فصل چهارم

آفلاتوکسین

۱- تاریخچه

زمان دقیق شناسایی آفلاتوکسینها مشخص نشده است، اما بطور یقین، زمان آن به قبل از سال ۱۹۶۰ مربوط می‌شود. به‌دنبال مسمومیت اتفاقی در بسیاری از گونه‌های حیوانی و در نتیجه مطالعات در این زمینه، بشر برای اولین‌بار به وجود آنها پی برد. در واقع با پی‌بردن به‌ارزش غذایی دانه‌های روغنی، برای تغذیه دام و انتقال این مواد از مناطق معتدله و اضافه کردن آنها به‌جیره غذایی حیوان، این مسمومیتها بوقوع پیوست.

در سال ۱۹۶۰ در فاصله چند ماه متجاوز از ۱۰۰/۰۰۰ بوقلمون در مزارع ماکیان جنوب و شرق انگلستان در اثر ابتلا به عارضه‌ای نامعلوم از بین رفتند.مطالعات بعدی نشان داد که این مشکل تنها به بوقلمون‌ها محدود نمی‌شود، بلکه جوجه اردکها و جوجه قرقاولها هم تحت تأثیر این بیماری قرار گرفتند و حساسیت بسیار نشان دادند. مقارن همین زمان بود که گزارشهایی از کنیا و اوگاندا رسید که حکایت از مشکلی مشابه، برای جوجه اردکها داشت. درهمین ایام نیز در امریکا شیوع یک ناراحتی کبدی در ماهی قزل‌آلا گزارش گردید (۳۱، ۲۸، ۴ و ۵).

بلافاصله پس از این حوادث آزمایشگاههای متعددی در امریکا وانگلستان بسیج شدند، تا این عارضه را پی‌گیری کرده وعلت اصلی آنرا مشخص کنند. گروههایی از متخصصین داسپزشکی، میکروبیولوژی، تغذیه، شیمی‌آلی و معدنی با بکارگرفتن تکنیک‌های مدرن و پیشرفته درعلوم مربوط، فعالیتهای تحقیقاتی را آغاز کردند.

علائم این عارضه در پرندگان عبارت بود از: بی‌اشتهایی، خواب‌آلودگی، ضعیف شدن بالها، انحنای گردن و در نهایت مرگ حیوان که در فاصله زمانی ۳ الی ۴ هفته اتفاق می‌افتاد.

آزمایشهای کالبد شکافی، از خونریزی، نکروزه[1] شدن کبد و تورم کلیوی حکایت می‌کرد. بررسیهای نسجی نشان داد که در سلولهای پارانشیم کبد، آتروفی[2] و در سلولهای اپی‌تلیوم لوله صفراوی، بشدت هایپرپلازی[3] ایجاد شده است (۳۱، ۲۸، ۵ و ۴).

نه تنها حیوانات فوق، بلکه خوک، گوسفند و گوساله نیز تحت تأثیر این بیماری قرار می‌گرفتند.

علائم این بیماری مشابه مسمومیت با گیاهانی نظیر senecio می‌باشد. سمیت این گیاهان ناشی از وجود آلکالوئیدهای پیرولیزیدین[4] است.

در مطالعات گسترده دانشمندان دریافتند که علت این مرگ و میر، هیچ عامل ویروسی، باکتریایی و یا میکروارگانیسم نوظهوری نمی‌باشد. سرانجام محققین وجود ترکیبات سمی، در ماده غذایی مصرف شده توسط حیوانات را عنوان کردند.

بررسیهایی که در سال ۱۹۶۰ انجام گرفت، نشانگر این واقعیت بود که ماده سمی می‌بایست، منشأ قارچی داشته باشد. سپس قارچ را از مواد غذایی آلوده جدا نمودند. پس از کشت آن در محیط غذایی مناسب و کروماتوگرافی به کمک صفحات نازک، لایه متابولیتهای حاصل از قارچ، فلورسانس آبی و سبز در مقابل اشعه ماورای بنفش از خود ساطع می‌کنند. قارچ جدا شده آسپرژیلوس فلاووس[5] نام داشت و توکسین آن هم به عنوان آفلاتوکسین (Aspergillus flavus toxin)، نامیده شد (۴۶، ۳۱، ۲۸، ۵ و ۴).

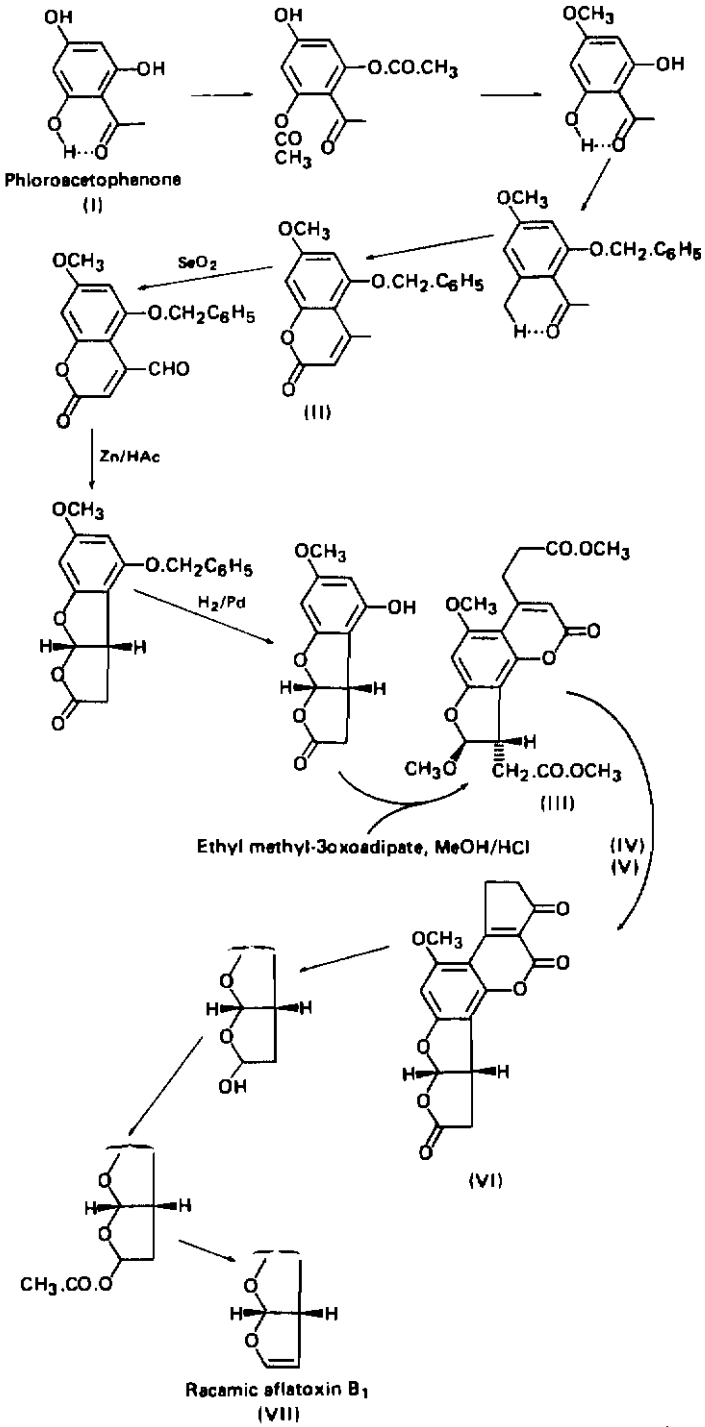
درمیان مایکوتوکسینها، آفلاتوکسینها مهمترین آنهاهستند و بیماریهای ناشی‌از تغذیه مواد آلوده به آفلاتوکسین، خطرات قابل ملاحظه‌ای را برای انسان، دام و طیور به همراه دارد.

آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس[6] دوگونه مهم تولید کننده آفلاتوکسین، در بین گونه‌های مختلف آسپرژیلوسها هستند. این دو قارچ بعنوان یک عامل مولد فساد در فرآورده‌های انباری به حساب می‌آیند.

خصوصیات فیزیکو شیمیایی و مراحل بیوسنتز بعضی از آفلاتوکسینها و متابولیتهای آنها در جدول ۴-۱ و شکل ۴-۱ خلاصه شده است (۴۹، ۴۱ و ۱۱).

---

1. Necrosis
2. Atrophy
3. Hyperplasia
4. Pyrrolizidine alkaloids
5. Aspergilus flavus
6. Aspergillus parasiticus



شکل ۴-۱- مراحل بیوسنتز آفلاتوکسینها (۴۹، ۴۱ و ۱۱)

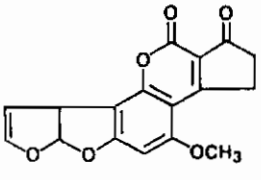
جدول ۴-۱. خصوصیات فیزیکو شیمیایی آفلاتوکسینها و متابولیتهای آنها

آفلاتوکسین	فرمول مولکولی	وزن مولکولی	نقطه ذوب °C	جذب UV ۲۶۵nm	جذب UV ۳۶۰-۳۶۲nm	نشر فلئورسنس nm
B_1	$C_{17}H_{12}O_6$	۳۱۲	۲۶۸-۲۶۹	۱۲۴۰۰	۲۱۸۰۰	۴۲۵
B_2	$C_{17}H_{14}O_6$	۳۱۴	۲۸۶-۲۸۹	۱۲۱۰۰	۲۴۰۰۰	۴۲۵
G_1	$C_{17}H_{12}O_7$	۳۲۸	۲۴۴-۲۴۶	۹۶۰۰	۱۷۷۰۰	۴۵۰
G_2	$C_{17}H_{14}O_7$	۳۳۰	۲۳۷-۲۴۰	۸۲۰۰	۱۷۱۰۰	۴۵۰
M_1	$C_{17}H_{12}O_7$	۳۲۸	۲۹۹	۱۴۱۵۰	(۳۵۷nm)۲۱۲۵۰	۴۲۵
M_2	$C_{17}H_{14}O_7$	۳۳۰	۲۹۳	(۲۶۴nm)۱۲۱۰۰	(۳۵۷nm)۲۲۹۰۰	-
P_1	$C_{16}H_{15}O_6$	۲۹۸	>۳۲۰	(۲۶۷nm)۱۱۲۰۰	(۲۶۲nm)۱۵۴۰۰	
Q_1	$C_{17}H_{12}O_7$	۳۲۸	-	(۲۶۷nm)۱۱۴۵۰	(۳۶۶nm)۱۷۵۰۰	-
آفلاتوکسیکول	$C_{17}H_{14}O_6$	۳۱۴	۲۳۰-۲۳۴	(۲۶۱nm)۱۰۸۰۰	(۳۲۵nm)۱۴۱۰۰	۴۲۵

۲- انواع آفلاتوکسین

۲-۱- آفلاتوکسین B_1

آفلاتوکسین B_1 با وزن ملکولی ۳۱۲ و با فرمول $C_{17}H_{12}O_2$ در مقابل نور ماورای بنفش، فلورسانس آبی نسبتاً قوی از خود نشان می‌دهد. این آفلاتوکسین به شکل بلورهای کریستالی بی‌رنگی است و در حرارت ۲۶۹-۲۶۸ درجه سانتی‌گراد که نقطه ذوب آن است، تجزیه می‌شود. لازم به تذکر است که اخیراً فرم راسمیک آفلاتوکسین B_1 نیز سنتز شده است.



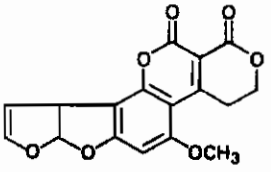
شکل ۴-۲- ساختمان شیمیایی آفلاتوکسین B_1

۲-۲- آفلاتوکسین G_1

آفلاتوکسین G_1 با وزن ملکولی ۳۲۸ و با فرمول $C_{17}H_{12}O_7$ که در برابر اشعه ماورای‌بنفش ساطع کننده نور فلورسانس سبز است.

شواهد اخیر نشان می‌دهد که فلورسانس سبز آفلاتوکسین G_1 احتمالاً بدلیل ناخالصی زردرنگی است که می‌توان آن را جدا نمود. در واقع آفلاتوکسین خالص G_1 فلورسانس آبی از خود نشان می‌دهد.

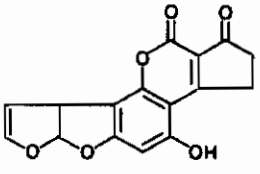
نقطه ذوب این آفلاتوکسین ۲۴۶-۲۴۴ درجه سانتی‌گراد می‌باشد (۴۲، ۱۶، ۳۲ و ۱۲).



شکل ۴-۳. ساختمان شیمیایی آفلاتوکسین G_1

۲-۳- آفلاتوکسین P_1

آفلاتوکسین P_1 متابولیتی است که در اثر دمتیلاسیون آفلاتوکسین B_1 ایجاد می‌شود. در ادرار حیواناتی چون میمون می‌توان آن را ردیابی کرد. این آفلاتوکسین از کشت آزمایشگاهی قارچ آسپرژیلوس استخراج شده است (۴۲، ۳۲، ۱۶، ۱۵ و ۱۲).



شکل ۴-۴. ساختمان شیمیایی آفلاتوکسین P_1

۲-۴- آفلاتوکسین B_2 و G_2

آفلاتوکسین B_2 با وزن ملکولی ۳۱۴ و با فرمول $C_{17}H_{14}O_6$ و آفلاتوکسین G_2 با وزن ملکولی ۳۳۰ و با فرمول $C_{17}H_{14}O_7$ می‌باشد.

این آفلاتوکسینها به ترتیب در مقابل نور ماورای بنفش، فلورسانس آبی و سبز از خود ساطع می‌کنند. نقطه ذوب آنها نیز به ترتیب ۲۸۹-۲۸۶ و ۲۴۰-۲۴۷ درجه سانتی‌گراد است. آفلاتوکسینهای B_2 و G_2 را از هیدروژناسیون دقیق آفلاتوکسینهای B_1 و G_1 می‌توان بدست آورد (۴۲، ۳۲ و ۱۲).

آفلاتوکسین G_2 آفلاتوکسین B_2

شکل ۴-۵. ساختمان شیمیایی آفلاتوکسین B_2 و G_2

۲-۵- آفلاتوکسینهای M_1 و M_2 و GM_1

اگر آفلاتوکسین B_1 به تنهایی یا همراه با آفلاتوکسینهای دیگر در خوراک دام بوسیله حیوانات خورده شود به توکسینهای دیگری در ترشحات و بافتهای آنها تبدیل می‌شود، که دوتا از این توکسینها که در شیر حیوانات مشخص گردیده است تحت عنوان توکسینهای شیر یا اصطلاحاً آفلاتوکسینهای M_1 و M_2 نامیده می‌شوند (M از کلمه Milk به معنای شیر منشاء گرفته است). آفلاتوکسینهای M_1 و M_2 از نظر ساختمانی به ترتیب مشتقات ۴ هیدروکسی آفلاتوکسین B1 و آفلاتوکسین B_2 هستند. خاصیت فلورسانس آفلاتوکسینهای M_1 و M_2 ۳ مرتبه بیشتر از آفلاتوکسین B_1 است و خاصیت سرطانزایی، جهش‌زایی و سمیت آن مشابه آفلاتوکسین B_1 است، این توکسین بعد از اینکه آفلاتوکسین B_1 بوسیله حیوان خورده شود یا مستقیماً به حیوان تزریق گردد در اوره، مدفوع، عضلات، کبد و کلیه قابل تشخیص و شناسایی است. فرمول مولکولی آفلاتوکسین M_1 یک اکسیژن بیشتر از آفلاتوکسین B_1 دارد (فرم هیدروکسی). آفلاتوکسین M_1 شباهت ساختمانی زیادی با آفلاتوکسین B_2 و G_2 دارد و محصول هیدروکسیله شده آفلاتوکسین G_1 به نام آفلاتوکسین GM_1 خوانده می‌شود و شباهت زیادی به آفلاتوکسین

M_1 دارد. ترکیب حاصل از هیدروکسیله شدن آفلاتوکسین G_2 را GM_2 می‌خوانند که از نظر ساختمانی شباهت زیادی به آفلاتوکسین M_2 دارد(۳۲). اپتیمم، درجه pH برای تبدیل آفلاتوکسین B_1 به M_1 درکبد موجودات زنده‌ایی نظیر موش، سنجاب، میمون، گاو، مرغ و انسان در سیستم آنزیمی NADPH حدود ۸/۹ است و همچنین Km واکنش آنزیمی حدود ۰/۱۲ میلی‌مول و سرعت ماکزیمم واکنش (V_{max}) ۰/۴۴ نانومول در هر میلی‌گرم از پروتئینهای میکروزمال به‌ازای هر دقیقه می‌باشد. البته کبد بعضی ازگونه‌های حیوانی از نظر آفلاتوکسین B_1 به M_1 ممکن است فعالتر باشند. مثلاً سرعت تبدیل در سنجاب و میمون به‌ترتیب ۱ و ۳ درصد است شرایط آزمایش و پارامترهایی نظیر pH و غلظت در سرعت تبدیل دخالت دارند. سمیت حاد آفلاتوکسین M_1 و تأثیر آن در ممانعت ازکد برداری RNA و سنتز پروتئینها درست باندازه آفلاتوکسین B_1 است ولی تأثیر آن بر DNA کمتر از آفلاتوکسین B_1 می‌باشد. قدرت سرطانزایی آفلاتوکسین M_1 $\frac{1}{10}$ قدرت سرطانزایی آفلاتوکسین B_1 است و قدرت جهش‌زایی آن $\frac{1}{30}$ جهش‌زایی آفلاتوکسین B_1 می‌باشد.

آفلاتوکسین M_1 درجه حرارت پاستوریزاسیون را تحمل می‌کند و بررسیهای انجام شده با شیرهایی که بطور طبیعی و مصنوعی با آفلاتوکسین M_1 آلوده شده بودند مقاومت آفلاتوکسین M_1 را ثابت کرده‌اند. آفلاتوکسین M_1 درجه حرارت ۶۴°C را بمدت ۲ ساعت تحمل کرده و حالت اولیه خود را حفظ می‌کند ولی افزایش درجه حرارت ثبات ساختمانی آنرا کاهش می‌دهد. فرآیندهای مختلف حرارتی که برای تهیه انواع فرآورده‌های لبنی بکار می‌روند، نمی‌توانند پایداری آفلاتوکسین M_1 راکاهش دهند و همچنین مشخص شده است که پایداری آفلاتوکسین M_1 در طی فرآیند حرارتی به نوع آلودگی محصول بستگی ندارد و در شیر با آلودگی طبیعی و مصنوعی مقاومت به حرارت یکسانی داشته است (۵۱، ۴۶، ۳۲ و ۲۶). امروزه به‌کمک جذب سطحی خاک بنتونیت توانسته‌اند آفلاتوکسین موجود در شیر را حذف نمایند. ۲درصد بنتونیت باعث شده تا آفلاتوکسین M_1 و M_2 تا حد ۸۹ درصد از محیط حذف شود و استفاده بیشتر از بنتونیت باعث شده تا آفلاتوکسین بیشتری کاهش یابد. البته بنتونیت روی محتوای پروتین شیر تأثیر گذاشته و ثابت شده است به ازای مصرف هر ۲ درصد بنتونیت ۵ درصد (یاکمتر) ازکل پروتئین شیرکاسته می‌شود. نتایج بررسیهای مختلف ثابت کرده است که می‌توان از بنتونیت بعنوان وسیله‌ای برای حذف آفلاتوکسین از شیرخام کمک گرفت. البته

مطالعات دقیقتری برای تعیین ایمنی و حفظ مواد مغذی و خواص شیر درصورت کاربرد این روش باید انجام گردد تا مسلم شود که به کیفیت شیر لطمه‌ای وارد نشده و کاملاً سم‌زدایی می‌شود، و نیز از آن می‌توان در ساخت انواع فرآورده‌های لبنی استفاده نمود. آفلاتوکسین M_1 در pH بین ۶/۵ - ۴/۵ بسیار پایدار است. آزمایشات مختلف در pH های متفاوت این نظر را اثبات کرده است، به نظر می‌رسد که محیط اسیدی برای تجزیه آفلاتوکسین M_1 قدرت نداشته باشد. غلظتهای بالای آمونیاک نیز قادر است آفلاتوکسین M_1 را حتی در سطوح خارجی تر پنیر که آلودگی به آفلاتوکسین M_1 را دارند تخریب کند. برای انجام اینکار لازم است که آمونیاک در زمان طولانی و در غلظتهای بالا با محصول اینکوباسیون شود. مشخص شده است که آفلاتوکسین M_1 موجود در شیر کامل خام می‌تواند بوسیله آب اکسیژنه به همراه ریبوفلاوین و لاکتوپراکسیداز غیرفعال گردد. عمل خنثی کردن آفلاتوکسین M_1 به کمک این مواد در درجه حرارت ۳۰ درجه سانتی‌گراد به‌مدت نیم ساعت صورت می‌گیرد و در طی آن اگر دما را تا ۶۳ درجه سانتی‌گراد افزایش دهند ۹۸ درصد کاهش آفلاتوکسین M_1 خواهیم داشت. این روش در صنایع لبنیات و تخمیر و تولید انواع محصولات لبنی نظیر پنیرسازی به دلیل مشکلات ایمنی و بیولوژیکی و تغییرات ویژگیهای تغذیه‌ای کاربرد ندارد (۵۱، ۳۲ و ۲۶). سولفیت پتاسیم سبب خنثی کردن آفلاتوکسین M_1 در شیر و فرآورده‌های شیری می‌شود. بیشترین درصد کاهش آفلاتوکسین یعنی ۴۵ درصد بوسیله‌سولفیت‌پتاسیم‌درغلظت ۵٪ مول‌ودردرجه‌حرارت ۲۵°C در زمان ۵ ساعت بوده است. بابکارگیری غلظتهای بیشتر میزان حذف آفلاتوکسین M_1 کاهش یافته‌است (۳۳، ۳۲ و ۱۲).

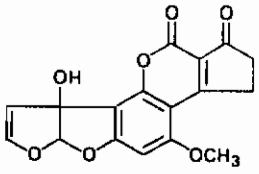
توسط کروماتوگرافی کاغذی اشباع شده بوسیله فرمالدئید-آب به نسبت ۱۵ : ۸۵ و سیستم حلال اتیل استات - بنزن به نسبت ۱ : ۹ دو آفلاتوکسین M_1 و M_2 شناسائی شده است که در آن M_1 فلورسانس آبی مایل به بنفش و R_f = ۰/۳۴ و M_2 فلورسانس بنفش و با R_f = ۰/۲۳ را نشان می‌دهد.

گزارش شده است که شدت فلورسانس آفلاتوکسینهای M_1 و M_2 سه بار قوی‌تر از شدتی بوده که از آفلاتوکسین B_1 انتظار می‌رود.

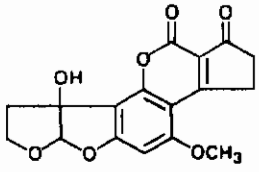
این توکسین در شرایط آزمایشگاهی نیز از آسپرژیلوس فلاووس جدا شده که نشان می‌دهد می‌توان در آزمایشگاه هم آن را تهیه و مورد مطالعه قرار داد.

این آفلاتوکسینها بصورت کریستالهای جامد بوده و آفلاتوکسین M_1 دارای نقطه ذوب ۲۹۹ درجه سانتی‌گراد و آفلاتوکسین M_2 دارای نقطه ذوب ۲۹۳ درجه سانتی‌گراد می‌باشد.

فرمول شیمیایی آفلاتوکسین M_1، $C_{17}H_{12}O_7$ بوده و در واقع ۴-هیدروکسی آفلاتوکسین B_1 است. طیف ماورای‌بنفش و مادون قرمز این دو توکسین نیز شبیه یکدیگر است. آفلاتوکسین M_2 مشابه دی‌هیدروآفلاتوکسین M_1 و در واقع ۴- هیدروکسی آفلاتوکسین B_2 است. به عبارتی از هیدروژنه شدن آفلاتوکسین M_1 حاصل می‌شود. فرمول شیمیایی آفلاتوکسین M_2، $C_{17}H_{14}O_7$ می‌باشد. گزارش شده است که سمیت آفلاتوکسین M_1 در واقع معادل آفلاتوکسین B_1 می‌باشد (۵۱، ۴۲، ۳۲ و ۱۲).



شکل ۴-۶. ساختمان شیمیایی آفلاتوکسین M_1



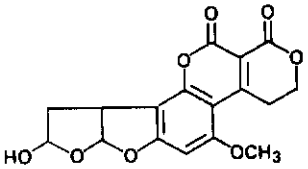
شکل ۴-۷. ساختمان شیمیایی آفلاتوکسین M_2

۲-۶- آفلاتوکسینهای B_2a و G_2a

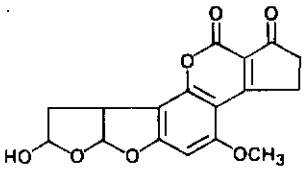
این دو آفلاتوکسین ترکیب هیدروکسی آفلاتوکسین و مشتق آفلاتوکسینهای B_2 و G_2 هستند. آفلاتوکسین B_2a ایزومر آفلاتوکسین M_2 با گروه هیدروکسیل در موقعیت ۲ مولکول است و آفلاتوکسین G_2a در واقع ۲- هیدروکسی آفلاتوکسین G_2 است.

در سال ۱۹۶۶ این دو مشتق در شرایط آزمایشگاهی از کشت آسپرژیلوس فلاووس جدا

شدند. همچنین با افزودن کاتالیزورهای اسیدی به سوسپانسیون آفلاتوکسین B_1 نیز می‌توان آنها را بدست آورد(۴۲، ۳۲ و ۱۲).



آفلاتوکسین G_2a

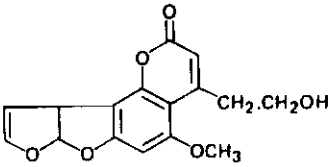


آفلاتوکسین B_2a

شکل ۴-۸. ساختمان شیمیایی آفلاتوکسین B_2a و G_2a

۲-۷- آفلاتوکسین B_3

همان آفلاتوکسین B_1 است که در حلقه سیکلوپنتان آن اتانول جایگزین شده است و بنابراین در واقع ۶- متوکسی، ۷- دی‌فوروکومارین است. شکل زیر ساختمان شیمیایی آفلاتوکسین B_3 را مشخص کرده است (۴۲، ۳۲ و ۱۲).



شکل ۴-۹. ساختمان شیمیایی آفلاتوکسین B_3

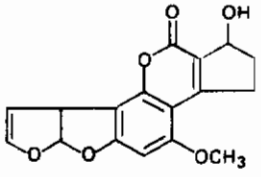
آفلاتوکسین B_3 را، پارازیتیکول[1] هم می‌نامند، و برای جوجه اردک بشدت سمی است ولی برای جنین مرغ سمیت کمتری نسبت به آفلاتوکسین B_1 دارد.

---

1. Parasiticol

۲-۸- آفلاتوکسین R_o یا آفلاتوکسین L یا آفلاتوکسیکول[1]

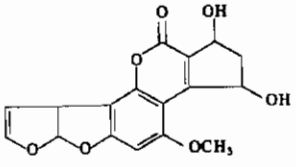
چنانچه بجای بخش کتونی سیکلوپنتان در آفلاتوکسین B_1، گروه هیدروکسیل قرار بگیرد، آفلاتوکسین حاصل را، آفلاتوکسین R_o گویند. این توکسین، تغییرات عمده‌ای را در پلاسمای موش صحرایی موجب می‌شود و خاصیت سرطانزایی دارد. این واکنش از تبدیل آفلاتوکسین R_o به آفلاتوکسین B_1 (هیدروژناسیون آفلاتوکسین R_o) صورت می‌گیرد. شکل زیر ساختمان شیمیایی آفلاتوکسین R_o یا L را نشان می‌دهد (۳۲ و ۱۲).



شکل ۴-۱۰. ساختمان شیمیایی آفلاتوکسین R_o

۲-۹- آفلاتوکسین LH_1

آفلاتوکسین LH_1 مشتق دی‌هیدروکسیله آفلاتوکسین B_1 است. شکل زیر ساختمان شیمیایی آفلاتوکسین LH_1 را نشان می‌دهد.



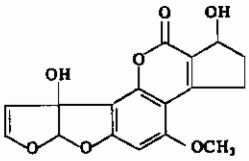
شکل ۴-۱۱. ساختمان شیمیایی آفلاتوکسین LH_1

۲-۱۰- آفلاتوکسین LM_1

ترکیبی است که از احیای آفلاتوکسین M_1 بدست می‌آید. همچنین بوسیله اکسیداسیون آفلاتوکسین R_o یا آفلاتوکسیکول نیز حاصل می‌شود (۵۱، ۴۲، ۳۲ و ۱۲).

---

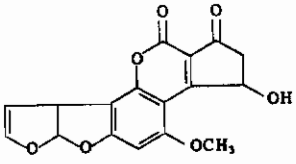
1. Aflatoxicol



شکل ۴-۱۲. ساختمان شیمیایی آفلاتوکسین LM_1

۲-۱۱- آفلاتوکسین Q_1

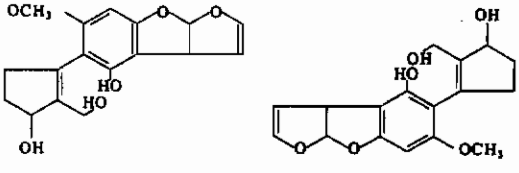
مشتق مونوهیدروکسیله آفلاتوکسین B_1 است که گروه هیدروکسیل روی اتم کربن β کربنیل حلقه سیکلوپنتان واقع شده است و بررسیهای آزمایشگاهی[1] سمیت آن را در موش صحرایی، گاو و موش به اثبات رسانیده است.



شکل ۴-۱۳. ساختمان شیمیایی آفلاتوکسین Q_1

۲-۱۲- آفلاتوکسین RB_1 و RB_2

آفلاتوکسینهای B_1 و B_2 احیا شده را، $AFRB_1$ و $AFRB_2$ می‌گویند.



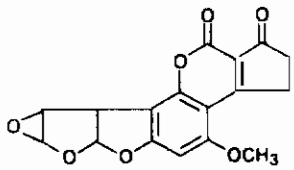
آفلاتوکسین RB_2 آفلاتوکسین RB_1

شکل ۴-۱۴ ساختمان شیمیایی آفلاتوکسینهای RB_1 و RB_2

1. invitro

۲-۱۳- آفلاتوکسین B_1 - 2 , 3 - oxide

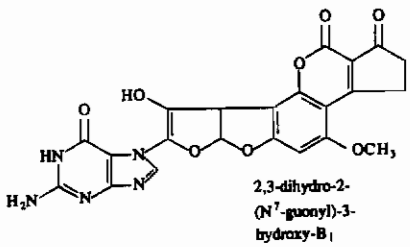
آفلاتوکسین B_1 - 2, 3 - oxide یا آفلاتوکسین B_1 - 8 , 9 - oxide یکی از ترکیبات حد واسط و متابولیسم آفلاتوکسین B_1 است و در واقع امروزه بر این اعتقاد هستند که این آفلاتوکسین شکل فعال یا ماده سرطانزایی نهایی حاصل از آفلاتوکسین B_1 است. قابلیت پیوند کوالانسی -اپوکسیدی که این ترکیب با ماکرو ملکول‌هایی نظیر DNA، RNA و پروتئینها انجام می‌دهد علت اصلی سمیت و سرطانزایی آفلاتوکسین B_1 شناخته شده‌است.



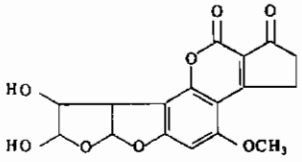
شکل ۴-۱۵ ساختمان شیمیایی آفلاتوکسین B_1 - 2, 3 - oxide

۲-۱۴- آفلاتوکسین o-alkyl

این آفلاتوکسینها ناشی از متوکسیله کردن آفلاتوکسینها می‌باشند. ساختمان برخی از مشتقات o-olkyl آفلاتوکسینها در شکلهای زیر مشخص گردیده است. علاوه بر مواد فوق‌الذکر، سایر مشتقات و متابولیتهای دیگری از آفلاتوکسینها خالص شده‌اند که ساختمان شیمیایی آنها در اشکال زیر مشخص گردیده است.



شکل ۴-۱۶ ساختمان شیمیایی مشتقات آفلاتوکسین



شکل ۴-۱۷ ساختمان شیمیایی آفلاتوکسین B_1 - دی‌هیدرودیول[1]

۳- روشهای حذف و غیرفعال کردن آفلاتوکسینها

۳-۱- روش فیزیکی

۳-۱-۱- درجه حرارت

حساسیت آفلاتوکسینها، در برابر حرارت تابع شرایط محیطی است. برای مثال وجود رطوبت در مواد غذایی باعث افزایش درصد تجزیه و از بین رفتن آفلاتوکسینها در برابر حرارت می‌شود و این کار تحت تأثیر هیدرولیز حلقه لاکتونی در غلظتهای مؤثر رطوبت و درجه‌حرارت انجام می‌گیرد. یا اینکه حضور رطوبت در محیط سبب تحریک واکنشهای شیمیایی در موقعیتهای مختلف بعضی مایکوتوکسینها شده و در نتیجه سمیت آنها را تغییر می‌دهد. یا حضور پروتئینها و سایر ترکیبات غذایی در محیط باعث حفظ و ثبات آفلاتوکسینها در مواد غذایی حرارت دیده می‌شوند که اینکار ناشی از کاهش نفوذ حرارت و تثبیت توکسین بوسیله اتصال با پروتئینها و سایر اجزای تشکیل دهنده نمونه غذایی است (۴۳، ۴۲، ۳۳ و ۳۲).

در شرایطی که مایکوتوکسین خالص است مقاومت زیادی در برابر درجه حرارت دارد و برای تجزیه شدن نیاز به درجه حرارت‌های بالاتری دارد. نقطه ذوب ۹۰ درصد از مایکوتوکسینها بالاتر از ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد است و ۷۰ درصد از توکسینهای قارچی نقطه ذوب ۲۵°C-۱۵۰ دارند. در جدول زیر لیست مایکوتوکسینهایی آمده است که در درجه حرارت ذوبشان تجزیه می‌شوند.

1. B1- dihydrodiol

جدول ۴-۲ - مایکوتوکسینهایی که در نقطه ذوبشان تجزیه می‌کردند.

مایکوتوکسین	درجه حرارت °C
Atlatoxin B_1	۲۶۸-۲۶۹
Atlatoxin B_1 aldehyde	۲۷۳-۲۷۶
3-Hydroxy atlatoxin B_1	۲۸۰
Aflatoxin D_1	۲۵۵-۲۵۸
Aflatoxin Q_1	۲۶۶
Agroclavine	۱۹۸-۲۰۳
Alternariol	۳۵۰
Alternariol methyl ether	۲۶۶-۲۷۰
Cyclochlorotine	۲۵۱
Cytochalasine E	۲۰۶-۲۰۸
Ergocryptine	۲۱۲
Errgometrine	۱۶۲-۱۶۳
Ergotamine	۲۱۲-۲۱۴
Flavutoxin	۳۵۰
Gliotoxin	۲۲۱
Ibotenic acid	۱۴۵
Lysergic acid	۲۴۰
Malformin C	۳۰۰
Maltorhyzine	۶۹
Muscazone	۱۹۰
Muscimol	۱۷۲-۱۷۴
Phalloin	۲۵۰-۲۸۰
Rubratoxin B	۱۸۵-۱۸۶
Ruguiosin	۲۹۰
Sterigmatocystin	۲۶۵
Tremortin A	۲۱۰-۲۳۰
Tremortin B	۱۸۵-۱۹۵
Verruculogen (TR.1)	۲۳۳-۲۳۵
Viomellein	۲۶۰

برای افزایش درصد تجزیه و کاهش انواع مایکوتوکسینها و بخصوص آفلاتوکسینها در مواد غذایی انواع روشهای حرارتی وجود دارد که عبارتند از:

الف - بریان کردن مواد غذایی[1]

مواد غذایی حاوی آفلاتوکسین و یا اوکراتوکسین چنانچه به‌مدت ۳۰ دقیقه در درجه حرارت بالاتر از ۲۰۰°C-۱۵۰ سرخ شوند، سمیت آنها به میزان ۸۰-۴۰ درصد کاهش می‌یابد.

1. Roasting

در مواردی که مایکوتوکسینها داخل بافت میسلیومی قارچ جای گرفته است روش بریان کردن درصد کمی از توکسینها راکاهش می‌دهد(۳۲، ۳۱).

ب - پخت بصورت نان یاکیک یا پخت در فر[1]

درجه حرارتهای ۱۲۰°C-۹۰ فر سبب می‌شود که ۸۰ درصد آفلاتوکسین در نان یاکیکی که ۲۰ درصد آفلاتوکسین داشته، تجزیه شود (۴۳، ۴۲، ۳۳ و ۳۲).

ج - پخت در محیطهای آبکی[2] **یا پخت مرطوب**

درصد تجزیه آفلاتوکسینها و بخصوص آفلاتوکسین B_1 در محیطهای آبکی و در درجه‌حرارتهای ۱۲۰°C به‌مدت ۲۰ دقیقه افزایش می‌یابد. زیرا در این روش حلقه لاکتونی آفلاتوکسین بلوکه شده و خصوصیات خود را از دست می‌دهد، برای تأثیر بهتر درجه‌حرارت مرطوب، را با فشار توأم می‌کنند. تأثیر درجه حرارت توأم با فشار در مقایسه با سایر روشهای حرارتی در تجزیه و خنثی کردن آفلاتوکسینها در جدول مقایسهٔ روشهای حرارتی برای تجزیه آفلاتوکسینها مشخص شده است.

بنظر می‌رسد که فاکتورهای موجود در مواد غذایی تأثیر زیادی در اثر حرارت مرطوب دارند. برای مثال مواد غذایی که درصد چربی بالایی دارند و یا روغن آنها زیاد است در برابر تجزیه شدن آفلاتوکسینها در روش حرارت مرطوب مقاومت زیادی از خود نشان می‌دهند. (۳۳، ۳۲).

همچنین در جدول ۴-۳ درصد تجزیه آفلاتوکسین B_1، M_1 و اوکراتوکسین در مواد غذایی مختلف تحت تأثیر شرایط مختلف حرارتی نشان داده شده است.

در روشهای جدید و پیشرفته تهیه مواد غذایی و تهیه خوراک دام حرارتهایی اعمال می‌گردد تاکیفیت محصولات در ضمن فرآیند تهیه افزایش یافته و نیز درصد کاهش و میزان تجزیه انواع مایکوتوکسینهای موجود در آنها نیز افزایش یابد. در جدول ۴-۵ انواع درجات حرارت و روشهای پیشرفته کاربردی برای ایمن سازی و تهیه خوراک‌دام مشخص شده است.

---

1. Baking 2. Cooking

جدول ۴-۳ تأثیر فرآیندهای مختلف حرارتی بر میزان تجزیه انواع مایکوتوکسینها در فرآورده‌های غذایی و خوراک دام

نوع فرآورده	روش بکار رفته حرارتی	درصد تجزیه
	آفلاتوکسین B_1	
بادام‌زمینی	بریان کردن در ۱۵۰°C بمدت ۳۰ دقیقه	۸۰
بادام‌زمینی	بریان کردن خشک	۶۹
بادام‌زمینی	بریان کردن روغنی	۶۵
فرآورده‌های بادام‌زمینی	بریان کردن در ۲۰۴°C	۴۰-۵۰
ذرت	بریان کردن در ۱۶۵°C-۱۴۵	۴۰-۵۰
دانه‌های روغنی	بریان کردن در ۱۹۰°C بمدت ۱۵ دقیقه	۸۰
آرد دانه روغنی	بریان کردن در ۱۹۰°C بمدت ۱۵ دقیقه	۶۰
دانه روغنی	سرخ کردن در ۱۹۰°C بمدت ۶ دقیقه	۶۰
آرد گندم	پخت در فر	۶۰-۹۰
آرد گندم	پخت در فر با دمای ۱۲۰°C بمدت ۳۰ دقیقه	۸۰
محلول آبی	حرارت ۱۲۰°C بمدت ۲۰ دقیقه	کمی
آرد بادام‌زمینی	اتوکلاو در ۱۲۰°C بمدت ۴ ساعت	۹۵
میوه‌ها و ادویه‌ها	اتوکلاو در ۱۲۰C بمدت ۳۰ دقیقه	۲۹-۳۹
میوه‌ها و ادویه‌ها	اتوکلاو در ۱۲۰°C بمدت ۶۰ دقیقه	>۵۰
میوه‌ها و ادویه‌ها	حرارت خشک در آون ۶۰°C بمدت ۶۰ ساعت	۲۲-۷۷
روغن بادام‌زمینی	حرارت دادن در ۱۲۰°C بمدت ۱۰ دقیقه	۵۰
روغن بادام تصفیه نشده	حرارت بالاتر از ۲۵۰°C	ناچیز
روغن نارگیل	حرارت دادن در ۲۱۵°C-۱۸۰ بمدت ۱۰ دقیقه	۴۱
آرد بادام‌زمینی	پخت در حرارت ۱۰۰°C بمدت ۲ ساعت	۳۴
آرد پنبه دانه	پخت در حرارت ۱۰۰°C بمدت ۲ ساعت	۸۰
برنج	جوشاندن خیلی زیاد	-
برنج	پخت تحت فشار و حرارت ۱۲۰°C	۷۳
برنج	پخت معمولی	۴۹
برنج	پخت تحت فشار و آب زیاد	۸۲
آرد ذرت فشرده	جوشاندن	۲۸
آرد ذرت فشرده	سرخ کردن	۳۳-۵۳
آرد ذرت	پخت در فر و بصورت کماج	۱۳
جو خیسانده	پخت معمولی	۷۲-۸۶
ذرت	پخت در فر بصورت کیک	۷۰
	آفلاتوکسین M_1	
پنیر	حرارت دادن در ۹۰°C بمدت ۳۰ دقیقه	۹
	اوکراتوکسین A	
قهوه	بریان کردن	۸۰-۹۰
دانه قهوه سنبله‌دار	بریان کردن در ۲۰۰°C بمدت ۵ دقیقه	۱۰۰
دانه قهوه تلقیح‌نشده	بریان کردن در ۲۰۰°C بمدت ۲۰-۱۰ دقیقه	۰-۱۲
فرآورده‌های غلات	اتوکلاو کردن در ۱۲۰°C بمدت ۳ ساعت	۷۰
جو خیسانده	پخت معمولی	۷۲-۷۳
	وُمی توکسین	
آرد گندم	پخت در فر	۱۹-۶۹

جدول ۴-۴ درصد تجزیه آفلاتوکسین را در انواع روش‌های حرارتی و انواع مواد غذایی

ماده غذایی	درصد تجزیه	روش حرارتی
روغن بادام‌زمینی	۵۰	حرارت در ۱۲۰°C بمدت ۱۰ دقیقه
روغن بادام‌زمینی تصفیه نشده	اندکی	حرارت بالاتر از ۱۵۰°C
روغن بادام‌زمینی	اندکی	حرارت بالاتر از ۲۵۰°C
روغن نارگیل	۴۱	حرارت در ۲۱۹°C-۱۸۰ بمدت ۱۰ دقیقه
روغن زیتون	اندکی	حرارت بالاتر از ۲۰۰°C
روغن زیتون	۶۵	حرارت بالاتر از ۲۵۰°C
محلول آبی	اندکی	حرارت در ۱۲۰°C بمدت ۲۰ دقیقه
بادام‌زمینی	۵۹-۳۵	حرارت خشک در ۱۰۵°C
آرد بادام‌زمینی	۶۶	پخت در ۱۰۰°C بمدت ۲ ساعت و رطوبت ۳۰ درصد
آرد پنبه‌دانه	۸۰	پخت در ۱۰۰°C بمدت ۲ ساعت
برنج	۴۹	پخت معمولی
برنج	۷۳	پخت توأم با فشار در ۱۲۰°C
برنج	۸۲	پخت توأم با فشار و افزایش آب
شلتوک برنج	۱۰۰	جوشاندن زیاد توأم با فشار ۲۰PSI در مدت ۱۰ دقیقه
جو خیسانده	۸۶-۷۲	پخت معمولی
کیک ذرت	اندکی	پخت در شرایط قلیایی
ذرت	۴۰	پخت در فر بصورت کیک
ذرت	۴۶	پخت در فر بصورت کیک
آرد ذرت	۲۸	جوشاندن
آرد بادام‌زمینی	۹۵	اتوکلاو در ۱۲۰°C بمدت ۴ ساعت
میوه‌ها و ادویه‌ها	۳۹-۹	اتوکلاو در ۱۲۰C بمدت ۳۰، دقیقه
میوه‌ها و ادویه‌ها	۵۰ <	اتوکلاو ۱۲۰°C بمدت ۶۰ دقیقه
بادام‌زمینی	۱۰۰ و ۹۶ و ۷۲	اتوکلاو در ۱/۵ اتمسفر و زمان ۳۰، ۶۰ و ۹۰ دقیقه
میوه‌ها و ادویه‌ها	۷۷-۲۲	آون کردن بصورت خشک دمای ۶۰°C بمدت ۶ ساعت
آرد گندم	۹۰-۶۰	پخت در فر
آرد گندم	۸۰	پخت در فر در ۱۲۰°C بمدت ۳۰ دقیقه
آرد ذرت	۱۳	پخت در فر بصورت کماج
ذرت	۷۰	پخت در فر بصورت کیک
آرد ذرت	۵۳-۳۳	سرخ کردن
دانه روغنی (Pecan)	۶۰	سرخ کردن‌در روغن‌در ۱۹۰°C بمدت ۶ دقیقه
بادام زمینی	۶۵	بریان کردن در روغن ۳۴۵°C-۳۲۵ بمدت ۷-۳ دقیقه
ذرت	۸۱-۴۰	بریان کردن در ۱۶۵°C-۱۴۵
دانه روغنی (Pecan)	۸۰	بریان کردن در ۱۹۰°C بمدت ۱۵ دقیقه
آرد دانه روغنی	۶۰	بریان کردن در ۱۹۰°C بمدت ۱۵ دقیقه
آردبادام‌زمینی	۸۳-۴۱	بریان کردن در ۲۰۴°C
بادام زمینی لپه شده	۸۳-۵۰	بریان کردن در ۱۵۰°C بمدت ۳۰ دقیقه
بادام زمینی که مصنوعاً آلوده شده	۴۵-۳۰	بریان کردن در ۱۵۰°C بمدت ۳۰ دقیقه
بادام زمینی	۷۹-۵۸	بریان کردن خشک در ۴۰۰°C-۲۵۰ بمدت ۳۰-۵ دقیقه
دانه روغنی	۹۰-۶۰	بریان کردن خشک در ۱۹۱°C بمدت ۱۵ دقیقه
بادام زمینی	۹۵	بریان کردن با مایکروویو (۶kw) بمدت ۴ دقیقه
بادام زمینی	۹۵	بریان کردن با مایکروویو (۱/۶kw) بمدت ۱۶ دقیقه
بادام‌زمینی که مصنوعاً آلوده شده	۴۵-۳۰	بریان کردن با مایکروویو (۰/۷kw) بمدت ۸/۵ دقیقه
بادام زمینی	۷۱-۴۸	بریان کردن با مایکروویو (۰/۷kw) بمدت ۸/۵ دقیقه

جدول ۴-۵ روشهای پیشرفته حرارتی برای ایمن‌سازی خوراک دام از مایکوتوکسینها

روش حرارتی	شرایط اعمال حرارت
بخار	بخار در شرایط اتمسفر معمولی بمدت ۳۰-۱۵ دقیقه یا بکارگیری بخار در اتمسفر ۷۵PSI-۲۵ بمدت ۵-۶ دقیقه
پخت بصورت انفجاری	بخار خشک در اتمسفر ۴۳PSI-۳۳ بمدت ۲۵-۲۰ ثانیه
بریان کردن با حرارت خشک	حرارت بالاتر از ۱۴۹°C-۱۲۸
اشعه مادون قرمز	حرارت ۱۴۹°C بمدت ۵۰-۲۰ ثانیه
بودادن (تفت دادن)	حرارت ۴۲۷°C-۳۷۰ بمدت ۲۰-۱۵ دقیقه

۳-۱-۲- استفاده از صافیها

امروزه به‌کمک صافیها و عمل فیلتراسیون در صنایع مختلف بخصوص صنایع روغن‌کشی قادرند ۱۰۰ درصد آفلاتوکسین موجود در روغنهای خوراکی را حذف نمایند (۳۲، ۳۱). عمل سانتریفوژ کردن قادر است فقط ۶۵ درصد آفلاتوکسین موجود در روغن بادام‌زمینی را رسوب داده و حذف نماید و ۳۵ درصد باقی‌مانده را می‌توان به‌کمک خاکهای فعال شده و جذب سطحی آفلاتوکسین بر روی آنها از محیط غذایی دور نمود. از اینرو صافیهای بالشتک مانند به گونه‌ای طراحی می‌شوند که بعنوان ابزاری در صنایع روغن‌کشی بدون ایجاد زیان و یا داشتن هزینه بالا استفاده شوند. فیلترهای مخصوص جذب سموم در مرحله اول عبور روغن ۸۵ درصد آفلاتوکسین را حذف می‌کنند و بعد از عبور مجدد روغن از میان آنها قابلیت حذف آفلاتوکسین به ۱۰۰ درصد می‌رسد. مقدار جذب آفلاتوکسین تابعی از نوع خاک مورد استفاده در صافی است. قدرت جذب خاک نیز بستگی به عوامل محیطی دارد. برای مثال در pH خنثی ۱۰۰ میلی‌گرم آفلاتوکسین B_1 بوسیله ۱۰۰ میلی‌گرم کربن فعال جذب می‌شود، و در شرایط pH اسیدی و قلیایی قدرت جذب آن بالاست اما نه به‌اندازه شرایط pH خنثی.

اندازه و مناسبت صافیها برای استفاده در آزمایشگاه، پایلوت، و یا صنعت نیاز به‌بررسی و کنترل دارد (۴۳، ۴۲، ۳۳ و ۳۲).

۳-۱-۳- جداسازی مکانیکی

جداسازی مکانیکی یا سورت محصولات کشاورزی آلوده به آفلاتوکسین، به عنوان یک روش فیزیکی خنثی سازی و یا غیرفعال نمودن آفلاتوکسینها نبوده، بلکه سیستمی است جهت

پیشگیری از رشد و توسعه و نفوذ عوامل تولیدکننده انواع آفلاتوکسین در محصولات کشاورزی و بخصوص محصولات غذایی. بنابراین توصیه‌های زیر به عنوان ساده‌ترین راهها برای حفظ کیفیت محصولات و همچنین حذف آفلاتوکسین ارائه می‌گردد: (۴۳، ۴۲، ۳۳ و ۳۲):

- محصولات حساس و آسیب‌پذیر در برابر حمله قارچها و آلودگی به سموم قارچی، باید در محیطی مناسب انبار، نگهداری و حمل و نقل شوند.

- هنگام تهیه و استفاده از غذای دام در مواردی که آلودگی قارچی زیاد است، محصول کنار گذاشته شود، همچنین غذای‌دام و طیور در شرایط مناسبی ازنظر درجه‌حرارت و رطوبت نگهداری شوند تا از رشد و تکثیر قارچها و آلودگی به سموم قارچی مصون باقی بمانند.

- دستگاههای انتقال و تغذیه دامها نیز باید دارای امکانات نظافت و ضد عفونی باشند.

- داخل مخازن غذا بخصوص بخشهای قیفی شکل باید کاملاً صیقلی بوده و هم‌زنی جهت بهم زدن محتویات داشته باشد تا امکان چسبیدن مواد به گوشه‌ها و یا جدارهای مخازن وجود نداشته باشد.

- بازرسی مداوم و دقیق کارشناسان فنی و کارگران از مراحل و بخشهای مختلف تهیه و تولید محصولات، انبار و کنترل کیفیت دقیق مواد اولیه (۴۳، ۴۲، ۳۳ و ۳۲).

۳-۲- روش اشعه‌دهی[1]

اشعه‌های یونیزه کننده نظیر اشعه گاما اغلب برای حذف میکروارگانیسمهای بیماریزا از مواد غذایی مختلف و انواع خوراک دام استفاده می‌شود. 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 مقاومند و تأثیر غیرمستقیم این اشعه سبب تجزیه آفلاتوکسینها می‌گردد به صورتی که اشعه گاما آب‌را تجزیه کرده‌وسبب آزادشدن‌رادیکالهامی‌گردد ودرنتیجه‌شرایط لازم‌برای‌تخریب‌وتجزیه آفلاتوکسینها ایجاد می‌شود. برای مثال آفلاتوکسین B_1 در محیط خشک به مقدار زیاد در برابر تأثیرات مخرب اشعه گاما مقاومت نشان می‌دهد، حتی اگر از دوزهای بالای اشعه و مقادیر ۳۰

1. Radiation

مگاراد استفاده گردد، ولی زمانی که توکسین در محیط مرطوب یا آبکی باشد دوزهای پایین‌تر اشعه گاما (بالاتر از ۱ مگاراد) می‌تواند آفلاتوکسین B_1 را بطور کامل تجزیه نماید (۴۳ و ۳۳).

توانایی تجزیه کنندگی اشعه گاما و حساسیت انواع مایکوتوکسینها در مقایسه با انواع منابع اشعه در جدول ۴-۶ مشخص شده است.

جدول ۴-۶ درصد تجزیه آفلاتوکسین B_1 و اوکراتوکسین A در مواد غذایی مختلف و در حضور منابع نوری متفاوت

مایکوتوکسین	درصد تجزیه	منابع و شرایط نور	ترکیب
آفلاتوکسین B_1	جزئی	فلئورسنس ۱ ساعت	روغن پنبه‌دانه
آفلاتوکسین B_1	بیشتر از ۴۵	نور معمولی ۶۰ ساعت	میوه‌های خشک و ادویه‌ها
آفلاتوکسین B_1	جزئی	فلئورسنس ۱ ساعت	صفحه کروماتوگرافی لایه نازک
آفلاتوکسین B_1	جزئی	نور سفید ۱ ساعت	صفحه کروماتوگرافی لایه نازک
افلاتوکسین B_1	۹۳-۶۳	لامپ تنگستن - جیوه	برنج
اوکراتوکسین A	ایجاد ترکیب جدید	لامپ گزنون ۶-۵ ساعت	حلال‌ها

با افزایش غلظت آفلاتوکسین یا در حالت خشک و رسوبی، درصد تجزیه بوسیله اشعه گاما کاهش می‌یابد. در جدول ۴-۷ حساسیت آفلاتوکسین B_1 و اوکراتوکسین به اشعه گاما در انواع مواد غذایی مشخص گردیده است.

در بعضی اوقات کاهش دوز اشعه گاما به میزان ۱۰۰ کیلوراد باعث تحریک تولید آفلاتوکسین در فرآورده‌های غذایی می‌شود و این مسئله ناشی از تغییرات مسیرهای بیوشیمیایی میکروارگانسیمها و تولید بیشتر مایکوتوکسین می‌باشد.

پرتودهی آفلاتوکسین B_1 و G_1 با نور ماورای‌بنفش و روی صفحات سلیکاژل با طول موج ۳۶۵ نانومتر باعث ایجاد دو ترکیب با سمیت کمتر می‌گردد. کاهش سمیت مربوط به بازشدن حلقه لاکتونی آفلاتوکسینها نمی‌باشد بلکه مربوط به از دست دادن یکی از بندهای مضاعف در حلقه فوران و یا از دست دادن حلقه فورانی می‌باشد (۴۳، ۴۲ و ۳۳).

در جدول ۴-۸ درصد تجزیه آفلاتوکسینها در انواع مواد غذایی که در معرض اشعه UV و مرئی قرار گرفته‌اند، مقایسه شده است.

جدول ۴-۷ حساسیت آفلاتوکسین B_1 و اواکراتوکسین در برابر اشعه گاما

درصد تجزیه	روش حرارتی	محصول غذایی
	آفلاتوکسین B_1	
هیچ	۷ تا ۱۵ یا ۳۰ مگاراد روی صفحات نازک کروماتوگرافی	سم خالص
جزئی	بیشتر از ۳۰ مگاراد روی صفحات نازک کروماتوگرافی	سم خالص
جزئی	۱-۰/۲۵ مگاراد در محلول آبی	سم خالص
تماماً	جز از ۱ مگاراد در محلول آبی	سم خالص
هیچ	۲/۵ مگاراد	آرد بادام‌زمینی
هیچ	۳ مگاراد ۸، ۱۶ یا ۳۲ درصد رطوبت	برنج
۵۰-۰	۵-۰/۲۵٪ مگاراد در برش‌های خشک	نان
	اوکراتوکسین A	
هیچ	۷/۵ مگاراد در متانل	حلال

جدول ۴-۸ درصد تجزیه آفلاتوکسینها در برابر اشعه مرئی و UV

نوع ماده غذایی	درصد تجزیه	روش اشعه‌دهی
آرد بادام زمینی		اشعه UV ۸ ساعت
روغن بادام زمینی	۴۵-۴۰	اشعه UV ۲ ساعت
روی صفحه نازک کروماتوگرافی	جزئی	نورفلئورسنس ۱ ساعت
روغن پنبه‌دانه	جزئی	نور فلئورسنس ۱ ساعت
ادویه و میوه‌های خشک	بالاتر از ۴۵	نور مرئی بیشتر از ۶۰ ساعت
روی صفحه نازک کروماتوگرافی	جزئی	نور سفید ۱ ساعت
برنج	۹۳-۶۳	لامپ تنگستن - جیوه
روغن بادام‌زمینی	۱۰۰	نور خورشید ۱۵ دقیقه
روغن پنبه‌دانه	۷۵ <	نور خورشید ۳۰ دقیقه
روغن ذرت	۹۵	نور خورشید ۴۰ دقیقه
کازئین	۸۳	نور خورشید ۶ ساعت
خمیر بادام زمینی (کیک)	۵۰	نور خورشید ۶ ساعت
آرد نارگیل خشک شده	ناچیز	نور خورشید ۳/۵ ساعت
برش نازک بادام زمینی با چربی	۹۰	نور خورشید ۱۴ ساعت
برش نازک بادام زمینی بدون چربی	۷۷	نور خورشید ۱۴ ساعت
بادام زمینی که بطور طبیعی آلوده شده	۵۰	نور خورشید ۱۴ ساعت
غذاهای نواحی گرمسیر	جزئی	نور خورشید

۳-۳- روش عمل‌آوری یا فرآیند کردن

عمل‌آوری بعضی از محصولات کشاورزی باعث کاهش میزان آفلاتوکسین در محصول نهایی می‌شود. برای مثال آسیاب کردن دانه‌های مرطوب باعث می‌شود عصاره دانه که محتوی مواد پیش‌ساز و تشکیل دهنده آفلاتوکسین است، خارج شوند. یا عمل‌آوری و خیساندن دانه‌های ذرت موجب می‌شود که آفلاتوکسین در بخشهای مختلف دانه قرار گیرد به‌صورتی‌که ۴۰ درصد آفلاتوکسین موجود در آب مرحله خیساندن دانه‌ها، ۳۸-۳۰ درصد در فیبر دانه، ۱۷-۴ درصد در گلوتن و ۱۰-۶ درصد در جوانه قرار می‌گیرد، همچنین اگر دانه برنج مرطوب تخمیر شده و برشته گردد، آفلاتوکسین موجود در دانه از بین می‌رود (۳۳، ۳۲).

۳-۴- روش شیمیایی

روشهای شیمیایی غیرفعال کردن انواع آفلاتوکسین در محصولات کشاورزی، باید آفلاتوکسینها را به طور کامل به یک فرآورده غیرسمی تبدیل کند، بدون اینکه تغییری در کیفیت و ماهیت مواد اولیه ایجاد نماید.

حلقه لاکتونی در ساختمان انواع آفلاتوکسینها بیشترین تأثیر را در برابر عوامل شیمیایی می‌پذیرند. برای مثال در برابر عوامل قلیایی حلقه‌های لاکتونی باز شده و هیدرولیز می‌شوند و اینکار منجر به کاهش سمیت و سرطانزا بودن آفلاتوکسینها می‌گردد (۴۳، ۴۲، ۳۳ و ۳۲).

انواع عوامل شیمیایی برای حذف و غیرفعال کردن آفلاتوکسینها در زیر مشخص شده است.

۳-۴-۱- عوامل کلرینه کننده

کلریت سدیم به عنوان اولین و اصلی‌ترین ماده شیمیایی برای حذف انواع آفلاتوکسینها از سطوح آلوده کاربرد دارد و نیز تأثیر خوبی در تجزیه آفلاتوکسینها از مواد غذایی دارد. کلرینه کردن مواد غذایی با هیپوکلریت سدیم در غلظتهای ۰/۲، ۱، ۵ و ۱۱ درصد همراه با ۳ درصد اسیدکلریدریک و یا ۱۰ درصد گاز کلر سبب می‌شود که آفلاتوکسین B_1 موجود در مواد غذایی و یا بشکل خالص به میزان ۱۰۰ میلی‌گرم تجزیه شود. (۳۳)

حداقل غلظت هیپوکلریت سدیم (بلیچ) برای تجزیه کامل آفلاتوکسین در مواد غذایی،

$۸/۸\times۱۰^{-۳}$ مول در یک دوره دو ساعته است. برای تأثیر بهتر هیپوکلریت سدیم کنترل pH محیط نقش مؤثری دارد و تحت شرایط اسیدی، کلر به صورت یک اکسیدکننده قالب عمل می‌کند و آفلاتوکسین B_1 موجود در محیط را به ترکیبات دیگری به نام ۸ و ۹- دی‌کلرو و ۸ و ۹- دی‌هیدرکسی آفلاتوکسین B_1 تبدیل می‌کند. ۸ و ۹- دی‌کلرو آفلاتوکسین B_1 خاصیت سرطانزایی دارد اما ناپایدار است و بسرعت به ۸ و ۹- دی‌هیدرکسی آفلاتوکسین B_1 هیدرولیز می‌شود. برای سرعت بخشیدن بیشتر به عمل هیدرولیز می‌توان از استن به میزان ۵ درصد نیز استفاده نمود.

کلرینه کردن مواد غذایی برای حذف آفلاتوکسین از آنها مشکلاتی را از نظر ایمنی و سلامت غذاها ایجاد می‌کند، زیرا کلر باقی‌مانده در ماده غذایی سبب تغییر شکل چربیها و مواد پروتئینی می‌شود. با این وجود سمیت کلر هنوز بدرستی مشخص نشده است (۴۳، ۴۲، ۳۳ و ۳۲).

۳-۴-۲- عوامل اکسیدکننده

- پراکسید هیدروژن: پراکسید هیدروژن ماده‌ای است ارزان قیمت که به آسانی در دسترس است، و کارآیی آن در تجزیه سموم قارچی بالا است و باقی‌مانده آن در مواد غذایی تجزیه شده و از بین می‌رود. همچنین پراکسید هیدروژن مانع از رشد قارچهای تولید کننده آفلاتوکسین درمحیط کشتهای مصنوعی می‌شود ودرغلظت ۰/۵ درصد و pH حدود ۴ و یا غلظت ۶ درصد و pH = ۹/۵ آفلاتوکسین موجود در مواد غذایی را بطورکامل تجزیه می‌کند. آزمایشات مشخص کرده است که ۹۷ درصد آفلاتوکسین موجود در بادام‌زمینی بدون چربی وقتی که در معرض غلظت ۶ درصد پراکسیدهیدروژن قرارگرفته است، تخریب شده است (۴۳، ۴۲، ۳۳ و ۳۲).

- اُزن: اُزن یک اکسیدکننده قوی است که بصورت عرضی با باندهای دوگانه ۹-۸ حلقه فوران آفلاتوکسینها اتصال برقرار می‌کند و بصورت الکتروفیلیک جذب حلقه فوران می‌گردد. بنابراین بعنوان یک تجزیه‌کننده قوی برای آفلاتوکسینها محسوب می‌شود و قادر است در مدت چند دقیقه و در درجه حرارت اتاق آفلاتوکسینها را بطور کامل تجزیه کند.

بکارگیری اُزن برای کاهش آفلاتوکسین در پنبه دانه‌ایی که ۲۲ درصد رطوبت داشته است، باعث شده است که در طی دو ساعت و در درجه حرارت ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد ۹۱ درصد آفلاتوکسین B_1 موجود در پنبه دانه تخریب گردد. البته اُزن سبب کاهش پروتئین و اسیدآمینه و

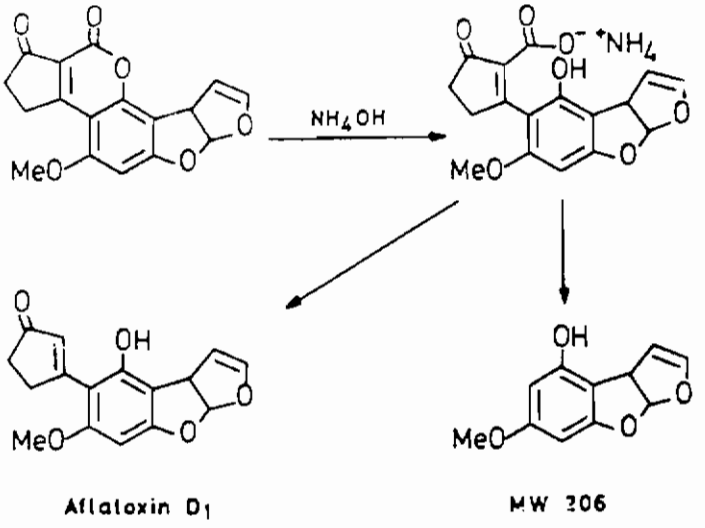
لیزین شده است و بنابراین بعنوان یک روش موفق در حذف آفلاتوکسین از مواد غذایی مطرح نمی‌باشد (۳۳).

شرایط کاربرد	محصول غذایی	ماده شیمیایی
به طور کامل آفلاتوکسین B_1 بمدت ۲ ساعت در ۱۰۰°C از بین برده است	پنبه دانه با ۲۲ درصد رطوبت	اُزن
۷۸ درصد کل آفلاتوکسین موجود در مدت ۱ ساعت و دمای ۱۰۰°C از بین رفته است	بادام‌زمینی با ۳۰ درصد رطوبت	

-بی سولفیت سدیم: بی‌سولفیت سدیم بعنوان یک افزودنی در صنایع غذایی کاربرد زیاد دارد و نیز ماده‌ای است که می‌تواند در غیرفعال کردن آفلاتوکسینها در مواد غذایی مؤثر باشد. این ماده در غلظتهای ۰/۵ و ۱ درصد سبب غیرفعال شدن آفلاتوکسین در مواد غذایی می‌شود. حتی بسیار مؤثرتر از هیدروکسید سدیم و آمونیاک، بی‌سولفیت سدیم به دو صورت در دو جایگاه فعال آفلاتوکسین اثر می‌گذارد؛ اول اینکه به حلقه لاکتونی متصل می‌شود و آنرا غیرفعال می‌کند، و دوم اینکه به انتهای حلقه فورانی آفلاتوکسین اضافه می‌شود و آنرا غیرفعال می‌کند، و یا همزمان هر دو کار را انجام می‌دهد.

۳-۴-۳- عوامل هیدرولیتیک

- آمونیاک: ۹۵ درصد آفلاتوکسین موجود در مواد غذایی و خوراک دامها با کمک آمونیاک گازی یا مایع تخریب می‌گردد. چنانچه درکاربرد این ماده، فاکتور مدت زمان استفاده، درجه‌حرارت و غلظت را در ترکیب مناسبی داشته باشیم، درصد تجزیه و کاهش آفلاتوکسین در مواد غذایی بطور مؤثرتری انجام خواهد شد. برای مثال در درجه حرارت ۱۲۰°C-۸۰ و فشار بالا لازم است ماده غذایی بمدت ۳۰-۱۵ دقیقه حرارت ببیند تا آفلاتوکسین کاملاً تجزیه شود. آمونیاک بوسیله هیدرولیز حلقه لاکتونی آفلاتوکسین B_1 و دکربوکسیکه کردن آن سمیت آفلاتوکسین B_1 راکاهش داده و از بین می‌برد و آنرا به‌ترکیب غیر سمی آفلاتوکسین D_1 تبدیل می‌نماید (۴۳، ۴۲، ۳۳ و ۳۲).



شکل ۴-۱۸ مرحله تشکیل آفلاتوکسین D_1 در حضور آمونیاک

با رعایت محدودیتهایی سازمان غذا و دارو (FDA)، کاربرد آمونیاک برای خنثی کردن آفلاتوکسین موجود در غذای دام در ایالات مختلف آمریکا مجاز اعلام شده است (۳۳).

تأثیر انواع غلظتهای آمونیاک در تجزیه آفلاتوکسین و در شرایط متفاوت درجه‌حرارت، فشار و رطوبت در جدول ۴-۹ مشخص شده است.

- هیدروکسیدکلسیم : لایم یا هیدروکسیدکلسیم در غلظت ۲ درصد موجب تجزیه آفلاتوکسین B_1 در مواد غذایی می‌شود و اگر آنرا به همراه فرمالدئید و یا مونومتیل آمین استفاده کنیم قدرت خنثی سازی آنرا برای آفلاتوکسینها افزایش می‌دهیم. در زمان بکار بردن هیدروکسیدکلسیم حلقه لاکتونی آفلاتوکسین B_1 باز شده و آفلاتوکسین D_1 با سمیت کمتر ایجاد می‌شود (۴۳، ۴۲ و ۳۳).

- متیل آمین : ۹۰ درصد آفلاتوکسین موجود در مواد غذایی به کمک ۱/۲۵ درصد متیل آمین تجزیه می‌شود. همین اثر را فرآیند پخت، در دمای ۱۰۰°C بمدت ۲ ساعت دارد (۴۳، ۴۲ و ۳۳).

به طور کلی تأثیر مواد قلیایی در محیطهای محلول و دمای ۱۱۰°C برای تجزیه

جدول ۴-۹ تأثیر انواع غلظتهای آمونیاک در تجزیه آفلاتوکسین

آفلاتوکسین							
مقدار نهایی ppb	مقدار اولیه ppb	سویسترا	زمان	درجه‌حرارت	فشار	رطوبت	غلظت آمونیاک
۳۰	۲۷۰	ذرت	۳ ساعت	۱۴۵	–	۲۰	٪۰/۵
۱۰۳	۳۳۴	آرد پنبه‌دانه	۳۰ دقیقه	۹۳	۴۵psi	۱۵	آنهیدروز
۸۵	۳۴۰	آرد پنبه‌دانه	۳۰ دقیقه	۸۲	۳۰psi	۱۰	آنهیدروز
۱۲۵	۴۰۰۰	آرد پنبه‌دانه	۳۰ دقیقه	۱۰۰	۴۰psi	۱۴	٪۴
۶۰	۳۵۰	آرد پنبه‌دانه	۱۵ دقیقه	۹۳	۴۵psi	۱۲/۵	آنهیدروز
۶۰	۱۲۱	بادام‌زمینی	۱۵ دقیقه	۹۳	۴۵psi	۱۰	آنهیدروز
۱۰۵	۷۰۹	آرد بادام‌زمینی	۱ ساعت	۹۳-۱۲۱	۲۰۰	۱۰-۱۵	–
۶۳	۱۱۱	آرد بادام‌زمینی	–	–	۴۳۰	۱۵	٪۶/۷
۷۳	۶۰۰	کیک خروجی‌بادام‌زمینی	۳۰ دقیقه	۹۵	۳bar	۱۵	آنهیدروز
۱۸۲	۱۵۳	آردبادام‌زمینی	۱۵ دقیقه	۸۰	۳bar	–	گاز
۳۷	۱۱۴۰	آرد بادام زمینی	۱۵ دقیقه	۸۰	۳bar	–	گاز
۹۳	–	آرد بادام‌زمینی	۱۵ دقیقه	۸۰	۰/۵-۲bar	۸	گاز
۶۵	–	آرد بادام‌زمینی	–	۸۵	فشار پمپ	۲۰	۲/۵ درصد
۱۴/۵	۳۰۰	کیک بادام‌زمینی	۱ ساعت	۵-۹۵	محیط	۱۰-۱۵	۱ درصد
۲۸	۱۹۷۷	آردبادام‌زمینی	۱ ساعت	۱۱۸	۲۶psi	۱۷	۴ درصد
۹۱	۴۰/۰۰۰	سلیکاژل H	۳۰ دقیقه	۱۰۰	۴۰psi	خشک	۴ درصد
۱۵	۱۶۰	ذرت	۱۲ روز	۴/۹	محیط	۱۷/۵	۱/۵ درصد

ادامهٔ جدول ۴-۹.تأثیر انواع غلظتهای آمونیاک در تجزیه آفلاتوکسین

آفلاتوکسین							
مقدار نهایی ppb	مقدار اولیه ppb	سوبسترا	زمان	درجه‌حرارت	فشار	رطوبت	غلظت* آمونیاک
۱۶	۱۰۰۰	ذرت	۱۴ روز	۲۵	محیط	۱۷/۶	گاز
۱۱۷	۸۹۶	ذرت	۱۷۹ روز	محیط	محیط	۱۱	۱/۵
۵	۷۵۰	ذرت	۱۳ روز	محیط	محیط	۱۷/۵	۱/۵ درصد
۱۵	۹۰	ذرت	۷ دقیقه	محیط	محیط	۱۱	۱/۱ درصد
۵	۶۰۰	ذرت	۳ روز	۳۸	محیط	۱۵	۰/۵ درصد
۱۱۵	۱۹۰۰	پنبه‌دانه	۲۱ روز	محیط	محیط	۲۰	۱/۵ درصد
۸۱	۸۰۰	پنبه‌دانه	۱۵ روز	۴۳	محیط	۱۲/۵	۲ درصد
۱۴۰	۴۰۰	پنبه‌دانه	۲۱ روز	محیط	محیط	۱۷	۱/۵ درصد
۱۷۵	۲۵۰۰	آرد بادام‌زمینی	۵ روز	محیط	محیط	۲۰	۵ درصد
۱۳۵	۷۹۰	آرد بادام‌زمینی	۵ روز	۵۰	محیط	۱۵	۳ درصد
۸۷	-	کیک بادام‌زمینی	۱۰ روز	محیط	محیط	۲۰	۵ درصد
۲۷	۱۰۰۰	آرد بادام‌زمینی	۱ ساعت	۱۰۰	< 1bar	۱۷	۷ درصد
۸۷	-	ذرت	۱۰ روز	محیط	محیط	۲۰	۵ درصد
۱۰۴	-	پنبه‌دانه	۷ روز	۲۰	محیط	-	هیدروکسیدآمونیوم
۱۰۴	-	پنبه‌دانه	۱ ساعت	۱۰۰	محیط	-	هیدروکسیدآمونیوم

* درصد آمونیاک بر مبنای مقدار آمونیاک اضافه شده به ۱۰۰گرم سوبسترا است به شکل محلول آمونیاک و یا هیدروکسید آمونیوم.

آفلاتوکسینها به صورت زیر می‌باشد :

کربنات آمونیوم < بی‌کربنات سدیم < هیدروکسید آمونیوم < بی‌کربنات پتاسیم < کربنات سدیم <کربنات پتاسیم < هیدروکسید سدیم < هیدروکسید پتاسیم

در زیر شرایط کاربرد متیل آمین برای کاهش غلظت آفلاتوکسین موجود در انواع محصولات غذایی مشخص شده است :

شرایط کاربرد	نوع محصول	ماده قلیایی و غلظت
در یک راکتور متحرک به مدت ۲ ساعت و دمای ۱۰۰°C باعث شده آفلاتوکسین از ۱۱۱μg/kg به کمتر از ۵μg/kg کاهش یابد	بادام‌زمینی با ۳۰ درصد رطوبت	متیل آمین ۱/۲۵ درصد
آفلاتوکسین B_1 را از ۱۳۰μg/kg به ۱۴μg/kg کاهش داده و آفلاتوکسین B_2 را حذف کرده است.	پنبه دانه	متیل آمین ۱/۲۵ و ۱۵ درصد آب
آفلاتوکسین B_1 را از ۲۸/۵۰μg/kg به ۶۳μg/kg رسانده و کل آفلاتوکسین موجود را از ۴۰۰۰μg/kg به ۶۵μg/kg رسانیده است و کاهش داده است.	بادام‌زمینی با ۱۵ درصد آب	متیل آمین ۱/۲۵ درصد

- انواع اسیدها : اسیدهای مختلف باعث هیدراسیون آفلاتوکسین B_1، در محل پیوند اولفینی ۹-۸ انتهای حلقه فوران می‌شوند. در این واکنش آفلاتوکسین B2a ایجاد می‌شود که سمیت آن $\frac{1}{200}$ آفلاتوکسین B_1 است.

آفلاتوکسین G_1 نیز تحت تأثیر اسیدها به آفلاتوکسین G2a تبدیل می‌شود. کاربرد اسیدها در فرآیند خنثی سازی انواع آفلاتوکسین در مواد غذایی موجب کاهش کیفیت و ارزش پروتینی مواد غذایی می‌شود و در تجزیه آفلاتوکسین در فرآیندهای تهیه مواد غذایی کاربردی ندارند (۴۳، ۴۲، ۳۳ و ۳۲).

۳-۲-۴- سایر مواد شیمیایی

محلولهایی نظیر دی متیل آمین هیدروکلراید (۵ درصد)، آلدئیدها (فرمالدئید)، پراکسید بنزوئیل، یُد، سولفات، آهن آمونیاکی، پرمنگنات پتاسیم و برات سدیم به‌مقدار قابل توجهی آفلاتوکسین موجود در مواد غذایی راکاهش می‌دهد، اماکاربرد این مواد در مواد غذایی محدودیت‌هایی دارد زیرا مشکلاتی‌رانظیر ایمنی و سلامت ماده غذایی ایجاد می‌کنند (۴۳، ۴۲، ۳۳و ۳۲).

۳-۲-۵- تصفیه یا استخراج آفلاتوکسین به کمک حلالها

روش تصفیه یا حذف آفلاتوکسین از مواد غذایی بیشتر برای از بین بردن آفلاتوکسین در روغنهای حاصل از دانه‌های روغنی کاربرد دارد. از آنجاکه آفلاتوکسین به صورت خالص در آب و هیدروکربنهای اشباع، محلول بوده، اما در حلالهای قطبی نظیر متانول، اتانول،کلروفورم و بنزن محلول می‌باشد، سیستمهای بکارگیری حلالها، روش مناسبی برای خنثی سازی آفلاتوکسین در مواد غذایی آلوده و بخصوص دانه‌های روغنی می‌باشد (۴۳، ۴۲، ۳۳ و ۳۲).

از جمله حلالهایی که بیش از همه توصیه می‌شوند، استون، بنزن و کلروفورم هستند و متانول بصورت مایع نیز نتایج بسیار خوبی را می‌دهد. همچنین استون به همراه ۱۰ درصد وزنی آب کاهش شدیدی در میزان آفلاتوکسین ایجاد می‌کند (۴۳، ۴۲، ۳۳و ۳۲).

حلالها از طریق تغییر ساختمان شیمیایی آفلاتوکسین، تولید یک فرآورده با سمیت کمتر را می‌نمایند.

جدول ۴-۱۰ سیستم حلال مناسب برای حذف انواع آفلاتوکسین در انواع محصولات کشاورزی را مشخص کرده‌است.

۳-۲-۶- ویتامینها

الف - ویتامین A

بررسی اثر ترکیبات غذایی بر روی خاصیت سرطانزایی آفلاتوکسینها نتایج منطقی و جالبی را مشخص می‌کند، بدین ترتیب که اگر رژیم غذایی از نظر لیپیدها فقیر باشد برای رشد وگسترش سرطان‌مناسب است. بعلاوه آفلاتوکسین B_1 می‌تواند آسیب‌سرطانی درموشهایی‌که دچارکمبود

جدول ۴-۱۰ حلالهای مناسب حذف آفلاتوکسین

محصول	سیستم حلالی مورد استفاده برای حذف آفلاتوکسین	نحوه کاربرد
بادام زمینی	هگزان - اتانل (۷۹:۲۱) هگزان - متانل (۷۳:۲۷) هگزان - استن (۴۱:۵۹) هگزان - اتانل - آب (۸۲:۱۲:۳) هگزان استن - آب (۴۴/۴:۵۴/۵:۱/۱)	برای استخراج روغن و آفلاتوکسین
بادام‌زمینی‌بصورت لپه شده	حرارت دادن نیم‌ساعت در آب $90^{\circ}C$ یا کلرید کلسیم ۰/۵ درصد	جهت حذف ۹۵-۹۰ درصد آفلاتوکسین
آرد بادام‌زمینی	کلروفرم	آردبادام زمینی بصورت مرطوب
آرد بادام‌زمینی	استن - هگزان - آب	-
آرد بادام‌زمینی	بی‌کربنات سدیم ۱ درصد	حذف ۱۰۰ درصد آفلاتوکسین به همراه ۳۳ درصد پروتئین
آرد بادام‌زمینی	کلرید کلسیم ۱ درصد	حذف ۸۰ درصد آفلاتوکسین به همراه ۶ درصد پروتئین
آرد بادام‌زمینی	ایزوپنتانل آبی - آب (۸۰:۲۰)	-
کیک پرس شده بادام‌زمینی	استن - هگزان - آب (۵۴:۴۴:۲)	استخراج در حد پایلوت
فرآورده بادام‌زمینی	استن - هگزان - آب (۵۰:۴۸/۵:۱/۵)	-
آرد پنبه‌دانه	استن به همراه ۳۰-۲۵ درصد آب	حذف ۹۷ درصد از آفلاتوکسین B_1
آرد پنبه‌دانه	ایزوپروپانل - آب (۸۰:۲۰)	-
آرد دانه روغنی	استن، بنزن، کلروفرم، متانل و آب جوش	حذف نشده است
آرد دانه روغنی	استن و ۱۰ درصد آب	کاهش سمیت و رساندن آفلاتوکسین به به پایین‌تر از ۳۰ میکروگرم به ازای هر کیلوگرم
آرد دانه روغنی	استن - هگزان - آب	-
فرآورده‌های دانه‌روغنی	استن	-
روغن	سودا	-

ویتامین A هستند ایجاد کند اما در موش‌های کنترل، این وضع مشاهده نمی‌شود و از آنجایی که ویتامین A جزو ویتامین‌های محلول در چربی می‌باشد این مطلب بطور کاملتری تأیید می‌شود.

تستهای تغذیه‌ای بطور واضح نشان می‌دهد که رژیم غذایی می‌توانند در مطالعات طویل‌المدتی که بر روی بروز غدد سرطانی انجام می‌گیرد مؤثر باشد. بر طبق بررسیهای به‌عمل آمده هسته دی‌هیدروفوران به تنهایی در ملکول آفلاتوکسین خاصیت سرطانزایی ایجاد می‌کند و احتمال دارد که خاصیت سرطانزایی آفلاتوکسین B_1 هم مربوط به دلتالاکتون غیراشباع و هم به سیستم حلقوی دی فوران در ساختمان شیمیایی توکسین باشد (۴۳، ۴۲، ۳۲ و ۲۲).

ب - ویتامین D

بررسیهای انجام شده نشان می‌دهد که مایکوتوکسینها موجب کاهش مقاومت استخوانها می‌شوند که از طریق شکستن آنها قابل اندازه گیری است. همچنین خاصیت ارتجاعی استخوانها را افزایش می‌دهد که این حالت از طریق خم کردن و هنگام شکستن با یک نیروی عملی بکار گرفته شده قابل اندازه گیری است. این روش محاسبه در مورد بیشتر بیماریهای ساق پا در پرندگان تجربه شده است. آفلاتوکسینها باعث کاهش میزان فسفر و کلسیم سرم خون می‌شوند و ثابت شده است که این کاهش بستگی به جیره غذایی ندارد (۴۳، ۴۲، ۳۲ و ۲۲). آنچه از این مشاهدات می‌توان انتظار داشت، این مطلب است که اثرات سوء آفلاتوکسینها با کمبود ویتامین D رابطه متقابلی دارد.

پ - ویتامینهای گروه B

تیامین و ویتامینهای گروه B سنتز آفلاتوکسین را تحریک می‌کنند، ولی ریبوفلاوین و پیریدوکسین در این امر دخالتی نداشته و مؤثر نیستند.

ت - ویتامین E

ویتامین E بعنوان یک آنتی اکسیدان، گرچه تأثیر قابل توجهی بر رشد میسلیومهای قارچی از خود نشان نمی‌دهد، لیکن در محیطی که از تترا کلرید کربن بعنوان عامل محرک تولید آفلاتوکسین استفاده شده باشد نه تنها اثر مهارکنندگی بر تولید آفلاتوکسین نداشته بلکه برعکس در بالاترین غلظتهای مورد استفاده از ویتامین E در مقایسه با محیطی که فقط شامل تترا کلریدکربن بوده است، افزایش قابل توجهی را در تولید آفلاتوکسین نشان داده است. (۲۲، ۸).

ث - ویتامین C

مطالعات بیوشیمیایی اهمیت ویتامین C را در ایجاد سرطان نشان داده است (۲۲). ویتامین C در غلظتهای متفاوت اثرات گوناگونی را از خود نشان می‌دهد، بطوریکه برخی محققین معتقدند که اثر ویتامین C بعنوان یک آنتی‌اکسیدان درست مشابه ویتامین E می‌باشد و در محیطهای حاوی تترا کلرید کربن سبب تشدید تولید آفلاتوکسین می‌شود؛ این در حالی است که تأثیر چندانی بر رشد میسلیوم‌های قارچی ندارد. اما در بررسی انجام شده توسط برخی از دیگر محققین نتایج متفاوتی حاصل شده است.

۳-۴-۷- ترکیبات فنلی

ترکیبات فنلی دارای خواص ضدمیکروبی کاملاً شناخته شده‌ای هستند، امروزه دریافته‌اند که این ترکیبات می‌توانند در مهار تولید آفلاتوکسین در محیطهای آبکی و برخی از سوبستراهای جامد مؤثر واقع شوند. بدین جهت از ارتووانیلین به منظور جلوگیری از تولید آفلاتوکسین در برخی از غلات و دانه‌های روغنی استفاده شده است.

در پژوهشی که در همین خصوص انجام شد، ۲۵ گرم از هریک از دانه‌های زیر از قبیل: برنج (var.sita)، گندم (var.s-۳/۸)، ذرت (var.conga-۲) بادام‌زمینی (var.Ak۱۲-۲۴)، خردل (var.BR-۱۳) در ۵۰۰ ppm محلول آبکی ارتووانیلین به مدت ۲ ساعت در یک ارلن مایر ۱۵۰ میلی‌لیتری خیسانده شدند (دانه‌های کنترل در آب مقطر خیسانده شدند). پس از جدا کردن مقادیر مازاد محلول، تعداد زیادی از دانه‌های روغنی اتوکلاو شدند. روز بعد، دانه‌ها با ۰/۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون اسپور سویهٔ تولیدکنندهٔ آفلاتوکسین، یعنی آسپرژیلوس پارازیتیکوس (NARL-۳۲۴۰) تلقیح شدند. دانه‌های آلوده شده به مدت ۷ روز و در حرارت $۲۸\pm۱^{\circ}C$ اینکوباتور و نگهداری شدند. سپس آفلاتوکسینها استخراج شده و بوسیله اسپکتروفتومتر، میزانشان تعیین گردید.

به منظور ارزشیابی اثرات ارتووانیلین، درصد جوانه زنی[1] دانه‌های روغنی، تعیین شده است که نتایج آن در جدول زیر درج گردیده است:

1. Germination

جدول ۴-۱۱ درصد اثر مهارکنندگی ارتووانیلین در تولید آفلاتوکسین و جوانه‌زنی

دانه‌ها	تولید آفلاتوکسین	جوانه زنی
برنج	۸۵/۶۳	-
گندم	۵۴/۱۸	۲/۲۲
ذرت	۵۲/۲۷	-
بادام‌زمینی	۷۶/۲۵	۸/۲۴
خردل	۵۱/۰۶	۱۰/۵۶

تولید آفلاتوکسین توسط آسپرژیلوس پارازیتیکوس بر روی غلات و دانه‌های روغنی می‌توان به مقدار قابل توجهی توسط ارتووانیلین مهار و کنترل نمود. ماکزیمم اثر بازدارندگی در تولید آفلاتوکسین به ترتیب در برنج و به میزان ۸۵/۶، بادام‌زمینی به میزان ۷۶/۲۵ درصد، گندم به میزان ۵۴/۲، ذرت به میزان ۵۲/۳ و خردل به‌میزان ۵۱/۱ درصد گزارش شده است.

ارتووانیلین اثر قابل توجهی بر روی جوانه‌زدن دانه‌ها نداشته است. ماکزیمم اثر مهار کنندگی در جوانه‌زدن به میزان ۱۰/۶٪ مشخص گردید. تولید آفلاتوکسین توسط آسپرژیلوس پارازیتیکوس با موفقیت در محیط مایع و بر روی برخی از سوبستراهای جامد کنترل و بررسی گردیده است. نتایج این بررسی نشان دهنده این مطلب است که می‌توان از ارتووانیلین در برخی از دانه‌هایی که از نظر اقتصادی بسیار مهم هستند به منظور جلوگیری از تولید آفلاتوکسین استفاده نمود.

این موضوع هم که استفاده از ارتووانیلین هیچ اثر جانبی نامطلوبی در جوانه زدن دانه‌ها نداشته است از نکات برجسته کاربرد این ماده شیمیایی می‌باشد.

طی سال‌های گذشته، مطالعات وسیعی راجع‌به کافئین‌یا، ۱ و ۳ و ۷ تری متیل گزانتین، صورت گرفته است که نشان دهندهٔ اثرات بسیار زیاد کافئین بر سیستمهای بیولوژیکی است. در بین نتایج حاصله مشخص شده است که کافئین سبب مهار رشد و تولید مایکوتوکسینهای پلی‌پپتیدی که توسط تعدادی از گونه‌های آسپرژیلوس و پنی‌سیلیوم ایجاد می‌شود، می‌گردد. این بررسیها نشان می‌دهد که خاصیت مهارکنندگی کافئین سبب مقاومت دانه‌های کاکائو و قهوه در مقابل آلودگی با آفلاتوکسین بوده و تصور می‌شود که نقش کافئین دراین موارد، مشابه عمل یک

باز دارنده طبیعی رشد قارچ[1] است. در مطالعات متعددی به این مسئله اشاره شده است که اثر مهارکنندگی کافئین بسیار اختصاصی بوده بطوریکه ترکیبات شیمیایی مختلفی که از نظر ساختمانی مشابه کافئین بوده‌اند بر تولید آفلاتوکسین اثر نمی‌گذارند. به‌نظر می‌رسد که کافئین در مهار فسفودی‌استراز Amp حلقوی دخالت داشته باشد (۲۷، ۲۳، ۱۴).

سنتز آفلاتوکسینها در محیطهای کشت آسپرژیلوس پارازیتیکوس با افزودن ۲ میلی‌گرم کافئین به هر میلی‌لیتر از محیط کشت، کاملاً مهار شده است.

بررسیهای آنزیمی نشان داده است که هیچ تغییر مهمی در فعالیتهای اختصاصی گلوکز ۶ فسفات دهیدروژناز، مانیتول دهیدروژناز، فسفوفروکتوزکیناز، فروکتوز ۱ و ۶ دی فسفاتاز، پیروات‌کیناز و یا مالات دهیدروژناز ایجاد نشده است.

ظاهراً بنظر می‌رسد که کافئین توسط محدودکردن جذب کربوهیدراتها که توسط کپک به منظور سنتز این گروه از مایکوتوکسینها مورد استفاده قرار می‌گیرد، سنتز آفلاتوکسین را مهار می‌نماید (۳۳، ۲۷، ۲۶، ۲۳، ۱۵ و ۱۴).

دهیدروکسی آنیزول بوتیله (BHA)، هیدروکسی تولوئن‌بوتیله (BHT)، آلفاتوکوفرول (ویتامین E)، اسیدآسکوربیک (ویتامین C)، گلوتاتیون احیا شده[2] و سیستئین که بعنوان آنتی اکسیدان‌کاربرددارند درمحیط کشت آسپرژیلوس پارازیتیکوس حاوی تترا کلریدکربن که محرک پرقدرتی درسنتز آفلاتوکسین می‌باشد مورد سنجش قرارگرفته‌اند. نتایج این تحقیقات نشان می‌دهد که حضور BHA درمحیط به‌مقدارزیادی سبب مهار تولید آفلاتوکسین می‌شود و اثر مهارکنندگی این ماده باکاهش غلظت، کاهش می‌یابد. برخلاف این ماده، ویتامین E، ویتامین C، گلوتاتیون احیا شده و سیستئین سبب تشدید اثر تحریکی تترا کلریدکربن بر تولید آفلاتوکسین می‌شوند.

افزودن ترکیبات فوق تأثیر قابل توجهی بر رشد میسلیومهای قارچ نمی‌گذارد. پژوهشگران دریافتند که اکسیداسیون چربیها[3] نقش مؤثری در بیوسنتز آفلاتوکسین توسط آسپرژیلوس پارازیتیکوس و آسپرژیلوس فلاووس هم در موجود زنده و هم در آزمایشگاه ایفاء می‌کند.

در موجود زنده با مشاهده این مطلب که تولید آفلاتوکسین موقعی که آسپرژیلوس

---

1. Fangi Static.
2. Reduced glutathione (GSH)
3. Lipoperoxidation.

پارازیتیکوس و آسپرژیلوس فلاووس روی دانه‌های روغنی رشد می‌کنند، بیشتر از زمانی است که بر روی دانه‌های حاوی نشاسته رشد می‌نمایند. مشخص شده است که بازده آفلاتوکسین بطور مستقیم در ارتباط با عدد پراکسیدی می‌باشد که در عصاره چربی دانه‌ها وجود دارد. در آزمایشگاه تولید آفلاتوکسین در محیط کشت آسپرژیلوس پارازیتیکوس یا آسپرژیلوس فلاووس با افزودن مواد زیر به مقدار زیادی افزایش می‌یابد.

- مواد هیدروفیلیک با حلقه اپوکسید (حتی اپوا کسیدهایی که به میزان محدودی در طی اکسیداسیون چربیهای غیراشباع تولید می‌شوند).

- هیدروپراکسیدهایی که از واکنش لیپواکسیژناز لوبیای ژاپنی[1] بر اسیدلینولئیک بدست می‌آید.

- ارگواسترول و سیتواسترول که به ترتیب مهمترین استرول‌های قارچ ودانه‌های روغنی می‌باشند.

تعدادی از محققین نیز نقش سوربات پتاسیم را در حفظ و نگهداری دانه‌های ذرت که حاوی ۳۰، ۲۴ و ۱۸ درصد رطوبت بوده بررسی نموده‌اند. در این آزمایش از کشت خالص آسپرژیلوس پارازیتیکوس NRRL2999 استفاده گردید و سپس رشد میسلیوم، تولید گازکربنیک ومایکوتوکسین اندازه گیری شد. بطور کلی نتایج حاصله نشان داد که تولید دی‌اکسیدکربن و مایکوتوکسین با افزایش مقدار سوربات در محیط کاهش می‌یابد. همچنین سوربات پتاسیم بر روی دانه‌های ذرت که حاوی رطوبت کمتری بوده و در داخل ظرف در بسته در حضور غلظتهای بالای CO_2 نگهداری شده بودند، تأثیر بیشتری نشان داد.

۳-۵- روشهای بیولوژیکی و میکروبی

در سال ۱۹۶۶، دانشمندان توانستند از میکروارگانیسمهایی مانند مخمرها، کپکها، اسپورکپکها، آکتینومیستها، باکتریها، خزه و جلبکها جهت از بین بردن آفلاتوکسین، استفاده نمایند.

برای مثال یکنوع باکتری بنام فلاوباکتریوم اورانتیکوم (B-184NRRL) می‌تواند سبب

---

1. Soybean.

تخریب آفلاتوکسین در محیط کشت شود و عمل سم‌زدایی این میکروارگانیسم در محیط شیر، روغن، ذرت، کره بادام‌زمینی، سبوس، و بادام، به اثبات رسیده است. در کلیه این آزمایشات مشخص گردیده است که فلاو باکتریوم اورانتیکوم در حرارت ۲۸°C، به‌مدت ۱۲ ساعت، قادر است تمامی آفلاتوکسینها را در محیط کشت از بین ببرد.

گونه‌های فراوانی از قارچها دربخشهای مختلف گیاه بادام‌زمینی حضور دارند که قانون حاکم در میان این میکروارگانیسمها، رقابت است.

شاید امکان داشته باشد که گونه‌هایی راکه از رشد آسپرژیلوس فلاووس جلوگیری می‌نمایند تقویت کرد. تأیید اصلی روی این گونه تحقیقات از مشاهدات دو دانشمند به نامهای chang-min-chung و Lynd منشأ گرفته به این معنی که بیشترین مقدار آفلاتوکسین در بادام‌زمینی‌هایی که در خاکهای اسیدی پرورش یافته‌اند و پایین‌ترین مقدار توکسین در آنهایی که در خاکهای قلیایی رشد کرده‌اند مشاهده شده است. این تفاوت در مقدار تولید توکسین ممکن است مربوط به اثر pH بر روی فعالیت آنتاگونیستی میکروارگانیسمها بر علیه آسپرژیلوس فلاووس باشد.

نه‌اینکه‌فقط قارچها بلکه‌باکتری‌ها هم ممکن است نقشی در این رقابت ایفاء کنند بطوری که باکتریها تولید آفلاتوکسین رامتوقف و یا آنرا متابولیزه و تبدیل به ماده‌ای با قدرت سمیت کمتری می‌نمایند. ضمناً استفاده‌از آنتی‌بیوتیک aureofungin نیز،گاهی جهت توقف تولید آفلاتوکسین توصیه شده است. این چنین مشاهداتی زمینه‌ایی برای تحقیقات عمیق در مورد استفاده از روشهای بیولوژیکی که بتواند مواد آلوده به مایکوتوکسینها را سَم‌زدایی کند، بوجود می‌آورد.

در یک مقیاس صنعتی (یعنی در مقیاس بزرگ و اقتصادی، نه آزمایشگاهی و کوچک) تمام روشهای فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی که برای بهبود کیفیت بهداشتی غذاهای آلوده به مایکوتوکسینها بکار برده می‌شوند، باید شرایط زیر را داشته باشند (۲۷، ۲۳، ۱۴).

- انجام‌تمام‌روشها آسان‌وساده‌باشدوسبب‌نشودکه‌به‌بهای‌اولیه‌ماده‌غذایی‌زیادافزوده شود.

- روشهایی راکه بکار می‌بریم، نباید سبب مرطوب شدن یک غذای خشک شوند. زیرا علاوه بر اینکه لازم است مجدداً ماده غذایی را خشک کنیم. اشکالاتی در حمل و نقل و انبارداری ماده غذایی نیز ایجاد می‌شود.

- روش مورد استفاده نباید ترکیب اصلی را تغییر دهد، چنین تغییری ارزش غذایی و

مخصوصاً میزان پروتئین را تغییر خواهد داد.

ـ روش مورد استفاده نباید سبب ایجاد یا باقی ماندن سمی یا سرطانزا شود.

۴ـ آفلاتوکسیکوز[1]

آفلاتوکسینها گروهی از توکسینهای قوی هستند که باعث تأثیرات مخرب در سیستمهای بیولوژیکی می‌شوند. این متابولیتها در پاره‌ای از پستانداران، پرندگان و ماهیها ایجاد سرطان، جهش و ناهنجاری جنینی می‌کنند.

۴-۱- آفلاتوکسیکوز در انسان

بطور کلی آفلاتوکسینها عامل ایجاد نکروز و سیروز حاد کبدی می‌باشند. علائم آفلاتوکسیکوز در پستانداران، از دست دادن اشتها، کمبود وزن، یرقان و تکثیر سریع سلولهای مجرای صفراوی است (۴۲، ۳، ۲).

آلودگی حاد به آفلاتوکسین موجب زردی غشای مخاطی، تجمع چربی در کبد و خونریزی می‌شود. گرچه کبد آماج حمله آفلاتوکسیکوز است، اما ضایعات سرطانی در دیگر اندامها بویژه معده، کلیه، کولون، ریه، غدد بزاقی و اشکی و نسج پوست پستانداران زیاد گزارش شده است (۴۲، ۳ و ۲).

افزایش فعالیت فسفاتاز در سرم نشان گویایی بر آلودگی کبدی و اختلال در اعمال متابولیسمی و بدکارکردن آن است. شواهدی از عکس‌العمل انسان در برابر آفلاتوکسینها و گزارشهایی از جنوب شرقی آسیا، هندوستان، افریقا و آلمان در دست است، مؤید این نظریه است که آفلاتوکسینها در مرگ و میر انسان بخصوص کودکان دخیل بوده‌اند.

شباهت زیادی در اثرات ناشی از استعمال دوزهای مؤثر آفلاتوکسین B_1 روی میمون گونه[2] و سندرم ری[3] در تایلند وجود دارد. این علائم عبارتند از: تب، اسهال، استفراغ، تشنج و اغما که در کودکان و در میمونها کاملاً به هم شباهت دارند. بررسی موادغذایی مورد مصرف کودکان تایلندی، آلودگی شدید آنها را به آفلاتوکسین نشان می‌دهد (۴۲، ۳ و ۲).

---

1. Aflatoxicosis 2. Macaque 3. Rey's syndrom

آثار بروز آفلاتوکسیکوز در انسان از روی انجام مطالعات آزمایشگاهی روی میمون رزوس[1] بدست آمده است.

مواردی چند از آفلاتوکسیکوز در انسان به شرح زیر است (۴۴، ۴۲ و ۳۴):

در اوگاندا، پسر بچه‌ای از ناراحتی و تورم شکم رنج می‌برد و به بیمارستان مراجعه کرد و پس از ۲ روز جان سپرد. در کالبد شکافی از اندامها، نکروز کبدی کاملاً مشهود بود. او از کاساوای[2] کپک زده تغذیه کرده بود. بعد از تجزیه شیمیایی سیب‌زمینی شیرین ۱۰۷ppm توکسین بدست آمد.

در تایوان، در دو دهکده مجاور هم، ۲۶ نفر در نتیجه خوردن برنج کپک زده حاوی ۲۰۰ppm آفلاتوکسین B_1 مسموم شده بودند با وجود اینکه تحت درمان قرار گرفتند. اما به‌فاصله چند ساعت تا چند روز ۳کودک آنها، جان سپردند.

در هندوستان در سال ۱۹۷۴ در دو ایالت گجرات و راجستان از ۳۹۷ بیمار مسموم، پس از پذیرش در بیمارستان ۱۰۶ نفر آنها درگذشتند، این افراد از ذرت آلوده به آسپرژیلوس‌فلاووس تغذیه کرده بودند. پس از تجزیه ماده غذایی مصرفی میزان آفلاتوکسین در آن ۱۶ppm-۶ مشخص گردید.

تجزیه عصاره نسج کبدی در ۲ مورد مرگ و میر در چکسلواکی و نیوزیلند نشان داد که آفلاتوکسینهای B_1 و G_1 در کبد قابل ردیابی بودند.

تحقیقات زیادی در زمینه رابطه بین میزان آفلاتوکسین موجود در جیره غذایی و بروز سرطانهای کبدی انجام شده است. در این زمینه با اندازه گیری میزان آفلاتوکسین موجود در غذاهای مصرفی اعم از خریداری شده از بازار و یا نگهداری شده در انبارهای منازل، رابطه مستقیمی بین مصرف آنها با بروز مصرف آفلاتوکسیکوز مزمن بدست آمده است. از بررسی نتایج حاصله می‌توان قبول کرد که هزاران نفر در نقاط مختلف دنیا از آفلاتوکسیکوز ناشی از تغذیه مواد غذایی آلوده رنج می‌برند (۴۲، ۲۹، ۲۵، ۲۰ و ۱۹).

البته در بررسیها و مطالعات اپیدمیولوژیکی سعی می‌کنند موارد دیگری چون الکلیسم،

---

1. Rhesus

۲. سیب‌زمینی شیرین

مصرف پاره‌ای از داروهای گیاهی، سوء تغذیه، آلودگیهای ویروسی راکه همگی منجر به سرطانهای کبدی می‌شوند از آفلاتوکسیکوز تفکیک کنند. مواردی هم از وابستگی سرطان کولون به آفلاتوکسین ذکر شده است.

سرطان کولون در امریکا، پس از سرطان ریه در مردها و پس از سرطان پستان در زنها بالاترین رقم مبتلایان به سرطان را داشته است.

۴-۲- آفلاتوکسیکوز در حیوانات

پژوهشگران دریافتند که مواردی از تومورهای کبدی در موش صحرایی در نتیجه رژیم غذایی آلوده به آفلاتوکسین ایجاد شده است. همچنین آفلاتوکسینها بوجود آورنده سرطان‌های کبدی در حیوانات هستند.

تأثیر آفلاتوکسین به این صورت است که چربی مدفوع بالا رفته و یا بعبارت دیگر با خوراندن غذای آلوده به آفلاتوکسین از یک طرف و خروج آن از طرف دیگر نشان داده شده است که مقدار کمی از آنزیمهای هاضمه چربی و نمکهای صفراوی در هضم و جذب مواد غذایی در لوله‌های گوارشی دخالت می‌نمایند. تأثیر دیگر آفلاتوکسینها، ایجاد کوفتگی و خونریزی است. آفلاتوکسینها، پرندگان را از طریق بالا بردن شکنندگی دیواره مویرگهای خونی، کاهش مقاومت بافتی و کاهش در غلظت فاکتورهای مخصوص انعقاد خون آماده و مستعد کوفتگی می‌سازد. گذشته از خونریزی و کوفتگی آشکار در لاشه‌ها، این علائم در جریان کشتار طیور بوسیله لکه‌های کوچک قرمز رنگی که به علت وجود نقصی در دستگاه گردش خون ایجاد شده قابل تشخیص است.

در بررسی انجام شده، LD_{50}[1] انواع آفلاتوکسینها به عوامل چندی بستگی دارد که از آن جمله موارد زیر قابل ذکر هستند (۱۰).

۱- سن ۲- جنسیت ۳- نژاد ۴- راه ورود به بدن ۵- شرایط حیوان ۶- ترکیب رژیم غذایی ۷- شرایط محیط در زمان مصرف آفلاتوکسین ۸- فاصله بین زمان مصرف و اندازه گیری آفلاتوکسین

---

۱. آن مقدار از ماده سمی که نیمی از حیوانات مورد آزمایش را هلاک کند.

حساسیت حیوانات مختلف در برابر آفلاتوکسینهای بررسی شده که نتیجه آن در جدول زیر منعکس است (۱۰):

جدول ۴-۱۲- توکسیسیته حاد آفلاتوکسین B_1

گونه حیوان	LD_{50} میلی‌گرم آفلاتوکسین به ازای کیلوگرم وزن بدن
جوجه اردک	۰/۳۳۵
خرگوش	۰/۳
گربه	۰/۵۵
خوک	۰/۶۲
سگ	۰/۵-۱/۰
گوسفند	۱/۰
خوکچه هندی	۱/۴
موش	۹
موش صحرایی نر	۷/۲
موش صحرایی ماده	۱۷/۹

میزان آفلاتوکسین موجود در جیره غذایی که منجر به بروز و ظهور لکه‌ها و ضایعات در کبد می‌شود، در حیوانات مختلف متفاوت است و بسته به حساسیت آنها از ۳۰ تا ۴۵۰۰ pbb متغیر است. جدول ۴-۱۳ نشان دهنده این ارتباط است.

جدول ۴-۱۳ رابطه بروز ضایعات کبدی و میزان آفلاتوکسین B_1 در جیره غذایی حیوانات

گونه حیوان	میزان آفلاتوکسین B_1 در جیره غذایی که سبب بروز ضایعات کبدی می‌شود (pbb)
جوجه اردک	۳۰
جوجه بوقلمون	۳۰۰
مرغ	۵۰۰
گاو گوشتی	۷۰۰
خوک	۸۰۰
گوسفند	۱۰۰۰
میمون	۲۰۰۰
گاو شیرده	۲۳۰۰
موش	۴۵۰۰

جدول زیر اثرات سرطانزایی آفلاتوکسین B_1 در موش صحرایی را نشان می‌دهد (۲۰).

جدول ۴-۱۵- بررسی اثرات مقادیر مختلف آفلاتوکسین B_1 در ایجاد سرطان در موش

کل حیوانات آزمایش شده	تعداد حیوانات با اثرات سرطانی	مقادیر آفلاتوکسین (pbb)
۱۸	۰	۰
۲۲	۲	۱
۲۲	۱	۵
۲۱	۴	۱۵
۲۵	۲۰	۵۰
۲۸	۲۸	۱۰۰

۵- سمیت آفلاتوکسینها

۵-۱ بررسی سمیت کبدی ایجاد شده در موش صحرایی ماده توسط آفلاتوکسین B_1 و تداخل با اتنیل استرادیول[1]:

برای انجام این بررسی به موشهای صحرایی ماده[2] یک دوز داخل صفاقی آفلاتوکسین B_1 به مقدار ۶-۳ میلی‌گرم به ازای هرکیلوگرم وزن بدن تجویز گردید. ۲۴ ساعت بعد و هر هفته، تا زمانی که کشته شدند به تعدادی از موشهایی که آفلاتوکسین B_1 دریافت می‌کردند از طریق لوله گذاری در معده[3] دوزی معادل ۱۳ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن، اتنیل‌استرادیول تجویز گردید.

سپس ۱، ۳، ۶ و ۹ ماه پس از شروع آزمایش، حیوانات کشته شدند. کبد توسط میکروسکوپ نوری و تعیین هیستو شیمیایی آنزیم گاما گلوتامیل ترانسفراز (GGT) کبد و پلاسما و همچنین سنجش فعالیت آنزیمهای متابولیزه‌کننده در کبد، مورد سنجش و بررسی قرار گرفت.

نتایج نشان دادند آفلاتوکسین B_1 فقط تغییرات بسیار اندکی در میزان اجزای متفاوت مورد مطالعه ایجاد می‌کند. بنابراین مایکوتوکسین اثری برروی فعالیت آنزیم گاما گلوتامیل ترانسفراز

1. Estradiol ethynyl 2. Spaque-Dacoley 3. Gavage

نداشته و فعالیت آنزیم اپوکسید هیدرولاز را تا ما کزیمم، ۴۲ درصد افزایش می‌دهد. در مقابل اتنیل استرادیول به میزان ۵۰-۲۰ درصد فعالیت آنزیم UDPGT[1] و همچنین غلظت سیتوکروم p-۴۵۰ و پروتئینهای میکروزومال[2] کاهش می‌دهد. ولی استروژن فعالیت اپوکسید هیدرولاز را تا میزان ۱۵۰ درصد و GGT کبدی را تا ۴۰۰ درصد، و GGT پلاسمایی را نیز تا ۱۷۵ درصد افزایش می‌دهد (۱۰، ۹).

در کبد موش صحرایی مورد آزمایش ضایعات بافتی در حالتی که بطور توأم از اتنیل استرادیول و آفلاتوکسین B_1 استفاده شده بود، مشخص‌تر بود.

این مطالعه نشان می‌دهد که تداخل بین تجویز طولانی اتنیل استرادیول و یک دوز منفرد تزریقی داخل صفاقی از آفلاتوکسین B_1 تولید ضایعات کبدی را تحریک کرده که احتمالاً نشانه سرطان سلولهای کبد می‌باشد.

بررسی منابع علمی نشان می‌دهد که آفلاتوکسین B_1 مؤثرترین عامل ایجادکننده سرطان کبد در موشهای صحرایی شناخته شده است. درحالی که هورمونهای استروئیدی مثل اتنیل استرادیول ممکن است بعنوان عامل ایجادکننده تومورهای کبدی عمل نمایند.

نتایج حاصل از بررسی فوق نشان دهندهٔ این مطلب است که اتنیل استرادیول بعنوان یک جزء استروژنی داروی ضد حاملگی خوراکی می‌تواند ضایعات کبدی ایجاد نماید، ولی ضایعات بافتی ایجاد شده در کبد حیواناتی که بطور توأم از اتنیل استرادیول و آفلاتوکسین B_1 استفاده کرده‌اند، افزایش یافته است. علاوه بر این دانشمندان دریافتند که سلولهای فاقد سیتوپلاسم[3] و سلولهای اسیدوفیل و بازوفیل کانونی می‌تواند نشانه ایجاد سلولهای سرطانی باشد (۱۹، ۱۸، ۱۰ و ۹).

ضایعات کبدی ناشی از اتنیل استرادیول به تنهایی و یا همراه با آفلاتوکسین B_1 با افزایش فعالیت آنزیم GGT پلاسمای کبدی همراه بود که بعنوان نشانه‌ای مثبت برای ضایعات پیش سرطانی و سرطانی است (۱۰، ۹).

کبد، جایگاه اصلی تغییرات مختلف استروئیدها بوسیله اکسیداسیون و کنژوگه کردن می‌باشد. این عمل ممکن است اثرات مختلف اتنیل استرادیول را بر روی کبد توضیح دهد.

---

۱. UPD گلوکورونوزیل ترانسفراز

2. Microsomal proteins

3. Clear cell

کاهش وزن کبد احتمالاً مربوط به اثرات کاتابولیزه نمودن استروژنها در موش صحرایی است.

اثرات شدید آفلاتوکسین B_1 بر روی کبد و در ناحیه شکم نیز ارزیابی شده است. بطوریکه مصرف روزانه ۰/۴ میکروگرم از آفلاتوکسین B_1 توسط موش صحرایی سبب رشد غیرطبیعی در لایه اپتیلیوم مجاری صفرا می‌شود.

ضمناً ناراحتیهای زیاد درونی برای حیوان بوجود می‌آورد که حساسترین قسمت اجزاء درونی همان کبد حیوان است.

اخیراً شواهدی مبنی بر این وجود دارد که مصرف دراز مدت آفلاتوکسین توسط حیوانات آزمایشگاهی موجب بروز تومورهای بدخیم می‌شود (۱۹، ۱۸، ۱۰ و ۹).

با تستهای تغذیه‌ای دراز مدت[1] بر روی ماهی قزل‌آلا در آزمایشگاه مشاهده شده است که نوع و مقدار پروتئین رژیم غذایی، قدرت سرطانزایی آفلاتوکسین B_1 را تغییر می‌دهد، بطوریکه رژیمهای غذایی حاوی مقادیر بالای کنسانتره پروتئین ماهی[2]، ایجاد تومورها و آسیب شدیدتری نسبت به رژیمی که حاوی مقادیر کمتری پروتئین باشد، می‌کند.

تجربیات آزمایشگاهی وجود آفلاتوکسینها را در جفت حیوان اثبات نموده است. طبق یک گزارش به گاو حامله‌ای که آفلاتوکسین خورانده شده بعد از وضع حمل، گوساله کاملاً سالم بدنیا آمده است. نظیر همین آزمایش درمورد موش نیز انجام گرفته ولی اثرات ناهنجاری جنینی مشاهده نشده است. در کل، آفلاتوکسینها موجب کاهش رشد و نقصان مقاومت بدن حیوانات در مقابل بیماریها می‌گردد، معذالک زیاد شدن سلولها در اپی‌تلیوم مجاری صفرا از نشانه‌های بارز این نوع مسمومیت می‌باشد.

اثرات مسمومیت مزمن بسته به نوع حیوان متفاوت است زیرا حساسیت حیوانات گوناگون در مقابل آفلاتوکسین فرق می‌کند. حیوانات جوان نسبت به حیوانات مسن حساسترند. نشخوار کنندگان نسبت به سایر حیوانات به آفلاتوکسین مقاومترند. کاهش حساسیت دامهای روستایی بدین‌صورت رده‌بندی می‌شود.

گوسفند < اسب < گاو < خوک

در آفلاتوکسیکوز حاد به علت وارد شدن غلظتهای زیاد آفلاتوکسین به بدن حیوان

---

1. Longterm 2. Fish protein concentrated

ضایعات بعدی بیشتر و به صورت تورم کبدی، سختی پارانشیم کبدی و خونریزی ظاهر می‌شود. اثرات کلیوی آفلاتوکسینها بسیار نادر و تنها در موارد معدود ضایعات کلیوی همراه با نفریت گزارش شده است. همچنین اختلال در عمل ریه‌ها موجب تجمع خلط در آنها می‌گردد. علاوه بر این مشخص شده است که اثر سوء آفلاتوکسین بر روی سیستم اعصاب مرکزی سبب تشنج عضلانی در حیوان می‌گردد و بعد از ظاهر شدن این علائم است که مرگ حیوان فرا می‌رسد. ولی در آفلاتوکسیکوز مزمن، اثرات مزمن آفلاتوکسینها در حیوانات بصورت بیماریهای کلینیکی ظاهر می‌شود که شایعترین آنها سل می‌باشد. بهترین راه مبارزه با شیوع آفلاتوکسیکوز تغییر رژیم غذایی حیوان می‌باشد.

اولین آزمایشاتی که برای پی بردن به اثرات سمی آفلاتوکسینها انجام شد، تست روی جوجه اردک یک روزه به وزن تقریبی ۵۰گرم بوده است. به این منظور عصاره بادام‌زمینی و یا فرآورده آن را در کلروفرم حل کرده و بدین ترتیب چربی را خارج می‌کنند و باقیمانده را بوسیله متانول و اتر (ده حجم متانول، یک حجم آب، ده حجم اتر) استخراج می‌کنند. آفلاتوکسین در فاز آبی متانول باقی می‌ماند که پس از خارج کردن حلال، آفلاتوکسین را در آب امولسیون کرده و نتیجه آن معمولاً به صورتی می‌باشد که غلظت نهایی به ازای هر سانتی‌متر مکعب معادل ۴۰ گرم از نمونه اولیه است، آنگاه امولسیون حاصله را بوسیله یک لوله پلاستیکی، وارد سنگدان جوجه‌اردک می‌کنند.

در روز اول مقداری معادل ۱۰ واحد بین‌المللی در جیره غذای هر جوجه در نظر می‌گیرند و مقدار توکسین تجویز شده، تدریجاً افزایش پیدا می‌کند.

یک نمونه وقتی خیلی سمی تلقی می‌شود که بچه اردک در عرض هفت روز پس از تزریق بمیرد. بچه اردکهایی را که زنده می‌مانند، برای بررسی ضایعات حاصله از مصرف توکسین در کبد، آزمایش می‌کنند. ارزش این آزمایش قسمتی مربوط به دانستن مقدار قدرت کشندگی سم و همچنین قسمتی مربوط به شناسایی اثرات مزمن و غیرکشنده توکسین روی مجاری صفراوی است که با تزریق مقدار کم آفلاتوکسین به بچه اردک «۰/۰۴ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم» مورد بررسی قرار می‌گیرد. تست جوجه اردک یک روزه دشواریهایی را نیز بدنبال دارد نظیر، لزوم پرورش مداوم حیوانات، اما مسایلی مانند پس آوردن و استفراغ کردن ماده سمی تزریق شده هرگز در این آزمایش وجود ندارد (۱۹، ۱۸، ۷، ۶، ۵ و ۴).

پس از تست جوجه اردک یک روزه مهمترین تست بیولوژیکی مورد استفاده تست جنین جوجه است که عبارت است از تلقیح عصاره سمی مورد آزمایش به داخل کیسه هوا یا کیسه زرده یک تخم بارور از نژاد white-leghorn، یا یک نژاد بارور دیگر.

سپس تخم مذکور را به مدت ۵ روز در گرمخانه نگاهداری می‌کنند. بعضی از دانشمندان تخم را قبل از قراردادن در گرمخانه مورد تلقیح قرار می‌دهند.

پژوهشگران دیگر ۹ روز پس از اینکه تخم در گرمخانه قرار گرفت عمل تلقیح روی آن انجام می‌دهند. جنین جوجه خیلی نسبت به آفلاتوکسین حساس است و دو روز پس از تزریق در مقایسه با نمونهٔ شاهد که برای نخستین بار بر روی آن تست انجام می‌شود، از روی شدت ضایعات کبدی، اثرات سمی بوجود آمده مورد بررسی واقع می‌شود.

جوجه اردک حساس به آفلاتوکسین است، بنابراین امکان شناسایی مقادیر کم سم وجوددارد. تست جوجه اردک یک روزه برای ارزیابی اثرات سمی آفلاتوکسینها کاربرد فراوانی دارد.

برای تعیین LD_{50} در بیشتر آزمایشها از جوجه اردک یک روزه استفاده می‌شود، بطوریکه LD_{50} مربوط به آفلاتوکسین B_1، ۰/۵۶۴mg/kg و LD_{50} برای آفلاتوکسین G_1، ۱/۸mg/kg تعیین شده است.

٦- معالجه آفلاتوکسیکوز

واضح است که در هنگام مواجه شدن با یک مورد اثبات شده آفلاتوکسیکوز نخستین اقدامی که باید انجام داد تنظیم یک رژیم غذایی متناسب با موازین بهداشتی است که بدینوسیله منشاء اولیه آلودگی بر طرف می‌شود.

مخلوطی از کولین، اینوزیتول، ویتامین B_2 و ویتامین E باعث جلوگیری از ایجاد ضایعات کبدی ناشی از مصرف آفلاتوکسین می‌گردند.

باید یادآوری کرد که می‌توان از اثر سمیت آفلاتوکسین بوسیله معالجه پیش‌گیرانه با فنوباربیتال[1] جلوگیری نمود. فنوباربیتال آفلاتوکسین را به محصولات غیر سرطانزا متابولیزه

1. Phenobarbital

می‌کند. به کمک استات کورتیزون و دهیدروکورتیزون یک کاهش نسبی در هپاتوم[۱] موش صحرایی بدست آمده، اما چنین معالجه‌ای روی کارسینومهای[۲] ماهی قزل‌آلا اثری نداشته است.

آفلاتوکسین B_1 می‌تواند آسیب سرطانی در موشهایی که دچار کمبود ویتامین A هستند ایجاد کند، اما در موشهای کنترل این وضعیت بروز نمی‌کند. علاوه بر این آفلاتوکسین باعث کاهش در میزان فسفر و کلسیم سرم خون می‌شود و در نتیجه آفلاتوکسین با کمبود ویتامین D اثرات متقابلی دارد. از آنجایی که این دو ویتامین (A , D) از ویتامینهای محلول در چربی محسوب می‌شوند، بنابراین رژیم غذایی که از نظر لیپیدها ناقص باشد، برای رشد و گسترش سرطان مناسب است. از اینرو می‌توان انتظار داشت که این دو ویتامین در معالجه آفلاتوکسیکوز نقش مؤثری را ایفا کنند.

۷- خواص بیولوژیکی آفلاتوکسینها

۷-۱- سرطانزایی آفلاتوکسین

عوارض ناشی از مصرف آفلاتوکسینها به دو صورت ظاهر می‌شود:

الف - پدیده‌های سریع وابسته به خاصیت سمیت

ب - پدیده کند مربوط به خاصیت سرطانزایی

ممانعت از بروز بیماریهای نوع اول لزوماً وقوع اثرات ناشی از مصرف طویل‌المدت توکسین را جلوگیری نمی‌کند.

در سال ۱۹۴۳ پیدایش غدد کبدی در ماهی گزارش شده است ولی در آن زمان، هیچگونه اطلاعات علمی در مورد آفلاتوکسین وجود نداشت. در سال ۱۹۴۴، در مراکش، پژوهشگران کثرت وقوع ضایعات کبدی در خوکهای مورد آزمایش راگزارش نمودند. علاوه براین وجود غدد متعدد به همراه التهاب[۳]، کم و بیش مشخص درکبد آنها ذکر شده بود و مطالعات بافتی[۴] غدد مشخص می‌کرد که آنها غدد خوش‌خیم[۵] یا سرطانی[۶] بودند (۱۷).

---

۱. تومورهای خوش خیم کبدی

۲. تومورهای بدخیم کبدی

3. Cirrhosis

4. Histoloqy

۵. ادنوما

۶. کارسینوما

در سال ۱۹۶۱ نیز چندین مورد از تومور کبد در اردکهای ۹ ماهه یا بزرگتر، از چندین منطقه در فرانسه گزارش گردید که در بعضی موارد مربوط به تومورهای خوش‌خیم بود و در برخی موارد هم مربوط به تومورهای بدخیم می‌شد. در اینجا یک فرضیه با منشاء ویروسی متصور شده بود.

بطور مشابه در سال ۱۹۶۰ وجود تومور کبدی[۱] را در موشهایی که تحت یک رژیم معین قرار گرفته بودند، تشخیص دادند. در سال بعد نقش توکسینی راکه توسط آسپوژیلوس فلاووس تولید می‌شود، چنین تعریف گردید.

تولید غدد سرطانی در کبد موشهایی دیده می‌شود که تنها ۶ ماه از شیر گرفته شده بودند و با غذای آلوده به آفلاتوکسین به میزان ۱۰ قسمت در ۱۰ میلیون، تغذیه شده بودند.

پس از تغذیه کردن موشها با مواد حاوی آفلاتوکسین، مشاهده شده بود که غدد سرطانی به رنگ زرد مایل به خاکستری با علایم خونریزی[۲] و مرگ بافت[۳] ایجاد می‌شود.

اگر مقدار نسبتاً زیادی از محصولات غذایی بادام‌زمینی که با آسپرژیلوس آلوده شده بودند به رژیم غذایی موشها افزوده شود، احتمال بروز تومورهای کبدی، متناسب با غلظت آفلاتوکسین در غذا وجود دارد.

جدول ۴-۱۶ رابطه بین غلظت آفلاتوکسین تعیین شده توسط فلورسانس و احتمال بروز سرطان کبد در موش

غلظت آفلاتوکسین در غذا (mg/kg)	دورهٔ آزمایش (روز)	احتمال بروز تومورهای کبدی
۵/۰	۳۷۰	۱۴/۱۵
۳/۵	۳۴۰	۱۱/۱۵
۳/۵	۳۳۵	۷/۱۰
۱/۰	۳۲۳	۸/۵۱
۰/۲	۳۶۰	۲/۱۰
۰/۰۰۵	۳۸۴	۰/۱۰

۱. هپاتوما ۲. هموراژیک و نکروتیک

3. Necrotic

چنانچه به جای غذای بادام‌زمینی آلوده به آسپرژیلوس فلاووس، آفلاتوکسین بصورت خالص به غذا افزوده شود، نتایج مشابهی حاصل خواهد شد.

هرچه حیوان جوانتر باشد، در مقابل خاصیت سرطانزایی توکسینها حساس خواهد بود. ایجاد تومور در حیوانات تازه از شیر گرفته شده، به میزان ۰/۵-۰/۲ میلی‌گرم آفلاتوکسین در هر کیلوگرم رژیم غذایی آنها کفایت می‌کند و اثراتش غیرقابل برگشت است.

گزارش شده است که مصرف روزانه ۵ میکروگرم آفلاتوکسین، موجب افزایش غددی که رشد غیرعادی دارند نمی‌شود. حتی پس از یکسال بنظر می‌رسد که حیوانات از نظر سلامت عمومی در وضع بسیار خوبی هستند، لیکن بازهم در ۶۰-۵۰٪ از موشهایی که تحت این اثر غذایی قرار گرفته بودند، نهایتاً غدد سرطانی ظاهر شده بود (۱۹، ۱۸، ۱۰ و ۹).

بر خلاف حالت بالا، خوردن ۲۰ میکروگرم آفلاتوکسین در روز، هرچند که در ابتدا هیچ ضایعه‌ای ایجاد نمی‌کند، اما پس از یکسال برحالت ضعف مزاجی افزوده شده و در ۷۰-۶۰٪ موارد هم تومورهای بدخیم بوجود می‌آید.

بنابراین افزایش در دوز مصرفی روزانه آفلاتوکسین بدون اینکه موجب ظاهر شدن تعداد خیلی بیشتری تومور بشود، در وضعیت کلی سلامتی، تغییراتی را باعث می‌شود.

بعلاوه با مشاهده یک مورد سرطان در معده موش انسان به این فکر افتاد که آفلاتوکسین، ممکن است ایجاد سرطانهای مختلفی در اعضایی به جز کبد بکند، (مثلاً در ریه‌ها).

مسلم است که رژیم غذایی سهم مهمی را در سرطانی شدن به عهده دارد، بدین ترتیب که اگر رژیم غذایی که از نظر لیپیدها ناقص باشد، برای رشد و گسترش سرطان مساعد است.

طبق بررسیهایی که به عمل آمده مشخص گردیده است که هسته دی‌هیدرودی فوران تنها ترکیب شیمیایی با خاصیت سرطانزایی در مولکول آفلاتوکسین نیست، و ممکن است که، خاصیت سرطانزایی آفلاتوکسین B_1 هم به وجود سیستم دی‌هیدرودی فوران و هم به دلتا - لاکتون غیر اشباع، بستگی داشته باشد (۱۹، ۱۸، ۱۰ و ۹).

همچنین ممکن است که آفلاتوکسین B_1 تنها یک سرطانزای مقدماتی باشد و برای اینکه تبدیل به یک ترکیب سرطانزای فعال بشود، لازم است که احتمالاً توسط آنزیمهای میکروزومی دگرگون گردد (۱۹، ۱۸، ۱۰ و ۹).

۷-۲- اثرات ایجاد ناهنجاری جنینی[1]

اثرات ایجاد ناهنجاری جنینی توسط آفلاتوکسین در سال ۱۹۷۵ مورد بررسی قرار گرفته است. هر چند که اثر آفلاتوکسین B_1 بر روی جنین و ایجاد نقص فیزیکی در آن، در سال ۱۹۶۷ گزارش شده بود، تزریق داخل صفاقی[2] آفلاتوکسین B_1 به مقدار ۴ میکروگرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن که در روز هشتم حاملگی انجام شده بود، منجر به مرگ جنین گردید.

تقریباً ۵۰٪ جنینها در مادرانی که آفلاتوکسین دریافت کرده بودند و بیش از ۸۵٪ جنینها در مادران شاهد طبیعی بودند. ولی دوز آفلاتوکسین به میزان ۲ میکروگرم به ازای هرکیلوگرم وزن بدن هیچگونه اثر سوئی نداشته است.

در سال ۱۹۶۷ طی آزمایشاتی به ۱۲ موش باردار، آفلاتوکسین B_1 بصورت دوزهای مکرر روزانه از طریق تزریق داخل صفاقی به مقدار ۴ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن داده شد و هیچگونه اثرات ایجاد ناهنجاری جنینی مشاهده نگردید (۱۹).

با وجود این تعداد قابل توجهی جنین مرده در مادرانی که آفلاتوکسین دریافت کرده بودند، مشاهده گردید در حالی که در مادران شاهد چنین مسأله‌ای دیده نمی‌شد.

۷-۳- اثرات جهش‌زایی

آفلاتوکسین B_1 موجب انحرافات کروموزمها، شکسته شدن کروموزمها، شکسته شدن کروماتیدها و شکسته شدن DNA در سلولهای گیاهی و حیوانی می‌شود.

اطلاعات حاصل از تست Ames مشخص کرده است که آفلاتوکسین B_1 نسبت به سایر آفلاتوکسینها دارای بیشترین فعالیت جهش‌زایی می‌باشد. جدول ۴-۱۷ قدرت جهش‌زایی انواع آفلاتوکسینها را در مقایسه با یکدیگر مشخص کرده است (۴۳، ۴۲، ۳۳ و ۳۲).

همچنین جهش‌زا بودن آفلاتوکسین B_1 در سالمونلاتیفی‌موریوم TA۹۸ در مقایسه با سایر انواع آفلاتوکسین و نیز سرطانزا بودن آنها در حیوانات مختلف بررسی شده است که نتایج آن در جدول ۴-۱۸ مشخص شده است (۴۳، ۴۲، ۳۳ و ۳۲).

---

1. Teratogenic 2. Peritoneum

جدول ۴-۱۷ قدرت جهش‌زایی انواع آفلاتوکسینها

آفلاتوکسین	مقداردوز برحسب‌نانوگرم	میانگین‌مقدارارتباط‌خطی ± انحراف معیار	جهش‌زایی‌درمقایسه باآفلاتوکسین B_1
B_1	۲۵-۲۰۰	۰/۹۲±۰/۰۷	۱
B_2	۱۰۰-۳۲۰۰	۰/۹۲±۰/۰۹	۰/۰۰۲
G_1	۵۰-۸۰۰	۰/۹۸±۰/۰۲	۰/۰۳۳
G_2	۱۰۰-۱۶۰۰۰	۰/۷۹±۰/۱۰	۰/۰۰۱
M_1	۵۰-۸۰۰	۰/۹۸±۰/۰۰	۰/۰۳۲
L	۲۵-۴۰۰	۰/۹۴±۰/۰۴	۰/۲۲۸
LH_1	۲۵-۴۰۰	۰/۰۸±۰/۰۱	۰/۰۲۰
Q_1	۱۰۰-۲۰۰۰	۰/۹۷±۰/۰۳	۰/۱۲
P_1	۱۰۰-۶۰۰۰	۰/۷۹±۰/۱۹	۰/۰۰۱
B_2a	۱۰۰-۴۰۰۰	۰/۴۵±۰/۳۵	۰/۰۰۰
G_2a	۵۰-۱۴۰۰		۰/۰۰۰

جدول ۴-۱۸ - خاصیت جهش‌زایی آفلاتوکسین B_1

آفلاتوکسین	مقدارجهش‌زایی	جاندارها	سرطانزایی
B_1	۱۰۰	موش‌صحرایی	بالاترین قابلیت ایجاد سرطان کبد
B_2	۰/۲	راسو	وجود دارد
		ماهی قزل‌آلا	
		موش‌صحرایی	ضعیف
G_1	۳/۳	راسو	کمتر از آفلاتوکسین B_1
		ماهی‌قزل‌آلا	
		موش صحرایی	
G_2	۰/۱	راسو	غیرممکن
		ماهی قزل‌آلا	
M_1	۳/۲	موش‌صحرایی	کمتر از آفلاتوکسین B_1
L	۲۲/۸	راسو	$\frac{1}{3}$ سرطانزایی آفلاتوکسین B_1
		ماهی قزل‌آلا	
		راسو	$\frac{1}{2}$ سرطانزایی آفلاتوکسین B_1
		ماهی‌قزل‌آلا	

ارتباط قابل توجهی بین جهش‌زایی بودن و سمیت انواع آفلاتوکسینها وجود دارد که در جدول ۴-۱۹ این ارتباط در مقایسه با آفلاتوکسین B_1 به تنهایی مشخص گردیده است (۴۲، ۳۲).

جدول ۴-۱۹ - ارتباط بین سمیت و خاصیت جهش‌زایی آفلاتوکسین B_1

آفلاتوکسین	سمیت	جهش‌زایی
B_1	بسیاربالا	در سالمونلاتی فی‌موریوم به اثبات رسیده است.
B_2	۲/۴ مرتبه کمتر از آفلاتوکسین B_1	۵۰۰ مرتبه کمتر از آفلاتوکسین B_1
B_2a	۲۰۰ مرتبه کمتر از آفلاتوکسین B_1	۱۰۰۰ مرتبه کمتر از آفلاتوکسین B_1
B_1s	مشخص نشده و عقیده برآن است که غیرسمی است	-
D_1	۱۸ مرتبه کمتر از آفلاتوکسین B	۱۵۰ مرتبه کمتر از آفلاتوکسین B_1
G_1	۱/۶ مرتبه کمتر از آفلاتوکسین B_1	۳۰ مرتبه کمتر از آفلاتوکسین B_1
M_1	به اندازه سمیت آفلاتوکسین B_1	۳۰ مرتبه کمتر از آفلاتوکسین B_1
P_1	۱۵ مرتبه کمتر از آفلاتوکسین B	۱۰۰۰ مرتبه کمتر از آفلاتوکسین B_1
Q	۱۸ مرتبه کمتر از آفلاتوکسین B_1	۸۳ مرتبه کمتر از آفلاتوکسین B_1

۷-۴- اثرات بیوشیمیایی

مطالعات زیادی در حال انجام است تا مکانیزم و راههای مختلف اثرات بیوشیمیایی آفلاتوکسینها در هر سطح را در آزمایشگاه[۱] و در موجود زنده[۲] مشخص نماید. در موجود زنده عمل متقابل توکسین با اجزای متشکله سلولی، بخصوص نوکلئیک اسید و واسطه‌های متابولیسم پروتئین، حائز اهمیت فراوان است.

آفلاتوکسین می‌تواند به عنوان یک باز دارنده بیوسنتز مواد عمل کند، به‌طوری که دوزهای بالای آن باعث بازدارندگی کلی شده و دوزهای کمتر آن به تدریج بر سیستمهای مختلف اثر می‌کند. همچنین اثر مستمر آفلاتوکسین بر روی سلولهای کبدی را می‌توان بصورت زیر طبقه‌بندی نمود، بطوری که هر مرحله نتیجه مرحله قبلی باشد (۳۸، ۳۷).

۱- عمل متقابل با DNA و ممانعت از عمل پلیمرازهایی که مسئول سنتز DNA و RNA هستند.

1. in Vitro 2. in Vivo

۲- جلوگیری از سنتز DNA
۳- جلوگیری از سنتز RNA و باز داشتن RNA پیامبر (mRNA)
۴- تغییر دادن مورفولوژی یا شکل هسته
۵- کاهش در بیوسنتز پروتئین

۷-۵- اثر متقابل با DNA

آفلاتوکسین می‌تواند به DNA متصل شود و در ساختمان مولکولی آن تغییر ایجاد کند. آفلاتوکسین B_1 که از لحاظ بیولوژیکی فعالترین نوع آفلاتوکسین است قویتر از آفلاتوکسینهای G_1 و G_2 وارد واکنش می‌شود.

براساس عمل متقابل آفلاتوکسین با پورین و مشتقات پورینی که بوسیله دستگاه اسپکتروسکپی تعقیب شده است، یک تفاوت اساسی بین آفلاتوکسین و سایر ترکیباتی که با DNA واکنش نشان می‌دهند، این است که آفلاتوکسین با DNA یک رشته‌ای هم می‌تواند وارد عمل متقابل شود. معهذا اتصال با DNA آنچنان ضعیف است که عبور از یک ستون کروماتوگرافی[1] به سادگی کمپلکس را از هم جدا می‌کند. این عمل متقابل می‌تواند ممانعت از سنتز DNA و RNA را بطور همزمان توسط آفلاتوکسین توضیح دهد.

۷-۶- جلوگیری از سنتز DNA

ممانعت از بیوسنتز اسیدنوکلئیک می‌تواند به علت غیرفعال کردن سیستمهای سازنده آنزیم باشد، و یا ممکن است به این خاطر باشد که ملکولهای DNA ایی که در سلولهای صدمه دیده وجود دارند دیگر نمی‌توانند مدل خوبی برای همانندسازی[2] باشند.

این ضعف همانند سازی DNA تحت تأثیر آفلاتوکسین، با عمل اکتینومایسین[3] قابل مقایسه است (بخصوص که ساختمان این دو ملکول از بعضی جنبه‌ها مشترک است). اکتینومایسین بدرون زنجیر مارپیچی دوگانه DNA نفوذ کرده و در جایگاهی که حاوی گوانین است جای می‌گیرد. در حالی که آدنین و تیمین بصورت تغییر نیافته باقی می‌مانند. مطالعات دقیقی در مورد عملکرد آفلاتوکسین B_1 بر روی متابولیسم کبد به عمل آمده است که طی آن از

1. Sephadex 2. Daplication 3. Actinomycin

برداشت بافت کبد[1] برای تحریک سنتز استفاده شده است.

چنانچه یک برداشت کبدی جزئی در فرد سالم انجام شود، پُرسازی جبرانی حاصل خواهد شد که این فرآیندی است که توسط آفلاتوکسین از آن ممانعت می‌شود.

اگر ۶۰-۳۰ میکروگرم در روز توکسین در طی پنج روز قبل از عمل جراحی برداشتن $\frac{2}{3}$ از جگر تزریق شود، حیوان تا ۲۴ ساعت پس از جراحی تلف خواهد شد که این نشانه بارزی است از نقش آفلاتوکسین در جلوگیری از سنتز DNA می‌باشد.

۷-۷-کاهش سنتز RNA

آفلاتوکسینها بوسیله عمل متقابل و واکنش با DNA می‌توانند از نسخه‌برداری DNA توسط RNA پلیمراز ممانعت کرده و بدین صورت از بیوسنتز RNA نیز جلوگیری نمایند (۱۳). فعالیت RNA سیتوپلاسمی به‌کل متوقف می‌شود در حالیکه این حالت در مورد RNA هسته‌ای خفیف‌تر است. فعالیت RNA هسته‌ای در مراحل اولیه کاهش پیدا می‌کند و بعد از ۱۵ دقیقه تماس با آفلاتوکسین، بیوسنتز، به میزان ۹۵-۹۰٪ متوقف می‌شود.

نتایج آزمایشات بر روی موجودات زنده و بر روی سلولهای کبدی موش نسبت به‌بررسیهای آزمایشگاهی بر روی سلولهای موجود درکشتی از بافتهای انسانی (بعنوان مثال سلولهای کلیوی Helas3 و T یا سلولهای changکبد) سریعتر بدست می‌آید.

این پدیده در دوزهای کم (۰/۵-۱mg/kg) بازگشت‌پذیر است و فرآیندهای بیوسنتزی مختلف طبق نظم زیر مجدداً شروع می‌شود:

پس از ۲۴ ساعت سنتز کلی RNA هسته‌ای، سپس سنتز RNA هستک، و پس از ۴۸ ساعت سنتز DNA از سرگرفته می‌شود.

۷-۸- تغییرات مورفولوژی هستک

چنانچه برای موشهای نر[2] به وزن ۱۰۰گرم یک دوز آفلاتوکسین به میزان ۱ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن بطور داخل صفاقی تزریق کنیم، پس از ۳۶ ساعت موجب

---

1. Hepatectomy 2. Fischer

تغییر ساختمانی در هستک سلولهای کبدی می‌شود، این امر بستگی به ممانعت از فعالیت آنزیمی دارد.

به هرحال این بی‌نظمی هستک حتی به دنبال یک دوز آفلاتوکسین B_1 حداقل به میزان ۰/۲ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن، قابل مشاهده است. و این پدیده با مصرف ۰/۱mg/kg اتفاق نمی‌افتد. علیرغم این مطلب مشاهداتی در دست است که نشان می‌دهد این غلظت، فعالیتهای آنزیمی را به میزان ۵٪ کاهش می‌دهد.

مشاهدات مشابهی در رابطه با هستک سلولهای کبد جنین جوجه در کشت بافت[1] به‌عمل آمده است. این تغییرات از نظر مورفولوژیکی بعنوان قطعه قطعه شدن هستگی[2] تعبیر شده‌اند (۲۳ و ۱۳).

۷-۹-کاهش در بیوسنتز پروتئین

قابلیت ممانعت کنندگی آفلاتوکسین B_1 از سنتز پروتئینها بیش از سرعت و میزان اثر ممانعت کنندگی آن از سنتز DNA و RNA است (جدول ۴-۲۰). بعد از نشاندار کردن اسید آمینه‌لوسین مشخص شده که پس از ۳ تا ۸ ساعت مصرف دوزهای خوراکی آفلاتوکسین B_1 به میزان ۳mg/kg، ۶۰ درصد سنتز پروتئین در سلولهای کبد موش متوقف گردیده است (۳۲).

همچنین در بررسی میمون بصورت آزمایشگاهی بعد از ۱۳۰-۳/۵ ساعت مصرف ۲mg/kg آفلاتوکسین B_1، ۴۵ درصد سنتز پروتئین در سلولهای کبد متوقف شده است و تزریق صفاقی ۶۰mg/kg آفلاتوکسین B_1 به جگر موش موجب شده است که ۳۰ درصد از سنتز پروتئین بعد از گذشت ۱ ساعت متوقف گردد.

اثر ممانعت کنندگی آفلاتوکسین B_1 و تقلیل بیوسنتز پروتئینها تحت تأثیر دو عمل صورت می‌پذیرد (۴۲ و ۳۲):

- بر هم خوردن نظم پلی ریبوزمها
- ایجاد ریبوزمهای مارپیچی

---

1. Tissueculture 2. Nucleolas segregation

بر هم خوردن نظم پلی ریبوزمها:

بعد از استفاده از آفلاتوکسین B_1 در کبد موش، سنجاب، میمون و کشت سلولهای کشت داده شده و بررسی بافتها مشاهده گردیده که ۷۰ درصد پلی زومهایی که در معرض ۱/۵mg/kg دوز تزریق صفاقی آفلاتوکسین B_1 بوده‌اند بعد از ۱۸ ساعت، تبدیل به مونوزمها شده‌اند. همچنین وقتی کبد موش در معرض ۱۵mg/kg آفلاتوکسین B_1 به صورت تزریق صفاقی قرار گرفت بعد از ۷ روز، ۵۰ درصد پلی زومهایش تبدیل به مونوزم شد.

- ایجاد ریبوزمهای مارپیچی:

حضور پلی ریبوزمهای مارپیچی بعد از تزریق ۱mg/kg آفلاتوکسین B_1 به جگر و کلیه سنجاب و موش، پس از گذشت ۱۵ دقیقه از تزریق با میکروسکوپ الکترونی تأیید شده است. هر مارپیچ ریبوزم دارای ۳۰-۲۵ ریبوزم بوده که با زاویه °۷۰-۶۰ نسبت به یکدیگر قرار گرفته‌اند و مانع از کارکرد صحیح mRNA می‌شوند.

آفلاتوکسین M_1 و G_1 نیز مانع از سنتز پروتئینها در جگر و کلیه سنجاب می‌شوند. اما اثر آنها در ممانعت کنندگی سنتز پروتئین به اندازه آفلاتوکسین B_1 نمی‌باشد. سنتز پروتئینهای پلاسما «آلبومین، فیبرونوژن، آلفا- ۲گلبولین، و آلفا اسیدگلیکو پروتئین» بعد از اضافه کردن مقادیر ۱۲۵-۱۰۰۰ $\mu g/100g$ آفلاتوکسین B_1، ظرف ۴-۲ ساعت متوقف شده است (۴۲ و ۳۲).

۷-۱۰- ممانعت از سنتز چربیها

در بررسی آزمایشگاهی و بافتی مشخص شده که آفلاتوکسین B_1 مانع از سنتز لیپیدها می‌گردد، و از ورود پارافسفات به داخل فسفولیپیدهای جگر و استات به داخل چربیهای جگر ممانعت می‌کند.

آفلاتوکسین B_1 همچنین مانع از ورود استات به داخل تری‌گلسیریدها، اسیدهای چرب، کلسترول و استرکلسترول جگر می‌شود و مصرف ۲-۵mg/kg آفلاتوکسین به شکل تزریق صفاقی موجب شده که سنتز کلسترول در جگر سنجاب بطور کامل متوقف گردد (۴۲ و ۳۲).

جدول ۴-۲۰ تأثیر غلظت آفلاتوکسین B_1 بر مقدار سنتز DNA ، RNA و پروتئین توسط فلاویاکتریوم آرنتیاکوم، ارقام داده شده بیانگر میانگینی حاصله از افزایش مقدار آفلاتوکسین B_1 و میزان سنتز DNA، RNA و پروتئین در ۱۰ میلی‌گرم از محیط کشت حاوی باکتری پس از ۴ دوره اینکوباسیون در مقایسه با مقدار سنتز DNA، RNA و پروتئین نمونه شاهد که فاقد آفلاتوکسین B_1 بوده، می‌باشد.

پروتئین (Mg)	RNA (Mg)	DNA (Mg)	B_1 (Mg/l)
۱۹۰	۷۰	۳۳	۰
۱۹۰	۶۰	۲۷	۱۰
۱۸۰	۶۰	۲۱	۲۵
۱۷۰	۶۰	۰	۵۰
۱۶۵	۵۰	-	۱۰۰

۷-۱۱- ذخیره آفلاتوکسین در بافتها

در کالبد شکافی از بافتهای اجساد ۲۳کودک مبتلا به آنسفالوپاتی دژنراسیون چربی[1] در اثر مصرف آفلاتوکسین B_2 دیده شده که مقدار این توکسین در کبد برابر ۰/۰۹۳ mg/kg، در مدفوع ۰/۱۲۳ میلی‌گرم در کیلوگرم، در معده ۰/۱۲۷mg/kg و در صفرا ۰/۰۸mg/lit بوده است.

نمونه‌های ادرار ۵۱کودک مبتلا به بیماری فوق مورد مطالعه قرار گرفته است. در ۸ نمونه از ادرار آنها آفلاتوکسین B_1 مشاهده شده است. در حالی که از تجزیه ادرار ۲۳کودک سالم حضور هیچگونه آفلاتوکسینی گزارش نشده است، که دلیل عدم تماس قبلی این کودکان با آفلاتوکسین می‌باشد. ذخیره شدن آفلاتوکسین در بافتهای بدن میمون هم شبیه انسان است. آفلاتوکسین در مغز، کبد، کلیه، قلب و صفرای بعضی از حیوانات، حداقل ۲ روز و حداکثر ۳ روز باقی می‌ماند.

۸- روشهای تشخیص، تخلیص، و شناسایی آفلاتوکسینها

اکثر، متدهای استخراج، تشخیص و شناسایی آفلاتوکسینها، براساس قابلیت انحلال

1. Encephalopathy-Fatty-Degenerative

آفلاتوکسینهادرحلالهای‌قطبی‌مانندکلروفرم،متانول،اتانول،استون،بنزن وغیرقابل‌نامحلول‌بودن آنها در حلالهای غیرقطبی (لیپیدی)، مانند هگزان، اتردوپترول و دی‌اتیل‌اتر، صورت می‌گیرد.

استخراج چربی در نمونه‌های مورد آزمایش هنگامی ضروری است که بیش از ۲۰٪ چربی در ماده مورد آزمایش وجود داشته باشد. این چربیها می‌تواند، یا بوسیله اتردوپترول و یا پاپنتان، و یا با استفاده از هگزان در دکانتور، در حالی که خوب تکان داده می‌شود، استخراج گردد. سپس عصاره استخراج شده با آب مقطر، رقیق می‌گردد و بوسیله کلروفرم استخراج می‌شود و فاز محلول درکلروفرم لایه‌ای جدا گانه‌ای را تشکیل می‌دهد. پس از جدا شدن حلال، باقی مانده آن را در مخلوطی از پترولیوم اتر، متانول و آب، حل کرده وبا تکانهای شدید آن را جدا می‌کنند. سپس فاز زیرین (متانول) را بوسلیه اتر دوپترول دوباره شستشو داده و تحت فشارکم تبخیر می‌کنند.

روش خالص‌سازی آفلاتوکسینها بوسیله کروماتوگرافی لایه نازک صوت می‌گیرد اگر صفحه را در معرض اشعه ماورای بنفش قرار دهند ظهور یک نقطه فلورسانس آبی، زیر امواج بلند ماورای بنفش دال بر وجود آفلاتوکسین می‌باشد، در واقع آفلاتوکسینها وقتی در معرض نور ماورای بنفش با طول موج بالا قرار گیرند، دارای خاصیت فلورسانس شدیدتری هستند. این خاصیت موجب می‌شود که این ترکیبات حتی در مقادیر بسیار جزئی (۰/۵ نانوگرم یاکمتر در نقطه) ngr/spot ۰/۵ مشخص شوند.

۸-۱- جداسازی و تشخیص آفلاتوکسینها به روش T.L.C

روش کروماتوگرافی لایه نازک یاT.L.Cبه علت سرعت عمل، حساسیت و سادگی کار، در اکثر آزمایشگاهها مورد استفاده قرار می‌گیرد. در این روش انتخاب نوع ماده جاذب از اهمیت خاصی برخوردار است و معمولاً سیلیکاژل همراه باگچ در لایه‌های نازک به ضخامت ۰/۲۵-۰/۵ میلی‌متر مورد استفاده قرار می‌گیرد.

حلالهای‌رایج‌مورداستفاده‌جهت‌جداسازی‌آفلاتوکسینهای‌مورد‌آزمایش‌عبارتنداز: (۲۴)

کلروفرم/متانول (۹۳:۷ تا ۹۹:۱)

کلروفرم/استون (۸۵:۱۵) تا (۹۰:۱۰)

کلروفرم/استون/اتانول (۸۹:۱۰:۱)

متانول/آب/اتر (۸۲۵:۱۵۰:۲۵)

بنزن/اتانول/آب (۳:۱:۹۶)

معمولاً عمل تبخیر برحسب درجه حرارت و حلال مورد استفاده از ۴۵ دقیقه تا ۳ ساعت متغیر است.

در این روش با اندازه گیری R_F که عبارت است از مسافت طی شده توسط ماده مجهول نسبت به مسافتی که حلال پیموده و مقایسه آن با R_F استاندارد، نمونه مورد آزمایش تشخیص داده می‌شود.

۸-۲- تشخیص و شناسایی آفلاتوکسین به روش گاز کروماتوگرافی ـ اسپکترومتری جرم (G.C.M)

شناسایی آفلاتوکسین به کمک روش گاز کروماتوگرافی - اسپکترومتری جرم، یک روش سریع برای آفلاتوکسینهای B_1 و B_2 می‌باشد که در این روش، تشخیص به کمک بمباران الکترونی و شناسایی یون انتخابی صورت می‌گیرد.

در این روش ابتدا عصاره را خالص نموده و سپس به داخل ستون مخصوص تزریق می‌شود. حد تشخیص این روش برای آفلاتوکسینهای B_1 و B_2 ۰/۱ppb می‌باشد.

۸-۳- تشخیص و شناسایی آفلاتوکسینها با روش کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا (HPLC)

در روش HPLC ابتدا به کمک روشهای شیمیایی، مشتقات آفلاتوکسینهای مورد بررسی را تهیه می‌نمایند. این عمل بدین منظور صورت می‌گیرد تا قدرت تشخیص، حساسیت و میزان انتخابی و اختصاصی بودن روش افزایش پیدا کند.

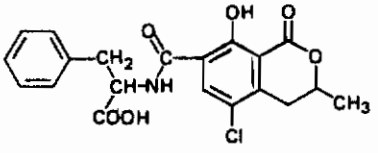
برای مثال، آفلاتوکسینهای B_1 و G_1 به کمک مخلوط اسیدتری فلورواستیک و آب به همی‌استالهای[1] B_2 و G_2 که خاصیت فلورسانس بیشتری دارند، تبدیل می‌شود و سپس این مشتقات بوسیله کروماتوگرافی مایع با فاز معکوس جدا شده و تفکیک می‌گردد. این روش در

1. Hemiacetaldehydes

مقایسه با سایر روشها قابل اطمینانترین و معمولترین روش استفاده برای آنالیز و شناسایی آفلاتوکسینها می‌باشد که بعنوان یک روش استاندارد و برتر در مقابل سایر روشهای جدید، شناخته شده است (۴۰، ۳۳، ۳۱ و ۲۷).

۹- اوکراتوکسین[1]

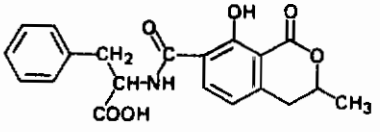
اوکراتوکسینها جزو ترکیبات فنیل آلانینی بوده که دارای یک هسته ایزوکومارین می‌باشند (۴۵، ۴۰، ۳۵ و ۳۱).



Ochratoxin A

شکل ۴-۱۹ اوکراتوکسین A $(C_{20}H_{18}O_6NCl)$

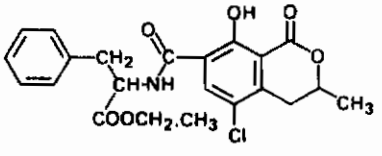
نقطه ذوب ۹۴-۹۶°C



Ochratoxin B

شکل ۴-۲۰ اوکراتوکسین B $(C_{20}H_{19}O_6N)$

نقطه ذوب 221°C

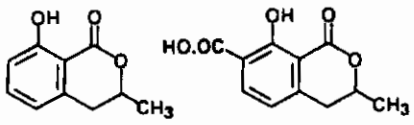


شکل ۴-۲۱ اوکراتوکسین C یا اتیل استراوکراتوکسین A

$(C_{22}H_{22}O_6NCl)$

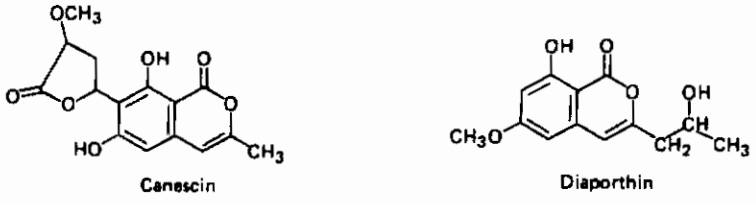
---

1. Ochratoxin.



شکل ۴-۲۲ اوکراسین یا ملین (دی هیدروکسی - ۳ و ۴ -دی هیدرو - ۸ - هیدروکسی ۳- متیل ایزوکومارین)

تجزیه‌اوکراتوکسین سبب‌ایجاد دی‌هیدروایزوکومارین می‌شود. دی‌هیدروایزوکومارین در ادرار سنجاب آزمایشگاهی که با سم اوکراتوکسین تغذیه شده بود، مشاهده گردیده است. هیدرولیز اوکراتوکسین A با آنزیمهای پروتئولیتیک ایجاد ال- فنیل‌آلانین و ماده‌ای به نام اوکراتوکسین آلفا (۷-کربوکسی، ۵-کلرو، ۸- هیدروکسی، ۳ و ۴ -دی‌هیدرو، ۳R- متیل ایزوکومارین)می‌کند.این ماده‌درعصاره‌صفراهم‌دیده‌می‌شود.ساختمان‌شیمیایی‌اوکراتوکسینها شبیه ساختمان شیمیایی توکسین Diaporthin است که بوسیله Endothia parasitica تولید می‌شود.علاوه براین به canescin تولید شده بوسیله penicillium canescens نیز شباهت دارد.



شکل ۴-۲۳ ساختمان شیمیایی Diaporthin و Canescin

اوکراتوکسینها به مقدار زیاد و متنوع بوسیله Aspergillus ochraceus تولید می‌شوند. این توکسینها خیلی ساده‌تر از آفلاتوکسینها، استخراج می‌گردند.

سمیت اوکراتوکسین تابعی از سهولت از دست دادن گروه فنلی آن می‌باشد (۴۰ و ۳۱).

برای مثال بیشترین سمیت را اوکراتوکسین A دارد و LD_{50} این سم برای جوجه اردک یک روزه ۲۵ میکروگرم به ازای هر کیلوگرم وزن جوجه است. البته مقدار ۵۰$\mu g/kg$ نیز در بعضی موارد گزارش شده است.

LD_{50} این سم در مورد موش Albino به روش خوراکی در نرها ۲۲mg/kg و در مادهها ۲۰mg/kg میباشد. این مقادیر LD_{50} درست نصف مقداری است که در مورد LD_{50} آفلاتوکسین B_1 گزارش شده است. LD_{50} اوکراتوکسین در مورد لارو یا نوزاد میگوی آبهای شیرین (Artemia salina) حدود ۱۰/۱μg/ml میباشد. ترکیب متیل اتر اوکراتوکسین A دقیقاً به اندازه اوکراتوکسین A سمی میباشد. همچنین مشخص شده که اوکراتوکسین C نیز به اندازه اوکراتوکسین A سمیت دارد. ولی LD_{50} این توکسین در جوجههای یک روزه ۲۱۶ میکروگرم است، در حالی که LD_{50} اوکراتوکسین A در مورد همین جوجهها ۱۶۶ میکروگرم تعیین شده است.

اوکراتوکسین سبب مرگ جوجهها و برهها میشود و همچنین سبب فلج شدن و خرابی دستگاه تنفس دراین موجودات است. درگوسالهها و خوکها همراه با بهم چسبیدن[1] گلبولهای قرمز خون درکبد و ایجاد ضایعات قلبی موجب مرگ میشود.

این توکسین در جوجههای ۴ هفتهای نژاد White leghorn، باعث تأخیر بلوغ جنسی میشود، و زمانی که غلظت سم افزایش مییابد، مقدار تولید تخممرغ نیز کاهش پیدا میکند. همچنین اوکراتوکسین سبب ضایعات کلیوی و گاهی اوقات مرگ حیوان میشود. ترکیب شدن آنزیم فسفوریلاز کبدی بااوکراتوکسین سبب افزایش گلیکوژن در این بافت میشود. اوکراتوکسین به همراه یکی از متابولیتهای ناشی از هیدرولیز خود، مانند دیهیدروایزوکومارین سبب تأثیر منفی بر بافت تنفسی میشود، در واقع اثر آن روی میتوکندری بافت تنفسی است. کپکهایی که قابلیت تولید اوکراتوکسینها را دارند شامل Aspergillus ochraceus که بیشتر از همه سم تولید میکند و کپکهای دیگری نظیر A.sulphureus، Penicillium viridiatum، A.mellcus و A.alliaceus میباشند. کپک A.sulphureus دارای بازدهی زیاد تولید اوکراتوکسین است و چنانچه به مدت ۱۰-۸ روز روی محیط کشت حاوی گلوکز یا ساکارز که دارای ۱۰mg/lit پتاسیم و ۲۵mg/lit فسفر در دامنه pH = ۶-۶/۳ پرورش یابد، مقدار قابل توجهی توکسین تولید میکند. همچنین مقدار اوکراتوکسین B و A ایجاد شده بوسیله کپک A.ostianus تقریباً به اندازه میزان تولید آفلاتوکسین در این کپک میباشد (۴۵ و ۳۵).

---

1. Agglutination

۹-۱- استخراج و شناسایی اوکراتوکسین

همانطور که قبلاً اشاره شد استخراج اوکراتوکسینها نسبت به آفلاتوکسینها به‌مراتب ساده‌تر است. به این منظور ابتدا با کلروفرم این توکسین از ماده غذایی استحصال شده و سپس بوسیله حلال هگزان رسوب داده می‌شود. آنگاه به کمک فیلتراسیون مجدداً سم جدا شده را در کلروفرم حل می‌کنیم تا خلوص آن افزایش یافته و متعاقباً به کمک محلول آبی ۰/۵ مولار بیکربنات سدیم، دوباره خالص‌سازی و در انتها به کمک روش TLC بر روی ستون سلیکاژل شناسایی می‌شود.

حلالهای مورد استفاده در شناسایی اوکراتوکسین عبارتند از (۳۹ و ۳۰):

اسیداستیک - بنزن به نسبت ۴:۱

اسیداستیک - متانول - بنزن به نسبت ۱۲:۲:۱

اتیل‌استات - تولوئن - اسیدفرمیک ۹۰٪ به نسبت ۵:۴:۱

در انتها به کمک روش اسپکتروفلورودنسیمتری[1] و روش فلورسانس[2] مقدار دقیق اوکراتوکسین، مشخص می‌گردد.

۹-۱-۱- شناسایی اوکراتوکسینها به روش Bioassay

در روش bioassay از باسیلوس سرئوس واریته میکوئیدس[3] استفاده می‌شود میزان بازدهی و تولید اوکراتوکسین با توجه به محیط کشت مصرفی متفاوت خواهد بود، البته شرایط محیطی نیز تأثیر می‌گذارد، مثلاً اگر در فرایند کشت ارلن‌مایر یا فرمانتور راکه حاوی محیط کشت است، خوب تکان دهیم، بازدهی افزایش می‌یابد. همچنین حضور منابعی نظیر اسیدگلوتامیک و پرولین به میزان ۸gr/lit و سایر منابع ازته، به میزان ۶۰ gr/lit-۱۵ تأثیر عمده‌ای در بازدهی خواهد داشت.

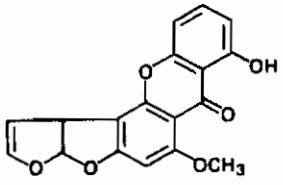
شرایط مناسب تولید اوکراتوکسین در دامنه‌حرارتی $۲۸^{\circ}C$ بعد از گذشت ۱۴-۷ روز و در محدوده pH = ۶-۶/۳ می‌باشد (۳۰، ۲۹).

---

1. Spectrofluorodensitometry Method
2. Fluorescence method
3. Bacillus Cereus Var.Mycoides.

۱۰- استریگماتوسیستین[1]

فرمول شیمیایی استریگماتوسیستین $C_{10}H_{12}O_6$ می‌باشد و ساختمان شیمیایی آن در شکل زیر مشخص شده است (۴۲، ۲۵ و ۱).



شکل ۴-۲۴ ساختمان شیمیایی استریگماتوسیستین

استریگماتوسیستین به صورت کریستالهای زردرنگی است که نقطه ذوب حدود ۲۴۶°C دارد و در آب نامحلول می‌باشد.

از نظر ساختمانی این توکسین دارای هسته دی‌هیدروفوروبنزوفوران می‌باشد. استریگماتوسیستین بوسیله Aspergillus versicolor تولید می‌شود.

استریگماتوسیستین، سمیت کمتری نسبت به آفلاتوکسینها دارد و LD_{50} این سم برای موش‌ها عبارت است از (۴۲، ۳۵ و ۲).

بصورت خوراکی ۱۶۶ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم برای ماده‌ها
بصورت خوراکی ۱۲۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم برای نرها
بصورت داخل صفاتی ۶۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم برای نرها

LD_{50} در مورد میمون‌ها ۳۲mg/kg می‌باشد و در نوزاد میگوی آبهای شور LD_{50} ۰/۵۴μg/ml است.

استریگماتوسیستین در مقادیر بین ۱۰۰ mg/kg-۱۸ سبب نکروز بافت کبدی می‌شود. وسعت صدمه‌ای که به بافت وارد می‌شود بستگی به نحوی مصرف سم دارد که آیا بصورت

1. Sterigmatocystin.

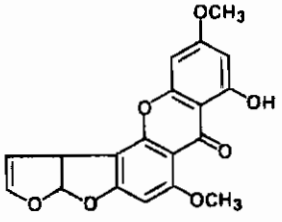
خوراکی مصرف گردیده یا صفاقی تزریق شده است.

در مقادیر بسیار بالای سم یعنی ۱۴۴mg/kg نکروز بافتها همراه با پرخونی کلیه‌ها می‌باشد. این مایکوتوکسین بعد از متابولیسم در طول ۲۴-۱۲ ساعت در ادرار، مدفوع و بخصوص دستگاه گوارش موش ظاهر می‌گردد.

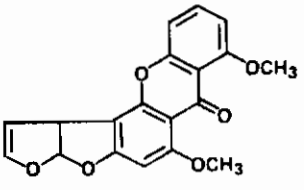
دانشمندان مختلف مشخص کرده‌اند که استریگماتوسیستین یک ترکیب سرطانزا است و از نظر ساختمانی، شباهت زیادی به آفلاتوکسینها دارد (۴۲، ۳۵ و ۲).

مایکوتوکسینهای دیگری نیز شناسایی شده‌اند که شباهت زیادی به استریگماتوسیستین دارند، مانند ۶- متوکسی استریگماتوسیستین ($C_{19}H_{14}O_7$) با نقطه ذوب ۲۲۳°C° و $[\alpha]_D^{25}$=۳۶۰.

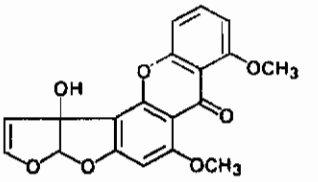
اورتومتیل استریگماتوسیستین که از A.flavus ایزوله شده‌اند و همچنین آسپرتوکسین که از ۲گونه متفاوت A.flavus جدا گردیده، از نظر ساختمان شیمیایی و شکل فضایی مشابه استریگماتوسیستین می‌باشند (۴۲، ۳۵ و ۲).



شکل ۴-۲۵ ساختمان شیمیایی ۶- متوکسی استریگماتوسیستین



شکل ۴-۲۶ ساختمان شیمیایی اورتومتیل استریگماتوسیستین



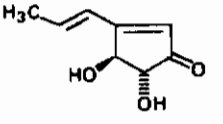
شکل ۴-۲۷ ساختمان شیمیایی آسپرتوکسین

۱۰-۱- استخراج و شناسایی استریگماتوسیستین

روش استخراج و آنالیز فیزیکوشیمیایی و شناسایی استریگماتوسیستین در غلات و دانه‌های روغنی بدین صورت است که ابتدا این توکسین به مشتقات منواستات تبدیل می‌شود تا خاصیت فلورسانس آن افزایش یابد. به این ترتیب، طیف جذبی UV استریگماتوسیستین بخوبی قابل تشخیص است و می‌توان این ترکیب را بخوبی از آنتراکینون‌ها تفکیک نمود (۴۲، ۳۵، ۲ و ۱).

۱۱- ترین یا اسید تریک[1]

تریک اسید یا ترین، آنتی‌بیوتیکی است که بوسیله کپک A.terreus تولید می‌شود. فرمول شیمیایی این اسید عبارت است از $C_8H_{10}O_3$ و ساختمان شیمیایی این توکسین در شکل زیر مشخص گردیده است.



شکل ۴-۲۸ ساختمان شیمیایی تریک اسید

تریک اسید خاصیت یک اسید حقیقی را ندارد و LD_{50} آن، در روش تزریق صفاقی ۷۱-۱۱۹mg/kg گزارش شده است.

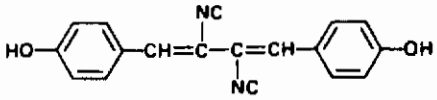
1. Teric. Acid.

بعضی از گونه‌های A.terreus، علاوه بر ترین، به طور هم زمان تولید سیترینین می‌کنند. همچنین این کپک قادر است اسید سوکسنیک و اسیدا گزالیک را نیز تولید کند.

A.terreus کپکی است که به مقدار زیاد از خاک و گاهی اوقات از سبزیجات ایزوله شده است و علاوه بر ترین، فلاویپین (Flavipin) یا ۳ و ۴ و ۵- تری هیدروکسی -۶- متیل فتالیک آلدهید[۱] را نیز تولید می‌کند. (۱)

۱۲- گزانتوسیلین[۲]

گزانتوسیلین مایکوتوکسینی است که بوسیله A.chevulievi و بعضی از گونه‌های کپک نظیر Aspergillus notatum تولید می‌شود. این سم در گروه سموم کبدی[۳] می‌باشد.



شکل ۴-۲۹ ساختمان شیمیایی گزانتوسیلین

LD_{50} این سم برای موش به صورت تزریق عضلانی ۲۵mg/kg است و در تزریق صفاقی ۳۵mg/kg و در مصرف خوراکی ۴۰ mg/kg می‌باشد (۱).

۱۳- فوماگیلین[۴]

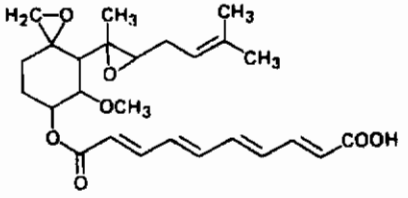
این سم اولین‌بار درسال ۱۹۵۴ از پالیده کشت کپک A.fumigatus استخراج گردید(۲).

فرمول بسته آن $C_{26}H_{34}O_7$ است و اثر سمیت سلولی[۵] زیادی دارد. فوماگیلین، مانع از سنتز اسیددزوکسی ریبونوکلئیک یا DNA می‌شود. و از این نظر عملکرد آن شبیه تأثیر

1. 3, 4, 5- Trihydroxy- 6 Methyylphthalic
2. Xanthocillin
3. Hepatotoxic.
4. Fumagillin.
5. Cytotoxic.

توکسینهای Sporofusarin، barbituric Acid و Streptomycin می‌باشد.

LD_{50} این سم در موش در فرم تزریقی عضلانی ۸۰۰ mg/kg و در فرم خوراکی ۲۰۰۰ mg/kg می‌باشد.

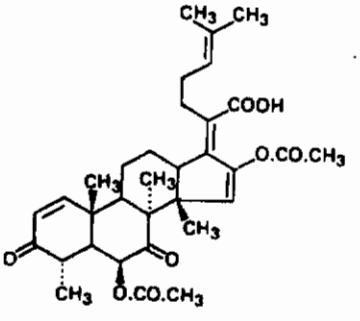


شکل ۴-۳۰ ساختمان شیمیایی فوماگیلین

سمیت این توکسین بالا نبوده و قابلیت آن را دارد که به عنوان دارو علیه بیماریهایی نظیر اسهال‌آمیبی[1] استفاده شود. امروزه تحت عنوان دارویی بنام Fumidile یا Fumogilline، amebaciline، phagopedine sigma، باکنترل دقیق قدرت سمیت آن مصرف می‌شود. (۲)

۱۴- اسید هلولیک[2]

اسیدهلولیک، تری‌ترپنی است که در فرم طبیعی و ثابت به صورت دی‌استات می‌باشد. فرمول شیمیایی هلولیک اسید $C_{33}H_{44}O_8$ است (۱).



شکل ۴-۳۱ ساختمان شیمیایی هلولیک اسید

1. Amoebic Dysentry
2. Helvolic Acid.

نقطه‌ذوب این توکسین $^{\circ C}$ ۲۱۱-۲۰۸ می‌باشد و سایر خصوصیات فیزیکی آن به‌صورت زیر است:

$[\alpha]_D^{25}$ = ۱۲۴° (کلروفرم) و λmax ۳۲۲nm (E =۹۸) و ۲۳۱nm (E =۱۷/۳۰۰)

LD_{50} هلولیک اسید در تزریق صفاقی به میزان ۴۰۰mg/kg و در تزریق وریدی ۲۵۰mg/kg و بصورت خوراکی ۱mg/kg است. اگر همین مقدار خوراکی را در حالت تزریق وریدی به‌کار ببریم، با تغییر شکل چربیها درکبد مواجه می‌شویم.

جهش یافتگان A.fumigatus و A.helvole، تولید مقدار زیادی اسیدهلولیک می‌کنند (۱).

منابع

1- Abedi. Z.H. et Scott P.M. 1969.--Detection of toxicity ofaflatoxins, sterigmaticystin and other fungal toxins by lethal action on zebra fish larvae. J. Ass. Offic. Anal. Chem., t. LII, p. 963-969.

2- Albarak. et Yamagishi S. 1970.--Effects of ultraviolet irradiation on the destruction of aflatoxin B1. In HERZBERG M., Toxic Micro-organisms, p. 211-221.

3- Akaom., Kuroda K. et Wogan G. N.1971.--Aflatoxin B1: the kidney as a site of action in the mouse.Life sci., II, t. X, p. 495-501.

4- Allcroftr. 1964.--Aspects of aflatoxicosis in farm animals. Mycotoxins in Foodstuffs., p. 153-162.

5- Allcroftr. 1969.--Aflatoxicosis in farm animals. in GOLDBLATT L.A., Aflatoxin. Academic Press, p. 237-264.

6- Alperte., Serck-Hanssen A. et Rajagopollan B. 1970.-- Aflatoxin-induced hepatic injury in the African monkkey. Arch. Environ. Health, t. XX, p. 723-728.

7- Ayresj .L., Lee D.J., Wales J.H. et Ssjjhuber R.O. 1971.-- Aflatoxin. structure and hepatocarcinogenicity in rainbow trout (Salmo gairdneri). J. Nat. Cancer Inst., t. XLVI, p. 561-564.

8- Basappas. C., Jayarman A., Areenivasamurthy V. et Pappia H.A.B. 1967.--Effect of B-group vitamins and ethyl alcohol on aflatoxin production by Aspergillus oryzae. Indian J. Exp. Eiol., t. V, p. 262-263.

9- Bassiro. et Adekunle A. 1970.--Teratogenic action of aflatoxin B1 palmotoxin Bo and palmotoxin Go on the chick embryo. J. Pathol., t. CII,p. 49-51.

10- Bauerd., Lee B. J. et Ssnnhuber R. O. 1969.--Acute toxicity of aflatoxins B1 and G1 in the rainbow trout (Salmo gairdneri). Toxicol. Appl. Pharmacol., t. XV, p. 415-419.

11- Biollazm., Bochi G. et Milne G. 1970.--Biosynthesis of the aflatoxins. J. Am Chem. Soc., t. XCII, p. 1033-1055.

12- Buchi G. et Weinreb S.M. 1969.--The total synthesis of racemic allatoxin M1 (milk toxin). J. Am. Chem. soc., t. XCI, p. 5408-5409.

13- Cappucid. T. 1966.--Aflatoxin and chromosomal studies (Aspergillus flavus).Bull. Environ. Contam. Toxicol., t. I, p. 205-207.

14- Chelkowski, J. 1980. Formation of mycotoxins and detoxification in cereal grains. Roczniki, Academii Rolniczes. Wpoznaniv - Rozprawy Naukowe Nukoo. 47pp.

15- Coomest. J., Crowther P. C., Feuell A.J. et Francis B.J. 1966.--Experimental detoxification of groundnut meals containing aflatoxin. Nature, G.B., t. CCIX, p. 406-407.

16- Daleziosj., Wogan G. N. et Weinreb S. M. 1971.-- Aflatoxin P1 : a new aflatoxin metabolite in monkeys. Science, t. CLXXI, p. 584-585.

17- Darnes., G. L., Nelson G. L. et Manbeck H.B. 1970.-- Effects of drying, storage gases, and temperature on development of mycoflora and aflatoxins in stored high-moisture peanuts. Phytopathology, t. LX, p. 581.

18- Davis., N.D. et Diener U.L. 1970.--Environmental factors affecting the production of aflatoxin. in HERZBERG M., Toxic micro-organisms, p. 43-47.

19- Dicknes., J. W. et Pattee H.E. 1956.-- Time- Temperature-Moisture effects on aflatoxin production in peanuts inoculated with a toxic strain of Aspergillus flavus. Rept. to Peanut

Improvement Working Group Meeting, Washington, 27-28 avr., 13 p.

20- Dolimpio., D., Jacobson C. et Legator M. 1968.--Effect of aflatoxin on human leucocytes. Proc. Sox. Exp. Biol. Med., t. CXXVII, p. 559-562.

21- Dowell, F. Smith, j. 1995. Anote on high moistore conter Forigen material effects on aflatoxin in peanutsduring storage. peanut science. 22 (2). 166-168.

22- Dutton., M. F. et Heathcote J. G. 1969.--O-Alkyl derivatives of aflatoxins B2 and G2 .Chem. and Ind., p. 983-986.

23- Dwarakanath 21- C. T., Rayner E. T., Mann G. E. et Dollear F. G. 1968.-- Reduction of aflatoxin levels in cottonseed and peanut meals by ozonization. J. Amer. Oil Chem. Soc., t. XLV, p. 93-95.

24- Eldridge., D.W.--Nutritional factors influencing the synthesis of aflatoxin B1 by Aspergillus flavus. M.S. Thesis, Auburn Univ., Alabama.

25- Finoli, G. Galli, A. Vecchig, A. Villani, A. 1995. aflatoxin producting strainsof Aspergillus flavus from spieces. industrie alimentori. 340, 342, 1174-1151.

26- Fischbach., H. et Campbell A.L. 1965.-- Note on detoxification of the aflatoxins. J. Assoc. Off. Agr. Chem., t. XLVIII, p. 1-28.

27- Goldblatt., L.A. et Robertson J.A. 1965.--Extraction of Aspergillus flavus aflatoxin from groundnut meal with acetone-hexane-water azeotrope. Int. Biodet. Bull., t. I, p. 41-42.

28- Gourama, H. Bullerman, L. B. 1995. Aspergillus flavus and Aspergillus parasiticus, Aflatoxigenic fungi of concern in food and feeds. Journal of food protection, 58 (12), 1305-1404.

29- Hesseltine., C. W. 1967.--Aflatoxins and other mycotoxins. Health Laboratory Science, t. IV, p. 222-228.

30- Karainnonglou, P., et 1989. Occurrence of aflatoxin M1 in raw and pasturized milk and in feta and relema cheese samiles. Milchwissenschafy, 44(12). pp: 746-748.

31- Klich, M. A., Yu, J. Change, P. K. Mullaney, E. J. Bhatnagar, D. clevland, T. E. 1995. Hybridization of genes involved in aflatoxin biosynthesis to DNA of aflatoxiyenic and nonaflatoxiyenic, asperyilli. Applied Microbiology and biotechnology 44 (314), 439-443.

32- Letutour, B. Tantaovi, Elaruki, A. Ihlal, L. 1983. Simultaneous detection of alfatoxin B_1 and ochratoxin A in olive oil. Journal of the American oil chemistry society. 60 (4), 835-837.

33- Lindenfelser., L.A. et Ciegler A. 1970.--Studies on aflatoxin detoxificationin shelled corn by ensilling. J. Agric. Food Chem., t. XVIII, p. 640-643.

34- Macdonal, S. Castle, L. 1996. Auk vetail survey of aflatoxins in herbs and spices and their fare during cooking. Food Additives and contaminants, 13 (1) , 121-128.

35- Majerus, P. Woller, R. leevivat, P. Klintrimas, T. 1985. Spices mould contamination and content of aflatoxins, ochratoxin A and steriymatocystin. Bilographic citation, fleischwirt schafr, 65 (9) 1155-1158.

36- Manabe., M. et Matsuura S. 1971.--Liquid chromatography of aflatoxins including aflatoxins B2 and G2 . Agric. Biol. Chem., t. XXXV, p. 417-423.

37- Micco, C. Gross, M. Ononi, R. Chirico, M. Brea, C. 1986. Monitoring for aflatoxin B_1, ochratoxin A and zearalenone in Italian moize of the 1982-1984. Crops. Rivista, della, societa, Italiana, di, scienza, dell, Alimentazionei 15(3), 113-116.

38- Nesheim., S. 1967.--note on ochratoxins (Aspergillus ochraceus). Ass. Off. Anal. Chem.

J., t. L. p. 370-371.

39- Nesheim., S. 1969.--Isolation and purification of ochratoxin A and B and preparation of their methyl and ethyl esters. J. Ass. Off. Anal. Chem., t. LXX, p. 975-979.

40- Pons., W.A., and Franz, W.O. 1977.--High performance liquid chromatography of aflatoxins in cottonseed products. J.A.O.A.C., 60, p. 89-95.

41- Resnik, S. Neiva, S. Pacin, A. Martinez, E. Apro, N. Latreites, S. 1996. A survey of the natural occurence of aflatoxins and zeralenone in orgentine filed maize. Food additives and contaminats 13(1), 115-120.

42- Salunkhe, D.K., Adsole, R.N., Padule, D.N., 1987. Aflatoxins in foods and feeds, published by, B.V. Gupta, managing, Director metropolitan.

43- Samarajeewa, U., Sen, A.C., Cohen, M.D., Wei, C. I., 1989. Detoxification of aflatoxins in foods and feeds by physical and chemical methods.

44- Schroeder., H.W. et Ashwortii L.J. 1966.--Aflatoxins: some factors affecting production and location of toxins in Aspergillus flavus-oryzae. J.Stored Prod. Res., t. I,p. 267-271.

45- Searcy., J. W., Davis N. D. et Diener V. L. 1969.-- Biosynthesis of ochratoxin A. Appl. Microbiol., t. XVIII, p. 622-617.

46- Shibatu, TM. M., Souzacunha, M. Del. R. Hirooka, E. Y. 1995. Risk of aflatoxin production is soybean. Semina, 16(1), 168-177.

47- Van Zytveld., W.A., Kelley D.C. et Dennis S.M. 1970.-- Aflatoxicosis : the presence of aflatoxins or their metabolites in livers and sk...at museles of chickens. plult. Sci., t. XLIX, p. 1350-1356.

48- Varham., S.D. et Yadava I.S. 1968.-- Biochemistry of aflatoxins. A review. J. Nutr. Diet., t. V,p. 87-89.

49- Whiaker, I. Horwitz, W., Albert, R. Nesheim, S. 1996. Variability associated with analytical methods used to measure aflatoxin in agricultural commodities. Journal of AOAC International, 79(2) 476-485.

50- Wogan., G.N. 1966.-- Chemical nature and biological effects of aflatoxins. Bacteriol. Rev., t. XXX, p. 460-470.

51- You-Min., Fu, 1996. Determination of aflatoxin M_1 in milk and milk product using immuno - affinity column and fluorescence measurements. Journal of Food and Drug analysis. 4(2). 175-183.