Saffron Agronomy & Technology
Vol. 1, No. 2. 2014, P. 102-111

نشریه زراعت و فناوری زعفران
جلد ۱، شماره ۲، زمستان ۱۳۹۲- ص: ۱۱۱-۱۰۲

مقاله علمی کوتاه

اندازه‌گیری میزان آفلاتوکسین در زعفران به‌وسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و تخلیص با ستون ایمونوافینیتی

حامد رضا بهشتی[۱]، جواد فیضی[۲]، مهناز ژیانی اصغرزاده[۳] و سمیه سادات فکور جنتی[٤]

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۰۵/۰۱
تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۰٦/۰۷

چکیده

در این تحقیق یک روش جهت اندازه‌گیری آفلاتوکسین در زعفران با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مجهز به آشکارساز فلورسانس ارائه شده است. در این روش آفلاتوکسین با استفاده از متانول ۸۰٪ استخراج و سپس توسط ستون ایمونوافینیتی تخلیص شد. اندازه‌گیری‌ها در طول موج تحریک ۳۶۵ و طول موج نشری ۴۴۵ نانومتر انجام گرفت. حد تشخیص آفلاتوکسین‌های B_1، B_2، G_1 و G_2 به ترتیب ۰/۲۹۳، ۰/۰۸ ، ۰/۵۵ و ۰/۳۰ می باشد. درصد انحراف استاندارد نسبی در اندازه‌گیری انواع آفلاتوکسین بین ۵/۱-۱/۳۳ و میزان درصد بازیافت نیز در محدوده ۶۷-۹۴ می باشد. با توجه به نتایج روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا به‌کار گرفته شده در این تحقیق می‌توان به توانایی این روش در تعیین و اندازه‌گیری گونه‌های مختلف آفلاتوکسین در زعفران پی برد.

واژه‌های کلیدی: آسپرژیلوس فلاووس، آشکارساز فلورسانس، مایکوتوکسین

۱، ۲، ۳ و ٤- به‌ترتیب دکتری داروساز مدیر عامل آزمایشگاه کنترل کیفی تستا، دانشجوی دکتری شیمی تجزیه ، کارشناس ارشد علوم و تکنولوژی غذایی دانشگاه آزاد سبزوار و کارشناس ارشد مهندسی صنایع غذایی آزمایشگاه کنترل کیفی تستا.
(*- نویسنده مسئول: Email: feizy.j@gmail.com)

مقدمه

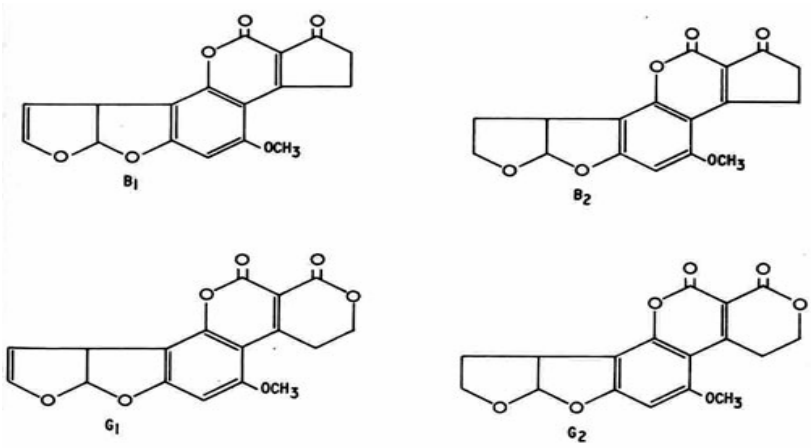
مایکوتوکسین‌ها گروه مهمی از ترکیبات بسیار سمی هستند که توسط انواع خاصی از قارچ‌ها تولید می گردند (Turner et al., 2009; Tan et al., 2009; Papp et al., 2002). آفلاتوکسین‌ها، مایکوتوکسین‌هایی هستند که توسط دو نوع کپک به نام‌های Aspergilus Flavous و Aspergilus Parasiticus ایجاد می‌شوند. در کلمه Aflatoxin حروف A و F به ترتیب نماینده جنس قارچ یا Aspergilus و گونه آن یا Flavous می‌باشند که با لغت Toxin ترکیب شده است (Kamkar, 2006; Akiyama et al., 2001). مطالعات زیادی در مورد گونه‌های این قارچ شامل Aspergilus Parasiticus و Aspergilus Flavous ، Aspergilus Nomius و Aspergilus Niger در دانشگاه‌ها و مراکز تحقیقاتی جهان صورت پذیرفته است و براساس این مطالعات در طبیعت، چهار نوع آفلاتوکسین اصلی شامل B_1 ، B_2 ، G_1 ، G_2 و دو نوع محصولات متابولیکی به نام‌های M_1 و M_2 وجود دارند. در شکل ۱ ساختار شیمیایی آفلاتوکسین‌های گروه B و G نشان داده شده است (Caller et al., 2007; Xiulan et al., 2006).

آفلاتوکسین‌ها نسبت به سایر سموم قارچی به علت اثرات سرطان‌زائی و ایجاد مسمومیت حاد از اهمیت بیشتری برخوردارهستند. این سموم قادرند تا در طول مراحل مختلف از قبیل رشد، برداشت و انبار نمودن دانه‌های خوراکی و ادویه‌جات ظهور پیدا کنند. از جمله اثرات مخرب آفلاتوکسین‌ها می‌توان به تضعیف و نابودی سیستم ایمنی، جهش-های ژنتیکی و سرطان اشاره نمود. بسیاری از کشورها با توجه به داشتن آلودگی‌های قارچی در مواد غذائی و محصولات کشاورزی با تصویب قوانین و مقررات ویژه ای توانسته‌اند بهداشت و سلامتی مواد غذائی تولیدی خود را تأمین نمایند (Adegoke et al., 1996; Barbesgaard et al., 1992; Bartine & Tantaoui-Elaraki, 1997; Berardo et al., 2005; Stark, 1980; Ueno et al., 1978).

بیشتر ادویه‌جات محصول مناطق گرمسیری و مرطوب هستند. آب و هوای گرم و مرطوب موجب طولانی شدن دوره خشک شدن این محصولات می‌گردد و عدم آموزش کافی به کشاورزان برای حل این مشکلات، در شرایط کیفی محصولات به نحو نامطلوبی تاثیر گذار است، با توجه به گزارشات به‌دست آمده ۵ تا ۱۰درصد محصولات توسط قارچ‌ها ازمیان می‌روند و دیگر قابل مصرف توسط انسان نیستند. ادویه‌جات توسط دامنه وسیعی از میکروارگانیسم‌ها شامل قارچ‌های سمی (به‌ویژه Aspergilus) که در اثر شرایط بد جمع‌آوری و دوره‌های خشک کردن طولانی، گرد و غبار، آب و فاضلاب و فضولات انسانی و حیوانی در محصولات که به صورت غیر بسته بندی شده در مغازه‌ها به فروش می‌رسد آلوده می‌شوند. از آن‌جا که ادویه‌جات اغلب به صورت خام مورد استفاده قرار می‌گیرند، وجود آلودگی در این محصولات می‌تواند به‌طور مستقیم سلامت انسان را تحت تأثیر قرار دهد. زعفران نیز به‌عنوان ادویه گران‌قیمتی که همواره به دلیل داشتن رنگ، بو و خواص دارویی‌اش مورد توجه بسیار قراردارد از این مسئله مستثنی نمی‌باشد.

زعفران، کلاله‌های خشک و قرمز رنگ گیاه کروکوس ساتیوس از خانواده زنبق است (Abdullaev et al., 2003). زعفران گران‌بهاترین گیاه زراعی موجود در روی کره زمین است که از گذشته‌های دور به دلیل رنگ زیبا و عطر و طعم استثنایی آن در مواد غذایی مختلف کاربرد داشته است (Abdullaev, 1992). امروزه بجز ایران سایر کشورهای تولید کننده زعفران، اسپانیا، یونان، هند و مراکش می‌باشند (Negbi, 1999). در طی دهه گذشته مطالعات

زیادی در زمینه ترکیبات شیمیایی زعفران توسط گروه‌های تحقیقاتی مختلف انجام گرفته است. در سال‌های اخیر با توجه به شناسایی دقیق ترکیبات زعفران تحقیقات زیادی در خصوص اثرات درمانی آن صورت گرفته و توجه به اثرات بیولوژیکی و دارویی آن افزایش یافته است و در مورد اثرات ضد سرطانی آن نیز گزارش متعددی در سال‌های اخیر منتشر شده است (Abdullaev, 2002).



شکل ۱- ساختار شیمیایی آفلاتوکسین‌های B و G.
Fig.1- Chemical structure of aflatoxins B and G

با توجه به مصرف و همچنین صادرات زیاد زعفران به‌نظر می‌رسد ارزیابی مداوم و کنترل آلودگی‌های قارچی زعفران می‌تواند نقش بسزایی در تأمین سلامت مصرف کنندگان و همچنین رقابت در بازارهای بین المللی ایفا نماید و زعفران ایران به‌عنوان یک محصول سالم بتواند اصالت خود را حفظ نماید. دراین تحقیق روشی برای تعیین میزان آلودگی زعفران به آفلاتوکسین عملیاتی و مورد ارزیابی قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

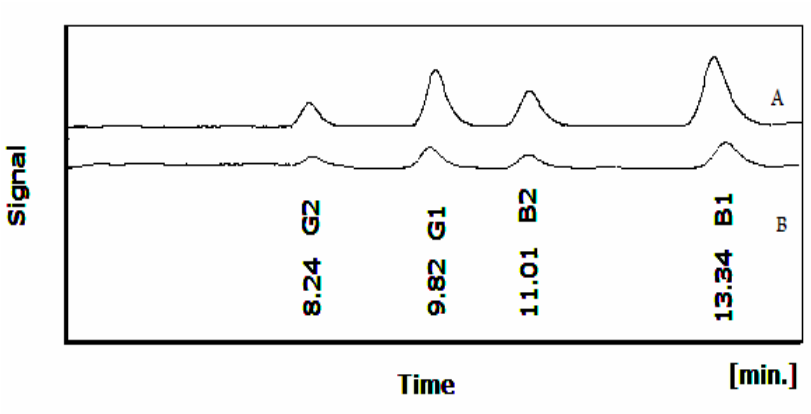
نمونه‌های زعفران از بازار مشهد با روش نمونه‌گیری تصادفی تهیه گردید. نمونه‌های شاهد زعفران از مزارع تربت حیدریه تهیه و به‌منظور جلوگیری از رشد قارچ ها در فریزر در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. متانول و استونیتریل با درجه خلوص کروماتوگرافی از شرکت مرک تهیه شده‌اند. استانداردهای آفلاتوکسین از شرکت سیگما تهیه گردید. سایر مواد شیمیایی مورد استفاده با درجه خلوص تجزیه‌ای از شرکت های مرک و شارلو خریداری شده‌اند.

در این تحقیق از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا از شرکت Sykam (آلمان) مجهز به پمپ دو پیستونی S2100 و ستون کروماتوگرافی Genesis C_{18} به طول ۲۵ سانتی‌متر، قطر داخلی ۴/۶ میلی متر و مواد پر شده ۵ میکرومتری استفاده شد. از آشکارساز فلورسانس RF-10AXL با طول موج تحریک ۳۶۵ و نشر ۴۴۵ نانومتر استفاده گردید. تنظیم دمای ستون با استفاده از آون ستون S4011 انجام گردید. مشتق‌سازی آفلاتوکسین توسط پمپ ثانویه S1122 در قطعه T شکل و در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد انجام گردید. جهت تهیه آب مقطر خلوص کروماتوگرافی از

دستگاه آب مقطر SG استفاده گردید.

جهت استخراج آفلاتوکسین، ۲ گرم نمونه با ۰/۲ گرم نمک طعام مخلوط و به آن ۸ میلی لیتر متانول افزوده و به مدت ۳ دقیقه به شدت جهت مخلوط شدن هم‌زده شد و سپس سانتریفوژ گردید. ۲ میلی‌لیتر از محلول سانتریفوژ شده با ۵۰ میلی لیتر بافر فسفات (PBS) به خوبی مخلوط گردید. جهت تخلیص آفلاتوکسین از نمونه، از ستون ایمونوافینیتی استفاده گردید. ابتدا ستون ایمونوافینیتی با ۱۰ میلی لیتر بافر PBS شستشو داده و ۵۲ میلی‌لیتر نمونه حاصل با سرعت ۱ قطره در ثانیه از ستون عبور داده شد. پس از شستشوی ستون با ۱۵ میلی لیتر آب مقطر، ستون با عبور فشار ملایم هوا به مدت ۱۰ ثانیه خشک گردید. جهت جدا کردن آفلاتوکسین متصل شده به ستون ایمونوافینیتی، ۲ میلی لیتر متانول کروماتوگرافی به ستون افزوده و پس از خروج، آفلاتوکسین جدا شده در ویال جمع-آوری گردید. ۲ میلی لیتر آب مقطر خلوص کروماتوگرافی به ویال افزوده و به شدت با ورتکس همزده شد. سپس نمونه با استفاده از صافی های سرسرنگی ۰/۴۵ میکرومتری صاف گردید.

مطابق روش ارائه شده توسط استاندارد ملی ایران به شماره ۶۸۷۲ (ISIRI 6872, 1382) از سیستم ایزوکراتیک حلال آب: متانول: استونیتریل (۶۰:۲۰:۲۰) به‌عنوان فاز متحرک و آشکارساز فلورسانس با طول موج تهییج ۳۶۵ و طول موج تحریک ۴۴۵ نانومتر استفاده شد. ستون مورد استفاده Genesis C_{18} (۵μm، ۴/۶ mm× ۲۵۰) است. در طول مدت زمان آزمایش سرعت جریان به میزان یک میلی‌لیتر در دقیقه و دمای ستون در ۴۰ درجه سانتی‌گراد ثابت نگه داشته شد. جهت مشتق‌سازی آفلاتوکسین از محلول اشباع ید که به صورت تازه و روزانه تهیه می‌گردد استفاده شد. مشتق سازی در قطعه T شکل و در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد انجام می‌گیرد. مقدار نمونه تزریقی به دستگاه ۲۰ میکرولیتر بود و همه آنالیزها ۴ مرتبه تکرار شد. شکل (۲) کروماتوگرام مربوط به یک نمونه زعفران را که شامل انواع آفلاتوکسین می‌باشد را در مقایسه با کروماتوگرام استاندارد آفلاتوکسین با غلظت ۷/۲ نانوگرم بر میلی‌لیتر را نشان می‌دهد. ترتیب خروج آفلاتوکسین‌ها به صورت G_2، G_1، B_2 و B_1 می‌باشد که به ترتیب در زمان‌های ۸/۲۴، ۱۱/۹،۰۱/۸۲ و ۱۳/۳۴ دقیقه می‌باشد. زمان بازداری پیک‌های آفلاتوکسین در نمونه زعفران با مقایسه آن با زمان بازداری پیک‌های استاندارد شناسایی می‌شوند.



شکل۲- کروماتوگرام نمونه زعفران (B) و استاندارد آفلاتوکسین(A) را نشان می‌دهد.
Fig. 2- Overlay chromatogram of saffron (B) and standard of aflatoxin (A)

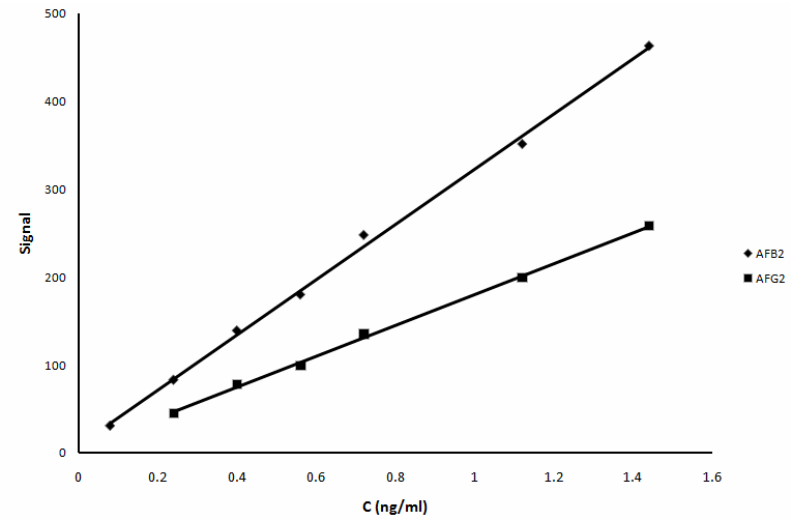
تعیین غلظت استاندارد اولیه هر کدام از انواع آفلاتوکسین با اندازه‌گیری جذب هرکدام به‌طور مجزا توسط دستگاه اسپکتروفتومتر ماوراء بنفش- مرئی در ناحیه طول موجی ۲۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر در مقابل حلال به‌طور مجزا اندازه‌گیری گردید و با استفاده از رابطه زیر غلظت هر گونه در محلول اولیه محاسبه شد. مقدار وزن مولکولی و ضریب جذب مولی برای انواع آفلاتوکسین در استاندارد ملی ایران به شماره ۶۸۷۲ گزارش شده است.

$$1\ \mu g\ \text{aflatoxin}\ ml^{-1} = \frac{A \times MW \times 1000}{\varepsilon}$$ معادله (۱)

نتایج و بحث

رسم منحنی استاندارد

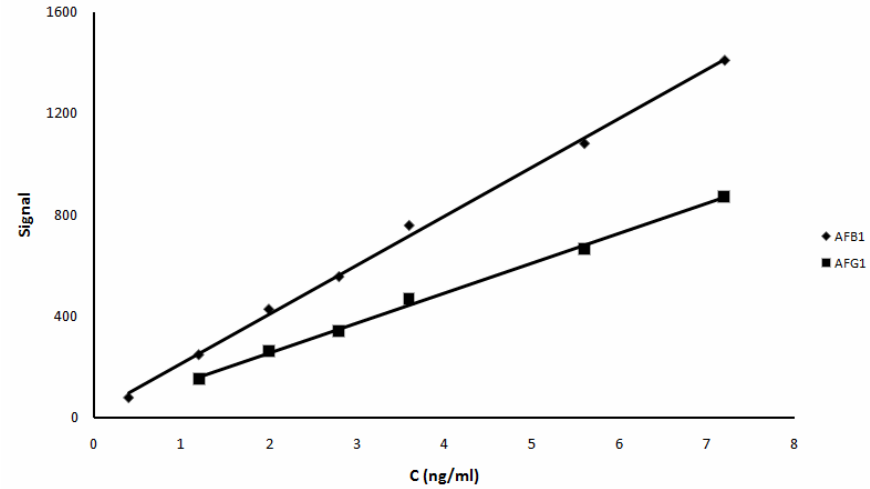
جهت رسم منحنی استاندارد از محلول‌های آبی متانولی استاندارد حاوی انواع آفلاتوکسین با غلظت‌های مختلف استفاده گردید. باتوجه به نتایج به‌دست آمده دامنه خطی بودن نتایج در محدوده غلظتی (۰/۴ تا ۷/۲ نانوگرم بر میلی-لیتر) برای گونه‌های (B_1 و G_1) و (۰/۰۸ تا ۱/۴۴ نانوگرم بر میلی‌لیتر برای گونه‌های (B_2 و G_2) به‌دست آمد.



شکل ۳- منحنی کالیبراسیون آفلاتوکسین‌های B_2 و G_2

Fig. 3- Calibration curve of aflatoxins B_2 and G_2

همان‌طور که شکل ۳ و ۴ نشان می‌دهد بین غلظت و سطح زیر پیک آفلاتوکسینهای B و G توافق خوبی برقرار است به‌طوری‌که ضریب همبستگی برای آفلاتوکسین‌های B_1، B_2 ، G_1 و G_2 به ترتیب ۰/۹۹۷۷، ۰/۹۹۷۸، ۰/۹۹۷۷ و ۰/۹۹۸۸ می‌باشد. معادلات کالیبراسیون برای انواع آفلاتوکسین در جدول ۱ نشان داده شده است.



شکل ٤- منحنی کالیبراسیون آفلاتوکسین‌های B_1 و G_1

Fig. 4- Calibration curve of aflatoxins B_1 and G_1

بررسی تکرارپذیری و صحت روش

جهت بررسی تکرارپذیری روش، از نتایج ۷ مرتبه آزمایش بر روی نمونه حقیقی (زعفران) حاوی ۱۰ نانوگرم از گونه‌های (B_1 و G_1) و ۲ نانوگرم از گونه‌های (B_2 و G_2) مطابق روش کار انجام پذیرفت و تکرارپذیری روش در تعیین انواع مختلف آفلاتوکسین در نمونه حقیقی به شرح جدول ۱ محاسبه گردید. حد تشخیص آفلاتوکسین‌های G_1، G_2، B_1 و B_2 به ترتیب ۰/۵۵، ۰/۳۰ ، ۰/۲۹۳ و ۰/۰۸ می باشد. درصد انحراف استاندارد نسبی در اندازه‌گیری انواع آفلاتوکسین بین ۱/۳۳-۵/۱ متغییر است.

جدول ۱- نشان دهنده مقادیر درصد انحراف استاندارد نسبی و حد تشخیص روش در اندازه‌گیری انواع آفلاتوکسین می باشد (نتایج LOD و LOQ برحسب نانوگرم برمیلی لیتر گزارش شده است).

Table 1- Relative standard deviation (RSD), limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) of HPLC method

Aflatoxin	B_1	B_2	G_1	G_2
Calibration equation	**y=193.05x+23.80**	**y=313.7x+9.34**	**y=117.88x+20.48**	**y=175.71x+4.94**
LOD	0.293	0.08	0.55	0.30
LOQ	0.93	0.26	1.77	0.96
٪RSD	1.33	1.71	2.63	5.10

به‌منظور تأیید صحت روش مقداری معین از سم آفلاتوکسین به نمونه شاهد افزوده شد و تحت فرآیند استخراج قرار گرفت جدول ۲ درصد بازیافت به‌دست آمده برای انواع آفلاتوکسین B_1، B_2 ، G_1 و G_2 را نشان می‌دهد که توجه به نتایج به‌دست آمده بیان‌گر این است که، نتایج در محدوده مقادیر درصد بازیافت مورد تأیید استاندارد ملی ایران به شماره ۶۸۷۲ یعنی ۷۰ تا ۱۱۰ درصد می‌باشد و این مطلب صحت روش را تأیید می‌نماید.

جدول ۲- درصد بازیافت آفلاتوکسین در زعفران.
Table 2- Recoveries of aflatoxins in saffron

Aflatoxin	B_1	B_2	G_1	G_2
Added (ng)	10	2	10	2
Result (ng)	7.11	1.54	6.71	1.89
Recovery (%)	71	77	67	94

تاکنون هیچ گزارشی در مورد اندازه‌گیری آفلاتوکسین در زعفران در منابع داخلی گزارش نشده است ولی مارتین و همکارانش (Martins et al., 2001) در تحقیقی در کشور پرتغال میزان انواع آفلاتوکسین را در ۱۲ نوع مختلف پودر ادویه (۵ نمونه هل، ۵ نمونه گرد فلفل قرمز، ۸ نمونه دارفلفل، ۵ نمونه میخک، ۷ نمونه زیره سبز، ۵ نمونه زردچوبه، ۵ نمونه زنجبیل، ۵ نمونه خردل، ۱۰ نمونه درخت جوز، ۱۲ نمونه پاپریکا، ۵ نمونه زعفران و ۷ نمونه فلفل سفید) با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و تخلیص با ستون ایمونوافینیتی اندازه گرفتند. آفلاتوکسین B_1 در ۴۳٪ نمونه‌ها مشاهده شد. آفلاتوکسین‌های B_2، G_1 و G_2 در هیچکدام از نمونه‌ها مشاهده نشد. همه نمونه‌های گرد فلفل قرمز به آفلاتوکسین B_1 در محدوده ۳۲-۲ میکروگرم بر کیلوگرم آلوده بودند. از نمونه‌های درخت جوز آزمون شده، آلودگی ۳ نمونه در محدوده ۵-۱، سه نمونه در محدوده ۲۰-۶ و دو نمونه دارای ۴۵ و ۵۸ میکروگرم بر کیلوگرم بود. آلودگی نمونه‌های فلفل، زیره سبز، زردچوبه، زعفران و فلفل سفید در محدوده ۵-۱ میکروگرم بر کیلوگرم قرار داشت. در سایر نمونه‌ها هیچکدام از آفلاتوکسین‌ها مشاهده نشد. فازکاس و همکاران (Fazekas et al., 2005) نیز در تحقیقی دیگر میزان آفلاتوکسین و اکراتوکسین را در ۹۱ نمونه ادویه (۷۰ نمونه پودر شده فلفل قرمز، ۶ نمونه فلفل سیاه، ۵ نمونه فلفل سفید، ۵ نمونه ادویه مخلوط و ۵ نمونه دارفلفل) در کشور مجارستان با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و تخلیص با ستون ایمونوافینیتی اندازه‌گیری نمودند. نتایج نشان داد که از ۷۰ نمونه فلفل قرمز ۱۸ نمونه دارای آفلاتوکسین بوده که ۷ تا از آنها مقداری بیشتر از حد مجاز پذیرفته شده یعنی ۵ میکروگرم بر کیلوگرم داشتند. در بین نمونه‌های دارفلفل یکی از نمونه‌ها دارای آفلاتوکسین بیشتر از حد مجاز بود. اکراتوکسین در ۳۲ نمونه از ۷۰ نمونه پودر فلفل قرمز آشکارسازی شد که ۸ نمونه دارای مقداری بیشتر از حد مجاز یعنی ۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم بود. یک نمونه دارفلفل هم دارای اکراتوکسین با غلظت ۲/۱ میکروگرم بر کیلوگرم بود.

با توجه به اهمیت زعفران از لحاظ دارویی و غذایی و با عنایت به کاربرد فراوان این محصول در دنیا اندازه‌گیری آفلاتوکسین به عنوان یک عامل خطر ساز که می‌تواند در مراحل مختلف برداشت، فرآوری و نگهداری زعفران ظاهر گردد حائز اهمیت می‌باشد. لذا از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مجهز به آشکارساز فلورسانس جهت اندازه-گیری آفلاتوکسینها استفاده شد. با توجه به نتایج بدست آمده، این روش می‌تواند به‌طور موثر در اندازه‌گیری انواع آفلاتوکسین در این گونه با ارزش مورد استفاده قرار گیرد همچنین با توجه روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا به‌کار گرفته شده در این تحقیق می‌توان به توانایی این روش در تعیین و اندازه‌گیری گونه‌های مختلف آفلاتوکسین در زعفران پی برد.

منابع

1. Abdullaev, F.I. 1992. Biological effects of saffron. Biofactors 4: 43-45.

2. Abdullaev, F.I. 2002. Cancer chemopreventive and tumoricidal properties of saffron (*Crocus sativus* L.). Experimental Biology and Medicine 227: 20-25.

3. Abdullaev, F.I., River´n-Negrete, L., Caballero-Ortega, H., Manuel Hernandez, J., Pérez-L´pez, I., and Pereda-Miranda, R. 2003. Use of in vitro assays to assess the potential antigenotoxic and cytotoxic effects of saffron (*Crocus sativus* L.) Toxicology in Vitro 17: 731–6.

4. Adegoke, G.O., Allamou, A.E., Akingbala, J.O., and Akanni, A.O. 1996. Influence of sundrying on the chemical composition, aflatoxin content and fungal counts of two pepper varieties—Capsicum annuum and Capsicum frutescens. Plant Foods for Human Nutrition 49(2): 113–117.

5. Akiyama, H., Goda, Y., Tanaka, T., and Toyoda, M. 2001. Determination aflatoxin B_1, B_2, G_1 and G_2 in spices using a multifunctional column clean-up. Journal of Chromatography A 932: 153-157.

6. Barbesgaard, P., Heldt-Hansen, H.P., and Diderichsen, B. 1992. On the safety of *Aspergillus oryzae* L.: a review. Applied Microbiology and Biotechnology 36: 569–572.

7. Bartine, H., and Tantaoui-Elaraki, A. 1997. Growth and toxigenesis of *Aspergillus flavus* isolates on selected spices. Journal of Environmental Pathology, Toxicology and Oncology 16: 61–65.

8. Berardo, N., Pisacane, V., Battilani, P., Scandolara, A., Pietri, A., and Marocco, A. 2005. Rapid detection of kernel rots and mycotoxins in maize by near-infrared reflectance spectroscopy. Journal of Agricultural and Food Chemistry 53: 8128–8134.

9. Caller, E., Marrubini, G., Brusotti, G., and Massolini, G. 2007. Development and integration of immunoaffinity monolitic disk for the on- line solid-phase extraction and HPLC determination with fluorescence detectionof aflatoxin B_1 in aqueous solutions. Journal of Pharmaceutical and Biomedicalanalysis 44: 396-403.

10. Fazekas, B., Tar, A., and Kovacs, M. 2005. Aflatoxin and ochratoxin a content of spices in Hungary. Food Additives and Contaminants. 22(9): 856-863.

11. Institute of Standards and Industrial Research of Iran (ISIRI). 1382. Food products - Determination of aflatoxin B1 and total aflatoxins using HPLC and immunoaffinity column – Test method. 1st. Revision. ISIRI No. 6872.

12. Kamkar, A. 2006. A study on the occurrence of aflatoxin m1 in Iranian feta cheese. Food control 17: 768-775.

13. Martins, M.L., Martins, H.M., and Bernardo, F. 2001. Aflatoxins in spices marketed in Portugal . Food Additives and Contaminants 18(4): 315–319.

14. Negbi, M. 1999. Ed. Saffron: *Crocus sativus* L. In: Medicinal and Aromatic Plants - Industrial Profiles. Taylor & Francis Publications, ISBN 978-90-5702-394-1.

15. Papp, E., H-Otta, K., Zaray G., and Mincsovics, E. 2002. Liquid chromatographic determination of aflatoxins. Microchemical Journal 73: 39-46.

16. Stark, A.A. 1980. Mutagenicity and carcinogenicity of mycotoxins: DNA binding as a possible mode of action. Annual Review of Microbiology 34: 235-262.

17. Tan, Y., Chu, X., Shen, G., and Yu, R. 2009. A single- amplified electrochemical immunosensor for aflatoxin B_1 determination in rice. Analytical Biochemistry 387: 82-86.

18. Ueno, Y., Kubota, K., and Nakamura, Y. 1978. Mutagenicity of carcinogenic mycotoxins in Salmonella typhimurium. Cancer Research 38: 536-542.

19. W Turner, N., Subrahanyam, S., and Piletsky, S. 2009. Analytical methods for determination of myco toxins: A review. Analytical Chimica Acta 632: 168-180.

20. Xiulan, S., Xiaolian, Z., and Jian, T. 2006. Development of an immunochromatoghraphic assay for detection of aflatoxin B_1 in foods. Food Control 17: 256-262.

Short communication

Aflatoxin determination in saffron by high-performance liquid chromatography and immunoaffinity column clean-up

S. Sadat Fakoor Janati[1], H. R. Beheshti[2], J. Feizy [*3] and M. Asadi[4]

Submitted: 23-07-2013
Accepted: 29-08-2013

Abstract

In this paper, method based on high performance liquid chromatography with fluorescence detection has been suggested to measure aflatoxin in saffron. This method required a simple extraction of aflatoxin using $MeOH/H_2O$ (80:20, v/v) and a purification by immunoaffinity column cleanup. Aflatoxin measurement was performed at an emission wavelength of 445 nm and an excitation wavelength of 365 nm. Detection limits for AFB_1, AFB_2, AFG_1 and AFG_2 were 0.293, 0.08, 0.55, and 0.30 ng g^{-1}, respectively. The percentage of Relative standard deviations for measuring aflatoxin is in the range of 1.33-5.10 % and the percentage of recovery is in the range of 94-67. Regarding The overall results of high-performance liquid chromatography applied in this experiment, we can realize that this method can be used for detection and measurement of different kinds of aflatoxins in saffron.

Keywords: *Aspergilus Flavous*, Florescence detector, Mycotoxin

1, 2, 3 and 4- Pharm D, Manager of Testa Quality Control Laboratory, PhD student, Analytical Chemistry, Testa Quality Control Laboratory, MSc, Food science and technology, Azad university of Sabzevar and MSc, Chemical Engineering-Food Science, Testa Quality Control Laboratory respectively.
(*- Corresponding author Email: feizy.j@gmail.com)