شناسایی و تعیین مقدار اکراتوکسین A در غلات عرضه شده با استفاده از HPLC

محمدرضا صائبی[1]، الهه تاجبخش[2]، ابراهیم رحیمی[1]*

۱. گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
۲. گروه زیست شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاداسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.
نویسنده مسئول:ebrahimrahimi55@yahoo.com

تاریخ دریافت مقاله: ۱۴۰۳/۱۱/۰۸ تاریخ پذیرش مقاله: ۱۴۰۴/۰۵/۰۹

خلاصه

مایکوتوکسین‌ها یا سموم قارچی، ترکیبات آلی هستند که در انتهای فاز رشدی برخی گونه‌های *قارچ‌های Fusarium .spp*، *Aspergillus spp*. *Penicillium sp.* در شرایط گرم و مرطوب تولید می‌شوند. از حدود ۴۰۰ نوع مایکوتوکسین موجود، حدود ۲۰ نوع آنها از نظر جهانی تهدیدی برای سلامت انسان و حیوانات محسوب می‌شوند. اکراتوکسین ها، مایکوتوکسین هایی هستند که عمدتاً به وسیله چندین گونه از قارچ‌های *آسپرژیلوس* شامل *آسپرژیلوس فلاووس*، *آسپرژیلوس پارازیتیکوس*، *آسپرژیلوس نومیوس*، *آسپرژیلوس اریزئوس* و پنی *سیلیوم پابرکولوم* و اکراتوکسین توسط *آسپرژیلوس اکراسئوس* تولید می‌شوند. در تحقیق حاضر میزان نفوذ سموم اکراتوکسین به غلات موجود در فروشگاه‌های شهر اصفهان مورد بررسی قرار گرفت. تعداد ۴۰ نمونه به طور تصادفی انتخاب شدند. و پس از یکنواخت کردن، در ۳ مرحله استخراج، تخلیص و تعیین مقدار سموم قرار گرفتند (تعیین مقدار از طریق مقایسه سطح زیر منحنی تک‌تک نمونه‌ها و استانداردها با احتساب ضریب رقت انجام شد). با توجه به حضور قارچ‌های مولد آفلاتوکسین و عوامل کنترل کننده این قارچ‌ها در محل تولید، همبستگی مثبتی بین کاهش جمعیت قارچ‌های مولد آفلاتوکسین و عوامل کنترل کننده با کاهش میزان آفلاتوکسین دیده شد. از پتانسیل عوامل کنترل کننده می‌توان برای جلوگیری از آلودگی غلات به آفلاتوکسین به خوبی استفاده نمود.

کلید واژه‌ها: اکراتوکسین، HPLC، آسپرژیلوس، غلات.

مقدمه

غلات مهمترین منبع غذایی برای انسان و دام بوده و مقادیر قابل توجهی از پروتئین، فیبر رژیمی و کربوهیدرات را تأمین می‌کنند (Tatari et al, 2022). اصلی‌ترین غلات مورد استفاده انسان شامل گندم (*تریتیکوم*)، برنج، ذرت و جو می‌باشد که همواره در معرض آلودگی توسط کپک‌های توکسین زا قرار دارند. مایکوتوکسین‌ها متابولیت‌های ثانویه‌ای هستند که توسط سویه‌های *آسپرژیلوس*، *فوزاریوم* و *پنی سیلیوم* و در محدوده‌ی وسیعی از محصولات کشاورزی، قبل، حین و بعد از برداشت تولید می‌شوند و سبب بروز مسمومیت حاد و مزمن، مسمومیت عصبی، اثرات سرکوب کننده سیستم ایمنی، ناهنجاری‌های جنینی، جهش‌زایی، سرطان‌زایی در انسان و دام و تحمیل خسارات اقتصادی فراوان به بخش کشاورزی می‌شوند. کپک غلات را می‌توان به دو گروه کپک‌های مزرعه‌ای و کپک‌های انباری تقسیم‌بندی نمود (Krska et al, 2008).

غلات به ویژه گندم محصولی مهم و استراتژیک در زندگی انسان محسوب می‌شود و با اطمینان می‌توان گفت که جز پرمصرف‌ترین محصولات کشاورزی به حساب می‌آید. در صورت آلودگی می‌تواند خطرات بسیار زیادی برای سلامت انسان به دنبال داشته باشد. مهم‌ترین عامل آلودگی غلات در مزرعه و انبار می‌تواند به وسیلهٔ میکروارگانیسم‌های مختلفی به ویژه قارچ‌ها باشد. جنس‌های *آسپرژیلوس* و *پنی سیلیوم* کپک معمول انباری بوده و در مراحل مختلف حمل‌ونقل، خشک کردن، انبار کردن و بسته‌بندی نامناسب بر روی محصول ظاهر می‌شوند. غذای آلوده منبع اصلی انتقال مایکوتوکسین‌ها به شمار می‌رود. مهمترین انواع مایکوتوکسین‌ها در محصولات کشاورزی و غذایی شامل آفلاتوکسین‌ها، فومونیسین، اکراتوکسین، زئارالنون و تریکوتیسین می‌باشند (Milani & Maleki, 2014). انواع آفلاتوکسین در غلات (ذرت، برنج و گندم) و زئارالنون به ویژه در ذرت وجود دارد. آلودگی با اکراتوکسین غالباً در زمان نگهداری روی می‌دهد و در انواع غلات به ویژه ذرت وجود دارد. مقاومت حرارتی بالای مایکوتوکسین‌ها در حین فرآوری مواد غذایی مشکلات جدی برای سلامتی انسان و دام ایجاد کرده است. امروزه به منظور جلوگیری از مسمومیت مایکوتوکسینی، روش‌های مختلفی مورد استفاده قرار می‌گیرند که به فناوری‌های قبل و بعد از برداشت تقسیم می‌شوند (McKevith, 2004; Pascale, 2009).

روش‌های کنترل قبل از برداشت نظیر عوامل محیطی مناسب، کشاورزی و عملیات تولید خوب و شرایط انبارداری صحیح است، همچنین در روش‌های کنترل بعد از برداشت نیز می‌توان از روش‌های فیزیکی، شیمیایی و بیولوژیکی بهره گرفت. روش‌های فیزیکی کاهش مایکوتوکسین‌ها شامل جداسازی دانه‌های آلوده، شستشو و غوطه‌ور کردن، اشعه دهی و فیلتر کردن و جذب است. انواع مواد شیمیایی نظیر بازها (آمونیاک)، عوامل اکسید کننده (هیدروژن پراکسید و اوزون) و اسیدهای آلی (فرمیک و پروپیونیک اسید) را می‌توان جهت سم‌زدایی بکار برد. به دلیل محدودیت سم‌زدایی فیزیکی و شیمیایی از قبیل کاهش کیفیت، هزینه بالا، ظرفیت اتصال کم و اثرات نامطلوب بر سلامت انسان، کاربرد روش‌های بیولوژیک جهت اطمینان از ایمنی مواد غذایی ضروری است. انواع مختلفی از باکتری (سویه‌های بروی باکتریوم و باسیلوس)، کپک (نظیر *کولونوستاچیس روزئا* و *ائروبازیدیوم پولولانس*)، مخمر (*ساکارومایسس سرویزیه* و *پیشیا آنومالا*) ترکیبات ضد قارچ طبیعی (اسانس‌های روغنی طبیعی و پلی فنولو فلاونوئیدها) از طریق اتصال به مایکوتوکسین‌ها و جذب آنها توانایی تخریب زیستی این ترکیبات را دارند (Shanakhat et al, 2018; Borbély et al, 2010).

مایکوتوکسین‌ها گروهی از متابولیت‌های ثانویه هستند که اغلب توسط قارچ‌هایی مانند پنی سیلیوم و آسپرژیلوس تولید می‌شوند. بزرگترین تخریب این سموم مربوط به مواد غذایی، به ویژه غلات است. بیماری‌های مختلفی توسط این مایکوتوکسین‌ها ایجاد می‌شود، که این بیماری‌ها از پاسخ‌های آلرژیک ساده تا سرکوب سیستم ایمنی و سرطان را شامل می‌شود. مایکوتوکسین‌ها مهم‌ترین متابولیت‌های قارچی هستند که به دلیل شیوع زیاد می‌توانند به سلامت انسان و دام آسیب بزنند. اکراتوکسین A (OTA) یکی از مهم‌ترین مایکوتوکسین‌هایی است که اثر متقابلی بر روی سلول‌ها دارد و به طور گسترده بر سلامت انسان و حیوان تأثیر می‌گذارد. این مایکوتوکسین توسط برخی از قارچ‌ها شامل *A. Ochraceus* و *P.Verrucosum* تولید می‌شود (Milani, 2013; Khaneghah et al, 2019).

اُکراتوکسین‌ها، ترکیبات سمی هستند که در انتهای مرحله رشدی قارچ‌های *آسپرژیلوس* و *پنی سیلیوم* در محصولات غذایی مختلف مانند حبوبات، ادویه‌جات، قهوه، کاکائو، بادام، پسته، گردو، انجیر خشک، میوه‌های خشک، کشمش و غلات در هنگام رشد در مزرعه، در مرحله برداشت به دلیل آسیب دیدن محصول، در حین

حمل‌ونقل و انبارداری به خصوص در صورتی که محصولات به درستی خشک نشده باشند، در شرایط رطوبتی و دمایی مناسب، تولید می‌شوند (Khorshidi et al, 2022; Smaoui et al, 2023). اکراتوکسین‌ها دومین گروه اصلی مایکوتوکسین‌ها یا سموم قارچی هستند که بعد از کشف آفلاتوکسین‌ها مورد توجه قرار گرفتند. اکراتوکسین A در سال ۱۹۶۵ در آفریقای جنوبی در پژوهش‌های آزمایشگاهی برای یافتن ترکیبات سمیِ جدیدِ قارچ آسپرژیلوس اُکراسئوس کشف شد و به دلیل نام قارچی که از آن گرفته شده بود، اُکراتوکسین نامیده شد (Nourbakhsh & Tajbakhsh, 2021). قارچ *آسپرژیلوس اُکراسئوس*، اولین بار توسط گیاه‌شناس و قارچ‌شناس آلمانی به نام کارل ویلهلم در سال ۱۸۷۷ کشف شد که *اُکراسئوس* به معنای به رنگِ اُکر یا اُخرایی رنگ یا زرد مایل به قهوه‌ای روشن است که رنگ کلنی این قارچ هم به رنگ گندمی مایل به زرد روشن است. اکراتوکسین‌ها در سه نوع A، B و C هستند که در این بین، اکراتوکسین A به دلیل داشتن یه قسمتِ آمینو اسیدی، که در ساخت پروتئین استفاده می‌شود (فنیل آلانین) با مهار آنزیم‌ها می‌تواند از تولید پروتئین در سلول‌های ایمنی بدن جلوگیری کند و از طرفی اکراتوکسین A، به دلیل داشتن کلر (cl) قادر است به DNA (ترکیبی که تمام اطلاعات ژنتیکی و وراثتی موجود زنده روی آن قرار دارد)، متصل شود که در نتیجه سمی‌تر از بقیه انواع اکراتوکسین‌ها است (Malir et al, 2016; Heussner & Bingle, 2015). البته نشخوارکنندگان در برابر سمیت اکراتوکسین A حساسیت کمتری دارند به دلیل اینکه در شکمبه آنها، میکروارگانسیم‌ها (یا میکروب‌ها) وجود دارد که قادرند اکراتوکسین A را به ترکیبات غیر سمی به نام (آلفا اکراتوکسین) تجزیه کنند با این حال، ممکن است سم اکراتوکسین به شیر وارد شود. البته ردپای کوچکی از آلودگی‌های اکراتوکسینی در ماهی‌ها مانند تیلاپیا و سالمون دیده شده که منبع خطرناکی از اکراتوکسین محسوب نمی‌شوند (El Khoury & Atoui, 2010).

از دیگر معضلات اکراتوکسین A که می‌توان به آن اشاره کرد این است که در صورت آلوده بودن محصولات غذایی به این سم قارچی، به دلیل مقاومت اکراتوکسین در برابر حرارت، با پخت و پزهای معمولی و فرآوری مواد غذایی که اغلب در محدوده دمایی ۸۰ تا ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد صورت می‌گیرد، از بین نمی‌رود. آژانس بین‌المللی تحقیقات روی سرطان (IARC)، اکراتوکسین A را در گروه B۲ یعنی به عنوان ترکیبی که احتمالاً در

سرطان‌زایی روی انسان نقش دارد، طبقه‌بندی کرد. اکراتوکسین A قادر است به DNA متصل شده و این فرآیند می‌تواند شروع سرطانی شدن یک سلول (کوچکترین واحد حیاتی بدن هر موجود زنده) باشد (Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007). با مصرف مواد غذایی آلوده به اکراتوکسین A، این سم به راحتی از طریق دستگاه گوارش بدن جذب شده و با اتصال به پروتئین اصلی خون (آلبومین) به سمت بخش‌های مختلف بدن از جمله کلیه و کبد رفته و در بافت‌های چربی بدن ذخیره می‌شود. طبق تحقیقات اکراتوکسین A، می‌تواند تا مدت‌ها در خون باقی بماند (Amézqueta et al, 2009). اثر مخرب و سمی اکراتوکسین A بیشتر روی کلیه است اما روی سایر اندام‌ها مانند کبد و همین‌طور سیستم ایمنی بدن نیز تأثیرگذار است. علاوه بر این، اکراتوکسین A قادر به عبور از جفت و ایجاد نقایص مادرزادی در جنین از جمله اختلال در رشد اندام‌های بدن و همین‌طور مرگ جنین است. بر اساس تحقیقات سازمان ایمنی مواد غذایی اروپا (EFSA)، مشخص شد که تجمع اکراتوکسین A می‌تواند بیشتر در خون، کبد و کلیه اتفاق بیفتد و مقدار کمتری از آن در بافت ماهیچه‌ای، چربی و شیر یافت می‌شود (Pfohl-Leszkowicz & Manderville, 2007). اکراتوکسین A یک ترکیب بیرنگ بلوری شکل با وزن مولکولی ۴۰۳/۸۲ دالتون و دارای فرمول مولکولی $C_{20}H_{18}NClO_6$ می‌باشد. اکراتوکسین A جزو ترکیبات فنیلآلانینی بوده که دارای یک هستهٔ ایزوکومارینی می‌باشد. اکراتوکسین A روی سلامت مردان هم اثرات منفی می‌گذارد و با جلوگیری از ترشح هورومون تستوسترون (هورمون جنسی) و با بدشکلی، کاهش تعداد و تحرک سلول اسپرم باعث ناباروری در آقایان شده و ممکن است باعث سرطان بیضه شود (Ringot et al, 2006; Chain et al, 2020). سم اکراتوکسین A، با جلوگیری از تولید پروتئین در سلول‌های ایمنی، باعث سرکوب سیستم ایمنی بدن می‌شود. تحقیقات روی حیوانات نشان داده است که این سم می‌تواند باعث کاهش اندازه اندام‌های ایمنی بدن مانند طحال، اندام لنفاوی (تیموس) و غدد لنفاوی شده و از این طریق عملکرد سیستم ایمنی را کاهش دهد و با گذاشتن اثرات مخرب روی سلول‌های لوزالمعده، ممکن است منجر به دیابت شود (Bui-Klimke & Wu, 2015). در صورت مصرف مواد غذایی آلوده به اکراتوکسین در زنان شیرده، این سم از طریق شیر به نوزاد منتقل می‌شود. کودکان با توجه به وزن کمتری که دارند و تعداد دفعات بیشتری که غذا مصرف می‌کنند، بیشتر در معرض خطر اکراتوکسین A قرار می‌گیرند. علاوه بر مادران و

نوزادان، افراد مسن که سیستم ایمنی ضعیف‌تری دارند هم از گروه‌های پرخطر محسوب می‌شوند. هدف از این مطالعه ارزیابی میزان سم اکراتوکسین در نمونه‌های غلات جداسازی شده از سطح عرضه بوده است (Clark & Snedeker, 2006; Battacone, Nudda, & Pulina, 2010).

روش کار

آماده‌سازی نمونه

جهت رفع آلودگی احتمالی، تمامی ظروف آزمایشگاهی با اسید هیدروکلریک شسته شده و با آب دیونیزه آبکشی و در آون خشک شدند. کلیهٔ ظروف مورد استفاده در این بررسی در حدود دو ساعت در محلول ۲ مولار اسید سولفوریک خیسانده شدند و پس از چندین بار شستشو با آب دیونیزه شسته و در آون خشک شدند. در این پژوهش تعداد ۴۰ نمونه از غلات صبحانه با پایه غله‌ای شامل گندم، ذرت، جو و برنج غیر شکلاتی در گروه‌های مختلف از شرکت‌های داخل ایران طبقه‌بندی شدند. نمونه‌ها به صورت تصادفی انتخاب و برای ادامه مراحل جداسازی انتخاب شدند. در ادامه نمونه‌ها با یک آسیاب آزمایشگاهی آسیاب شدند و پس از آن به منظور دستیابی به یک ترکیب یکنواخت توسط دستگاه مخلوط‌کن مخلوط و یکنواخت شدند (Rahimi et al, 2012).

مواد و وسایل مورد استفاده

مواد و وسایل مورد استفاده در طرح شامل سم آفلاتوکسین (B1, B2, G1, G2) خالص، سم اکراتوکسین A خالص، محلول متانول MeO، محلول اسید استیک خالص، محلول PBS، محلول Tween-20، محلول NaCl، حلال فاز متحرک H2O-HPLC، MeCN: H2O، کاغذ صافی معمولی، آب دیونیزه، دتکتور فلورسانس، GFF، دستگاه HPLC، ستون Immuno affinity، بلندر، حلال فاز متحرک می‌باشد. تمامی مواد شیمیایی به استثناء متانول و استونیتریل درجه HPLC دارای درجه آزمایشگاهی بودند (مرک آلمان). کلیه محلول‌ها با آب دیونیزه تهیه شدند (Swartz, 2010). استانداردهای AFB1 و OTA از شرکت شیمیایی سیگما خریداری شدند که در تهیه منحنی‌های کالیبراسیون مورد استفاده قرار گرفتند. ستون مورد استفاده برای آفلاتوکسین (Aflatest P) و اکراتوکسین (Chratest TM) از شرکت Vicam تهیه شد. جهت تایید اولیه میزان مایکوتوکسین‌ها از کیت آنزیمی ELIZA برای اکراتوکسین A و آفلاتوکسین B1 از شرکت Sigma تهیه شد. دستگاه HPLC مجهز به یک پمپ

Quarternary مدل 1200 Series و یک آشکار ساز UV/VIS از شرکت Agilent آلمان تهیه شد. ماکزیمم سرعت دوران یا چرخش 5000 rpm در نظر گرفته شد.

متانول، اسید استیک گلایسال، استو نیتریل و محلول ذخیرهٔ استاندارد اکراتوکسین A با غلظت ۱۰۰۰ppb در متانول با درجهٔ خلوص بسیار بالا و مخصوص دستگاه HPLC از نمایندگی شرکت Sigma و ستون‌های ایمونوافینیتی مخصوص اکراتوکسین A به نام پوری فست (Puri- Fast) از نمایندگی شرکت BIOS-LI در ایران تهیه شد (Kazakevich & Lobrutto, 2007).

استخراج و تخلیص

کلیهٔ ظروف به کار رفته در این بررسی، ابتدا چندین ساعت در محلول ۲ مولار اسید سولفوریک خیسانده می‌شدند و پس از چندین بار شستشو با آب لوله‌کشی و حصول اطمینان از اینکه در ظروف، اسیدی باقی نمانده (چک کردن با کاغذ pH)، در نهایت با آب دیونیزه شسته و در آون خشک می‌شدند. در انجام این تحقیق، از دستگاه HPLC دستگاه HPLC از نمایندگی شرکت Sigma و ستون‌های ایمونوافینیتی مخصوص اکراتوکسین A به نام پوری فست (Puri- Fast) از نمایندگی شرکت BIOS-LI در ایران تهیه شد. این دستگاه مجهز به دتکتور فلورسانس RF-10AXL و کنترل کننده سیستم و جریان 10-Avp و همچنین نرم‌افزار LC-solution استفاده شد (Hallsworth & Magan, 1997; Adams et al, 2009).

مرحله استخراج، تخلیص و تعیین مقدار سم انجام پذیرفت. در مرحله استخراج، ابتدا برای فعال کردن ستون‌ها محلول PBS را از آنها عبور داده شد. هر نمونه را به خوبی مخلوط کرده و سپس ۱۰ گرم از هر نمونه را با احتساب ۰/۱ خطا توزین گردید. سپس مقدار ۱۰ گرم از نمونه دیگر را نیز به عنوان نمونه Spike با ۰/۱ خطا توزین شد. به نمونه مد نظر ۵۰µl از اکراتوکسن A و آفلاتوکسین های B1،B2،G1،G2 با غلظت استاندارد ۱۰۰۰ppm تهیه شدند (Dohnal et al, 2013). سپس یک گرم از محلول NaCl و ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال استخراج اضافه، سپس محلول فوق را یک دقیقه با بلندر مخلوط و با کاغذ صافی فیلتر و سپس ۵ میلی‌لیتر از محلول فیلتر شده را به ۲۵ میلی‌لیتر محلول بافر نمکی (PBS) اضافه شد. پس از تکان دادن نمونه را از کاغذ صافی GFF عبور دادیم و در نهایت همه عصاره رقیق شده را ضمن رساندن دمای ستون به دمای آزمایشگاه برداشته و نمونه را از ۲۰ میلی‌لیتر محلول بافر نمکی (PBS) عبور داده شد (Luque et al, 2013). در مرحله تخلیص ۴۰ میلی‌لیتر از

عصاره رقیق شده را از ستون عبور و سپس ستون با استفاده از بافر نمکی (PBS) فسفات شستشو داده شد. در نهایت ستون با عبور فشار ملایم هوا به مدت ۱۰-۱۵ ثانیه خشک و به ستون MeOH: AOCH ۱۰۰۰ µl اضافه گردید. در مرحله تعیین مقدار، تشخیص با دتکتور فلورسانس ۳۳۳ =meλ و ۴۶۰= xeλ و ۱۰۰۰ =Gain و ۱۶= Attn تعیین مقدار شد. با مقایسه سطح زیر منحنی تک‌تک نمونه‌ها و استانداردها با احتساب ضریب رقت انجام تعیین مقدار شدند. رابطهٔ خط به دست آمده و ضریب همبستگی نشان‌دهنده رابطه خطی مطلوب بین غلظت‌های مختلف نمونه و سطوح زیر جذب در محدوده کاری بود (Mishra et al, 2016; Leitner et al, 2002). تکرارپذیری و تجدیدپذیری روش با تزریق محلول استاندارد اکراتوکسین A به دستگاه HPLC، در غلظت‌های ۰/۱، ۱، ۲/۵، ۵ و ppb ۱۰ در هفت روز متوالی، در روز اول از هر غلظت استاندارد شش بار و در بقیه روزها یک بار، و تعیین درصد انحراف معیار نسبی بررسی شد. برای تعیین کارایی روش در استخراج اکراتوکسین A از نمونه‌های غلات مورد بررسی، ابتدا یکی از نمونه‌ها بدون هیچ‌گونه افزایشی از استاندارد اکراتوکسین A به آن نمونه، مطابق روش کار، استخراج و آنالیز گردید (این عمل سه بار انجام شد). سپس یک میلی‌لیتر به ترتیب از استانداردهای ۰/۱، ۲/۵، ppb ۵ توسط گاز خلاء خشک شد و سپس به هر یک از غلظت‌ها، ۲۰ میلی‌لیتر از نمونه زیر صافی اضافه و مطابق روش کار استخراج و آنالیز شدند و این عمل برای هر غلظت شش بار تکرار شد.

تجزیه آماری

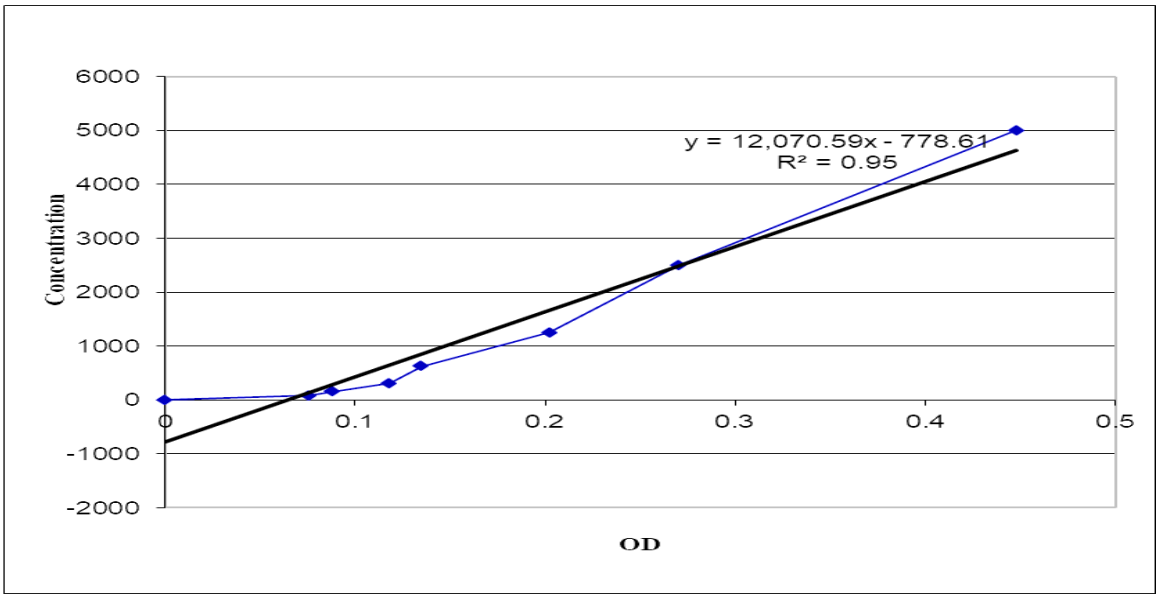
آمار توصیفی (میانگین، انحراف استاندارد، دامنه، حداکثر و متوسط) با تجزیه دو طرفه واریانس (ANOVA) و با استفاده از نرم‌افزار Minitab مورد ارزیابی و بررسی قرار گرفت.

نتایج

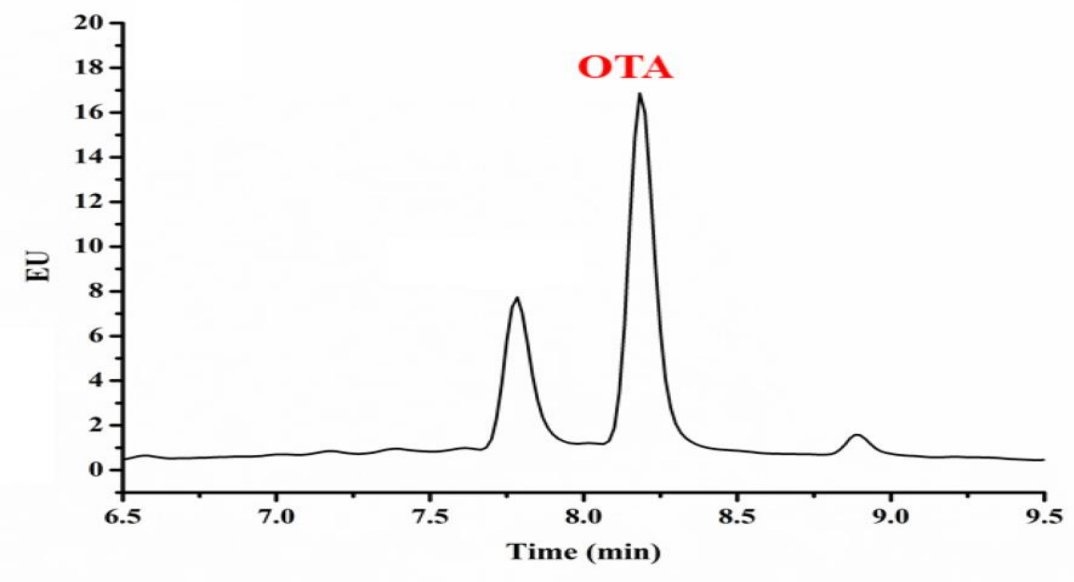
در این پژوهش تعداد ۴۰ نمونه از غلات صبحانه با پایه غله‌ای شامل گندم، ذرت، جو و برنج غیر شکلاتی در گروه‌های مختلف از شرکت‌های داخل ایران طبقه‌بندی شدند. نمودار ۱ منحنی کالیبراسیون برای تعیین غلظت اکراتوکسین A، نمودار ۲ منحنی کروماتوگرام مربوط به استاندارد اکراتوکسین A (۱۰ ppb) و نمودار ۳ کروماتوگرام مربوط به نمونهٔ غلات مورد بررسی را نشان داد. نتایج حاصله با تکرارپذیری و تجدیدپذیری و همچنین میانگین پنج بار تکرار نشان داده شده است. نمونه‌ها در غلظتی با میانگین ppb ۰/۰۹ و ماکزیمم

۰/۸۰۹ppb به اکراتوکسین A آلودگی داشتند. که خوشبختانه میزان آلودگی گزارش شده از حد مجاز نرمال پایین‌تر است. در حالی که میزان آلودگی نمونه‌های ذرت و گندم با نمونه‌های جو و برنج دارای اختلاف معنی‌داری از نظر وجود اکراتوکسین A بودند.

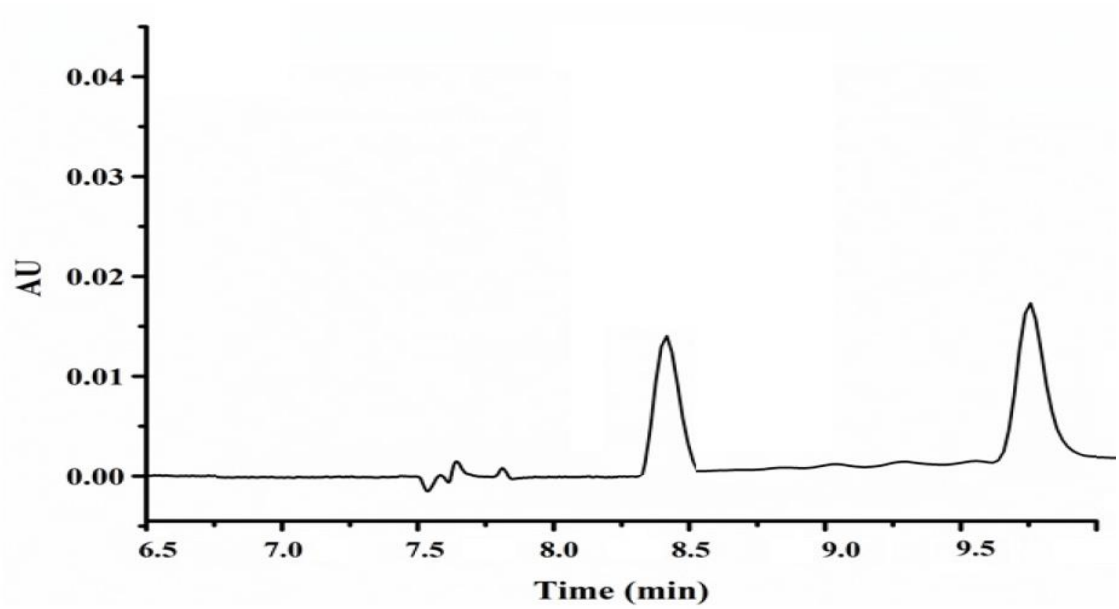
نمودار ۱: منحنی کالیبراسیون اکراتوکسین A



نمودار ۲: کروماتوگرام مربوط به استاندارد اکراتوکسین **A (۱۰ppb)**



نمودار ۳: کروماتوگرام مربوط به نمونهٔ غلات مورد بررسی



مقادیر اکراتوکسین در نمونه‌های غلات مورد ارزیابی در سه سطح غلظتی مختلف با میانگین پنج بار تکرار مورد ارزیابی قرار گرفت.

جدول ۱: تکرارپذیری و تجدیدپذیری نتایج اکراتوکسین A (نتایج میانگین پنج بار تزریق)

غلظت OTA ppb	میانگین (µ V* S) سطح بین یک روز	میانگین (µ V* S) سطح درون روزها	RSD (%) بین یک روز	RSD (%) درون روزها
۰/۱	۵۵۱۸/۲	۷۲۹۲/۵	۱۴/۰۸۸	۱۵/۹۸۳
۱/۵	۴۸۹۳/۳	۵۹۷۲۲/۶	۳/۵۱۶	۳/۵۷۱
۲/۵	۱۵۶۴۹/۴	۱۳۶۴۸۰/۷	۳/۲۸۸	۲/۴۲۷
۵	۲۷۷۷۰/۷	۲۵۴۷۲۶/۲	۲/۲۲۳	۱/۶۷۰
۱۰	۵۴۱۰۸/۸	۴۹۷۰۲۴/۸	۰/۶۴۳	۱/۱۲

جدول ۲: درصد بازیافت اکراتوکسین A در نمونه غلات در سه سطح غلظتی مختلف ppb ۰/۱، ppb ۲/۵ و ۵ppb
(نتایج میانگین ۵ اندازه‌گیری متوالی)

بازیافت ٪	مقدار اکراتوکسین A به دست آمده (ppb)	مقدار اکراتوکسین A اضافه شده (ppb)	فرآورده
۱۰۱	۰/۱۰۱	۰/۱	**ذرت**

۸۸	۲/۲	۲/۵	**گندم**
۹۵	۴/۷۵	۵	**جو و برنج**

بحث

آفلاتوکسین‌ها و اکراتوکسین‌ها از متابولیت‌های ثانویه قارچی هستند که توسط گروهی از قارچها به ویژه از جنس آسپرژیلوس ایجاد می‌گردند. مهم‌ترین قارچ‌های ایجادکننده آفلاتوکسین، *آسپرژیلوس فلاووس*، *آسپرژیلوس پارازیتیکوس* و *پنی سیلیوم پابرکولوم* و قارچ اصلی ایجادکننده اکراتوکسین، *آسپرژیلوس اکراسئوس* می‌باشد (Raters & Matissek, 2008). تاکنون در ایران مطالعه‌ای مبنی بر شیوع و گسترش اکراتوکسین A در گندم، آرد یا غلات مشابه دیده نشده است. در سال ۱۳۸۶ هادیان و همکاران به بررسی میزان شیوع اکراتوکسین A در برنج فروشگاه‌های زنجیره‌ای شهر تهران پرداختند. به این منظور ۱۰۰ نمونه به صورت تصادفی از فروشگاه‌ها تهیه و ۸۰ نمونه برنج داخلی و ۲۰ نمونه دیگر از برنج‌های وارداتی بودند. بر اساس نتایج حاصل از این مطالعه میزان آلودگی به اکراتوکسین A در ۹۷ درصد از نمونه‌های مورد ارزیابی کمتر از حد مجاز (۵ µg/kg) توسط استاندارد ملی و تحقیقات صنعتی ایران بود (Hadian et al, 2009).

در مطالعه حاضر، سطوح آلودگی به اکراتوکسین A نمونه‌های غلات داخل کشور، کمتر از انواع داخلی بود. دامنه تغییرات آلودگی به اکراتوکسین A در انواع غلات مورد ارزیابی ۱/۰۷ - ۰/۱۵ میکروگرم به ازای هر کیلوگرم بود. شرایط خوب بسته‌بندی در مورد غلات بسیار مهم است؛ زیرا عدم تهویه و وجود رطوبت و عدم فرآوری مطلوب می‌تواند از عللی باشد که غلات را به اقسام قارچها آلوده می‌نماید. موضوع دیگر نگهداری مواد به صورت خرد شده یا سالم است؛ زیرا آلودگی قارچی، ابتدا به صورت فراوان در دانه‌های شکسته یا آسیب دیده به وجود می‌آید. مطالعات اخیر نشان می‌دهد که به علت بالا بودن آلودگی قارچی میزان آفلاتوکسین افزایش می‌یابد و آلودگی قارچی ارتباط مستقیمی با افزایش سطح اکراتوکسین داشته و به همان میزان افزایش دارد؛ اما گاهاً به دلیل نبود شرایط کافی تولید توکسین قارچی انجام نمی‌شود. بنا به گزارش پی یر و همکاران در سال ۱۹۹۱ دانه‌های ذرت فاقد پوشش و فاقد سد طبیعی برای جلوگیری از آلودگی با قارچ آسپرژیلوس می‌باشند از این‌رو احتمال آلودگی با این مایکوتوکسین‌ها به ویژه

در دمای ۲۵ درجه به مدت ۷ تا ۹ روز افزایش می‌یابد. لازم به ذکر است عوامل دیگری همچون رطوبت، PH و فشار اسمزی در افزایش مایکوتوکسین‌ها نقش دارند (Pier, 1992).

از طرفی ممکن است قارچ‌ها در صورت نامطلوب شدن شرایط از بین بروند، اما سم تولید شده توسط آنها همچنان باقی می‌ماند؛ اما سم تولید شده توسط آنها همچنان باقی می‌ماند. ویلا و مرکاکی به بررسی میزان آفلاتوکسین و اکراتوکسین B در غلات صبحانه در فروشگاه‌های سطح شهر به روش HPLC پرداختند که به این نتیجه رسیدند که در بیش از نیمی از نمونه‌های مورد بررسی آفلاتوکسین B1 وجود دارد که این میزان مطابق نتایج به دست آمده در ۱۰٪ نمونه‌ها بیش از حد مجاز استاندارد اروپا می‌باشد (Villa & Markaki, 2009). مطالعات نشان داده است که پس از برداشت محصول نیز به‌کارگیری روش‌های مناسب فرآوری و خشک کردن و نگهداری در انبار جهت کاهش آلودگی و جلوگیری از گسترش آن لازم است. تامسون و هنک طی مطالعه مشابهی در سال ۲۰۰۰ نشان دادند که تولید آفلاتوکسین در صورت وجود شرایط مناسب، بدون توجه به طول مدت ذخیره و شرایط آب و هوایی انجام می‌گیرد (Thompson & Henke, 2000).

بنا به گزارش تامسون و هنک در سال ۲۰۰۰ تولید آفلاتوکسین در صورت وجود شرایط مناسب، بدون توجه به طول مدت ذخیره و شرایط آب و هوایی انجام می‌گیرد. هنک و همکاران در سال ۲۰۰۱ با مطالعه بر روی ۱۴۲ نمونه دانه‌های گیاهی گزارش نمودند در صورت فراهم بودن شرایط مناسب، امکان رشد قارچ و تولید آفلاتوکسین در تمام مراحل از عمل‌آوری تا ذخیره وجود دارد. شرایط خوب بسته‌بندی در مورد غلات بسیار مهم است؛ زیرا عدم تهویه و وجود رطوبت و عدم فرآوری مطلوب می‌تواند از عللی باشد که غلات را به اقسام قارچ‌ها آلوده می‌نماید (Thompson & Henke, 2000; Henke et al, 2001). در کشور ایران ضایعات نان به صورت نان خشک زیاد است و ریسک آلودگی آنها به مایکوتوکسین‌ها بالاست. با توجه به اینکه منشأ این نان خشک‌ها متفاوت بوده و ضوابط بهداشتی در نگهداری این گونه مواد زائد رعایت نمی‌شود، ورود این سموم قارچی از این طریق به جیرهٔ غذایی دام‌ها بسیار محتمل و بالطبع انسان به طور غیرمستقیم در معرض این آلاینده‌ها قرار می‌گیرد. لذا ضرورت دارد که غذای دام‌ها از نظر آلودگی به مایکوتوکسین‌هایی مانند اکراتوکسین و آفلاتوکسین بررسی شوند. در حال حاضر بهترین روش برای مقابله با

آلودگی به اکراتوکسین‌ها پیش‌گیری از آلودگی می‌باشد. با تغییر دما، کاهش رطوبت نسبی هوا، کاهش محتوای آب سوبسترا تا حدود زیادی می‌توان از رشد قارچ و تولید سم جلوگیری کرد. مطالعات نشان داده است که چنانچه پس از آلودگی به سم از آسپارتام به صورت خوراکی استفاده شود، آسپارتام از اتصال اکراتوکسین A به پروتئین‌های پلاسما جلوگیری کرده و باعث دفع آن می‌شود بدون اینکه اثر جانبی ایجاد نماید. نتایج بررسی شاتول (Shotwell) و همکارانش بر روی ۱۴۲ نمونه گندم جمع‌آوری شده از ویرجینیا، کارولینای شمالی، جنوب ایلینویز، کنتاگی و جنوب شرقی میسوری حاکی از عدم آلودگی نمونه‌های مورد بررسی به اکراتوکسین A بود (Shotwell et al, 1977). تابوک (Tabuc) و همکارانش در سال‌های ۲۰۰۴ - ۲۰۰۲ قارچ‌ها و مایکوتوکسین‌های (آفلاتوکسین، دزوکسی نیوالنول، زیرالنون، فوموزین و اکراتوکسین A) موجود در ۱۱۰ نمونه غلات (۳۵ گندم، ۵۴ ذرت و ۲۱ جو) از جنوب شرقی رومانی را مطالعه کردند. بر اساس نتایج آنها بیشترین آلودگی تعلق به قارچ‌های *آسپرژیلوس* و *فوزاریوم* داشت. بیش از ۹۰ درصد نمونه‌ها حداقل به یکی از مایکوتوکسین‌های مورد بررسی آلودگی داشتند. ولی فوموزین و اکراتوکسین A در هیچ یک از غلات مورد بررسی مشاهده نشد (Tabuc et al, 2009). نتایج این تحقیق نیز با نتایج مطالعات اخیر در راستای بررسی و جداسازی مایکوتوکسین‌ها از غلات و گندم در ایران همخوانی ندارد.

پارک (Park) و همکارانش در سال ۲۰۰۳ میزان اکراتوکسین A را در اقلام مختلف مواد غذایی (برنج، آرد گندم جو، آبجو) کشور کره بررسی کرده‌اند. آنها با جمع‌آوری نتایج سایر مطالعات انجام شده در این خصوص و الگوی مصرفی در کره، دریافت احتمالی روزانه اکراتوکسین A را در برای همه افاد کرهای، در محدودهٔ ۴/۱ - ۰/۸ برآورد کردند. در حالی که برای مصرف‌کنندگان سنگین وزن ۹/۱ - ۱/۷ نانو گرم بر کیلوگرم وزن بدن برآورد کردند (Park, Chung & Kim, 2005). محققان اظهار داشته‌اند که بر اساس این برآوردها، می‌توان نتیجه گرفت که در حال حاضر ریسک قابل توجه‌ای از تماس با اکراتوکسین A برای مصرف‌کنندگان متوسط کرهای، وجود ندارد (Park, Chung & Kim, 2005).

مطالعات مشابه به بررسی میزان مایکوتوکسین‌ها در لبنیات پرداختند. البرزی و همکاران در شیراز میزان آلودگی پنیر پاستوریزه به آفلاتوکسین M۱ را به روش ELISAتعیین کردند. نتایج این مطالعه نشان داد که برخلاف اینکه ۳۰٪ از شیرهای پاستوریزه آلوده بودند

ولی هیچ یک از پنیرهای تولید شده آفلاتوکسین M۱ بالاتر از حد مجاز نداشتند (Aydin et al, 2011).

با توجه به آلودگی اکثر نمونه‌ها به اکراتوکسین A، ضرورت توجه به این موضوع نمایان می‌شود. حداکثر حد مجاز آلودگی غلات به اکراتوکسین A در کشورهای اروپایی و برزیل و آمریکا ۵ µg/kg تعیین شده است، در حالی که برای فرآورده‌های غلات حداکثر حد مجاز ng/g ۳ تعیین شده است.

نتیجه‌گیری

با برجسته شدن مفهوم توسعه انسانی در سطح جهان، مسأله امنیت و ایمنی غذایی که از دیرباز مطرح بوده ابعاد تازه‌ای به خود گرفته و تحت تأثیر فعالیت سازمان ملل مورد توجه خاص قرار گرفته است. با گسترش ارتباطات و پدیدهٔ جهانی شدن، نیاز به ارتباط در کشورمان نیز احساس می‌گردد. این ارتباطات تابع قوانینی است که برای تمام کشورها تدوین گردیده و نادیده گرفتن آن امکان‌پذیر نیست. روابط تجاری در آینده تابع قوانین وضع شده توسط سازمان تجارت جهانی (WHO) صورت خواهد گرفت و رعایت استانداردهای بین‌المللی در مورد کالاهای تجاری امری اجتناب‌ناپذیر است. از مقایسه نتایج این مطالعه با نتایج سایر مطالعه‌ها می‌توان نتیجه گرفت که در اقلام عمده مواد غذایی آلودگی بالقوه به قارچ و سم ناشی از آن وجود دارد و می‌بایست در هنگام برداشت کلیه اقلام تشکیل‌دهنده خوراک انسان، استانداردهای جهانی اعمال گردد تا زمان مصرف شرایط مناسبی برای حمل و نگهداری آنها ایجاد شود. نکته قابل توجه دیگر اینکه هر چه زمان برداشت محصول در نقطه پایانی خط تولید یا در زمان تهیه خوراک تا زمان مصرف کمتر باشد، احتمال آلودگی کمتر است. نظر به اینکه هیچ کار تحقیقاتی گسترده‌ای در ارتباط با میزان دریافت مایکوتوکسین‌ها متناسب با عادات غذایی مردم ایران صورت نگرفته است، توجه مقامات بهداشتی را به تأثیر فزایندهٔ این آلاینده‌های مواد غذایی و نیاز روزافزون به بررسی سطوح آنها به‌طور پیوسته در مواد غذایی، آب و گیاهان برای تعیین دریافت مجاز روزانه، جلب می‌نماید.

منابع

۱. تاتاری, ش., et al., رد کامل سنجد و جودوسر در فرمولاسیون غلات صبحانه حجیم کارایی. Journal of Food Science & Technology (2008-8787), 2022. **19** (123).

۲. Krska, R., et al., *Mycotoxin analysis: An update.* Food additives and contaminants, 2008. **25**(2): p. 152-163.

۳. Milani, J. and G. Maleki, *Effects of processing on mycotoxin stability in cereals.* Journal of the Science of Food and Agriculture, 2014. **94**(12): p. 2372-2375.

۴. McKevith, B., *Nutritional aspects of cereals.* Nutrition Bulletin, 2004. **29**(2): p. 111-142.

۵. Pascale, M.N., *Detection methods for mycotoxins in cereal grains and cereal products.* Zbornik Matice srpske za prirodne nauke, 2009 (117): p. 15-25.

۶. Shanakhat, H., et al., *Current methods for mycotoxins analysis and innovative strategies for their reduction in cereals: An overview.* Journal of the Science of Food and Agriculture, 2018. **98**(11): p. 4003-4013.

۷. Borbély, M., et al., *Mycotoxin contamination in cereals.* Journal of Agroalimentary Processes and Technologies, 2010. **16**: p. 96-98.

۸. Milani, J., *Ecological conditions affecting mycotoxin production in cereals: a review.* Veterinarni Medicina, 2013. **58** (8).

۹. Khaneghah, A.M., et al., *Mycotoxins in cereal-based products during 24 years (1983–2017): A global systematic review.* Trends in food science & technology, 2019. **91**: p. 95-105.

۱۰. Khorshidi, M., et al., *The occurrence of aflatoxin M 1 in doogh, kefir, and kashk in Hamadan, Iran.* Food Science and Technology, 2022. **42**: p. e42022.

۱۱. Smaoui, S., et al., *The control of Fusarium growth and decontamination of produced mycotoxins by lactic acid bacteria.* Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 2023. **63**(32): p. 11125-11152.

۱۲. Nourbakhsh, F. and E. Tajbakhsh, *Neurotoxicity mechanism of Ochratoxin A.* Quality Assurance and Safety of Crops & Foods, 2021. **13**(2): p. 34-45.

۱۳. Malir, F., et al., *Ochratoxin A: 50 years of research.* Toxins, 2016. **8**(7): p. 191.

۱۴. Heussner, A.H. and L.E. Bingle, *Comparative ochratoxin toxicity: A review of the available data.* Toxins, 2015. **7**(10): p. 4253-4282.

۱۵. El Khoury, A. and A. Atoui, *Ochratoxin A: General overview and actual molecular status.* Toxins, 2010. **2**(4): p. 461-493.

۱۶. Pfohl-Leszkowicz, A. and R.A. Manderville, *Ochratoxin A: An overview on toxicity and carcinogenicity in animals and humans* . Molecular nutrition & food research, 2007. **51**(1): p. 61-99.

۱۷. Amézqueta, S., et al., *Ochratoxin A decontamination: A review.* Food control, 2009. **20**(4): p. 326-333.

۱۸. Ringot, D., et al., *Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update.* Chemico-biological interactions, 2006. **159**(1): p. 18-46.

۱۹. Chain, E.P.o.C.i.t.F., et al., *Risk assessment of ochratoxin A in food.* EFSA journal, 2020. **18**(5): p. e06113.

۲۰. Bui-Klimke, T.R. and F. Wu, *Ochratoxin A and human health risk: A review of the evidence.* Critical reviews in food science and nutrition, 2015. **55**(13): p. 1860-1869.

۲۱. Clark, H.A. and S.M. Snedeker, *Ochratoxin A: its cancer risk and potential for exposure.* Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B: Critical Reviews, 2006 .**9**(3): p. 265-296.

۲۲. Battacone, G., A. Nudda, and G. Pulina, *Effects of ochratoxin A on livestock*

production. Toxins, 2010. **2**(7): p. 1796-1824.

۲۳. در *A*, میزان آلودگی اکراتوکسین etرحیمی, برنج‌های عرضه شده در اصفهان. بهداشت مواد غذایی, ۲۰۱۲. ۲(۱ (۵) بهار): p. 11-17.

۲۴. Swartz, M., *HPLC detectors: a brief review.* Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 2010. **33**(9-12): p. 1130-1150.

۲۵. Kazakevich, Y.V. and R. Lobrutto, *HPLC for pharmaceutical scientists*. 2007: John Wiley & Sons.

۲۶. Hallsworth, J.E. and N. Magan, *A rapid HPLC protocol for detection of polyols and trehalose.* Journal of microbiological methods, 1997. **29**(1): p. 7-13.

۲۷. Adams, M., et al., *A protocol for HPLC-based activity profiling for natural products with activities against tropical parasites.* Natural Product Communications, 2009. **4**(10): p. 1934578X0900401013.

۲۸. Dohnal, V., et al., *A comparison of ELISA and HPLC methods for determination of ochratoxin A in human blood serum in the Czech Republic.* Food and chemical toxicology, 2013. **62**: p. 427-431.

۲۹. Luque, M.I., et al., *Development of a PCR protocol to detect ochratoxin A producing moulds in food products.* Food control, 2013. **29**(1): p. 270-278.

۳۰. Mishra, R.K., et al., *Evaluation of extraction methods for ochratoxin A detection in cocoa beans employing HPLC.* Food Additives & Contaminants: Part A, 2016. **33**(3): p. 500-508.

۳۱. Leitner, A., et al., *Comparison of methods for the determination of ochratoxin A in wine.* Analytica Chimica Acta, 2002. **453**(1): p. 33-41.

۳۲. Raters, M. and R. Matissek, *Thermal stability of aflatoxin B 1 and ochratoxin A.* Mycotoxin research, 2008. **24**: p. 130-134.

۳۳. Hadian, H., et al., *Occurrence of ochratoxin A in rice sold in chain stores in Tehran, 2007.* 2009.

۳۴. Pier, A., *Major biological consequences of aflatoxicosis in animal production.* Journal of Animal Science, 1992. **70**(12): p. 3964-3967.

۳۵. Villa, P. and P. Markaki, *Aflatoxin B1 and ochratoxin A in breakfast cereals from Athens market: Occurrence and risk assessment.* Food Control, 2009. **20**(5): p. 455-461.

۳۶. Thompson, C. and S.E. Henke, *Effect of climate and type of storage container on aflatoxin production in corn and its associated risks to wildlife species.* Journal of Wildlife Diseases, 2000. **36**(1): p. 172-179.

۳۷. Henke, S.E., et al., *Survey of aflatoxin concentrations in wild bird seed purchased in Texas.* Journal of Wildlife Diseases, 2001. **37**(4): p. 831-835.

۳۸. Shotwell, O.L., et al., *Survey of 1975 wheat and soybeans for aflatoxin, zearalenone, and ochratoxin.* Journal of the Association of Official Analytical Chemists, 1977. **60**(4): p. 778-783.

۳۹. Tabuc, C., et al., *Molds and mycotoxin content of cereals in southeastern Romania.* Journal of food protection, 2009. **72**(3): p. 662-665.

۴۰. Park, J.W., S.-H. Chung, and Y.-B. Kim, *Ochratoxin A in Korean food commodities: occurrence and safety evaluation.* Journal of agricultural and food chemistry, 2005. **53**(11): p. 4637-4642.

۴۱. آیدین, م.ت., et al., ارزیابی میزان اکراتوکسین *A* و آفلاتوکسین های (*B1, B2, G1, G2*) غلات عرضه شده در فروشگاه های شهر تهران به روش کروماتوگرافی با کارایی بالا در سال ۱۳۸۹. ۲۰۱۱.

Identification and determination of ochratoxin A in supplied cereals using HPLC

Mohammad Reza Saebi[1], Elaheh Tajbakhsh[2], Ebrahim Rahimi[1]*

1. Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

2. Department of Biology, Faculty of Basic Sciences, Islamic Azad University, Shahrekord Branch, Shahrekord, Iran.

Corresponding author: ebrahimrahimi55@yahoo.com

Abstract

Mycotoxins or fungal toxins are organic compounds that occur at the end of the growth phase of some species of *Fusarium fungi*. spp. *Aspergillus spp*., *Penicillium spp*. They are produced in hot and humid conditions. Out of about 400 types of mycotoxins, about 20 of them are considered a global threat to human and animal health. Ochratoxins are mycotoxins that are mainly produced by several species of *Aspergillus fungi* including *flavus*, *Parasiticus*, *Nomius*, Eryzeus and *Penicillium paberculum* and Ochratoxin by *Aspergillus ochraceus*. In the present research, the penetration rate of *Ochratoxin* toxins into cereals available in the stores of Isfahan city was investigated. 40 samples were randomly selected. After homogenization, they were placed in 3 stages of extraction, purification and determination of the amount of toxins (determination of the amount was done by comparing the area under the curve of individual samples and standards, including the dilution factor). According to the presence of aflatoxins-producing fungi and the controlling factors of these fungi in the production site, a positive correlation was seen between the decrease in the population of aflatoxins-producing fungi and the controlling factors with the decrease in the amount of aflatoxins. The potential of control agents can be used to prevent contamination of grains with aflatoxins.

Keywords: Ochratoxin, HPLC, Aspergillus, cereals.