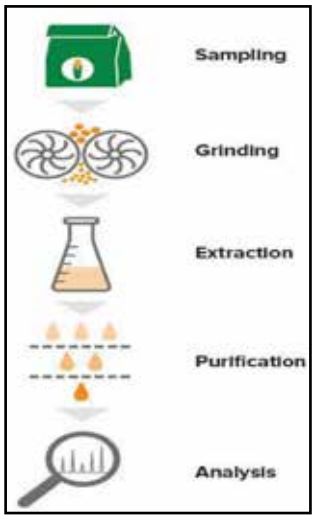
گردآوری و تدوین:
مهندس علی مرادی- شرکت پاسارگاد آزمای جهان

روش های آزمایشگاهی
آنالیز و شناسایی مایکوتوکسین ها – بخش دوم

بخش نخست که در شماره ۱۸۸ به آن پرداختیم، اختصاص به انواع مایکوتوکسین ها و مقادیر مجاز و خصوصیات بیماری زایی داشت. در این بخش به فرآیند تشخیص و شناسایی مایکوتوکسین ها از مرحله نمونه برداری و آماده سازی تا آنالیز و تشخیص توسط انواع متدهای آزمایشگاهی متنوع می پردازیم.

نخست باید درنظرداشت که پس از نمونه برداری، فرآیند آماده سازی نمونه Sample preparation قبل از انجام هریک از متدهای آنالیز و شناسایی سموم، از پیش نیازهای ضروری بوده که به اختصار شامل مراحل زیر است:

۱-Sampling(نمونه برداری)
۲-Grinding(آسیاب)
۳-Extraction(جذب آنالیت هدف، ماکوتوکسین ها)
٤-Purification(تخلیص)



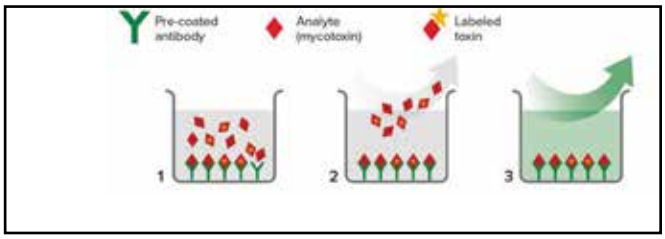
پس از انجام کامل مراحل فوق، نمونه آماده بررسی با روش های مختلف آزمایشگاهی است. در این باره دو روش کیفی Qualitative و کمی یا Quantitative وجود دارد که به اختصار به شرح زیر است:

۱-روش های کیفی Qualitative

خود شامل متدهای سریع از جمله ELISA,FLOUROMETERY است که بطور خلاصه منفی یا مثبت بودن وجود سموم را در نمونه نشان می دهند که به اختصار به آنها اشاره می شود.

ELISA-A

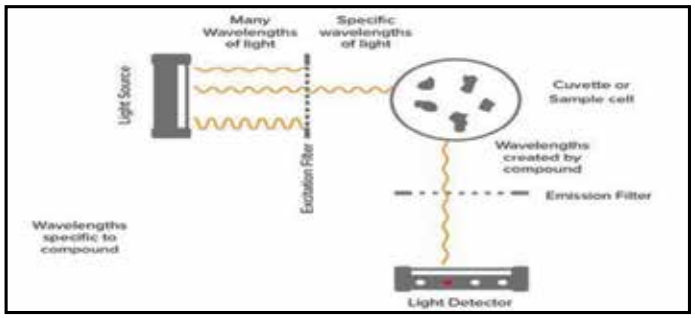
در این روش با تگ کردن آنتی بادی های اختصاصی مایکوتوسین ها درون چاهک های میکروپلیت و سپس اضافه نمودن نمونه حاوی مایکوتوکسین ها اصطلاحا آنها را توسط ایجاد کمپکس آنتی بادی-آنتی ژن گیرانداخته یا اصطلاحا Immobilize کرده و سپس با افزودن مقادیر مشخصی از مایکوتوکسین های نشاندار شده(Labeled)، آنها را در معرض رقابت جهت باند شدن به آنتی بادی های اختصاصی تگ شده در میکروپلیت ها قرار می دهند و پس از اضافه نمودن سوبسترای رنگی-فلورسانسی درصورت فراوانی سم در نمونه، اکثریت آنتی ژن(مایکوتوکسین)های نشاندار بعلت اشباع میکروپلیت ها با آفلاتوکسین های نمونه و عدم توانایی در چسبیدن به آنتی بادی های اختصاصی نتیجا تا شسته و فقط کمپکس آنتی بادی-آنتی ژن(مایکوتوکسین نمونه) داخل چاهک های پلیت باقی می ماند و سپس بکمک الایزاریدر، طی فرایند کالیریمتری و به کمک تغییرات میزان طیف رنگی بوجود آمده از پر رنگ به کم رنگ، وجود سم یا عدم آن در نمونه مشخص می شود. البته قابل ذکر است که از متد الایزا بعضا جهت اندازه گیری مقادیر سموم Quantitative هم استفاده می شود که روش دقیق و قابل استنادی بدلیل امکان واکنش های متقاطع Cross-Reaction نیست.



مزایا	معایب
۱-آسان بودن	۱-واکنش متقاطع با سایر ناخالصی ها و سموم
۲-سریع بودن	۲-کاربرد فقط جهت مواد خام
۳-حساسیت نسبی	۳-تداخل عملکرد کمپلکس های آنتی بادی-آنتی ژن

Fluorometry–B

در این متد بسیار ساده و سریع با استفاده از تاباندن یک رشته نور با طول موج مشخص Ultra violet single beam باعث تحریک Excitation مولکول های سم مورد نظر به مدار بالاتر انرژی می شوند که این مولکول ها به نوبه خود پس از نزول به سطح پایین تر با تخلیه انرژی خود، پرتوهایی را به صورت اشعه فلورسانس ازخود ساطع Emission نموده که توسط دتکتورهای مخصوصی دراین طول موج مشخص اندازه گیری شده و نشاندهنده وجود یا عدم وجود آفلاتوکسین در نمونه است.



مزایا	معایب
۱-سرعت عمل بالا حدود ۵-۳دقیقه	۱-عملکرد محدود(فقط آفلاتوکسین)
۲-عدم نیاز به پرسنل آموزش دیده یا حرفه ای	۲-واکنش متقاطع
۳-عدم نیاز به آزمایشگاه و تجهیزات پیچیده	
۴-قابلیت انجام در محل نمونه برداری(سیلو، زمین زراعی و ...)	

۲-روش های کمی Quantitative

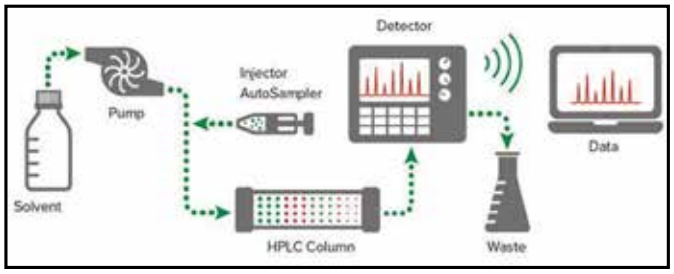
HPLC– A

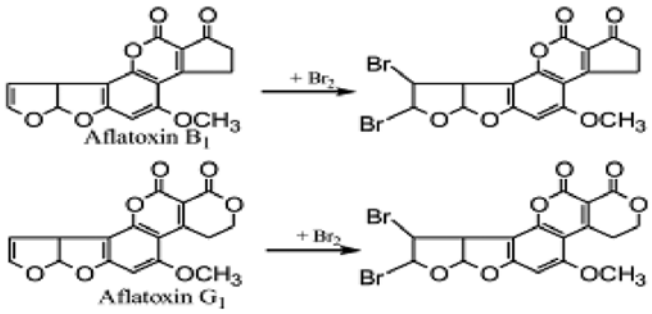
اساس کار در این متد که در کتب مرجع تحت عنوان Gold Standard شناخته می شود، بدین نحو است که هریک از سموم مایکوتوکسین براساس میزان واکنشی Interaction که با ماده جاذبAdsorbent پک شده داخل ستون کروماتوگرافی که عمدتا از نوع C18,Octadecyl که بنام فاز ساکن (Stationary Phase) شناخته می شود در فاز معکوسRP(Reverse Phase) با سرعت های مختلفی از داخل ستون توسط فاز متحرک(Mobile Phase)که عمدتا متشکل از درصد ترکیب مشخصی از حلال های آلی و آبی مانند آب,متانول و استونیتریل به ترتیب به نسبت ٪۶۰/٪۳۰/٪۱۰ است با شویش گرادیانی شسته شده و از ستون خارج می شوند و سپس توسط انواع دتکتورهای رایج ازجمله UV–Visible, Fluorescence و یا Mass در محدوده طول موج های مشخصی تفکیک و شناسایی می شوند.

ذکر این نکته نیز ضروریست که مطابق با بندهای ۲و۳ آماده سازی نمونه که در پیشگفتار به آن اشاره شد، مایکوتوکسین های موجود در نمونه های مشکوک حتما میبایستی با ستون های مخصوصی بنام Immunoaffinity Columns از انواع ناخالصی ها جداسازی و تخلیص شوند تا نمونه تهی از وجود هرگونه سموم یا مواد زاید مداخله گر شود.

روش کار Principle این ستون ها نیز بدین شکل است که مقدار مشخصی از آنتی بادی های اختصاصی هر سم مشخص (اعم از آفلاتوکسین،اکراتوکین، زیرالنون، داکسی نیوالنون، M1) را به داخل سطوحی از ژل که قبلا داخل لوله آزمایش فیکس شده است را باند می کنند که پس از اضافه شدن نمونه حاوی سم با آنها واکنش داده و تشکیل کمپلکس Ag–Ab را داده که داخل ستون می ماند و در مراحل بعدی، پس از شستشوی ستونWashing با محلول مخصوص، ابتدا ناخالصی ها از ستون شسته می شود و درنهایت با انجام Elution با حلال آلی قوی کمپلکس Ag–Ab شکسته شده و آنتی ژن تخلیص شده که همان سم خالص آفلاتوکسین میباشد از ستون خارج و آماده تزریق به دستگاه HPLC است.

شایان ذکر است که بعلت عدم وجود خاصیت UV–Activity فقط در آفلاتوکسین های موسوم به Afla Total B1,B2,G1,G2، استفاده از متد PCDR (Post Column Derivatization) بکمک دستگاهی بنام مشتق ساز که با نام تجاری COBRA CELL شناخته می شود ضروری است. مکانیسم عملکرد این دستگاه مشتق ساز نیز بدین نحو است که سم آفلاتوکسین توتال پس از انجام مراحل تخلیص که پیشتر شرح آن آمد و متعاقبا جداسازی از ستون کروماتوگرافی خارج شده به داخل دستگاه مشتق ساز یا همان کبراسل وارد شده و طی فرایند شیمیایی نسبتا پیچیده ای با پتاسیم برماید KBr اصلاحا تگ گردیده تا خاصیت نوری فلورسانس





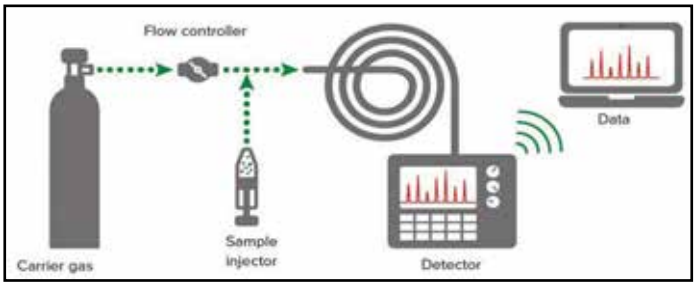
مزایا	معایب
۱-حساسیت بالا	۱-زمان آنالیز نسبتا طولانی و احتمال وجود خطا
۲-نیاز به مقادیر بسیار کم نمونه	۲-گران بودن تجهیزات مورد نیاز
۳-اختصاصیت بالا(تداخل کمتر)	۳-نیاز به نیروی متخصص

مزایا	معایب
۱-حساسیت بالا	۱-زمان آنالیز نسبتا طولانی
۲-نیاز به مقادیر بسیار کم نمونه	۲-گران بودن تجهیزات مورد نیاز
۳-قابلیت استفاده جهت آنالیز تمامی مایکوتوکسینها	۳-نیاز به نیروی متخصص و ماهر
۴-تکرار پذیری و دقت بالا	۴-نیاز به آزمایشگاه مجهز
۵-مورد تایید مراجع بین المللی بلحاظ فنی و قانونی	۵-قابلیت آنالیز فقط جهت سموم دارای جذب نوری

UV–Activity پیدا کرده و قابلیت اندازه‌گیری شدن توسط دتکتور فلورسانس را به‌کمک فرایند Excitation و Emission در طول موج مشخص داشته باشد.

GC– B

گاز کروموتوگرافی روش کمتر کاربردی نسبت به سایر متدهای رایج است. علتش هم کارکرد در دماهای بالا که خود موجب تغییر ماهیت نمونه های حساس می شود. بدین روی روش کمترتوصیه شده‌ای جهت آنالیز مایکوتوکسین ها است. اساس کار این متد نیز مانند کروماتوگرافی مایع است بدین نحو که نمونه فرآوری شده حاوی سم یا سموم مایکوتوکسین این بار توسط فاز متحرک گازی که عمدتا گاز هلیوم یا نیتروژن است از داخل ستونهای کاپیلاری(مویینه) ویژه ای که در محفظه Oven با دمای کنترل شده قرار داده شده به دمای مشخصی رسیده عبور داده میشود و بر مبنای تفاوت در قابلیت عبور از فاز ساکن پک شده داخل ستون شسته و خارج می‌شوند و سپس توسط دتکتورهای ویژه FID و ECD شناسایی می شوند.

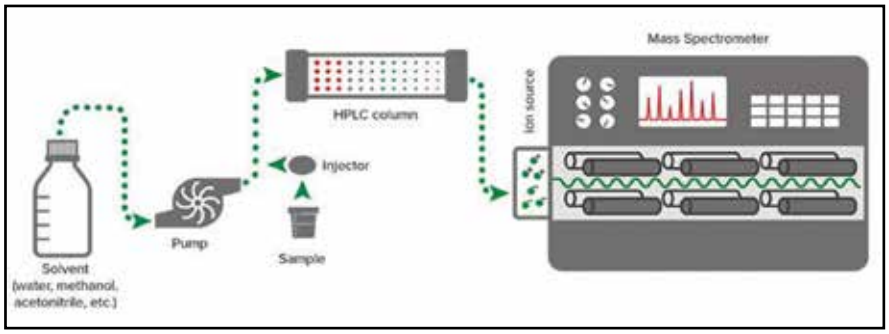


LC/MS/MS– C

اساس این روش که جزو حساسترین و دقیق‌ترین روش های آنالیز سموم مایکوتوکسین است، برپایه استفاده همزمان از تکنیک جداسازی دقیق فیزیکو شیمیایی توسطHPLC و تکنیک بی بدیل جداسازی فیزیکی ساختار مولکولی با روش Spectrometry Mass یا طیف‌سنجی است که موجب حد اعلای دقت و صحت نتایج بدست آمده است.

در این روش نمونه های آلوده به انواع مایکوتوکسین تنها با یک مرحله ساده آماده سازی نمونه که پیشتر به آن اشاره شد همزمان به دستگاه HPLC تزریق شده و پس از عبور از ستون‌های مخصوص Narrow bore/Micro bore که دارای قطر ذرات Particle size ≤۲.۵ µm اند جداسازی و تفکیک اولیه انجام می شوند و بطور همزمان به دستگاه طیف سنج Mass Spectrophotometer منتقل شده که در این دستگاه توسط پروب های پیشرفته ESI , APCI و دستگاه نبولایزر در محفظه خلا نسبت جرم مولکولی به بار الکتریکی Mass To Charge Ratio(m/z) را در ۲ مرحله Fragmentation متوالی اندازه‌گیری نموده و از آنجایی که این نسبت برای هر عنصری به‌لحاظ ساختاری کاملا اختصاصی است بنابراین نوع سموم آنالیز شده چه به لحاظ ماهیتی Qualitative و هم از نظر مقداری Quantitative بدون امکان بروز حتی کمترین میزان خطا Cross Reaction و یا تداخلی Interference قابل آنالیز و شناسایی است.

در پایان نیاز به یادآوری است که روش های آزمون مایکوتوکسین ها تنها به روش های گفته شده در این نوشتار مخدود نمی شود و هر روز شاهد روش های تازه ای هستیم، ازجمله RIA,LFT,HPTLC,PCR و غیر و که البته بیشتر جنبه تحقیقاتی دارند تا تشخیصی.



Disadvantages-معایب	Advantages - مزایا
۱-پیچیدگی عملکردی و ساختاری	۱-حساسیت بسیار بالا
۲-گرانقیمت بودن تجهیزات مورد نیاز	۲-نتایج دقیق کمی و کیفی
۳-نیاز به نیروی متخصص و ماهر	۳-سرعت عمل بالا(حداقل میزان آماده سازی نمونه)
	۴-قابلیت آنالیز همزمان همه انواع مایکوتوکسین ها
	۵- قابلیت آنالیز ترکیبات پیچیده
	۶- اختصاصیت بسیار بالا(کمترین تداخل)

منابع:

1. E uropean Food Safety Authority (EFSA), 2 012, http://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/mycotoxins.htm.
2. .P. Li, Z. Zhang, X. Hu, and Q. Zhang, "Adv anced hyphenated chromatographic-mass spectrometry in mycotoxin determination: Current stat us and prospects," Mass Spectrometry Reviews, vol. 32, no. 6, pp. 420–452, 2013.View at: Publisher Site | Scholar
3. J. O'Mahony, L. Clarkea, M. Whelan et al., "The use of ultra-high pressure liquid chromatography with tandem mass spectrometric detection in the analysis of agrochemical residues and mycotoxins in food—challenges and applications," Journal of Chromatography A, vol. 1292, pp. 83–95, 2013.View at: Publisher Site |
4. J. P. Meneely, F. Ricci, H. P. van Egmond, and C. T. Elliott, "Current methods of analysis for the determination of trichothecene mycotoxins in food," TrAC—Trends in Analytical Chemistry, vol. 30, no. 2, pp. 192–203, 2011. View at: Publisher Site | Google Scholar
5. https://www.fda.gov/animal-veterinary/biological-chemical-and-physical-contaminants-animal-food/chemical-hazards#Mycotoxins
6. http://www.inspection.gc.ca/animals/feeds/regulatory-guidance/rg8/eng/1347383943203/1347384015909?chap=1
7. F A O corporate documents repository. Worldwide regulation for mycotoxins in food and feed 2003.

آگهی استخدام

شرکت پاسارگاد آزمای جهان از افراد با سابقه مفید در زمینه فروش تجهزات آزمایشگاهی و تحقیقاتی در صنایع دارویی، غذایی و کلینیکال دعوت به همکاری می نماید. علاقمندان می توانند رزومه کاری خود را جهت بررسی و تعیین وقت مصاحبه به آدرس ایمیل زیر ارسال نمایند:

info@pasargodwl.com