی‌ها و مزایای rapid testها سرعت، سادگی و کم هزینه بودن می‌باشد که میتوان در زمانی اندک، غربالگری سریعی از سموم را در مقیاس وسیع انجام داد(پرو۱۹). اساس این تست سریع یک سازو کار ایمونوکروماتوگرافی می‌باشد که در آن AFM1 موجود در نمونه و AFM1-BSA تثبیت شده بر روی غشا با یکدیگر بر سر اتصال با کمپلکس قرمز نانوذرات متصل به آنتی بادی منوکلونال ضد AFM1 رقابت می‌کنند و در نهایت منجر به تشکیل و یا عدم تشکیل ناحیه مرئی در ناحیه تست می‌شوند

هدف از انجام این مطالعه اعتبار سنجی روشی سریع و کارآمد به منظور غربالگری اولیه‌ی نمونه‌ها بوده است البته مشخص است که این تست روشی سریع و دقیق به منظور شناسایی می‌باشد و نتیجه‌ی حاصل از آن به عنوان ارزیابی اولیه در نظر گرفته شده و در صورت لزوم روش‌های رفرنس به منظور تایید این نتایج باید انجام گیرند. کیت تست آفلاتوکسین M1 استفاده شده در این تحقیق توسط شرکت روژان آزما تولید شده است که برتری این تست سطح cut-off این تست است که بر اساس حد مجازAFM1 در شیر ایران تعیین شده است.

بر اساس نتایج به دست آمده بر اساس اعتبار سنجی روش HPLC منحنی کالیبراسیون استاندارد AFM1 در محدوده‌ی 0/05 -2/5 ng/ml خطی بوده و ضریب همبستگی برابر0/999 بوده است. میانگین درصد بازیافت در دامنه بین................ بوده است. حدشناسایی (LOD) و حد کمی سازی (LOQ) به ترتیب برابر0/006 و 0/02 بوده است. نتایج حاصل از اعتبارسنجی روش سریع از نظر صحت و تکرارپذیری به خوبی توسط روش تاییدی HPLC تایید شدند. پس از اعتبارسنجی دو روش به منظور تعیین حضور AFM1 تعداد ۳۰ نمونه شیر استرلیزه و ۱۰ نمونه شیر پاستوریزه بررسی شدند که نتایج نشان داد

جدول (5-1): آلودگی آفلاتوکسین M1 در نمونه های جمع آوری شده از برندهای مختلف

در سال ۲۰۱۶ عزیز الله فلاح و همکاران به مطالعه‌ی فصلی آلودگی با AFM1 در چهار گونه‌ی شیرده(گاو، گوسفند، بز و شتر)در یزد پرداختند که در ابتدا به روش الایزا و سپس جهت تأیید نهایی به روش HPLC آنالیز را انجام دادند، که از این میان میزان آلودگی در نمونه‌ی شیر گاو بالاترین درصد(۴۵/۵٪)و نمونه‌ی شیر بز کمترین درصد (۴/۰۳٪) را داشتند که همچون مطالعه ما از روش تاییدی HPLC استفاده کرده‌اند. [2].

در سال ۲۰۱۴ Wim Reybroeck و همکاران معتبرسازی یک lateral flow test را جهت شناسایی AFM1 در غلظت ng/L ۵۰ انجام دادند که این تست به منظور تأمین سلامت مواد غذایی توسط آژانس فدرال بلژیک پذیرفته شد که سطح cut-off تست سریع بر اساس حد مجاز AFM1 در اتحادیه اروپا تنظیم شده است اما در مطالعه ما سطح cut-off اختصاصا برابر حد مجاز ایران و 0/1ppb می‌باشد[38].

در سال ۲۰۱۲ عبدالعظیم بهفر و همکاران میزان AFM1 را در شیر پاستوریزه تولیدی شهر اهواز به روش HPLC تعیین کردند، که میانگین غلظت AFM1 در نمونه‌ها برابر ng/L ۲/۷ بود که از ng/L ۵۰ میزان پذیرفته شده برای شیر در ایران کمتر است [39].

در سال ۲۰۱۲ Dao H. Zhang و همکاران ساخت یک تست ایمونوکروماتوگرافی در سطح حد مجاز چین برابر با ng/L ۵۰۰ را توسط روش ELISA اعتبار سنجی کردند که در ۲۷ نمونه شیر جمع آوری شده ۱۰۰٪ همبستگی بین نتایج حاصل از تست سریع و روش ELISA داشت، همچون نتایج حاصل از مطالعه ما با تفاوت روش رفرنس و سطح حد مجاز بررسی شده.

در سال ۲۰۱۱ سفیدگر و همکاران میزان AFM1 را در شیر پاستوریزه‌ی شهر بابل به روش الایزا تعیین کردند که تمام نمونه‌ها آلوده به AFM1 و میزان AFM1 در تمام نمونه‌ها بالاتر از حد مجاز ۵۰ng/L بودند[40].

در سال ۲۰۱۰ علی حشمتی و همکاران میزان آلودگی شیرهای UHT[5] با AFM1 را در شهر تهران به روش الایزا تعیین کردند که در ۳۳/۳٪ از نمونه‌ها غلظت AFM1 بالاتر از حد مجاز ng/L ۵۰ بودند[41].

مطالب را نباید اینطوری به مقدمه تمام کنید بحث خیلی مهم است

[5] Ultra High Temprature

نتیجه گیری

نتایج به دست آمده از این تحقیق به خوبی همبستگی بین روش سریع AFM1 و روش HPLC را نشان می‌دهد و به خوبی نتایج اولیه حاصل از تست سریع، توسط HPLC تایید شده‌اند که همانطور که قبلا گفته شده از جمله مزایای بسیار روش سریع میتوان به هزینه پایین آن، سادگی روش، سرعت بالا، عدم احتیاج به آماده سازی نمونه اشاره کرد.

پیشنهادات

با توجه به توانایی بالا روش سریع آفلاتوکسین M1 در شناسایی AFM1 در نمونه‌های شیر بررسی شده و سطح cut-off روش که در سطح حد مجاز ایران و برابر 0/1 نانوگرم بر میلی لیتر است و مزایای بسیاری که این روش نسبت به روش پرهزینه‌ای همچون HPLC دارد به کار گیری این تست سریع به شدت به عنوان روشی جهت آنالیز اولیه‌ی نمونه‌ها پیشنهاد می‌شود.

1. Ghazani, M.H.M., *Aflatoxin M1 contamination in pasteurized milk in Tabriz (northwest of Iran).* Food and Chemical Toxicology, 2009. **47**(7): p. 1624-1625.
2. Fallah, A.A., R. Fazlollahi, and A. Emami, *Seasonal study of aflatoxin M 1 contamination in milk of four dairy species in Yazd, Iran.* Food Control, 2016. **68**: p. 77-82.
3. Williams, J.H., et al., *Human aflatoxicosis in developing countries: a review of toxicology, exposure, potential health consequences, and interventions.* The American journal of clinical nutrition, 2004. **80**(5): p. 1106-1122.

4. Ito, Y., et al., *Aspergillus pseudotamarii, a new aflatoxin producing species in Aspergillus section Flavi.* Mycological Research, 2001. **105**(2): p. 233-239.
5. Peraica, M., et al., *Toxic effects of mycotoxins in humans.* Bulletin of the World Health Organization, 1999. **77**(9): p. 754-766.
6. Fallah, A.A., *Assessment of aflatoxin M1 contamination in pasteurized and UHT milk marketed in central part of Iran.* Food and Chemical Toxicology, 2010. **48**(3): p. 988-991.
7. Rouessac, F. and A. Rouessac, *Chemical analysis: modern instrumentation methods and techniques*. 2013: John Wiley & Sons.
8. USDA/GIPSA, *Design criteria and test performance specifications for quantitative aflatoxin test kits.* 1998(1): p. 67-71.
9. *EMAN E: European Mycotoxins Awareness Network Co-ordinate.Leatherhead Food Research Association (UK).* . 2003.
10. Blount, W., *Turkey "X" disease.* Turkeys, 1961. **9**(2): p. 52-55.
11. Forgacs, J., *Mycotoxicoses—the neglected diseases.* Feedstuffs, 1962. **34**(18): p. 124–134.
12. Maggon, K., S. Gupta, and T. Venkitasubramanian, *Biosynthesis of aflatoxins.* Bacteriological reviews, 1977. **41**(4): p. 822.
13. Cole, R.J., M.A. Schweikert, and B.B. Jarvis, *Handbook of secondary fungal metabolites, 3-volume set*. 2003: Academic Press.
14. Hussein, H.S. and J.M. Brasel, *Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals.* Toxicology, 2001. **167**(2): p. 101-134.
15. Richard, J.L., *Some major mycotoxins and their mycotoxicoses—An overview.* International journal of food microbiology, 2007. **119**(1): p. 3-10.
16. Van Egmond, H.P., *Significance of mycotoxins in dairy production nub 1*. Vol. 15. 1989: Elsevier London is BN.
17. van Burik, J.-A.H. and P.T. Magee, *Aspects of fungal pathogenesis in humans.* Annual Reviews in Microbiology, 2001. **55**(1): p. 743-772.
18. McGinnis, M.R., L. Sigler, and M.G. Rinaldi, *Some medically important fungi and their common synonyms and names of uncertain application.* Clinical infectious diseases, 1999. **29**(4): p. 728-730.

19. Flores-Flores, M.E., et al., *Presence of mycotoxins in animal milk: A review.* Food Control, 2015. **53**: p. 163-176.

20. Anderson, J.A. and A.W. ALCOCK, *Storage of cereal grains and their products.* Storage of cereal grains and their products., 1954.

21. Organization, W.H. and I.A.f.R.o. Cancer, *Some naturally occurring substances: food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins.* IARC Monographs on the Evaluation of the Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans, 1993. **56**.

22. IARC, *Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans.* 2002. **82**: p. 171.

23. ISIRI, *Food and feed-mycotoxins-maximum tolerated level.* 2010: p. 1-10.

24. Anukul, N., K. Vangnai, and W. Mahakarnchanakul, *Significance of regulation limits in mycotoxin contamination in Asia and risk management programs at the national level.* journal of food and drug analysis, 2013. **21**(3): p. 227-241.

25. Moss, M.O., *Risk assessment for aflatoxins in foodstuffs.* International Biodeterioration & Biodegradation, 2002. **50**(3): p. 137-142.

26. Eaton, D.L. and J.D. Groopman, *The toxicology of aflatoxins: human health, veterinary, and agricultural significance*. 2013: Elsevier.

27. Jard, G., et al., *Review of mycotoxin reduction in food and feed: from prevention in the field to detoxification by adsorption or transformation.* Food Additives & Contaminants: Part A, 2011. **28**(11): p. 1590-1609.

28. Connor, W.E., *Importance of n− 3 fatty acids in health and disease.* The American journal of clinical nutrition, 2000. **71**(1): p. 171S-175S.

29. Visioli, F. and A. Strata, *Milk, dairy products, and their functional effects in humans: a narrative review of recent evidence.* Advances in Nutrition: An International Review Journal, 2014. **5**(2): p. 131-143.

30. Smith, K., G. Mittal, and M. Griffiths, *Pasteurization of milk using pulsed electrical field and antimicrobials.* Journal of Food Science, 2002. **67**(6): p. 2304-2308.

31. عباس, ش., کروماتوگرافی و طیف سنجی. 1372. 1906

32. رایس, ا., روش های کروماتوگرافی. 1371.
33. van Amerongen, A., D. Barug, and M. Lauwaars, *Rapid methods for biological and chemical contaminants in food and feed*. 2005: Wageningen Academic Pub.
34. Liu, C., et al., *Lateral flow immunochromatographic assay for sensitive pesticide detection by using Fe3O4 nanoparticle aggregates as color reagents*. Analytical chemistry, 2011. **83**(17): p. 6778-6784.
35. Chan, C.C., et al., *Analytical method validation and instrument performance verification*. 2004: John Wiley & Sons.
36. Bliesner, D.M., *Validating chromatographic methods: a practical guide*. 2006: John Wiley & Sons.
37. Köppen, R., et al., *Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations.* Applied microbiology and biotechnology, 2010. **86**(6): p. 1595-1612.
38. Reybroeck, W., et al., *Validation of a lateral flow test (MRLAFMQ) for the detection of aflatoxin M1 at 50 ng l− 1 in raw commingled milk.* Food Additives & Contaminants: Part A, 2014. **31**(12): p. 2080-2089.
39. Behfar, A., et al., *Determination of Aflatoxin M1 levels in produced pasteurized milk in Ahvaz City by using HPLC.* Jundishapur journal of natural pharmaceutical products, 2012. **7**(2): p. 80.
40. Sefidgar, S., et al., *Aflatoxin M1 in pasteurized milk in Babol city, Mazandaran Province, Iran.* Iranian journal of public health, 2011. **40**(1): p. 115.
41. Heshmati, A. and J.M. Milani, *Contamination of UHT milk by aflatoxin M 1 in Iran.* Food Control, 2010. **21**(1): p. 19-22.