مجلـه‌ی علمـی، پژوهشـی دانشـگاه علـوم پزشـکی زنجـان
دوره‌ی ۲۶، شماره‌ی ۱۱۵، خـرداد و تیر ۱۳۹۷، صفحات ۵۴ تا ۶۹

ارزیابی وجود جهش‌زایی مستقیم در چند نوع از رنگ‌های طبیعی خوراکی مورد استفاده در مواد غذایی با آزمون Ames

هاله اکبری[۱]، دکتر حبیب ضیغمی[۲]، دکتر مهران محسنی[۳]

نویسنده‌ی مسئول: دانشگاه علوم پزشکی زنجان، دانشکده داروسازی، گروه کنترل غذا و دارو mohsenim@zums.ac.ir

دریافت: ۹۵/۳/۱۹ پذیرش: ۹۵/۱۰/۵

چکیده

زمینه و هدف: *امروزه رنگ‌ها کاربرد وسیعی در صنایع مختلف غذایی اعم از صنایع تولید شیرینی، بستنی، نوشیدنی‌ها، و غیره دارند. رنگ‌ها می‌توانند عوارضی شبیه آسم، بیش فعالی در کودکان، و سرطان‌زایی داشته باشند.از این رو هدف این مطالعه، ارزیابی اثر جهش‌زایی مستقیم چند نوع از رنگ‌های طبیعی خوراکی به روش ایمز بود.*

روش بررسی: *پس از تهیه ۶ رنگ طبیعی از سه برند مختلف، جهش‌زایی مستقیم آن‌ها با تست ایمز بررسی گردید. در این تست سوش‌های سالمونلا تیفی موریوم TA98 و TA100، حامل جهش انتخابی در اپرون هیستیدین His^-روی محیط کشت گلوکز حداقل در حضور نمونه‌های رنگ کشت داده شد و تنها باکتری‌هایی که با جهش برگشتی His^+ شده بودند تشکیل کلنی دادند.*

یافته‌ها: *جهش‌زایی مستقیم رنگ‌ها از طریق شمارش کلنی‌های برگشتی در پلیت‌های حاوی رنگ خوراکی و مقایسه آن با کنترل منفی سنجیده شد. نتایج نشان داد که تعداد کلنی‌های برگشتی در پلیت‌های حاوی رنگ‌های آلبالویی و زرد طلایی شرکت B برای هر دو سویه و قهوه‌ای تیره شرکت B و C و نارنجی شرکت B به ترتیب برای سویه TA100 و TA98 در بعضی غلظت‌ها بیش از دو برابر پلیت کنترل منفی است و جهش‌زایی مستقیم نشان دادند. رنگ‌های سبز تیره و سبز روشن شرکت‌های A، B، C و زرد طلایی شرکت‌های A و C و آلبالویی و نارنجی شرکت C فعالیت جهش‌زایی مستقیم نداشتند.*

نتیجه‌گیری: *بر اساس نتایج، تعدادی از رنگ‌های مورد مطالعه علی‌رغم اینکه طبیعی عنوان شده‌اند، جهش‌زایی مستقیم نشان دادند.*

واژگان کلیدی: جهش‌زایی مستقیم، رنگ خوراکی طبیعی، تست ایمز، TA100 ، TA98

مقدمه

افزودنی‌های غذایی (Food Additives) ترکیباتی هستند که به منظور دوام یا بهتر نمودن ظاهر غذا، ترکیب، طعم و ارزش غذایی به مواد غذایی اضافه می‌شوند (۱). امروزه در حدود ۲۵۰۰ نوع از این ترکیبات مورد استفاده قرار می‌گیرد که استفاده در چنین طیف وسیعی از طرف بسیاری از سم شناسان مورد سوال قرار گرفته است،

۱- کارشناسی ارشد بهداشت و ایمنی مواد غذایی، دانشکده بهداشت و پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان
۲- دکترای تخصصی باکتری شناسی، استادیار گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان
۳- دکترای تخصصی مواد خوراکی، دانشیار گروه کنترل غذا و دارو، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی زنجان، زنجان

به ویژه آنکه عوارض ناشی از مصرف طولانی مدت این ترکیبات اغلب نامشخص می‌باشد (۲). رنگ‌ها جزو آن دسته از ترکیباتی می‌باشند که می‌توانند اثرات سوء مستقیم یا غیر مستقیم بر سلامتی انسان داشته باشند. البته اثرات طولانی مدت این ترکیبات حائز اهمیت می‌باشد. به‌طور کلی رنگ‌ها برای افزایش جذابیت مواد غذایی به آن‌ها افزوده می‌شوند (۴و۳). از رنگ‌های طبیعی با منشاء گیاهی می‌توان، کلروفیل، کاروتنوئید، آنتوسیانین، میوگلوبین را ذکر کرد و همچنین از میان رنگ‌های مصنوعی می‌توان به سان ست یلو، برلیانت بلو، آزوروبین و آلورارد اشاره کرد که در ۹۰ درصد محصولات مورد مصرف بچه‌ها به کار می‌رود (۵).

کمیته مواد افزودنی و آلاینده‌های مواد غذایی در سال ۱۹۷۸ مواد رنگی را به دو دسته دارای تائیدیه و معاف از تائیدیه تقسیم کرده است. در گزارشی که در سال۱۹۷۸ توسط کمیته مشترک FAO/WHO (سازمان خواروبار و کشاورزی سازمان بهداشت جهانی) منتشر شد، اشاره شده که رنگ‌های طبیعی بدون اتکا به تحقیقات سم شناسی مورد استفاده قرار می‌گیرند (٦). این ترکیبات می‌توانند عوارضی شبیه آسم، کهیر، بیش فعالی در کودکان، تضعیف سیستم ایمنی، واکنش‌های آنافیلاکتیک و حتی اثرات سرطان‌زایی ایجاد کنند. بنابراین بکارگیری صحیح چنین ترکیباتی در صنایع غذایی نقش مهمی در سلامتی و بهداشت مصرف کنندگان دارد (۸و ۷).

مواد جهش‌زا دو گونه هستند. برخی از آنها می‌توانند خود به طور مستقیم جهش‌زا باشندکه مواد با جهش‌زایی مستقیم نامیده می‌شوند و برخی دیگر بعد از فرآیند فعال سازی در بدن، جهش‌زا می‌شوند، این فرآیند اغلب با متابولیسم مواد درکبد رخ می‌دهد که به جهش‌زایی غیرمستقیم معروف است (۹). امروزه سرطان يكي ازمهم ترين عوامل مرگ و مير است كه فاكتورهاى بسيارى از جمله مواد شيميايي، وراثتي، پرتوها و راديكال‌هاى آزاد درايجاد آن نقش دارند (۱۰). این عوامل قادرند با تغییردرتوالی اسیدهای نوکلئیک در DNA، باعث القای جهش و بروز سرطان شوند (۱۱). این امر امروزه آنقدر اهمیت یافته است که بنا به اعلام کمیته مشترک FDA/WHO بررسی جهش‌زایی (موتاژنز)، یکی از مهم‌ترین تست‌های تاییدی هر محصول است (۱۲).

امروزه برای سنجش فعالیت جهش‌زایی ترکیب‌های مختلف، از باکتری‌ها استفاده می‌شود که در زمانی کوتاه نتایجی عالی ارائه می‌دهند، یکی از این روش‌های سنجش ترکیبات جهش‌زا به کمک باکتری‌ها، روش ایمز(Ames) است. ایمز و همکارانش در سال ۱۹۷۵ فعالیت جهش‌زایی و سرطان‌زایی ترکیبات مختلف را مورد بررسی قرار دادند. در این روش از سویه‌های سالمونلایی مختلفی استفاده شد که بر اثر جهش‌زایی، قدرت سنتز هیستیدین را از دست داده بودند (١٤و١٣). در مطالعه ای که توسط Ames و Mccann انجام گرفت، رابطه جهش‌زایی و سرطان‌زایی را حدود ۸۳ درصد ارزیابی کردند (۹).

سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) همه ساله لیستی از مواد افزودنی مجاز را برای مصارف گوناگون اعلام می‌نماید. رنگ‌های طبیعی از آن‌جایی‌که دارای منشاء طبیعی هستند به عنوان GRAS یا عموما سالم تلقی می‌گردند. تحقیقات اخیر نشان داده است که رنگ‌های طبیعی هم خالی از خطر نیستند، به‌عنوان مثال کورکومین که رنگ زرد حاصل از زردچوبه است ۱۵ بار از رنگ زرد تارتارازین سمی‌تر است (۱۵).

به دلیل گسترش مصرف رنگ‌های طبیعی خوراکی در مواد غذایی و احتمال بروز تقلب درتولید آنها و بی‌توجهی نسبت به زیان‌های حاصل از این امر و از آنجا که تحقیقی پیرامون جهش‌زایی رنگ‌های طبیعی خوراکی مورد استفاده در مواد غذایی در ایران صورت نگرفته است، این پژوهش با استفاده از روش ایمز به بررسی و مطالعه جهش زایی مستقیم چند رنگ طبیعی پر مصرف و مورد استفاده در صنایع غذایی کشورمان پرداخته است.

روش بررسی

تهیه نمونه و غلظت‌های موردآزمایش: رنگ‌های طبیعی خوراکی پر مصرف (سبز تیره، سبز روشن، قهوه‌ای تیره، زرد طلایی، نارنجی و آلبالویی) مورد استفاده در مواد غذایی به صورت کنسانتره از سه شرکت عمده تولید کننده‌ی رنگ در ایران و از هر کدام یک نمونه و در مجموع ۱۶ نمونه رنگ تهیه شد که هر یک از رنگ‌ها ۳ بار مورد ارزیابی قرارگرفت . به جهت ملاحظات اخلاقی از حروف A، B وC به جای نام شرکت‌های سازنده این رنگ‌ها استفاده شده است.

برای تهیه‌ی غلظت‌های مختلف از نمونه رنگ‌ها از حلال آب مقطر استفاده شد. غلظت اولیه نمونه رنگ بر اساس غلظتی است که شرکت تولید کننده رنگ به عنوان مقدار مجاز مصرف روزانه برحسب وزن بدن هر فرد اعلام نموده و بر اساس آن دو غلظت دیگر یعنی دو برابر و نصف غلظت اولیه انتخاب گردید. بنابراین غلظت‌های مختلف از نمونه رنگ‌ها برای شرکت A و B (۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکرولیتر در ۱۰ میلی‌لیتر) و برای شرکت C (۱۵، ۳۰ و ۶۰ میکرولیتر در ۱۰ میلی‌لیتر) انتخاب شد.

محیط‌های کشت مورد استفاده شامل: محیط آگارآگار، نوترینت آگار، مولر هینتون آگار و نوترینت براث از شرکت Merckآلمان تهیه شد.

تهیه موادشیمیایی: پودر بیوتین و ۴-نیترو کینولین n- اکساید (4NQO) از شرکت سیگما و سدیم آزاید، کریستال ویوله وآنتی بیوتیک آمپی‌سیلین، سدیم آمونیوم سولفات، اسید سیتریک، دی پتاسیم سولفات، گلوکز، منیزیم سولفات از شرکت Merck آلمان تهیه شد.

تهیه سویه‌های مورد آزمایش: سویه‌های TA98 و TA100 از باکتری *سالمونلاتیفی موریوم*، از سازمان پژوهش‌های علمی وصنعتی ایران بخش مرکز کلکسیون میکروبی تهیه شدند.

آزمون‌های تایید ژنوتیپ سویه‌های مورد آزمایش (TA100 و TA98): برای تایید سویه‌ها درتمامی آزمون‌های زیر از کشت براث تازه شبانه استفاده شد. این آزمون‌ها عبارتند از:

الف) جهش rfa: هر یک از سویه‌های مورد استفاده از نظر حساسیت به کریستال ویوله آزمایش شدند. برای این منظور یک دیسک کاغذی استریل آغشته به کریستال ویوله با غلظت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر (۰/۱ درصد) را در سطح پلیت‌های جداگانه کشت شده با هریک از سویه‌های *سالمونلاتیفی موریوم* (*TA100* و TA98) قرارداده، بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قطر هاله مهار رشد را می‌سنجند که باید حدود ۱۴ میلی‌متر باشد. رشد سویه‌های وحشی در حضور کریستال ویوله مهار نمی‌شود چون کریستال ویوله نمی‌تواند به درون سلول‌های باکتری نفوذ کند (۱۷و۱۶).

ب) جهش uvrB: وجود جهش uvrB با بررسی حساسیت هر یک از سویه‌ها به اشعه UV مشخص می‌شود. در منطقه‌ای از پلیت تلقیح شده با هر یک از سویه‌ها که اشعهUV دیده است، نباید هیچ کلنی بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد تشکیل شود. از آنجایی که این جهش حذفی به ناحیه‌ی Bio-uvrB هم گسترش می‌یابد و به حالت وحشی قابل برگشت نیست، می‌توان وابستگی سویه را به بیوتین نیز آزمایش کرد تا نقص در مسیر ترمیم DNA در اثر حذف uvrB را تایید نماید (۱۷و ۱۶).

ج) فاکتورR: سویه‌های TA100 و TA98 برای داشتن فاکتور مقاومت به آمپی سیلین مورد آزمایش قرار گرفتند. این آزمایش تنها نشانه مناسب برای کسب اطلاع از وجود پلاسمید نواحی خاص DNA یعنی پلاسمید pKM101 است که برای افزایش حساسیت به مواد جهش‌زا، همانندسازی وحساسیت بهUV، ضروری می‌باشد. بدین منظور دیسک آغشته به آمپی‌سیلین را در سطح پلیت کشت شده در سالمونلا تیفی موریوم (TA100 و TA98) قرار می‌دهیم که نباید هیچ هاله‌ای بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد اطراف آن مشاهده شود (۱۷و ۱۶).

تعیین حداقل غلظت بازدارندگی (MIC) رنگ های مورد مطالعه روی سویه‌های TA100 و TA98: قبل از اجرای تست ایمز ابتدا اثر کشندگی هر یک از سویه ها توسط رنگ‌های مورد مطالعه، بررسی شد. برای این‌کار از روش چاهک استفاده شد. ابتدا کشت شبانه‌ای از هر دو سویه TA98 و TA100 تهیه شد و بعد از ۱۵ ساعت برای اطمینان از وجود غلظت مناسب از باکتری در محیط کشت، تراکم آن در ۵۴۰ نانومتر به کمک دستگاه اسپکترو فتومتر بررسی شد. میزان جذب در این طول موج باید بین ۰/۱ تا ۰/۲ باشدتا بتواند میزان 10^8 cfu/ml را تامین نماید. برای تنظیم این میزان جذب از محیط نوترینت براث استریل استفاده شد. ۶ چاهک برای هر نمونه از رنگ‌های مورد مطالعه در پلیت‌های حاوی محیط کشت نوترینت آگارتلقیح شده با هر یک از سویه‌ها (به‌طور مجزا) آماده شد. به دلیل اهمیت اثر کشندگی غلظت های مختلف رنگ بر سویه‌ها به ترتیب برای شرکت‌های A و B از غلظت‌های ۲/۵، ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰ و ۸۰ (میکرولیتر بر ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر) و برای شرکت C از غلظت‌های ۱۵، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰ (میکرولیتر بر ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر) استفاده شد. دو چاهک نیز یکی برای کنترل منفی و دیگری برای کنترل مثبت در نظر گرفته شد. در داخل چاهک‌ها ۱۰۰ میکرولیتر نوترینت براث استریل شده ریخته شد و سپس ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت ۸۰ میکروگرم بر ۱۰ میلی لیتر از نمونه رنگ‌های شرکت‌های A و B برداشته و در چاهک اول تلقیح شد. بعد از همین چاهک ۱۰۰ میکرولیتر برداشته، به کمک پیپت به چاهک بعدی تلقیح شد و همین کار تا چاهک ششم انجام گرفت در انتها از چاهک ششم، مقدار ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و بیرون ریخته شد. برای رنگ‌های شرکت C نیز به ترتیب ۱۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های ۱۵، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰ میکرولیتر بر ۱۰ میلی‌لیتر به چاهک‌های اول تا ششم اضافه شد. به چاهک‌های ۷ و ۸ به‌ترتیب کنترل مثبت شامل ۱۰۰ میکرولیتر باکتری و ۱۰۰ میکرولیتر نوترینت براث و کنترل منفی فقط شامل ۲۰۰ میکرولیتر نوترینت براث استریل می‌باشد. رشد سویه‌ها دراطراف چاهک‌های حاوی غلظت‌های مختلف از هر نمونه رنگ، بعد از ۲۴ ساعت انکوباسیون در ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد و عدم وجود هاله عدم رشد گویای آن خواهد بود که غلظت‌های تعیین شده از رنگ‌ها، فاقد اثر کشندگی بر سویه‌های TA100 و TA98 هستند (۱۸).

آزمون جهش‌زایی رنگ‌ها به روش مستقیم با استفاده از *سالمونلاتیفی موریوم* سویه‌های TA98 و TA100: در مرحله‌ی اول این آزمون، به ۲ میلی‌لیتر تاپ آگار تهیه شده که حاوی محلول هیستیدین و بیوتین می‌باشد، ۵۰ میکرولیتر نمونه رنگ با غلظت‌های یاد شده وتهیه شده از کنسانتره و به‌صورت محلول در آب مقطر و ۱۰۰ میکرولیتر کشت تازه شبانه *سالمونلاتیفی موریوم* (TA100 و یا TA98) اضافه شد، سپس محتویات این لوله پس از ۳ ثانیه تکان در شیکر به‌طور یکنواخت در سطح محیط آگار حداقل گسترده شد. برای هر کدام از ۳ غلظت تعیین شده از نمونه رنگ‌های مورد آزمایش ۳ پلیت در نظر گرفته شد. همچنین کنترل مثبت و منفی نیز در آزمون لحاظ شد. کنترل منفی برای هر دو سویه TA98 و TA100 حاوی باکتری و آب مقطر استریل بوده، که حضور آن برای نشان دادن تعداد باکتری‌هایی که جهش برگشتی خود به خودی می‌یابند برای هر سویه مورد آزمایش ضروری است. کنترل مثبت برای سویه‌ی TA100، سدیم آزاید و برای سویه‌ی TA98، ۴-نیترو کینولین n- اکساید (4NQO) در نظر گرفته شد. که موادی با جهش‌زایی و سرطان زایی اثبات شده می‌باشند. این ترکیبات جهش زاهای تشخیصی خاص برای هر سویه هستند (۱۷). بعد از سفت شدن آگار، پلیت درانکوباتور ۳۷ درجه‌ی سانتی‌گراد قرار داده شد تا پس از۴۸ ساعت، کلنی‌های برگشت یافته در پلیت‌های حاوی نمونه رنگ وپلیت‌های کنترل منفی شمارش شوند.

روش تجزیه و تحلیل داده‌ها: در پایان آزمایش، تعداد کلنی‌های برگشتی در پلیت‌های حاوی غلظت‌های مختلف از رنگ‌ها و تعداد کلنی‌ها در پلیت حاوی کنترل منفی شمارش شده و نسبت جهش برگشتی محاسبه و جهش‌زا بودن یا نبودن ماده مورد مطالعه ارزیابی گردید. در واقع جهش برگشتی (MR)، نسبت تعداد کلنی‌های برگشتی در غلظت معین از نمونه به تعداد کلنی‌های برگشتی در کنترل منفی می‌باشد. در صورتی که میانگین تعداد کلنی‌های برگشتی درغلظت‌های مختلف رنگ‌ها مساوی و یا بیش از ۲ برابر میانگین تعداد کلنی ها در ۳ پلیت کنترل منفی باشد MR بزرگتر مساوی ۲ بیانگر جهش‌زا بودن رنگ مورد مطالعه است (۱۷).

یافته‌ها

نتایج حاصله در تایید ژنوتیپ سویه‌های سالمونلایی TA100 و TA98: تست حساسیت به کریستال ویوله: هاله عدم رشد در اطراف دیسک حاوی کریستال ویوله مشاهده و قطر هاله حدود ۱۴ میلی‌متر اندازه‌گیری شد. بنابراین سویه‌ها از لحاظ حساسیت به کریستال ویوله تایید شدند.

تست حساسیت به اشعه UV: سویه‌ها در قسمت اشعه دیده توسط اشعه UV رشد نداشتند، ولی در قسمت اشعه ندیده رشد کافی مشاهده شد. و نقص در ترمیم DNA بدین وسیله تایید شد.

تست مقاومت به آمپی‌سیلین: حضور فاکتور R با مقاومت به آمپی سیلین تایید شد که حضور پلاسمید Pkm101 را اثبات می‌کند و نیز باعث افزایش حساسیت به اشعه UV و مواد جهش‌زا می‌شود.

تست MIC: تست MIC در غلظت‌های مورد نیاز براساس غلظت‌های استاندارد مورد استفاده در صنعت انجام شد. و در این غلظت‌ها هیچ فعالیت ضد میکروبی و بازدارندگی مشاهده نشد و در نتیجه، غلظت‌های ۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکرولیتر در ۱۰ میلی‌لیتر برای نمونه رنگ شرکت‌های A و B و غلظت‌های ۱۵، ۳۰ و۶۰ میکرولیتر در ۱۰ میلی‌لیتر برای نمونه رنگ شرکت C انتخاب شد.

نتایج حاصل از جهش‌زایی مستقیم رنگ‌های طبیعی خوراکی به روش Ames: نتایج حاصل از جهش‌زایی مستقیم رنگ‌های طبیعی سبز تیره، سبز روشن، قهوه‌ای تیره، زرد طلایی، نارنجی و آلبالویی مربوط به سه برند مختلف با استفاده از *سالمونلا تیفی موریوم* TA98 و TA100 در جدول ۱ آورده شده است. پلیت‌های کنترل مثبت برای تایید خصوصیت جهش خود به خودی و پلیت‌های کنترل منفی نشان‌دهنده جهش برگشتی است. در این مطالعه برای ۳ غلظت تعیین شده از نمونه مورد آزمایش ۳ پلیت در نظر گرفته شده است و درمجموع میانگین آن‌ها با میانگین کنترل‌های منفی هر بار کشت با هم مقایسه شده است و مطابق جدول ۱ مشخص شد که رنگ آلبالویی شرکت C تست شده برای جهش‌زایی برای سویه‌های TA100 و TA98، در هر ۳ غلظت تعیین شده (۱۵، ۳۰ و۶۰ میکرولیتر در ۱۰ میلی‌لیتر) هیچ‌گونه فعالیت جهش‌زایی مستقیمی از خود نشان نداده است.

*جدول ۱: نتایج حاصل از جهش‌زایی رنگ‌های طبیعی شرکت **A***

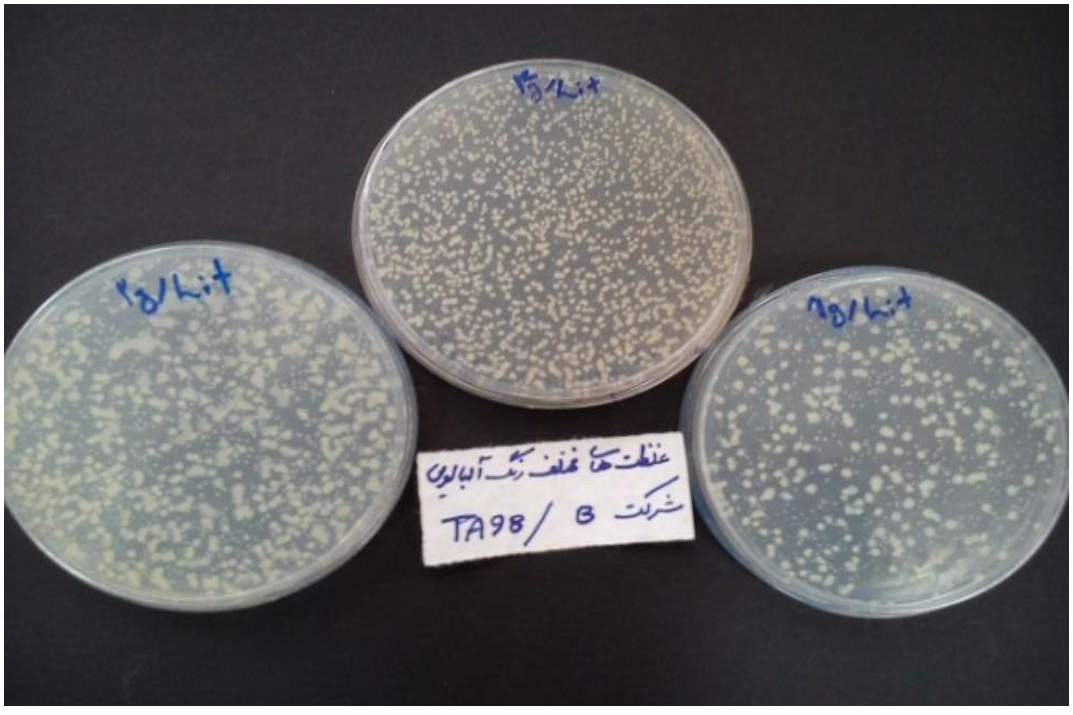
نمونه	غلظت **µL/10ml**	تعداد کلنی‌های برگشتی با استفاده از سویه **TA98**		تعداد کلنی‌های برگشتی با استفاده از سویه **TA100**	
		Mean± SD	MR	Mean± SD[1]	MR[2]
کنترل منفی	---	۲۵/۶۶±۱/۱۵	(۱)	۱۰۳±۲	(۱)
کنترل مثبت	---	٤۲٤/٦٦±٤/۱٦	(۱٦/٥٤)	۸۷۲±۲/٥۱	(۸/٤٦)
رنگ قهوه ای تیره	۱۰	۲۳±۳	(۰/۸۹)	٦٥±۲	(۰/٦۳)
	۲۰	۲۵/٦٦±۱/۱٥٤	(۱)	٦۷±۲	(۰/٦٥)
	٤۰	۳۰±۲	(۱/۱٦)	۷۳±۱	(۰/۷)
کنترل منفی	---	۲۵/٦٦±۰/٥۷	(۱)	۱۰۳±۲/٦٤	(۱)
کنترل مثبت	---	٤۹٤/۳۳±٤/۰٤	(۱۹/۲٦)	۷۹۳±٤/۲٤	(۷/٦۹)
رنگ زرد طلایی	۱۰	۱۱±۱	(۰/٤۲)	۷۰±۲	(۰/٦۷)
	۲۰	۱۲/۳۳±۱/٥۲	(۰/٤۸)	۷۸±۲/٦٤	(۰/۷٥)
	٤۰	۳٥±۱	(۱/۳٦)	۸۲±۲/٤٤	(۰/۷۹)
کنترل منفی	---	۲۹±۷	(۱)	٥۰±۱	(۱)
کنترل مثبت	---	۲۹۱/٦٦±۱۰/۲٦	(۱۰/۰٥)	۹۸۲±٤/۲٤	(۱۹/۶۴)
رنگ سبز تیره	۱۰	۲۱±۲	(۰/۷۲)	۲٥±۱	(۰/٥)
	۲۰	۲٤/٦٦±۳/۰٥	(۰/۸٥)	۲۸±۱	(۰/٥٦)
	٤۰	۱۸±۲	(۰/٦۲)	۳۰±۱	(۰/٦)
کنترل منفی	---	۲۳/٦٦±۲	(۱)	٤۰±۱	(۱)
کنترل مثبت	---	٥۲۲±۰/۳۲	(۲۲/۰٦)	۸۹۱±۸/٥	(۲۲/۲۷)
رنگ سبز روشن	۱۰	۲۰±۱	(۰/۸)	۱۷±۱	(۰/٤۲)
	۲۰	۲۳±٤/۳٥	(۰/۹۷)	۲۳±۱	(۰/٥۷)
	٤۰	۲٥/۳۳±۱/٥۲	(۱/۰۷)	۲۸±۱	(۰/۷)
رنگ نارنجی		NT[3]		NT	
رنگ آلبالویی		NT		NT	

۱. میانگین و انحراف معیار برای ۳ پلیت در هر غلظت

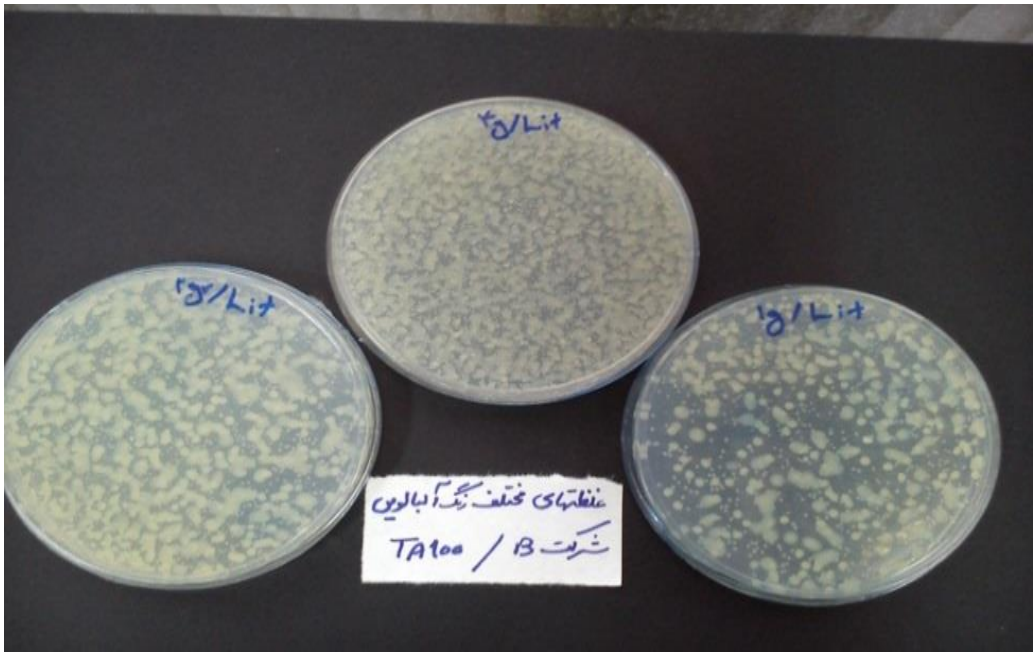
۲. نسبت تعداد کلنی های برگشتی در نمونه ها به کنترل منفی

۳. مطالعه جهش‌زایی بر روی این رنگ‌ها به علت عدم تولید توسط شرکت‌های مربوطه انجام نشد.

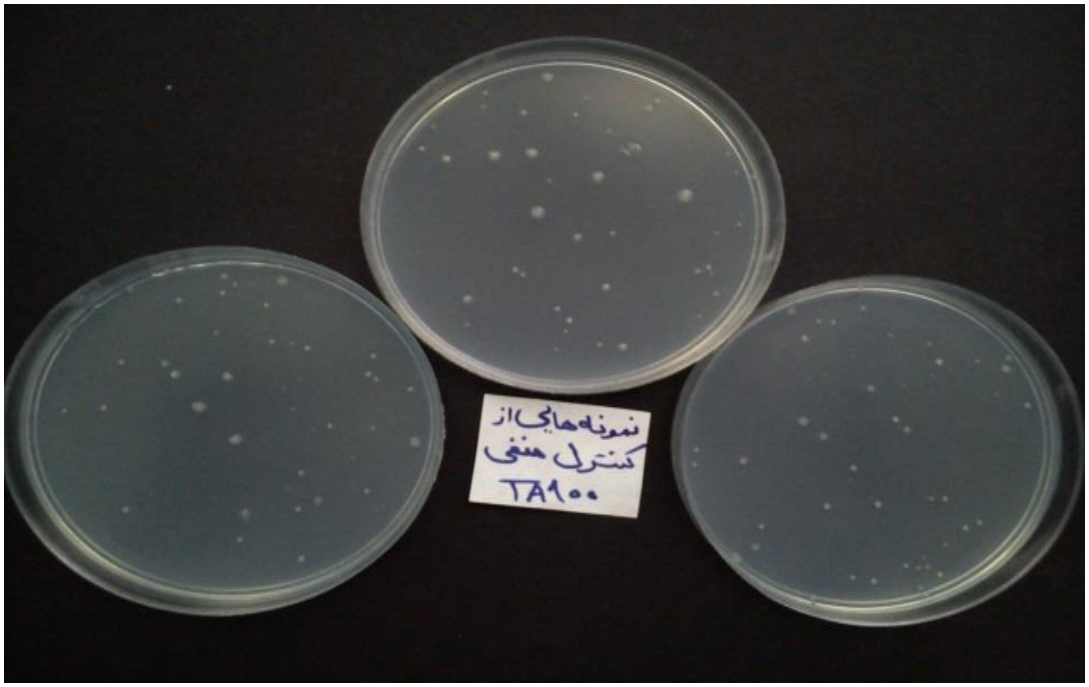
همچنین رنگ آلبالویی شرکتB با استفاده از سویه TA100 و TA98 در هر سه غلظت تعیین شده (۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکرولیتر در ۱۰ میلی لیتر) از خود جهش‌زایی مستقیم نشان داده است (شکل ۳و ۲و ۱). رنگ زرد طلایی شرکت‌های A و Cبا استفاده از سویه TA100 و TA98 در ۳ غلظت مشخص شده هیچ‌گونه فعالیت جهش‌زایی مستقیمی نشان ندادند و رنگ زرد طلایی شرکت B با استفاده از سویه‌های TA100 و TA98 در هر ۳ غلظت مشخص شده ازخود جهش‌زایی مستقیم نشان داد. رنگ قهوه‌ای تیره شرکت B با استفاده از سویه TA100 در هر سه غلظت تعیین شده (۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکرولیتر در ۱۰ میلی‌لیتر) در مقایسه با کنترل منفی از خود فعالیت جهش‌زایی مستقیم نشان داد و در هر ۳ غلظت تعیین شده برای سویه TA98 هیچ‌گونه فعالیت جهش‌زایی مستقیمی در تست دیده نشد. در بررسی رنگ قهوه‌ای تیره شرکت C با استفاده از سویه TA100 در هر ۳ غلظت مشخص شده هیچ‌گونه فعالیت جهش‌زایی دیده نشد ولی با استفاده از سویه TA98 و در غلظت ۶۰ میکرولیتر در ۱۰ میلی‌لیتر این رنگ از خود جهش‌زایی مستقیم نشان داد. رنگ نارنجی شرکت B با استفاده از سویه TA100 در دو غلظت ۲۰ و ۴۰ میکرولیتر در ۱۰ میلی‌لیتر در مقایسه با کنترل منفی از خود جهش‌زایی مستقیم نشان داده است اما با استفاده از TA98 هیچ‌گونه فعالیت جهش‌زایی مستقیم از خود نشان نداده است. رنگ‌های سبز تیره و سبز روشن هر سه شرکت A ,B ,C و نارنجی شرکت C و قهوه‌ای تیره شرکت A در هر سه غلظت تعیین شده با استفاده از ۲ سویه TA100 و TA98 در مقایسه با کنترل منفی، هیچ گونه فعالیت جهش‌زایی مستقیمی از خود نشان ندادند (جدول ۳و۲).



شکل ۱: رنگ آلبالویی شرکت B با استفاده از سویه TA98 در هر سه غلظت تعیین شده (۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکرولیتر در ۱۰ میلی لیتر) از خود جهش‌زایی مستقیم نشان داده است



*شکل ۲: رنگ آبالویی شرکت **B** با استفاده از سویه **TA100** در هر سه غلظت تعیین شده (۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکرولیتر در ۱۰ میلی‌لیتر) از خود جهش‌زایی مستقیم نشان داده است.*



شکل۳: پلیت حاوی کنترل منفی TA100

نتایج حاصل از جهش‌زایی مستقیم رنگ‌های طبیعی خوراکی مربوط به سه برند مختلف

جدول ۲: نتایج حاصل از جهش‌زایی رنگ‌های طبیعی شرکت ***B***

نمونه	غلظت µL/10ml	تعداد کلنی‌های برگشتی با استفاده از سویه TA98		تعداد کلنی‌های برگشتی با استفاده از سویه TA100	
		Mean± SD	MR	Mean± SD	MR
کنترل منفی	---	۲۹±۷/۲۱	(۱)	۵۰±۵/۵۶	(۱)
کنترل مثبت	---	۵۰۰/۳۳±۲/۵۱	(۱۷/۲۵)	۱۰۲۶/۶۶±۶۴/۲۹	(۲۰/۵۳)
رنگ قهوه ای تیره	۱۰	۲۳/۶۶±۵/۵	(۰/۸)	۶۰۳/۳۳±۸۹/۶۲	(۱۲/۰۶)
	۲۰	۲۴/۶۶±۳/۵۱	(۰/۸)	۶۱۳/۳۳±۶۱/۱۰	(۱۲/۲۶)
	۴۰	۳۲/۳۳±۱/۰۲۶	(۱/۱۱)	۸۲۸/۳۳±۱۷/۵۵	(۱۶/۵۶)
کنترل منفی	---	۲۸/۶۶±۷/۷۶	(۱)	۵۰±۵/۵۶	(۱)
کنترل مثبت	---	۴۵۰/۶۶±۲/۰۸	(۱۵/۷۲)	۹۹۲/۵±۱۰/۶	(۱۹/۸۵)
رنگ زرد طلایی	۱۰	۴۳۱/۶۶±۲/۰۸	(۱۵/۰۳)	۷۴۰±۲/۶۴	(۱۴/۸)
	۲۰	۷۶۰±۱	(۲۶/۵۱)	۱۰۰۰±۴/۵۸	(۲۰)
	۴۰	۸۰۰/۶۶±۷/۵۷	(۲۷/۹)	۱۰۰۰±۵/۵۶	(۲۰)
کنترل منفی	---	۲۹/۳۳±۷/۳۷	(۱)	۵۰/۶۶±۱/۱۳	(۱)
کنترل مثبت	---	۴۰۶±۹/۶۴	(۱۳/۸۴)	۱۰۰۴±۵/۵۶	(۱۹/۸۱)
رنگ سبز تیره	۱۰	۲۱±۲	(۰/۷۱)	۳۹±۱	(۰/۷۶)
	۲۰	۲۴/۶۶±۳/۰۵	(۰/۸۴)	۴۳±۱	(۰/۸۴)
	۴۰	۲۵±۳	(۰/۸۵)	۴۶±۱	(۰/۹)
کنترل منفی	---	۲۳±۲/۶۴	(۱)	۴۰±۱	(۱)
کنترل مثبت	---	۵۰۸/۳۳±۸/۵	(۲۲/۱)	۸۹۱±۸/۵	(۲۲/۲۷)
رنگ سبز روشن	۱۰	۱۹/۶۶±۱/۵۲	(۰/۸۵)	۲۵±۱	(۰/۶۲)
	۲۰	۲۳±۱	(۱)	۳۰±۱	(۰/۷۵)
	۴۰	۲۵/۳۳±۲/۳	(۱/۱)	۴۱±۱	(۱/۰۲)
کنترل منفی	---	۲۲/۶۶±۱/۱۵	(۱)	۵۰±۱	(۱)
کنترل مثبت	---	۵۲۰/۶۶±۷/	۵(۱۰/۴۱)	۹۸۱±۳/۶	(۱۹/۶۲)
رنگ نارنجی	۱۰	۱۴±۲	(۰/۶۱)	۹۱±۱	(۱/۸۲)
	۲۰	۱۸±۲/۶۴	(۰/۷۹)	۱۴۶±۱۰	(۲/۹۲)
	۴۰	۱۹±۳/۶	(۰/۸۳)	۲۲۲±۱۰	(۴/۴۴)
کنترل منفی	---	۳۲/۵±۳/۵۳	(۱)	۵۰±۱	(۱)
کنترل مثبت	---	۵۱۴/۳۳±۴/۱۶	(۱۵/۸۲)	۹۸۱±۳/۶	(۱۹/۶۲)
رنگ آلبالویی	۱۰	۵۷۲/۶۶±۶/۴۲	(۱۷/۶۲)	۷۵۰±۱	(۱۵)
	۲۰	۸۱۶±۱۴	(۲۵/۱)	۸۲۳±۱	(۱۶/۴۶)
	۴۰	۸۷۰±۳۰	(۲۶/۷)	۸۹۱±۱	(۱۷/۸۲)

جدول ۳: نتایج حاصل از جهش‌زایی رنگ‌های طبیعی شرکت C

نمونه	غلظت	تعداد کلنی‌های برگشتی با استفاده از سویه **TA98**		تعداد کلنی‌های برگشتی با استفاده از سویه **TA100**	
	µL/10ml	Mean± SD	MR	Mean± SD	MR
کنترل منفی	---	۲۹±۷/۲۱	(۱)	۳۸۳/۳۳±۲۸/۸۶	(۱)
کنترل مثبت	---	۵۱۰/۳۳±۷/۰۲	(۱۷/۵۹)	۹۷۵±۳۵/۳۵	(۲/۵٤)
رنگ قهوه ای تیره	۱۵	۲۹/٦٦±۱/۵۲	(۱/۰۲)	۷٤٦/٦٦±۷۷/۵۷	(۱/۹٤)
	۳۰	۳۰±۵	(۱/۰۳)	٦٦۰±۳۰	(۱/۷۲)
	٦۰	۷٤٦/٦٦±۳۵/۱۸	(۲۵/۷٤)	۷۰۳/۳۳±٦۸/۰٦	(۱/۸۳)
کنترل منفی	---	۲۹±۷/۲۱	(۱)	۳۹/٦٦±۳/۷۸	(۱)
کنترل مثبت	---	۳۸۷/۳۳±٦/۱۱	(۱۳/۳۵)	۹۹۵/٦٦±۹/۲۹	(۲۵/۱)
رنگ زرد طلایی	۱۵	۲۷/٦٦±٦/۱۱	(۰/۹۵)	۲۸/۳۳±۳/۷۸	(۰/۷۱)
	۳۰	۲۲/۳۳±۳/۷۸	(۰/۷۷)	۳۰/۳۳±۵/۰۳	(۰/۷٦)
	٦۰	۲۹/۳۳±٤/۷۲	(۱/۰۱)	٤۱±٦/۵۵	(۱/۰۳)
کنترل منفی	---	۲۹/۳۳±٦/۰۲	(۱)	۵۰/٦٦±۱/۱۳	(۱)
کنترل مثبت	---	۳۲۵/٦٦±۲۷/٤٦	(۱۱/۱)	۹٤۷±۳/٦	(۱۸/٦۹)
رنگ سبز تیره	۱۵	۲۲/٦٦±۲/۰۸	(۰/۷۷)	۳۲±۱	(۰/٦۳)
	۳۰	۲٤/۳۳±۲/۵۱	(۰/۸۲)	۳۰±۱	(۰/۵۹)
	٦۰	۲۸/۳۳±٤/۷۲	(۰/۹٦)	۳۸±۱	(۰/۷۵)
کنترل منفی	---	۲۳/٦٦±۰/۵۷	(۱)	٤۰±۱	(۱)
کنترل مثبت	---	٤۹٦±۷	(۲۰/۹٦)	۸۹۱±۸/۵	(۲۲/۲۷)
رنگ سبز روشن	۱۵	۱۱±۲	(۰/٤٦)	۲۰±۱	(۰/۵)
	۳۰	۱۲/۳۳±۳/۲۱	(۰/۵۲)	۲۷±۱	(۰/٦۷)
	٦۰	۱٤±۱	(۰/۵۹)	۳۲±۱	(۰/۸)
کنترل منفی	---	۲۲/٦٦±۱/۵۲	(۱)	۵۰±۱	(۱)
کنترل مثبت	---	٤٦٤±٤/۵۸	(۲۰/٤۷)	۹۸۱±۳/۷	(٤۳/۲۹)
رنگ نارنجی	۱۵	۱۳±۳/٤٦	(۰/۵۷)	٤۳±۱	(۰/۸٦)
	۳۰	۱۹±۲/٦٤	(۰/۸۳)	۵٦±۱	(۱/۱۲)
	٦۰	۲۱±۱	(۰/۹۲)	۸٤±۱	(۱/٦۸)
کنترل منفی	---	۲۲/٦٦±۲/۰۸	(۱)	۵۰±۱	(۱)
کنترل مثبت	---	٤۹۲/٦٦±۳/۰۵	(۲۱/7)	۹۸۱±۳/٦	(۱۹/٦۲)
رنگ آلبالویی	۱۵	۱۹±۲/٦٤	(۰/۸۳)	۵٤±۱	(۱/۰۸)
	۳۰	۲۱±۲/٦٤	(۰/۹۲)	۵۸±۱	(۱/۱٦)
	٦۰	۲۲/٦٦±۲/۰۸	(۱)	٦۲±۱	(۱/۲٤)

*جدول ۴: مقایسه نتایج حاصل از بررسی تعداد کلنی‌های برگشتی در سویه‌های **TA98** و **TA100** برای غلظت‌های مختلف از رنگ‌های طبیعی خوراکی تولیدی در شرکت‌های **A**، **B** و **C***

	شرکت سازنده و غلظت رنگ‌ها	**A**(µL/10ml)			**B**(µL/10ml)			**C**(µL/10ml)		
	و سویه‌ی به کار رفته	۱۰	۲۰	٤۰	۱۰	۲۰	٤۰	۱۵	۳۰	٦۰
TA98	قهوه‌ای تیره	-	-	-	-	-	-	-	-	++
	زرد طلایی	-	-	-	+	++	++	-	-	-
	سبز تیره	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	سبز روشن	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	نارنجی	ND	ND	ND	-	-	-	-	-	-
	آلبالویی	ND	ND	ND	++	++	++	-	-	-
TA100	قهوه ای تیره	-	-	-	++	++	++	-	-	-
	زرد طلایی	-	-	-	++	++	++	-	-	-
	سبز تیره	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	سبز روشن	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	نارنجی	-	-	-	-	++	++	-	-	-
	آلبالویی	-	-	-	++	++	++	-	-	-

- : میزان کلنی‌های برگشتی کمتر از ۲ برابر کلنی‌های برگشتی در پلیت‌های کنترل منفی (فاقد جهش‌زایی).

+: میزان کلنی‌های برگشتی بیشتر از ۲ برابر کلنی‌های برگشتی در پلیت‌های کنترل منفی و کمتر از۵۰۰ کلنی (جهش‌زایی ضعیف).

++: میزان کلنی‌های برگشتی بیشتر از ۲ برابر کلنی‌های برگشتی در پلیت‌های کنترل منفی و بین ۲۵۰۰-۵۰۰ کلنی (جهش‌زایی متوسط).

***ND**: عدم تولید رنگ توسط شرکت تولید کننده.*

بحث

در قرن حاضر یکی از علل مرگ و میر در جوامع صنعتی و پیشرفته، سرطان می‌باشد. در دو دهه گذشته انواع متفاوتی از مواد جهش‌زا و سرطان‌زای شیمیایی شناخته شده‌اند. امروزه دانشمندان بر این عقیده‌اند که آسیب‌ها و تغییرات ژنتیکی اعم از تغییرات ایجاد شده در توالی و انسجام DNA، بروز جهش در ژن‌ها و دیگر تغییرات ژنتیکی در ساختار کروموزومی در سرطان‌زایی نقش موثری دارند. از این جهت طراحی روش‌هایی برای مشخص نمودن سرطان‌زایی مواد بسیار با اهمیت می‌باشد. امروزه یکی از روش‌های متداول جهت غربالگری و شناسایی مواد جهش‌زا و ضد جهش‌زا روش ایمز است (۲۰و ۱۹). کاربرد روش ایمز در این تحقیق به‌عنوان آزمونی استاندارد و دقیق جهت شناسایی جهش‌زایی مواد می‌باشد. بررسی مقایسه‌ای که بر روی روش‌های مختلف سنجش جهش‌زایی مواد شیمیایی انجام شد، به این نتیجه دست یافتند که حدود ۷۱ تا ۷۶ درصد از نتایج جهش‌زایی مواد شیمیایی با استفاده از سوش‌های مختلف جهش یافته سالمونلا در آزمون‌ها می‌باشد (۲۱). در این پژوهش، جهش یافتگی سالمونلا TA100 و TA98 با جدول ارائه شده توسط ایمز و همکاران که بر اساس آخرین تحقیقات، ارایه داده شده است، هم سویی نشان داده و سویه‌ها تایید شدند. بر طبق نتایجی که ایمز و همکارانش با بررسی بر روی ۳۰۰ نوع ماده شیمیایی داشته‌اند، این تئوری بیان گردید که در صورتی که تعداد کلنی‌های برگشتی بر روی محیط کشت حاوی نمونه‌ها

۲ برابر و بیشتر از کلنی‌های کنترل منفی باشند، ماده جهش‌زا محسوب می‌شود (۲۲). در سال ۲۰۰۴، واکابایاشی و همکارانش عنوان نمودند که ترکیبات مختلف را می‌توان بر اساس تعداد کلنی‌های برگشتی به ۴ گروه تقسیم کرد: جهش‌زای ضعیف (۵۰۰ کلنی برگشتی)، جهش‌زای متوسط (۲۵۰۰-۵۰۰ کلنی برگشتی)، جهش‌زای قوی (۵۰۰۰-۲۵۰۰ کلنی برگشتی) و جهش‌زای بسیار قوی (بیش از ۵۰۰۰ کلنی برگشتی) (۲۳). بررسی‌های انجام شده در تحقیق حاضر بر روی رنگ‌های طبیعی خوراکی نشان می‌دهد (جدول ۴) که نمونه رنگ‌های زرد طلایی و آلبالویی شرکت B برای دو سویه TA100 و TA98 در هر سه غلظت تعیین شده (۱۰،۲۰ و ۴۰ میکرولیتر در ۱۰ میلی‌لیتر) جهش‌زا بوده که در دو غلظت (۲۰ و ۴۰ میکرولیتر در ۱۰ میلی‌لیتر) بیشترین میزان جهش‌زایی را بیان می‌کنند. میانگین تعداد کلنی‌های برگشتی *سالمونلا تیفی موریوم* در عدم حضور میکروزوم کبدی موش برای بررسی جهش‌زایی رنگ زرد طلایی و آلبالویی شرکت B، برای رنگ زرد طلایی برای سویه TA100، در هر دو غلظت (۲۰ و ۴۰ میکرولیتر در ۱۰ میلی لیتر) بیش از ۱۰۰۰ کلنی و برای سویه TA98 ، ۷۶۰ و ۸۰۰ کلنی و برای رنگ آلبالویی برای سویه TA100 در غلظت ۲۰ میکرولیتر در ۱۰ میلی‌لیتر ، ۸۲۳ کلنی و در غلظت ۴۰ میکرولیتر در ۱۰ میلی‌لیتر، ۸۹۱ کلنی و برای سویه TA98 به ترتیب ۸۱۶ و ۸۷۰ کلنی گزارش شد. بنا بر نتایج به دست آمده همان گونه که در جدول ۴ اشاره شده است، رنگ‌های زردطلایی و آلبالویی در غلظت‌های مورد بررسی، برای دو سویه TA100 و TA98 و رنگ قهوه‌ای تیره شرکت B برای هر سه غلظت (۱۰، ۲۰ و ۴۰ میکرولیتر در ۱۰ میلی‌لیتر) برای سویه TA100 جهش‌زا و سرطان‌زای متوسط می‌باشد در حالی که در بررسی جهش زایی رنگ قهوه‌ای تیره شرکت C به کمک سویه TA98 تنها در غلظت ۶۰ میکرولیتر در ۱۰ میلی‌لیتر این رنگ جهش زای متوسط محسوب می‌گردد و در غلظت‌های کمتر و با سویه TA100 جهش‌زا ظاهر نشده است.

نکته جالب توجه در جدول ۴ آن است که رنگ‌های زرد طلایی و آلبالویی شرکت B در غلظت‌های مورد بررسی برای هر دو سویه TA98 و TA100 جهش زای مستقیم ظاهر شده‌اند. از آنجا که سویه TA98 توانایی شناسایی جهش‌های مبتنی بر تغییر چارچوب (Frame Shift) را داراست و سویه TA100 توانایی شناسایی جهش‌های جایگزینی جفت بازهای آلی در DNA یعنی (Base-pair substitution) را دارد، می‌توان نتیجه گرفت که این دو رنگ با هر دو مکانیسم یاد شده می‌توانند جهش زا باشند.این در حالی است که رنگ قهوه‌ای تیره شرکت B تنها در جوار سویه TA100 جهش‌زا ظاهر شده است و می‌توان نتیجه گرفت که این رنگ دارای مکانیسم جهش‌های مبتنی بر جایگزینی جفت بازهای آلی در DNA می‌باشد ولی قادر به جهش‌زایی با مکانیسم تغییر چارچوب نیست.

نمونه رنگ‌های سبز تیره و سبز روشن شرکت‌های A، B، C و رنگ زرد طلایی شرکت‌های A و C برای دو سویه TA100 و TA98 و نارنجی شرکت C برای سویه TA98 در تحقیق حاضر جهش‌زا اعلام نشد زیرا تعداد کلنی‌های برگشتی *سالمونلا تیفی موریوم* در عدم حضور میکروزوم کبدی موش کمتر از ۲ برابر کنترل منفی بود.

در حال حاضر در کشور ما سرطان جزو بیماری‌های با شیوع بالا و پر هزینه به شمار می‌آید. بنابراین یافتن ترکیبات جهش‌زا و ضد جهش می‌تواند در پیشگیری از این بیماری و کاهش هزینه‌های درمان و ارتقای شاخص‌های سلامت کمک موثری به حساب آید. هرچند همه جهش‌ها مضر به شمار نمی‌آیند و حتی برخی مفیدند ولی جهش‌زایی لازمه کارسینوژنز و ایجاد سرطان است (۹). در این تحقیق به دلیل نبود امکانات کافی و هزینه بالای تهیه میکروزوم کبدی (S9) تنها به بررسی جهش‌زایی مستقیم رنگ‌های خوراکی با منشا طبیعی پرداخته‌ایم. مطالعه‌ای که بر روی رنگ طبیعی

آنتوسیانین در سال ۲۰۱۴ توسط نیترانون با استفاده از تست ایمز و سویه‌های TA100 و TA98 انجام گرفت، جهش‌زایی در این رنگ طبیعی برخلاف تحقیق حاضر مشاهده نشد (۲۴) ولی در مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۹ توسط شیباموتو روی رنگ‌های طبیعی کورکومین (رنگ زرد حاصل از زردچوبه) و کارامل (رنگ قهوه‌ای روشن) انجام شد جهش‌زایی این دو رنگ ثابت گردید (۱۵). نتایج این تحقیق بیانگر این موضوع است که حتی رنگ‌هایی با منشاء طبیعی نیز می‌توانند اثرات سوء سمی برای انسان داشته باشند و به طور مطلق بی‌ضرر نیستند (۲۶و۲۵). رنگ‌های طبیعی مورد مطالعه در تحقیق ما، در بعضی غلظت‌ها جهش‌زایی نشان دادند که این نتیجه با نتایج تحقیق ذکر شده، مطابقت دارد. همچنین تحقیقات نشان داده که حتی استعمال خارجی رنگ‌ها می‌تواند اثرات مضری بر سلامت انسان داشته باشد. بر اساس تحقیقات انجام یافته برخی از رنگ‌ها که در داروها و مواد آرایشی با استعمال خارجی به کار می‌رفت به علت ایجاد تومور تیروئید (در موش‌های نر) کنار گذاشته شد و FDA تایید کرد که مصرف این رنگ در انسان با خطر روبرو است (۲۷)، بنابراین می‌توان گفت که بسیاری از مواد آرایشی و بهداشتی می‌توانند اثرات جهش زایی مستقیم روی بدن انسان بگذارند. با وجود نتایج به دست آمده در این تحقیق لازم است که جهت اطمینان بیشتر نسبت به بررسی متابولیت‌های این رنگ‌ها در بدن (جهش زایی غیر مستقیم) تحقیقات لازم انجام گیرد.

نتیجه گیری

نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که برخی از رنگ‌های طبیعی خوراکی مورد استفاده در صنایع غذایی به رغم پر مصرف بودن در صنایع غذایی، دارای خاصیت جهش‌زایی مستقیم با مکانیزم‌های مختلف هستند. امکان غیر فعال شدن این ترکیبات بر اثر متابولیسم در بدن منتفی نیست ولی تحقیقات بیشتری برای اثبات خنثی شدن اثر جهش‌زایی آنها در درون بدن مورد نیاز است که به دلیل محدودیت‌های خاص اینگونه مطالعات و اهمیت آنها در فرصت‌های بعدی پژوهشگران علاقه مند به این حوزه آنها را بررسی خواهند نمود. با این وجود نباید خطرات ناشی از جهش زایی مستقیم این ترکیبات را نادیده گرفت.

پیشنهادات: مهم ترین پیشنهاد راهبردی در این زمینه، افزایش آگاهی صنف تولیدکنندگان و مصرف‌کنندگان این مواد غذایی نسبت به عوارض به‌کارگیری رنگ‌های خوراکی یاد شده و شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده‌ی رنگ‌های طبیعی جهش زا و اقدامات لازم جهت حذف یا جایگزین نمودن رنگ‌های جهش‌زای مورد آزمایش با ترکیباتی با همان کارایی و فاقد اثرات جهش‌زایی و سرطان‌زایی می‌باشد. همچنین پیشنهاد می‌شود پژوهش‌های بیشتری در خصوص جهش‌زایی مواد افزودنی بکار رفته در مواد غذایی انجام شود. جهت اطمینان بیشتر، بررسی متابولیت‌های این رنگ‌ها در بدن و استفاده از روش‌های دیگری برای بررسی جهش‌زایی و سرطان‌زایی همانند آزمون SOS/*umu* و یا Comet Assay ضروری می‌باشد.

تقدیر و تشکر

این مقاله بر اساس پایان نامه کارشناسی ارشد رشته بهداشت و ایمنی مواد غذایی مصوب در دانشگاه علوم پزشکی زنجان به رشته تحریر درآمده است و دارای مصوبه کمیته اخلاق پزشکی به شماره ZUMS.REC.1392.188 میباشد. از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران بخش مرکز کلکسیون میکروبی به خاطر در اختیار قرار دادن سویه‌های مورد استفاده و از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی زنجان به جهت حمایت‌های مالی خود که انجام این مطالعه را ممکن نمودند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1- Moldes AB, Vecino X, Cruz JM. 6- Nutraceuticals and Food Additives. Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Elsevier; 2017. 143-64.

2. Pourahmad J. General toxicology. 1st ed. Tehran: Samat; 2006, 178-1840.

3- Collins TFX, Sprando RL, Shackelford ME, Hansen DK, Welsh JJ. Food and Drug Administration Proposed Testing Guidelines for Reproduction Studies. *Regul Toxicol Pharmacol*. 1999; 30: 29-38.

4- Lin CS, Shoaf SE, Griffiths JC. Pharmacokinetic data in the evaluation of the safety of food and color additives. *Regul Toxicol Pharmacol*. 1992; 15: 62-72.

5- Batada A, Jacobson MF. Prevalence of artificial food colors in grocery store products marketed to children. *Clin Pediatr (Phila).* 2016; 55: 1113-9.

6-Sahari MA. Chemistry of colorants in food. 1st ed. Tehran: Andishmand; 2002: 9-14.

7- Soltandalal M, Mohamadi H, Dastbaz A, Vahedi S, Salsali M, Arasteh M. Surveillance on artifical colours in confectionary producst by chromatography in Tehran. *Gorgan Univ Med Sci J*. 2007; 9: 21.

8- Excellence center of toxicology and food chemistry. 1st ed. Tehran: Tehran University of Medical Sciences Press; 2007, 855-867.

9- McCann J, Choi E, Yamasaki E, Ames BN. Detection of carcinogens as mutagens in the Salmonella/microsome test: assay of 300 chemicals. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 1975; 72: 5135-39.

10- Eslami Pirharati Sh, Rahnema M. Assessment of mutagenic and carcinogenic of PTFE (Ames Test). *Quarter J Biol Sci*. 2010; 3: 51-59.

11- Wessner DR, Maiorano PC, Kenyon J, Pillsbury R, Campbell AM. Spot-overlay Ames test of potential mutagens. *Assoc Biol Lab Educ*. 2000;22:1-18.

12-. Paunikar R, Dawande AY. Detection of potential carcinogens by Ames test. *Asiatic J Biotechnol Resour*. 2010: 1; 57-64.

13- Al-Kobaisi MF. Jawetz, melnick & adelberg's medical microbiology. *Sultan Qaboos Univ Med J*. 2007; 7: 273.

14- Mehrabian S, Majd A, Dana R. Antimutagenic and anticarcinogenic effect of vegetative and generative parts of plantago major L. in Langrood (Gilan) and Hesarak (Karaj) areas. *Quarter J Animal Physioland Develop*. 2009:1; 23-32.

15- Shibamoto T, Bjeldanes B. Introduction to food toxicology. Davis, USA: Academic Press; 2009.

16- Maron DM, Ames BN. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res*. 1983; 113: 173-215.

17- Mortelmans K, Zeiger E. The Ames salmonella/microsome mutagenicity assay. /fundamental and molecular mechanisms of mutagenesis. *Mutat Res*. 2000; 455: 29-60.

18- Andrews JM. Determination of minimum inhibitory concentrations. *J Antimicrob*

Chemother. 2001; 48: 5-16.

19- Hakura A, Shimada H, Nakajima M, et al. Salmonella/human S9 mutagenicity test: a collaborative study with 58 compounds. *Mutagenesis*. 2005; 20: 217-28.

20- Rosenkranz HS. Synergy between systemic toxicity and genotoxicity: relevance to human cancer risk. *Mutat Res*. 2003; 529: 117-27.

21- Laura W.D.V.M. The dangers of Teflon/PTFE for brids. University Food Safety Scientist and Environmental Working Group. 2008; 1-2.

22-Ames B.N. Method for detecting carcinogens and mutagens with the *Salmonella*/ mammalin microsome mutagenicity test. *Mutate Res*. 1976; 31: 347-349.

23- Ohe T, Watanabe T, Wakabayashi K. Mutagens in surface waters: a review. *Mutat Res*. 2004; 567: 109-49.

24- Nitteranon V, Kittiwongwattana C, Vuttipongchaikij S, et al. Evaluations of the mutagenicity of a pigment extract from bulb culture of *Hippeastrum reticulatum*. *Food Chem Toxicol*. 2014; 69: 237-43.

25- Hagiwara A, Imai N, Ichihara T, et al. A thirteen-week oral toxicity study of annatto extract (norbixin), a natural food color extracted from the seed coat of annatto (Bixa orellana L.), in Sprague–Dawley rats. *Food Chem Toxicol*. 2003; 41: 1157-64.

26-Paumgartten FJ،De-Carvalho RR ،Araujo IB ، Pinto FM ،Borges OO ،Souza CA ،et al.Evaluation of the developmental toxicity of Annatto in the rat. *Food Chem Toxicol*. 2002; 40: 1595-601.

27- Hinton DM. US FDA "Redbook II" immunotoxicity testing guidelines and research in immunotoxicity evaluations of food chemicals and new food proteins. *Toxicol Pathol*. 2000. 28: 467-78.

Evaluation of Direct Mutagenesis in some of Natural Food Colors Using Ames Test

Akbari H[1], Zeighami H[2], Mohseni M[3]

[1]Dept.of Food Safety and Hygiene, Faculty of Paramedical, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

[2]Dept. of Microbiology, Faculty of Medicine, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

[3]Dept. of Food and Drug control, School of Pharmacy, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

Correcponding Author: Mohseni M, Dept. of Food and Drug control, School Faculty of Pharmacy, Zanjan University of Medical Sciences, Zanjan, Iran

E-mail: mohsenim@zums.ac.ir

Received: 8 Jun 2016 **Accepted:** 26 Jul 2016

Background and Objective: Nowadays, colors are widely used in various food industries, including sweets, confectionery, ice cream, beverages, and so on. Colors can have asthma-like complications, hyperactivity in children and cancers. Therefore, the aim of this study was to evaluate the direct mutagenic effect of several types of natural colors via Ames method.

Materials and Methods: After preparation of 6 natural colors from three different brands, their direct mutagenesis was investigated by Ames test. In this test, the strains of Salmonella typhimurium TA98 and TA100, carrying the selective mutation in His-Hiscoprotein Histidine, were cultured on glucose culture medium at least in the presence of color samples, and only the bacteria that had His + mutation were colonized.

Results: Direct mutagenicity of the food colors was measured by counting colonies in the plates containing edible color and comparing it with negative controls. The results showed that the number of referent colonies in plates containing cherry red and golden yellow for company B for both strains and the dark brown color of company B and C, and orange color for TA100 and TA98 strains in some concentrations were more than twice comparing the negative control plates and had direct mutagenic effects. The dark green and light green colors of the A, B, C, and golden yellow for companies A, C and cherry red and orange for companies C did not show direct mutagenic activity.

Conclusion: Based on these results, some of the studied colors, despite being declared natural, showed direct mutagenic activity.

Key words: Direct mutation, Natural edible color, Ames test, TA100, TA98