Food Hygiene, Vol. 14, No. 53, Spring 2024

"Research article: 1440"

Extraction and determination of some aflatoxins in corn samples by QuEChERS method combined with dispersive liquid-liquid microextraction coupled to high-performance liquid chromatography

Azadi, H.[1], Afshar Mogaddam, M.R.[2,3], Khandaghi, J.[4,5] *

1. M. Sc Graduate of Food Science and Technology, Sarab Branch, Islamic Azad University, Sarab, Iran
2. Food and Drug Safety Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
3. Pharmaceutical Analysis Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran Department of
4. Food Science and Technology, Sarab Branch, Islamic Azad University, Sarab, Iran
5. Department of food Biotechnology, Biotechnology Research Center, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran

*Corresponding author: khandaghi@iausa.ac.ir
(Received: 2024/2/4 Accepted: 2024/5/12)

Abstract

Mycotoxins-producing fungi can enter the body of animals and humans by contaminating grain and fodder. Aflatoxins are potential carcinogens that can lead to severe health issues such as neurological disorders and liver or kidney failure. In this study, we employed a combination of the QuEChERS method and Dispersive Liquid-Liquid Microextraction (DLLME) for the extraction and determination of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 from corn samples, using High-Performance Liquid Chromatography with Fluorescence Detection (HPLC-FLD). We investigated and optimized the key factors affecting both stages of the extraction process. The developed method was validated by assessing parameters such as the linear range, limits of detection and quantification, repeatability, and extraction recovery. The linear range of the technique, with a coefficient of determination exceeding 0.996, spanned from 0.23 to 200 ng/g. The method achieved a low limit of quantification (LOQ) of 0.23-0.38 ng/g, which is below the permissible limits for the target aflatoxins in corn. The method's reproducibility ranged from 3.9% to 7.1%, and extraction recovery was between 60% and 73%. The technique was applied to corn samples to detect aflatoxin B1 in all samples, with concentrations ranging from 1.1 to 11.2 ng/g. Overall, the proposed method is accurate, reliable, and highly efficient for analyzing and identifying aflatoxins in corn samples.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Aflatoxin, QuEChERS, High Performance Liquid Chromatography, Dispersive liquid-liquid microextraction

«مقاله پژوهشی: ۱۴۴۰»

استخراج و اندازه‌گیری باقی‌مانده برخی از آفلاتوکسین‌ها در نمونه‌های ذرت با روش کچرز تلفیق شده با میکرواستخراج مایع-مایع پخشی جفت‌شده به کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

تعیین آفلاتوکسین‌ها در ذرت به روش کروماتوگرافی

حورا آزادی[۱]، محمدرضا افشارمقدم[۲و۳]، جلیل خندقی[۴و۵*]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، واحد سراب، دانشگاه آزاد اسلامی، سراب، ایران
۲. مرکز ایمنی غذا و دارو، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
۳. مرکز تحقیقات آنالیز دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
۴. گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سراب، دانشگاه آزاد اسلامی، سراب، ایران
۵. گروه بیوتکنولوژی مواد غذایی، مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران
*نویسنده مسئول مکاتبات: khandaghi@iausa.ac.ir

(دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۱۱/۱۵ پذیرش نهایی: ۱۴۰۳/۲/۲۳)

چکیده

قارچ‌های تولیدکننده مایکوتوکسین‌ها می‌توانند گروه وسیعی از غلات و علوفه را آلوده کرده و از این طریق وارد بدن انسان شوند. آفلاتوکسین‌ها مواد سرطان‌زای بالقوه‌ای هستند و همچنین می‌توانند اثرات مخربی از جمله اختلالات عصبی، نارسایی کبد و کلیه را به همراه داشته باشند بنابراین کنترل مقدار آن‌ها در فرآورده‌های غذایی توسط متولیان سلامت کشور از اهمیت زیادی برخوردار است. در این کار پژوهشی از تلفیق روش کچرز با میکرواستخراج مایع-مایع پخشی به منظور استخراج افلاتوکسین‌های B_1، B_2، G_1 و G_2 از نمونه‌های ذرت استفاده شده و اندازه‌گیری آن‌ها با HPLC-FLD انجام شده است. برای این منظور تاثیر عوامل موثر در دو مرحله روش استخراج پیشنهادی بررسی و بهینه‌سازی شد. همچنین اعتبارسنجی روش توسعه داده شده با محاسبه ارقام شایستگی مانند محدوده خطی، حدود تشخیص و اندازه‌گیری، تکرارپذیری و راندمان استخراج ارزیابی گردید. محدوده خطی روش پیشنهادی (با ضریب تعیین بالاتر از ۰/۹۹۶) در محدوده ۰/۲۳ تا ۲۰۰ نانوگرم در گرم و حداندازه‌گیری پایین در محدوده ۰/۳۸-۰/۲۳ نانوگرم در گرم (کمتر از حد مجاز قابل قبول برای باقیمانده آفلاتوکسین‌های هدف در ذرت) حاصل شد. بر اساس نتایج تکرارپذیری روش توسعه داده شده در محدوده ۳/۹ تا ۷/۱ و همچنین بازده استخراج بین ۶۰ تا ۷۳ درصد بدست آمد. به‌علاوه اجرای روش مذکور بر روی نمونه‌های ذرت وجود آفلاتوکسین B_1 در تمامی نمونه‌ها در محدوده ۱/۱ تا ۱۱/۲ نانوگرم در گرم را نشان داد. در مجموع روش پیشنهادی دقیق و قابل اعتماد بوده و از کارایی بالایی در تجزیه و شناسایی آنالیت‌های هدف در نمونه ذرت برخوردار است.

واژه‌های کلیدی: آفلاتوکسین، کچرز، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، میکرواستخراج مایع-مایع پخشی

مقدمه

مصرف مواد غذایی ناسالم و ناایمنی به دلیل ارتباط مستقیم آن‌ها با سلامت افراد جامعه و ایجاد بیماری‌های گوناگون بسیار حائز اهمیت می‌باشد. در سال‌های اخیر با صنعتی شدن جوامع و حرکت آن‌ها به‌سوی تکنولوژی‌های نوین، اندازه‌گیری، شناسایی و حذف آلاینده‌های مواد غذایی و محیط‌زیست موردتوجه قرارگرفته‌اند (Alizadeh *et al*., 2021).

مایکوتوکسین‌ها گروهی از ترکیبات سمی و مضر می‌باشند که توسط برخی از کپک‌ها تولید و منجر به آلوده شدن مواد غذایی مختلف مورد مصرف انسان و حیوانات می‌شوند. بر اساس آمارها بیش از ۲۵ درصد محصولات کشاورزی در سراسر دنیا به مایکوتوکسین‌ها آلوده می‌شوند که در بین آن‌ها گروه وسیعی از غلات و علوفه هم وجود دارند (Fumagalli *et al*., 2021). ازآنجاکه کاهش میزان مایکوتوکسین‌ها در طی فرآوری مواد غذایی تقریباً غیرممکن است و این سموم در اکثر فرآیندهای تولید غذا (مانند حرارت دادن) از بین نمی‌روند، در غذا باقی‌مانده و از این طریق وارد بدن انسان می‌شوند (Adeyeye, 2020). از بین مایکوتوکسین‌های مختلف موجود، حدود ۲۰ نوع آن‌ها ازنظر جهانی تهدیدی برای سلامت انسان و حیوانات محسوب می‌شوند که از آن جمله می‌توان به آفلاتوکسین‌ها، اکراتوکسین A، پاتولین و فومونیسین‌ها اشاره نمود (Gholizadeh *et al*., 2022). آفلاتوکسین‌ها می‌توانند اثرات مخربی ازجمله نارسایی‌های کبد و کلیه را به همراه داشته باشند و ترکیبات بالقوه سرطان‌زا نیز می‌باشند (Medina *et al*., 2017). بنابراین کنترل مقدار مایکوتوکسین‌ها در فرآورده‌های غذایی توسط متولیان تغذیه و سلامت کشور از اهمیت بسیار زیادی برخوردار است.

روش‌های کروماتوگرافی به دلیل ظرفیت جداسازی بالا در شناسائی باقی‌مانده‌ی مایکوتوکسین‌ها، بسیار مورد توجه محققین بوده است (Badali *et al*., 2023; Na *et al*., 2022). با توجه به مطالعات گوناگون انجام شده، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا به روش اصلی برای تجزیه و تحلیل مایکوتوکسین در مواد غذایی تبدیل شده است که می‌تواند با آشکارسازهای مختلف ترکیب شود (Gholizadeh *et al*., 2022; Radić *et al*., 2022). با وجود توسعه بسیار خوب تکنیک‌های مبتنی بر کروماتوگرافی در تعیین آفلاتوکسین‌ها، برخی از عوامل از جمله ماتریکس پیچیده و غلظت کم ترکیبات هدف، می‌تواند استفاده مستقیم از این تکنیک در آنالیز نمونه را محدود کند بنابراین انجام برخی مراحل مقدماتی (مرحله پیش تغلیظ و آماده‌سازی) برای جداسازی ضروری است (Mogaddam *et al*., 2022).

روش کچرز یا QuEChERS (Quick, Easy, Cheap, Effective, Rugged, and Safe) یکی از متداول‌ترین روش‌های آماده سازی در آنالیز ترکیبات مختلف است (Nasiri *et al*., 2023; Farajpour *et al*., 2023). علی رغم سادگی این روش و قابلیت استخراج آنالیت‌ها به صورت مستقیم از بافت نمونه‌های حقیقی، عدم امکان تغلیظ و دستیابی به آنالیزهای حساس از معایب این روش می‌باشد (Anastassiades *et al*., 2003). از این رو در سال های اخیر تلفیق این روش با دیگر روش‌های استخراج به ویژه میکرواستخراج مایع-مایع پخشی یا DLLME (Dispersive Liquid-Liquid

Microextraction) مورد توجه قرار گرفته است (Andraščíková and Hrouzková, 2016). در این روش ابتدا آنالیت‌ها از داخل بافت نمونه به داخل حلال آلی استخراج شده و در مرحله‌ی بعد این حلال به عنوان حلال پخش‌کننده با یک حلال استخراج‌کننده مخلوط شده و سپس مرحله‌ی DLLME صورت می‌گیرد. در روش DLLME پخش شدن یک حلال آلی غیر قابل اختلاط با آب (حلال استخراج‌کننده) توسط یک حلال پخش‌کننده (قابل اختلاط با آب) در محلول آبی، موجب افزایش سطح تماس بین محلول آبی و حلال استخراج‌کننده شده و راندمان استخراج به طور قابل توجه‌ای افزایش می‌یابد (Zare Sani *et al*., 2023; Zeiadi *et al*., 2022).

در این کار پژوهشی یک شیوه استخراج موثر و کارا به منظور استخراج آفلاتوکسین‌های B_1، B_2، G_1 و G_2 از نمونه‌های ذرت توسعه یافته است. برای این منظور از تلفیق روش کچرز با میکرواستخراج مایع–مایع پخشی استفاده شده و آنالیت‌های مورد مطالعه با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مجهز به آشکارساز فلورسانت یا FLD (Fluorescent detector) آنالیز شدند.

مواد و روش‌ها

- تهیه محلول‌های مادر از آفلاتوکسین

محلول مادر آفلاتوکسین‌های G_1، G_2، B_1 و B_2 (Sigma–Aldrich, St. Louis, MA, USA) به صورت مخلوط به غلظت ۵ میلی‌گرم در لیتر از هر کدام، با حل کردن ۰/۵ میلی‌گرم از هر یک از این مواد در ۱۰۰ میلی‌لیتر استونیتریل (Merck, Darmstadt, Germany) تهیه شد.

- تهیه حلال اتکتیک عمیق

تهیه حلال اتکتیک عمیق یا DES (Deep eutectic solvents) غیر قابل اختلاط با آب با پیوالیک اسید و منتول (Merck, Darmstadt, Germany) به عنوان یک دهنده پیوند هیدروژنی یا HBD (Hydrogen-bond donor) و پذیرنده‌های پیوند هیدروژنی یا HBA (Hydrogen-bond acceptor) شامل کولین کلرید و تترابوتیل آمونیوم کلراید (Merck, Darmstadt, Germany) در نسبت‌های مولی مختلف ۱ به ۲ انجام شد. مخلوط‌ها در دمای ۸۰ درجه سلسیوس به مدت ۴۵ دقیقه حرارت داده شدند و به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ شدند (Rastpour *et al*., 2022). لازم به ذکر است در سایر نسبت های مولی حلال اتکتیک تشکیل نشد.

- نمونه‌های حقیقی

در این مطالعه، تعداد ۱۰ نمونه ذرت از محل‌های عرضه در شهر تبریز به صورت تصادفی خریداری شده و در دمای یخچال نگهداری شدند. ۵۰ گرم از همه نمونه‌ها جهت آنالیز مورد استفاده قرار گرفت. یک نمونه ذرت فاقد آفلاتوکسین‌های مورد مطالعه نیز با روش استاندارد ملی ایران تشخیص داده شده (ISIRI No. 6872) و به عنوان نمونه شاهد در فرایند بهینه‌سازی مورد استفاده قرار گرفت.

- شرایط بهینه‌ی دستگاه کروماتوگرافی مایع

شرایط کارکرد HPLC-FLD برای جداسازی آفلاتوکسین‌ها مطابق جدول۱ انتخاب شد.

جدول (۱)- شرایط بهینه‌ی HPLC- FLD به منظور آنالیز آفلاتوکسین‌های مورد مطالعه

نوع ستون	ستون Eclipse EDB C18 به طول ۲۵۰ میلی‌متر با قطر داخلی ۴/۶ میلی‌متر و اندازه ذرات ۵ میکرومتر
فاز متحرک	شویش گرادیان که با نسبت ۷۰:۱۵:۱۵ از مخلوط استونیتریل: متانول: آب حاوی ۱٪ (*v/v*) اسید استیک به مدت ۴ دقیقه شروع و سپس در زمان ۵ دقیقه به نسبت ۳۰:۲۵:۴۵ رسیده و ۲ دقیقه ادامه یافت. سپس در مدت ۲ دقیقه به همان نسبت اولیه برگشته و ۳ دقیقه در این نسبت ادامه پیدا کرد. شویش با جریان یک میلی‌لیتر در دقیقه انجام شد.
تزریق کننده	مقدار ۱۰ میکرولیتر با دمای ۴۰ درجه سلسیوس
طول موج تحریک دتکتور	۳۶۰ نانومتر
طول موج انتشار دتکتور	۴۳۰ نانومتر

- بهینه‌سازی شرایط استخراج و ارزیابی مشخصات تجزیه‌ای

استخراج آفلاتوکسین‌های هدف در این پژوهش با تلفیق روش کچرز و میکرواستخراج مایع-مایع پخشی انجام و تاثیر عوامل موثر در دو مرحله روش پیشنهادی بررسی و بهینه‌سازی شد.

بهینه‌سازی شرایط استخراج در مرحله کچرز با انتخاب ۵ نوع حلال آلی مختلف شامل استون، استونیتریل، متانول، اتانول و پروپانول و حجم‌های مختلفی از استونیتریل (۱/۲۵، ۱/۵، ۱/۷۵، ۲/۰ و ۲/۲۵ میلی‌لیتر) انجام شد. همچنین برای اختلاط نمونه‌ها از دو روش ورتکس کردن و امواج مافوق صوت استفاده گردید که مدت زمان ورتکس کردن نمونه‌ها در مدت زمان‌های متفاوت شامل یک تا ۵ دقیقه انجام شد.

همچنین حلال استخراج کننده در مرحله میکرواستخراج مایع-مایع پخشی، از بین حلال‌های اتکتیک عمیق منتول:کولین کلراید، پیوالیک اسید:کولین کلراید، منتول: تترابوتیل آمونیوم کلراید و پیوالیک اسید: تترابوتیل آمونیوم کلراید در حجم‌های ۵۰، ۶۰، ۷۰ و ۸۰ میکرولیتر انتخاب شد. به‌علاوه ارزیابی اثر نمک‌زنی در کارایی استخراج در مرحله دوم، با افزودن مقادیر صفر تا ۴ درصد وزنی/حجمی از سدیم کلرید به داخل محلول نمونه انجام شد.

پس از رسم نمودار معیارگیری با محلول‌های استانداردی با غلظت‌های ۰/۵، ۱، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ نانوگرم در گرم از هر یک از آفلاتوکسین‌ها، اعتبارسنجی روش توسعه داده شده با محاسبه ارقام شایستگی مانند حد تشخیص (Limit of detection)، حد اندازه‌گیری (Limit of quantification)، محدوده خطی (Linear range)، تکرارپذیری (براساس انحراف استاندارد نسبی یا RSD%) و راندمان استخراج (Extraction recovery) ارزیابی گردید.

- توسعه روش استخراج کچرز و تلفیق آن با روش میکرواستخراج مایع-مایع پخشی مبتنی بر حلال‌های اتکتیک عمیق برای استخراج آفلاتوکسین‌ها

برای این منظور ابتدا یک گرم از نمونه ذرت پودر شده و به داخل یک لوله آزمایش منتقل شد و سپس مقدار ۱/۷۵ میلی‌لیتر از استونیتریل به داخل نمونه اضافه

شده و مخلوط حاصل ۳ دقیقه ورتکس و به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ گردید. پس از آن فاز رویی حاوی آنالیت‌ها (آفلاتوکسین‌های G_1، G_2، B_1 و B_2) برداشته شده و پس از اختلاط با حجم ۶۰ میکرولیتر از حلال اکتیک عمیق پیوالیک اسید:کولین کلراید، مخلوط حاصل به داخل ۵ میلی‌لیتر آب دیوینزه پخش شد. در اثر این عمل حلال استخراج کننده به صورت قطرات ریزی آزاد شده و آنالیت‌های مورد مطالعه به داخل این حلال استخراج شدند که یک میلی‌لیتر از حلال جمع شده در سطح لوله آزمایش با یک لوله کاپیلاری برداشته شده و به دستگاه کروماتوگرافی فاز مایع با کارایی بالا مجهز به شناساگر فلورسانت (HPLC-FLD) تزریق گردید.

- آنالیز نمونه‌های حقیقی

قابلیت روش توسعه داده شده در آنالیز آفت‌کش-های انتخابی، با اندازه‌گیری آن‌ها در ده نمونه ذرت بررسی شد. برای مطالعه اثر احتمالی بافت نمونه، استخراج آنالیت‌ها از پنج نمونه ذرت (اسپایک شده با مقادیر یک و ۵۰ نانوگرم در گرم از هر کدام از آنالیت‌ها) و همچنین استونیتریل حاوی همان غلظت‌ها از آفلاتوکسین‌ها انجام و در نهایت تاثیر ماتریکس، با مقایسه نتایج بازیابی نسبی آنالیت‌های دو گروه تیمار اشاره‌شده تعیین شد (Chandran and Singh, 2007).

یافته‌ها

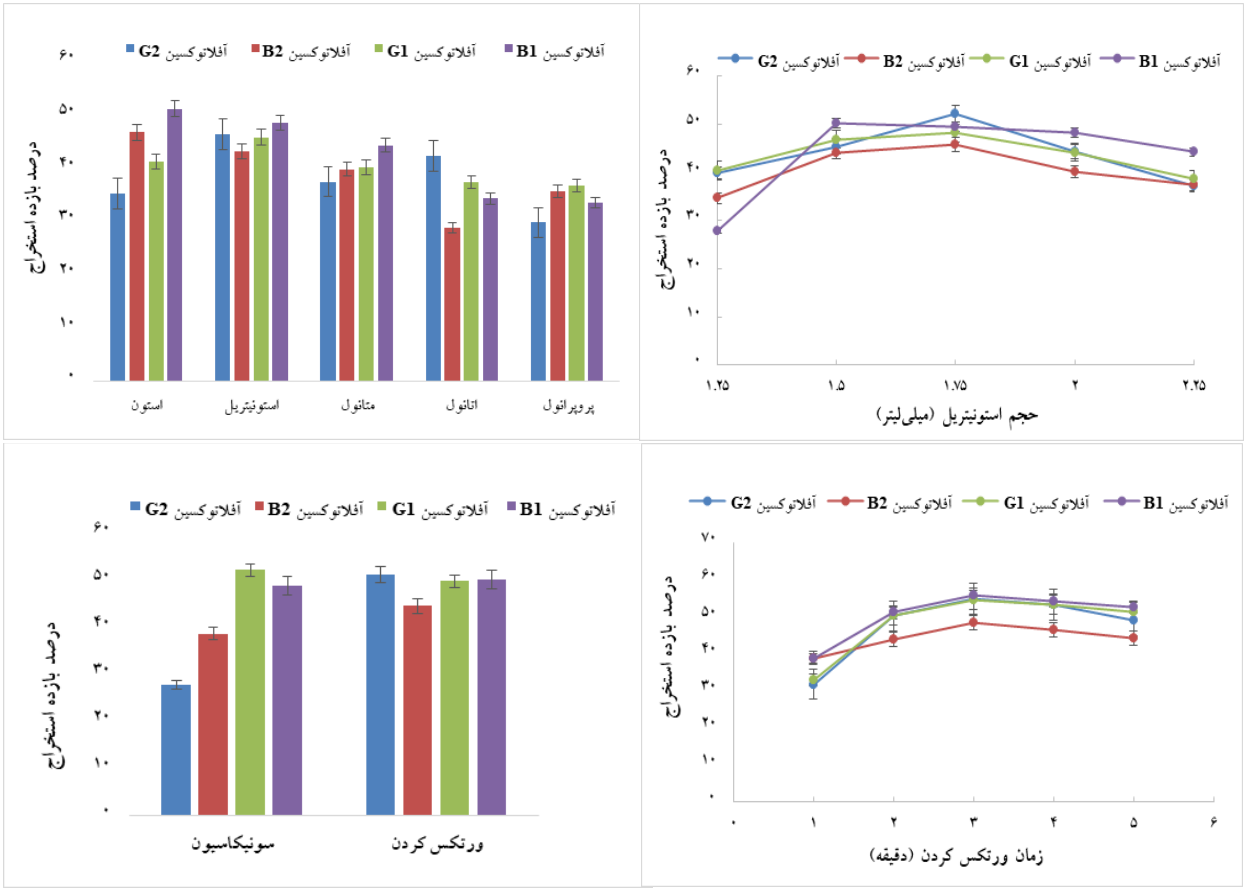
- نتایج بهینه‌سازی مرحله استخراج کچرز

- نوع و حجم حلال استخراج‌کننده

برای این مرحله از استخراج، ۵ نوع حلال آلی مختلف شامل استون، استونیتریل، متانول، اتانول و پروپانول انتخاب شده و مورد بررسی قرار گرفتند و در بین حلال‌های استفاده شده، استونیتریل قابلیت بیشتری در استخراج آفلاتوکسین‌های انتخابی نشان داد (شکل۱). برای ارزیابی اثر حجم حلال هم آزمایشاتی با حجم‌های مختلفی از استونیتریل انجام شد. یافته‌های بدست آمده نشان دادند (شکل۱) که با افزایش حجم حلال تا ۱/۷۵ میلی‌لیتر، سیگنال‌های تجزیه‌ای افزایش و بعد از آن افزایش حجم حلال منجر به کاهش کارایی روش پیشنهادی می‌شود. حجم فاز جمع شده رویی در این شرایط حدود ۱/۰ میلی‌لیتر بود.

- انتخاب نوع و مدت زمان مخلوط کردن نمونه و حلال

برای اختلاط کامل نمونه از دو روش ورتکس کردن و قرار دادن مخلوط نمونه‌ها در معرض امواج مافوق صوت استفاده شد که نتایج بدست آمده حاکی از تاثیر بهتر ورتکس کردن نمونه بود (شکل ۱). همچنین مدت زمان ورتکس کردن نمونه‌ها پارامتر دیگری است که باید مورد بررسی قرار گیرد. برای این منظور نمونه ذرت حاوی آنالیت‌ها با ۱/۷۵ میلی‌لیتر استونیتریل مخلوط شده و در مدت زمان‌های متفاوت شامل یک تا ۵ دقیقه ورتکس شدند. چنانچه در شکل ۱ مشاهده می‌شود، سه دقیقه ورتکس کردن نمونه منجر به استخراج حداکثری آفلاتوکسین‌های مورد مطالعه گردید.



شکل(۱)- بهینه‌سازی عوامل موثر در کارایی مرحله اول استخراج آفلاتوکسین‌های هدف از نمونه ذرت

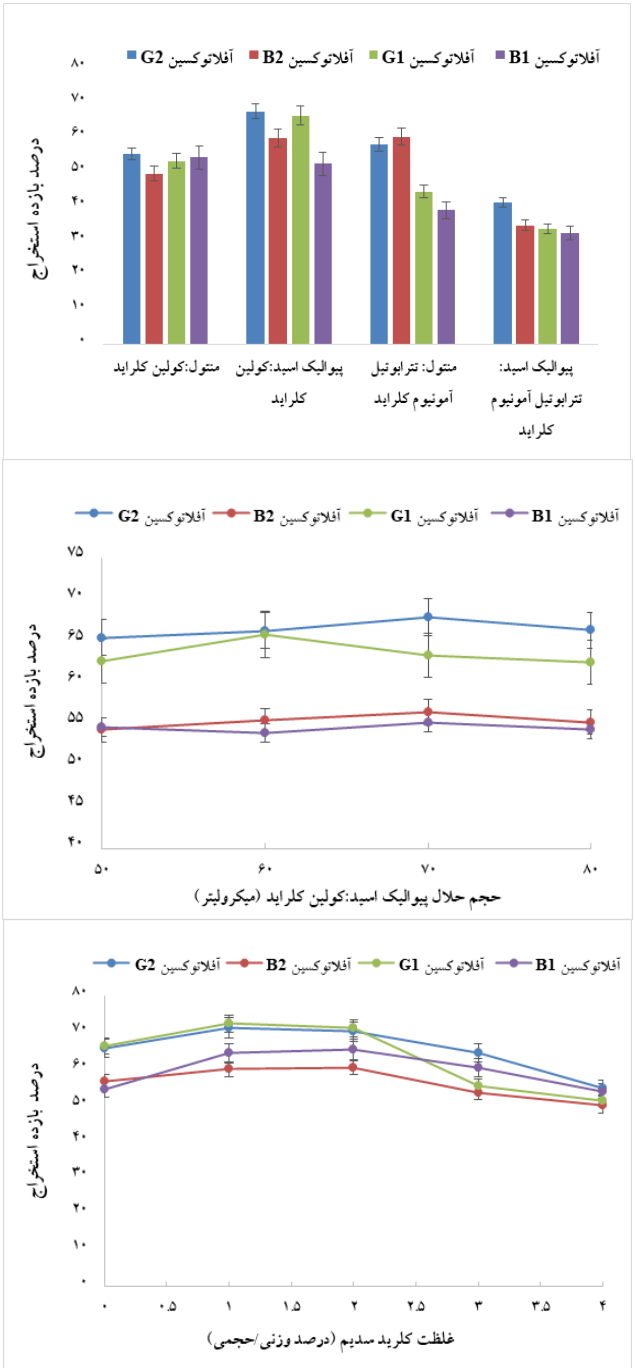
- **نتایج بهینه‌سازی مرحله دوم استخراج**

- **نوع و حجم حلال اتکتیک عمیق**

در این راستا از حلال‌های اتکتیک عمیق که حلال‌های سبز و تازه شناخته شده‌ای هستند به عنوان حلال استخراج کننده در مرحله میکرو استخراج مایع-مایع پخشی استفاده شده است. چنان‌که در شکل۲ دیده می‌شود، در بین حلال‌های مورد بررسی راندمان استخراج با حلال اتکتیک حاصل از اختلاط پیوالیک اسید:کولین کلراید بیشتر می‌باشد لذا این حلال برای مراحل بعدی انتخاب شد. ثبت سیگنال‌های تجزیه‌ای ناشی از حجم‌های مختلف این حلال نیز نشان داد که با افزایش حجم تا مقدار ۶۰ میکرولیتر راندمان استخراج آفلاتوکسین‌های مورد بررسی افزایش و سپس تقریبا ثابت باقی می‌ماند (شکل۲).

- **اثر نمک زنی**

برای بررسی اثر نیروی یونی در مرحله DLLME، مقادیر مختلفی از کلرید سدیم به داخل نمونه اضافه و روش پیشنهادی ادامه یافت. مطابق شکل۲ با افزایش مقدار NaCl تا یک درصد وزنی/حجمی راندمان استخراج آنالیت‌ها افزایش و سپس کاهش می‌یابد.



شکل(۲)- بهینه‌سازی عوامل موثر در کارایی مرحله دوم استخراج آفلاتوکسین‌های هدف از نمونه ذرت

- نتایج اعتبارسنجی روش

پس از اجرای روش توسعه یافته محدوده خطی برای هر یک از آنالیت‌ها بدست آمد. برای غلظت‌هایی که در آن‌ها نسبت سیگنال به نویز ۳ بود، حد تشخیص و برای غلظت‌های با نسبت سیگنال به نویز ۱۰، حد اندازه‌گیری درنظر گرفته شد. دقت روش با استفاده از انحراف

استاندارد نسبی(% RSD) و بصورت تکرارپذیری آزمون‌ها در یک روز و در بین روزها محاسبه شد. نتایج مشخصات تجزیه‌ای روش پیشنهادی در جدول۲ ارائه شده است.

جدول(۲)- ارقام شایستگی روش توسعه داده شده برای استخراج آفلاتوکسین‌های هدف از نمونه‌های ذرت

آنالیت	محدوده خطی[a]	ضریب تعیین	حد تشخیص[a]	حد اندازه‌گیری[a]	تکرارپذیری[b] در یک روز	تکرارپذیری[b] بین روزها	بازده استخراج[c]
آفلاتوکسین G_2	۰/۲۳-۲۰۰	۰/۹۹۸	۰/۰۶	۰/۲۳	۴/۱	۶/۵	۷۱±۴
آفلاتوکسین B_2	۰/۲۹-۲۰۰	۰/۹۹۷	۰/۰۸	۰/۲۹	۳/۹	۶/۸	۶۰±۴
آفلاتوکسین G_1	۰/۳۴-۲۰۰	۰/۹۹۹	۰/۱	۰/۳۴	۵/۵	۷/۱	۷۳±۲
آفلاتوکسین B_1	۰/۳۸-۲۰۰	۰/۹۹۶	۰/۱۱	۰/۳۸	۵/۶	۶/۴	۶۵±۳

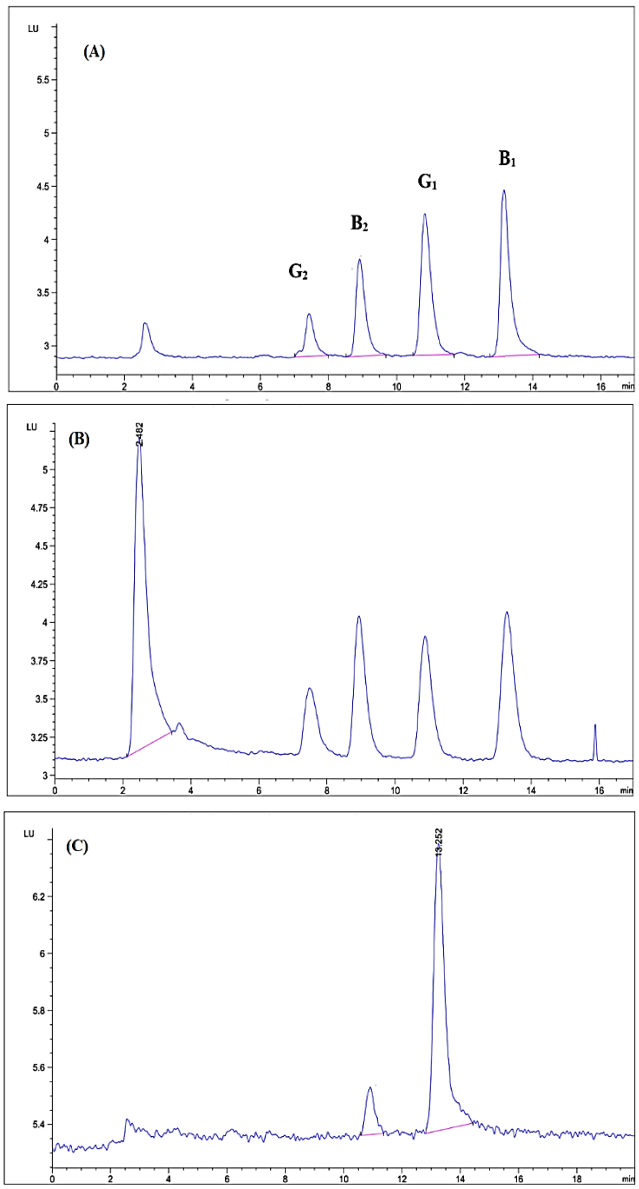
a) بر حسب نانوگرم در گرم

b) بر اساس انحراف استاندارد نسبی (با شش تکرار)

c) بازده ± انحراف استاندارد (با سه تکرار)

- **بررسی صحت روش**

بررسی قابلیت روش توسعه داده شده در اندازه‌گیری آنالیت‌ها، مقدار آن‌ها در ۱۰ نمونه حقیقی ذرت تحت شرایط بهینه توسعه داده شده اندازه‌گیری شد. مقایسه کروماتوگرام‌های حاصل از نمونه‌های حقیقی و نمونه استاندارد حاکی از آلودگی همه نمونه‌ها به آفلاتوکسین B_1 بود (جدول۳) که فقط تعداد دو نمونه از آن‌ها بیش از حد مجاز باقیمانده تعیین شده (۵ppb) برای این مایکوتوکسین در ذرت آلودگی نشان دادند (ISIRI No. 5925). سایر آفلاتوکسین‌ها در نمونه‌های مورد مطالعه یافت نشد. شکل۳، کروماتوگرام‌های HPLC-FLD مربوط به تزریق مستقیم استاندارد آنالیت‌های مورد مطالعه، نمونه ذرت اسپایک شده با آنالیت‌ها و یک نمونه‌ی ذرت اسپایک نشده را نشان می‌دهد.



شکل(۳)- کروماتوگرام HPLC- FLD حاصل از (A) تزریق مستقیم محلول استاندارد آفلاتوکسین‌های مورد مطالعه به غلظت ۲/۵ نانوگرم در میلی‌لیتر، (B) یک نمونه ذرت اسپایک شده با مقدار یک نانوگرم در گرم و (C) یک نمونه ذرت اسپایک نشده، پس از اجرای روش استخراج توسعه داده شده.

جدول(۳)- مقادیر آفلاتوکسین‌های مورد مطالعه در نمونه‌های حقیقی ذرت (نانوگرم در گرم)

نمونه‌های ذرت	آفلاتوکسین G_2	آفلاتوکسین B_2	آفلاتوکسین G_1	آفلاتوکسین B_1
۱	–	–	–	۴/۳
۲	–	–	–	۳/۲
۳	–	–	–	۱/۲
۴	–	–	–	۱/۱
۵	–	–	–	۱/۶
۶	–	–	–	۹/۱
۷	–	–	–	۲/۳
۸	–	–	–	۲/۴
۹	–	–	–	۱۱/۲
۱۰	–	–	–	۲/۳

- بررسی اثر بافت نمونه‌های حقیقی

برای ارزیابی مداخله احتمالی بافت ذرت در استخراج آفلاتوکسین‌های B_1، B_2، G_1، G_2، مقایسه سیگنال‌های تجزیه‌ای بدست آمده برای تعداد ۵ نمونه ذرت با روش افزایش استاندارد مورد بررسی قرار گرفت. برای این منظور نمونه‌های ذرت با آفلاتوکسین‌های مورد مطالعه اسپایک شده و سپس مقدار آن‌ها با روش پیشنهادی اندازه گرفته شد. مقادیر بازیابی نسبی با تقسیم مقادیر بازیابی شده به مقادیر اسپایک شده، محاسبه و گزارش گردید. یافته‌ها نشان داد که ماتریکس نمونه‌های ذرت در کارایی روش پیشنهادی موثر نیست (جدول۴).

جدول(۴)- نتایج ارزیابی اثر بافت ذرت در استخراج آفلاتوکسین‌های مورد مطالعه

آنالیت	انحراف استاندارد ± مقادیر بازیابی نسبی				
	نمونه۱	نمونه۲	نمونه۳	نمونه۴	نمونه۵
نمونه‌ها با غلظت یک نانوگرم در گرم از مخلوط آفلاتوکسین‌ها اسپایک شدند					
آفلاتوکسین G_2	۸۶±۴	۹۲±۵	۱۰۱±۴	۹۱±۲	۹۳±۴
آفلاتوکسین B_2	۸۹±۳	۸۷±۵	۸۴±۷	۹۳±۵	۹۷±۳
آفلاتوکسین G_1	۱۰۰±۴	۹۹±۳	۹۳±۲	۹۴±۳	۹۶±۴
آفلاتوکسین B_1	۹۷±۳	۹۸±۲	۹۵±۳	۹۱±۴	۹۹±۳
نمونه‌ها با غلظت ۵۰ نانوگرم در گرم از مخلوط آفلاتوکسین‌ها اسپایک شدند					
آفلاتوکسین G_2	۸۶±۵	۹۹±۳	۹۱±۲	۹۵±۴	۹۳±۴
آفلاتوکسین B_2	۹۹±۴	۹۷±۴	۹۶±۲	۹۸±۳	۱۰۵±۶
آفلاتوکسین G_1	۹۸±۵	۹۴±۲	۹۱±۴	۹۶±۲	۹۸±۳
آفلاتوکسین B_1	۹۳±۵	۹۲±۲	۹۶±۴	۹۴±۳	۹۳±۵

بحث و نتیجه‌گیری

نوع حلال استخراج کننده مورد استفاده در مرحله QuEChERS تأثیر مهمی بر عملکرد روش دارد. از آنجایی که حلال استخراج مورد استفاده در این مرحله به عنوان یک حلال پخش کننده در روش میکرواستخراج مایع-مایع پخشی استفاده خواهد شد، باید هم با فاز آبی و هم با استخراج کننده مورد استفاده در DLLME قابل اختلاط باشد. همچنین باید توانایی کافی در استخراج آنالیت‌ها از نمونه ذرت را داشته باشد (Rastpour *et al*., 2022). در روش توسعه داده شده، برخی از حلال‌های آلی مورد استفاده قرار گرفتند و بهترین کارایی از استونیتریل کسب شد که می‌توان آن را به دلیل ویسکوزیته پایین آن در مقایسه با سایر حلال‌های آزمایش شده و نفوذ بهتر آن به ماتریس نمونه نسبت داد.

حجم حلال استخراج کننده نیز از دیگر پارامترهایی است که هم در مرحله کچرز و هم در روش میکرو استخراج مایع–مایع پخشی نیاز به بهینه-سازی دارد. به طوریکه اگر حجم حلال جمع شده کمتر از حجم حلال اولیه باشد در این صورت حلال استخراج کننده در فاز آبی حل شده که میزان کاهش در حجم بسته به حلالیت حلال استخراج کننده در آب خواهد داشت (Zare Sani *et al*., 2023; Farajpour *et al*., 2023). همچنین هر چه حجم حلال استخراج کننده اولیه بیشتر باشد در این صورت حجم حلال جمع شده نیز بیشتر خواهد بود و فاکتور تغلیظ کاهش یافته و سیگنال تجزیه‌ای کمتر خواهد بود. از طرفی با کاهش حجم حلال، کارایی استخراج و تکرارپذیری کاهش می‌یابد (Jalili *et al*., 2020).

افزایش تحرکات مولکولی و بالا بردن ضرایب توزیع آنالیت‌ها در حلال سبب تسریع فرایند استخراج به داخل حلال استخراج کننده شود. به‌طور معمول در روش‌های تجزیه‌ای از روش‌هایی مانند ورتکس کردن (Amini *et al*., 2018)، استفاده از امواج مافوق صوت (Gholizadeh *et al*., 2022) و یا امواج مایکرو ویو (Sheikhzadeh *et al*., 2020) استفاده می‌شود. از آنجائیکه افزایش مدت زمان یا شدت هم زدن در هر کدام از روش‌های اشاره شده می‌تواند منجر به تخریب و تغییر شکل ترکیبات هدف موثر شده و بنابراین سبب کاهش راندمان استخراج شود (Llompart *et al*., 2019)، از این رو این پارامتر نیز باید مورد ارزیابی و بهینه‌سازی قرار گیرد.

با توجه به اینکه تمایل آنالیت ها به حلال های استخراج مختلف متفاوت است، نوع حلال استخراج در هر مرحله‌ای می‌تواند کارایی روش را تغییر دهد. برای انتخاب حلال استخراج باید فاکتورهای مختلفی در نظر گرفته شود که داشتن چگالی متفاوت نسبت به محلول نمونه، سمیت کمتر و تشکیل یک سیستم دو فازی از مهمترین عوامل می باشد (Rasi *et al*., 2021). در روش میکرو استخراج مایع–مایع پخشی از حلال‌های آلی به منظور جمع آوری آنالیت‌ها استفاده می‌شود که این حلال با استفاده از حلال پخش کننده به صورت قطرات بسیار ریز در فاز آبی پخش می‌شود (Rezaee *et al*., 2006). با توجه به اینکه اکثر حلال‌های آلی (بخصوص حلال‌های کلره) دارای سمیت بالایی می‌باشند (Zeiadi *et al*., 2022) از این رو در کار پژوهشی حاضر از حلال‌های اتکتیک عمیق که به‌عنوان حلال‌های سبز شناخته می‌شوند (Mogaddam *et al*.,

2023) به عنوان حلال استخراج کننده استفاده شده است.

معمولا در روش‌های استخراج، افزایش نمک به محلول‌های آبی می‌تواند سبب افزایش نیروی یونی فاز آبی شده و باعث کاهش حلالیت آنالیت‌ها در فاز آبی و انتقال آن‌ها به داخل حلال استخراج کننده شود که در نتیجه راندمان استخراج افزایش خواهد یافت (Farajzadeh *et al*., 2015). از سوی دیگر افزایش نمک به محیط استخراج می‌تواند حلالیت حلال استخراج کننده را نیز کاهش داده و منجر به افزایش حجم فاز آلی جمع شده شود که این امر می‌تواند باعث کاهش سیگنال تجزیه‌ای در اثر رقیق‌سازی شود (Meshkini *et al*., 2021). همچنین امکان دارد افزایش نمک باعث افزایش ویسکوزیته فاز آبی شده و ضریب انتشار آنالیت در فاز آبی را تحت تأثیر قرار دهد که به نوبه خود منجر به کاهش راندمان استخراج می‌شود (Limoei Khosrowshahi *et al*., 2022). لذا نمک‌زنی می‌تواند دو اثر متقابل داشته باشد، هرکدام از اثرات بر دیگری برتری داشته باشد در این صورت تأثیر آن عامل غالب خواهد بود. به همین دلیل در فرایندهای استخراج بررسی اثر نمک‌زنی از اهمیت زیادی برخوردار است.

مقایسه پارامترهای تجزیه‌ای روش حاضر با دیگر تحقیقات مشابه برای اندازه‌گیری آفلاتوکسین‌های مورد مطالعه نشان دهنده قابلیت قیاس یا حتی برتری برخی پارامترهای روش توسعه داده شده می‌باشد. از جمله این موارد می‌توان به بازده استخراج ۶۰ تا ۷۳ درصد برای آفلاتوکسین‌های B_1، B_2، G_1، G_2 در روش حاضر اشاره کرد که قابل قیاس با درصد بازیابی ۶۹ تا ۸۲ درصد برای همین آنالیت‌ها در نمونه برنج (Lesan *et al*., 2023) و یا درصد بازیابی ۳/۶۸/۳ تا ۸۷/۷ برای نمونه‌های سورگوم و پسته در تحقیق دیگری است (Ghali *et al*., 2009).

همچنین حدتشخیص بدست آمده برای آفلاتوکسین‌های هدف در مطالعه ما (۰/۱۱–۰/۰۶ نانوگرم در گرم) قابل مقایسه با حدود تشخیص حاصل شده برای همین مایکوتوکسین‌ها (۰/۰۷–۰/۰۲ نانوگرم در گرم) در تحقیق دیگری می‌باشد (Lesan *et al*., 2023). درحالیکه مقادیر این پارامتر تجزیه‌ای از ارقام بدست آمده برای حد تشخیص همین آنالیت‌ها در نمونه چای (۰/۲۸–۰/۱۵ نانوگرم در گرم) در مطالعه دیگری است (Gholizadeh *et al*., 2022). همچنین حد تشخیص حاصل شده برای گیاه دارویی سنا (۱/۲۷–۰/۷ نانوگرم در گرم) در تحقیق دیگری (Maneeboon *et al*., 2023)، پایین تر و ایده‌ال‌تر می‌باشد.

به‌علاوه یکی دیگر از نقاط قوت مطالعه حاضر تکرارپذیری بالای روش است بطوریکه درصد انحراف استاندارد نسبی بدست آمده برای آنالیز آفلاتوکسین‌های B_1، B_2، G_1، G_2 به ترتیب ۳/۹ تا ۵/۶ و ۶/۴ تا ۷/۱ برای تکرارپذیری در یک روز و تکرارپذیری بین روزها بوده است. این پارامتر تجزیه‌ای نیز قابل قیاس با مطالعات دیگر انجام شده در این‌خصوص می‌باشد بطوریکه تکرارپذیری روش توسعه داده شده برای اندازه‌گیری همین آنالیت‌ها در نمونه برنج به ترتیب ۳/۳–۳/۶ درصد و ۶/۶–۴/۰ درصد برای تکرارپذیری در یک روز و در بین روزها توسط محققین دیگر گزارش شده است (Lesan *et al*., 2023). در تحقیق دیگری تکرارپذیری آزمون اندازه‌گیری آفلاتوکسین‌های مذکور در نمونه گیاه داروئی سنا در یک روز و در بین

روزها به ترتیب ۱۰/۵۹-۳/۱۳ و ۷/۰۲-۲/۶۷ ثبت شد (Maneeboon *et al*., 2023) که همانند مطالعه حاضر از حد قابل قبولی برخوردار است.

در مجموع، محدوده خطی روش توسعه داده شده‌ی پیشنهادی (با ضریب تعیین بالاتر از ۰/۹۹۶) در محدوده ۰/۲۳ تا ۲۰۰ نانوگرم در گرم و حداندازه‌گیری پایین در محدوده ۰/۳۸-۰/۲۳ نانوگرم در گرم (کمتر از حد مجاز قابل قبول برای باقیمانده آفلاتوکسین‌های هدف در ذرت)، تکرارپذیری روش در محدوده ۳/۹ تا ۷/۱ و همچنین بازده استخراج بین ۶۰ تا ۷۳ درصد، تایید می‌کند که این روش دقیق و قابل اعتماد بوده و از کارایی بالایی در تجزیه و شناسایی آنالیت‌های هدف در نمونه ذرت برخوردار است. به‌علاوه اجرای روش مذکور بر روی نمونه‌های ذرت وجود آفلاتوکسین B1 در تمامی نمونه‌ها در محدوده ۱/۱ تا ۱۱/۲ نانوگرم در گرم را نشان داد که بجز دو مورد، مقادیر بدست آمده کمتر از حد مجاز تعیین شده برای باقیمانده این آفلاتوکسین در ذرت بود.

تعارض منافع

هیچگونه تعارض منافعی برای اعلام وجود ندارد.

منابع

- Adeyeye, S.A.O. (2020). Aflatoxigenic fungi and mycotoxins in food: a review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 60(5), 709-721.
- Afshar Mogaddam, M.R., Derakhshani, M., Farajzadeh, M.A., Nemati, M. and Lotfipour, F. (2022). Application of a modified lighter than water organic solvent-based air-assisted liquid-liquid microextraction method for the efficient extraction of aflatoxin M1 in unpasteurized milk samples. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 102(16), 4121-4133.
- Afshar Mogaddam, M.R., Khandaghi, J., Farajzadeh, M.A. and Najafzadeh, D. (2023). Development of in-situ synthesis of lighter than water-deep eutectic solvents under ultrasonic energy in a narrow tube and application in liquid–phase microextraction. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 103(2), 270-283.
- Alizadeh, A.M., Hashempour-Baltork, F., Khaneghah, A.M. and Hosseini, H. (2021). New perspective approaches in controlling fungi and mycotoxins in food using emerging and green technologies. Current Opinion in Food Science, 39, 7-15.
- Amini, R., Khandaghi, J. and Afshar Mogaddam, M.R. (2018). Combination of vortex-assisted liquid-liquid extraction and air-assisted liquid-liquid microextraction for the extraction of bisphenol A and bisphenol B in canned doogh samples. Food Analytical Methods, 11, 3267-3275.
- Anastassiades, M., Lehotay, D., Štajnbaher and Schenck, F.J. (2003). Fast and easy multi residue method employing acetonitrile extraction/partitioning and “dispersive solid-phase extraction” for the determination of pesticide residues in produce. Journal of AOAC Int. 86, 412-431.
- Andraščíková, M. and Hrouzková. S. (2016). Fast preconcentration of pesticide residues in oilseeds by the combination of QuEChERS with dispersive liquid-liquid microextraction followed by gas chromatography-mass spectrometry. Food Analytical Methods, 9, 2182-2193.
- Badali, A., Javadi, A., Afshar Mogaddam, M.R. and Mashak, Z. (2023). Dispersive solid phase extraction-dispersive liquid–liquid microextraction of mycotoxins from milk samples and

investigating their decontamination using microwave irradiations. Microchemical Journal, 190, 108645.

- Chandran, S. and Singh, R. (2007). Comparison of various international guidelines for analytical method validation. International Journal of Pharmaceutical Sciences, 62, 4-14.
- Farajpour, S., Afshar Mogaddam, M.R. and Khandaghi, J. (2023). Combination of QuEChERS Dispersive Liquid-Liquid Microextraction based on Magnetic Ionic Liquids for extraction of Carbamate Pesticides from Apple Samples prior to their analysis by High-Performance Liquid Chromatography. Journal of Food Technology and Nutrition, 20, 5-16. [In Persian]
- Farajzadeh, M.A., Afshar Mogaddam, M.R. and Alizadeh Nabil, A.A. (2015). Polyol-enhanced dispersive liquid-liquid microextraction coupled with gas chromatography and nitrogen phosphorous detection for the determination of organophosphorus pesticides from aqueous samples, fruit juices, and vegetables. Journal of separation science, 38(23), 4086-4094.
- Fumagalli, F., Ottoboni, M., Pinotti, L. and Cheli, F. (2021). Integrated mycotoxin management system in the feed supply chain: Innovative approaches. Toxins, 13(8), 572.
- Ghali, R., Belouaer, I., Hdiri, S., Ghorbel, H., Maaroufi, K. and Hedilli, A. (2009). Simultaneous HPLC determination of aflatoxins B1, B2, G1, and G2 in Tunisian sorghum and pistachios. Journal of Food Composition and Analysis, 22(7-8), 751-755.
- Gholizadeh, S., Mirzaei, H., Khandaghi, J., Afshar Mogaddam, M.R. and Javadi, A. (2022). Ultrasound–assisted solvent extraction combined with magnetic ionic liquid based-dispersive liquid-liquid microextraction for the extraction of mycotoxins from tea samples. Journal of Food Composition and Analysis, 114, 104831.
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran, (ISIRI), (2020). Food and feed- Maximum tolerated level of mycotoxins. 1st edition, ISIRI No. 5925. [In Persian]
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (ISIRI), (2012). Food and feedstuffs - Determination of aflatoxins B&G by HPLC method using immunoaffinity column clean up-Test method. 1st edition, ISIRI No. 6872. [In Persian]
- Jalili, V., Barkhordari, A. and Ghiasvand, A. (2020). New extraction media in microextraction techniques. A review of reviews. Microchemical Journal, 153, 104386.
- Lesan, S., Mirzaei, H., Khandaghi, J., Afshar Mogaddam, M.R. and Javadi, A. (2023). Development of deep eutectic solvent based pressurized liquid extraction combined with dispersive liquid-liquid microextraction; application in extraction of aflatoxins from rice samples before HPLC–FLD. Microchemical Journal, 190, 108554.
- Limoei Khosrowshahi, B., Marzi Khosrowshahi, E., Afshar Mogaddam, M.R. and Khandaghi, J. (2022). use of dispersive solid-phase extraction in combination with dispersive liquid-liquid microextraction for the assessment of organophosphorus pesticides in fruit juice samples using gas chromatography-nitrogen-phosphorus detector. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology, 17(2),87-98. [In Persian]
- Llompart, M., Celeiro, M. and Dagnac, T. (2019). Microwave-assisted extraction of pharmaceuticals, personal care products, and industrial contaminants in the environment. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 116, 136-150.
- Maneeboon, T., Chuaysrinule, C. and Mahakarnchanakul, W. (2023). Optimization and validation of dispersive liquid–liquid microextraction for simultaneous determination of aflatoxins b1, b2, g1, and g2 in senna leaves and pods using hplc-fld with pre-column derivatization. Toxins, 15(4), 277.
- Medina, Á., González-Jartín, J.M. and Sainz, M.J. (2017). Impact of global warming on mycotoxins. Current Opinion in Food Science, 18, 76-81.
- Meshkini, K., AfsharMogaddam, M.R. and Khandaghi, J. (2021). Development of homogeneous liquid-liquid extraction in combination with dispersive liquid-liquid microextraction based on deep eutectic solvents for the extraction and assessment of phytosterols in animal cream samples using gas chromatography equipped with flame ionization detector. Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology, 16(2), 57-67. [In Persian]

- Na, T. W., Seo, H. J., Jang, S. N., Kim, H., Yun, H., Kim, H., et al. (2022). Multi-residue analytical method for detecting pesticides, veterinary drugs, and mycotoxins in feed using liquid and gas chromatography coupled with mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1676, 463257.
- Nasiri, F., Haghighat, A., Afshar Mogaddam, M.R. and Khandaghi, J. (2023). Development of QuEChERS method Combined with dispersive liquid-liquid microextraction for determination of some pesticides in cucumber samples using High-performance liquid chromatography. Food Hygiene, 50(2), 33-47. [In Persian]
- Radić, B., Janić Hajnal, E., Mandić, A., Krulj, J., Stojanović, Z. and Kos, J. (2022). Development and validation of an HPLC–DAD method for the determination of moniliformin in maize. Journal of Food Processing and Preservation, 46(10), e16008.
- Rasi, H., Afshar Mogaddam, M.R. and Khandaghi, J. (2021). Application of a new extraction method coupled to high-performance liquid chromatography for tetracyclines monitoring in cow milk. Journal of food science and technology (Iran), 18(113), 339-349. [In Persian]
- Rastpour, N., Khandaghi, J., Farajzadeh, M.A. and Afshar Mogaddam, M.R. (2022). Deep eutectic solvent-based QuEChERS method combined with dispersive liquid–liquid microextraction for extraction of benzoylurea insecticides in cabbage leaves samples. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 102(12), 2778-2791.
- Rezaee, M., Assadi, Y., Milani Hosseini, M.R., Aghaee, E., Ahmadi, F. and Berijani, S. (2006). Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. Journal of Chromatography A, 1116(1–2), 1–9.
- Sheikhzadeh, F., Afshar Mogaddam, M.R., Farajzadeh, M.A. and Khandaghi, J. (2022). Development of microwave radiations-induced homogeneous liquid-liquid microextraction method for extraction of pyrethroid pesticides in fruit and vegetable samples. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 102(11), 2661-2672.
- Zare Sani, M., Afshar Mogaddam, M.R. and Khandaghi, J. (2023). Combination of cold induced HLLME with an effervescence-assisted DLLME based on deep eutectic solvent decomposition; application in extraction of some pyrethroid and carbamate pesticides from edible oils. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 103(18), 6367-6382.
- Zeiadi, S., Afshar Mogaddam, M.R., Farajzadeh, M.A. and Khandaghi, J. (2022). Combination of dispersive solid phase extraction with lighter than water dispersive liquid–liquid microextraction for the extraction of organophosphorus pesticides from milk. International Journal of Environmental Analytical Chemistry, 102(17), 5873-5886.