نگارش: حسین خاشابی و جمیله طیبی (۱)

بررسی و تخمین افلاتوکسین های B_1+B_2 و G_1+G_2 در محصول پسته به روش تین‌لایر کروماتوگرافی تحت تابش اشعه ماوراء بنفش (۲)

چکیده

در سال ۱۳۵٤ تعداد ۱۲۱ نمونه و در سال ۱۳۵۵ تعداد ۱۰۸ نمونه پسته با پوست سبز و بدون پوست سبز از لحاظ آلودگی به افلاتوکسین‌های B_1+B_2 و G_1+G_2 مورد آزمایش قرار گرفتند که نمونه‌های سال ۱۳۵٤ عاری از توکسین مزبور ولی در نمونه‌های سال ۱۳۵۵ تعداد ۱۲ نمونه به افلاتوکسین‌های B_1+B_2 آلوده بوده‌اند.

جهت بررسی شیمیائی افلاتوکسین از روش پیشنهادی انستیتو محصولات گرمسیری انگلستان با تغییراتی که در آن داده شد استفاده گردیده است این تغییرات در متن انگلیسی مقاله مشخص شده است.

مقدمه

افلاتوکسین مجموعه‌ایست از توکسین‌های مختلف که بوسیله گروه قارچهای **Aspergillus flavus** تولید میگردد. تاکنون ۱۳ نوع افلاتوکسین در طبیعت یافت شده که کلیه آنها دارای هسته کومارین می‌باشند که با نصف بی‌فوران ترکیب شده است علاوه بر آن یادارای یك حلقه پنتانون (افلاتوکسین سری **B**) ویالاکتون شش ضلعی (افلاتوکسین سری **G**) می‌باشند الکس سیکلر (CIEGLER, 1974). درنمونه‌های آلوده معمولا افلاتوکسین‌های G_1+B_1 از بقیه زیادتر و مقدار هریك از آنها نیز به شرایط رشد قارچ تولید کننده و بخصوص به درجه حرارت اپتیمم تولید هریك از آنها بستگی دارد گلدبلات (GOLDBLATT, 1969).

---

۱ ــ حسین خاشابی و جمیله طیبی ، تهران ، صندوق پستی ۳۱۷۸ ، موسسه بررسی آفات و بیماری های گیاهی .

۲ ــ این مقاله درتاریخ ۲۸/۶/۱۳۵۸ به‌هیئت تحریریه رسیده است.

روش بررسی

الف ــ تهیه نمونه پسته

در سال ۱۳۵٤ و ۱۳۵۵ آزمایشگاه بررسی آفات وبیماریهای گیاهی رفسنجان نمونه‌هائی باپوست سبزوبدون پوست سبز راتهیه وارسال‌داشت که مورد بررسی قرارگرفتند .

۱ ــ در سال ۱۳۵٤ ازده منطقه پسته کاری رفسنجان از تاریخ ۲۰ر٤ر۱۳۵٤ تا ۲٤ر٦ر۱۳۵٤ و هم چنین از سه انبار پسته نمونه‌هائی باپوست سبز تهیه و پس از خشك نمودن بمدت ٤۸ ساعت دراتو ۷۰ درجه سانتی گراد بسته‌بندی و ارسال گردید . تعداد نمونه‌های ارسالی ۷۳ عدد ووزن هریك از آنها یك کیلوگرم بوده‌است . ضمنا ازدو منطقه محمدآبادنوق وسعیدآبادرفسنجان نیز که با محصول کاپتافول سم‌پاشی شده‌بودند نمونه‌برداری ونمونه‌ها پس‌ازآماده‌شدن بطریق فوق ارسال گردیدند تعداداین نمونه‌ها ٤۸ عدد ووزن هرکدام یك کیلوگرم بوده‌است .

۲ ــ درسال ۱۳۵۵ تعداد ۵٦ نمونه پسته از هشت منطقه تهیه وپس‌ازپوست کندن بمدت ٤۸ ساعت در اتو ۷۰ درجه سانتی گراد خشك و ارسال گردید. هم چنین تعداد ۱۲ نمونه ازکارگاه های آماده کننده پسته و تعداد ٤۰ نمونه‌از دومنطقه سم‌پاشی شده بوسیله دیکوفول نمونه‌برداری و پس از آماده شدن‌بطریق فوق‌ارسال گردیده است. وزن‌هریك‌از نمونه‌ها یك‌کیلوگرم بوده است.

در نمونه‌های سال ۱۳۵٤ افلاتوکسین دیده نشد ولی‌چون‌در نمونه‌های سال ۱۳۵۵ به مواردی دراین زمینه برخوردگردید لذا توضیح بیشتری راجع به‌نمونه‌برداری سال ۱۳۵۵داده میشود : هشت منطقه بازدیده شده عبارتند از حسین‌آباد انار ، بهشت‌آباد، احمدآباد، جنت‌نوق، کبوترخان ، باغ‌محوطه آزمایشگاه رفسنجان ، رکن‌آباد نوق‌وایستگاه موسسه‌اصلاح‌بذرونهال.

از کارگاه‌های مختلف جمعا ۱۲ نمونه وازدونقطه سمپاشی‌شده‌بنامهای‌محمدآبادنوق‌و سعیدآباد رفسنجان نیز جمعا ٤۰ نمونه فرستاده شدند .

ب ــ بررسی شیمیائی

برای بررسی وتعیین مقدار افلاتوکسین‌درنمونه‌های ارسالی (۲۲۹نمونه) از روش‌پیشنهادی جونز (JONES, 1972) با تغییرات چندی بطریق زیر استفاده گردیده است:

۱ ــ خردکردن : نمونه (یك‌کیلوگرم) بوسیله Biender کاملا خرد گردید .

۲ ــ عصاره‌گیری : از ۵۰ گرم نمونه خرد شده عصاره‌گیری شد . مقدارآب‌مقطر مصرف شده ۲۵ میلی‌لیتر ومقدار سلیت اضافه شده ۲۵ گرم وکلروفرم مصرفی ۲۵۰ میلی‌لیتربوده است. مدت بهم زدن ۳۰ دقیقه وسانتریفوژدرمدت ۲۰ دقیقه‌با ۳۰۰۰ دور دردقیقه‌انجام گرفته است.

۳ ــ تصفیه محلول : برای تصفیه محلول روش کولن کروماتوگرافی انتخاب گردید. دراین روش از کولنی بطول ٤۰۰ و بقطر ۲۲ میلی‌متر استفاده شد. محتویات کولن‌بترتیب ۵ گرم سولفات سدیم انیدر ، ۱۰ گرم سیلیکاژل بقطر ۰٦۳ر۰ ــ ۲۰۰ر۰ میلی متر و ۱۵ گرم سولفات سدیم انیدر بوده که‌بشکل خیساندن درکلروفرم به‌کولن اضافه‌گردیده است. حلالهای‌مورد استفاده بترتیب نرمال هگزان ، اتراتیلیك ، محلول مخلوط کلر وفرم‌متانل‌بوده‌است.

٤ ــ تین‌لایر کروماتوگرافی : در این مرحله از صفحات کروماتوگرافی‌شیشه‌ای‌به‌ابعاد ۲۰×۲۰ سانتی متر که قشری از سیلیکاژل G بضخامت ۵ر۰ میلی‌متر روی‌آن گسترانیده‌شده بود استفاده گردید . مقدار آب افزوده شده به سیلیکاژل جهت تهیه یك خمیر قابل‌گسترش ۲۰۰ میلی‌لیتر ومدت بهم زدن‌آن دودقیقه بوده است محلولهای استانداردافلاتوکسین‌های B_1 و G_1 مورد استفاده نیز بغلظت ۰۰۲ر۰ میکروگرم در میکرولیتر تهیه گردیده است.

حلال تانك اول اتراتیلیك وحلال تانك دوم مخلوط کلروفرم ـ متانل بوده است . لامپ تولید کننده اشعه ماوراء بنفش در این آزمایشات Camag Typ. TI. 900-U و طول موج مورد استفاده ۰٫۳۵۰ میکرون بوده است.

نتیجه و بحث :

از مقایسه لکه‌های فلئورسانس ایجاد شده توسط نمونه ولکه‌های ایجاد شده توسط استاندارد وجود افلاتوکسین مشخص وبا محاسباتی مقدار آن معین گردیده است.

دربعضی موارد بعلت ناخالصی‌ها و رنگهائیکه در پسته وبخصوص درپوست سبز آن موجود بود لکه‌هائی بموازات لکه‌های مربوط به‌استاندارد ظاهر میگردید که‌مشکوك بنظر میرسید ولی باتوجه به‌اینکه افلاتوکسین در اتردارای Running front صفر میباشد با گذاشتن مجدد صفحات مشکوك در تانك اتر وحرکت لکه‌ها مشخص‌میگردید که‌این لکه‌هامربوط به افلاتوکسین نمی‌باشند .

با توجه به پوست سبز خارجی پسته که اشکالاتی درامر تصفیه وهم‌چنین تین‌لایرکرو ماتوگرافی تولید مینمود روشهای مختلفی جهت تصفیه مورد بررسی قرار گرفت‌نظیر استفاده از استات سرب وهم‌چنین کربنات مس وبالاخره کولن کروماتوگرافی که‌باتوجه‌به‌مواردزیر روش کولن کروماتوگرافی باانتخاب سیلیکاژل بقطر ۰٫۰۶۳ ـ ۰٫۲۰۰ میلی‌متر بجای سیلیکاژل بقطر ۰٫۰۵ـ۰٫۲ میلی‌متر روش بهتری تشخیص داده‌شده ومورد استفاده قرار گرفت .

الف ـ در تصفیه بوسیله کربنات‌مس بعلت باقی‌ماندن چربی وهم‌چنین‌رنگهای‌مزاحم مقایسه لکه‌های فلئورسانس نمونه واستاندارد بهنگام تین لایرکروماتوگرافی‌امکان‌پذیرنبوده است .

ب ـ در تصفیه بوسیله استات سرب می‌توان لکه‌های‌فلئورسانس‌نمونه‌رابا استانداردمقایسه نمود ولی وجود مواد مزاحم مقایسه رادشوار و امکان اشتباه را زیاد می‌نماید .

در روش کولن کروماتوگرافی نیز بررسی های کیفی وکمی درمورد محتویات کولن وحلالهای شستشو بعمل‌آمد تا محلول حاصله حتی‌المقدورعاری از مواد مزاحم بخصوص کلروفیل باشدلذا موادی نظیر شاربن اکتیو وفلوریزیل جهت رنك زدائی و گرفتن مواد مزاحم بکار برده شد ولی نتیجه مطلوب حاصل نگردید زیرا مشاهده شد علاوه براشکالاتی که‌در امر تصفیه بوجود میاید مقداری افلاتوکسین نیز جذب موادمذکور میگردد.

باتوجه به آزمایشهای انجام شده نتایج زیر حاصل گردیده است:

۱ ـ درنمونه‌های سال ۱۳۵٤ (۱۲۱ نمونه) افلاتوکسین‌های B_1+B_2 و G_1+G_2 مشاهده نگردید .

۲ ـ در نمونه‌های‌سال ۱۳۵۵ (۱۰۸نمونه) نتیجه به شرح زیر بوده است:

الف ـ نمونه‌ای تحت شماره ۲۱ که‌در تاریخ ۱۳۵۵٫۶٫۳۰ ازمنطقه کبوترخان‌نمونه برداری شده بود دارای ppb ۸۰ ونمونه دیگری تحت شماره ۵۳ که‌در تاریخ ۱۳۵۵٫۸٫۱۰ از باغ محوطه آزمایشگاه نمونه‌برداری گردید دارای ppb ۲۰۰ افلاتوکسین B_1+B_2 بوده‌اند .

ب ـ نمونه‌های تحت شماره ۶۰و۶۲ هریك دارای ppb ۲۰۰ونمونه‌تحت‌شماره۶۳ دارای ppb ۵۰ افلاتوکسین B_1+B_2 بوده است این نمونه‌ها مربوطبه کارگاههای متفرقه آماده کننده پسته در منطقه رفسنجان میباشند .

ج ــ درمنطقه محمدآباد نوق که با دیکوفول سمپاشی شده بودنمونه‌ای‌تحت شماره۱۶دارای ۲۰۰ ppb و نمونه‌دیگری تحت شماره ۱۰ دارای ۷۰ ppb افلاتوکسین B_1+B_2 بوده است.

در منطقه سعیدآباد رفسنجان که‌آن نیز با دیکوفول سمپاشی شده بود نمونه‌های تحت شماره ۱۲،۱۰،٤، ۱۵ و ۱۸ بترتیب۲۰۰ ، ۲۰۰ ،۸۰، ۱٤۰و ۳۳۳ ppb افلاتوکسین B_1+B_2 داشته‌اند .

ضمنا یادآور میشود که در کلیه نمونه‌های سال ۱۳۵۵ (۱۰۸ نمونه) افلاتوکسین G_1+G_2 مشاهده نگردیده است.