Journal of Food Hygiene, Vol. 10, No. 37, Springer 2020

"Research article" DOI: 10.30495/JFH.2020.671148

Efficiency of three cleanup methods for determination of Deoxynivalenol and its determination in cereal products

Jalili, M.[1*], Almasyan, A.[2], Rahmani, A.[3], Varehzardi, A.[4], Basaki, A.[5]

1. Assistant Professor, Department of Food Industries and Agricultural Research, Standard Research Institute (SRI), Karaj, Iran
2. M.Sc of Microbiology, National Standard Organization of Iran, Karaj, Iran
3. Assistant Professor, Department of Food Industries and Agricultural Research, Standard Research Institute (SRI), Karaj, Iran
4. M.Sc of Microbiology, Razi Herbal Medicines Research Center, Lorestan University of Medical Sciences, Lorestan, Iran
5. Assistant Professor, Department of Agricultural Science, Payame Noor University, Iran

*Corresponding author: jalili@standard.ac.ir
(Received: 2019/10/26 Accepted: 2020/2/6)

Abstract

Deoxynivalenol (DON) is one of the mycotoxins produced by *Fusarium* species. The current study was aimed to compare the efficiency of three cleanup columns (immunoaffinity, MycoSep^{TM} #225, MycoSep^{TM} #227), applied for the determination of DON in cereal products, using high-performance liquid chromatography (HPLC). At first, wheat flour samples were spiked with DON at three concentrations (200, 700, 1200 ng/g), then recovery values were measured after cleanup with the columns. The amount of DON was also measured in 60 samples of cereal products (wheat flour, rice, barley flour, noodles and bread). The results showed that the highest recovery value (between 87.4±2.5 to 95.2±2.2%) was obtained from the immunoaffinity column. However, there was no significant difference between the immunoaffinity column and MycoSep 225. The lowest recovery value was obtained using MycoSep 227 column ($P < 0.05$). The results also showed that 30 samples out of 60 (50%) were contaminated with DON. However, none of the samples exceeded the Iranian Standard limit (1000 ng/g). The highest contamination level (724.3 ng/g) was observed in a rice sample. The study showed that although the immunoaffinity column was more reliable in DON determination, MycoSep 225 showed promising recovery values. In addition, more precaution and measuring controls should be practiced by regulatory agencies to prevent mycotoxin contamination.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Deoxynivalenol, Cleanup, Cereal products

«مقاله پژوهشی» DOI: 10.30495/JFH.2020.671148

کارایی سه روش تخلیص در اندازه‌گیری داکسی‌نیوالنول و بررسی میزان آن در فرآورده‌های غلات

مریم جلیلی[1*]، ریکا الماسیان[2]، انوشه رحمانی[3]، امیر وره زردی[4]، طیبه بساکی[5]

۱. استادیار گروه مواد غذایی، پژوهشکده صنایع غذایی و کشاورزی، پژوهشگاه استاندارد، کرج، ایران
۲. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، سازمان ملی استاندارد ایران، کرج، ایران
۳. استادیار گروه مواد غذایی، پژوهشکده صنایع غذایی و کشاورزی، پژوهشگاه استاندارد، کرج، ایران
٤. کارشناس ارشد میکروبیولوژی، مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشگاه علوم پزشکی لرستان، لرستان، ایران
۵. استادیار دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه پیام نور، ایران
*نویسنده مسئول مکاتبات:jalili@standard.ac.ir

(دریافت مقاله: ۹۸/۸/٤ پذیرش نهایی: ۹۸/۱۱/۱۷)

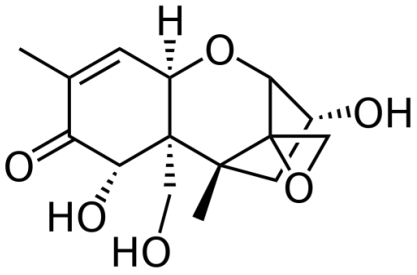
چکیده

داکسی نیوالنول (دان) یک نوع مایکوتوکسین است که توسط گونه‌های فوزاریوم تولید می‌شود. هدف از این بررسی مقایسه کارایی سه روش تخلیص (شامل ستون‌های ایمونوافینیتی و مایکوسپ ۲۲۵ و ۲۲۷) در اندازه‌گیری دان با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC) و سپس اندازه‌گیری دان در فرآورده‌های غلات بود. ابتدا نمونه‌های آرد گندم در سه غلظت (۱۲۰۰ ng/g، ۷۰۰، ۲۰۰) با سم دان غنی شد و سپس مقدار بازیافت نمونه‌ها پس از تخلیص با ستون‌ها، اندازه‌گیری شد. همچنین مقدار دان در ٦۰ نمونه فرآورده غلات (آرد گندم، برنج، آرد جو، نودل و نان) اندازه‌گیری گردید. نتایج نشان داد بیشترین مقدار بازیافت (بین ۲/۵±۸۷/٤۳ تا ۲/۲±۹۵/۱۷ درصد) مربوط به ستون ایمونوافینیتی بود. گرچه اختلاف معنی‌داری بین ستون ایمونوافینیتی و مایکوسپ ۲۲۵ وجود نداشت. کمترین مقدار بازیافت با استفاده از ستون مایکوسپ ۲۲۷ به‌دست آمد (P<۰/۰۵). از بین ٦۰ نمونه مورد بررسی، ۳۰ نمونه (۵۰٪) به سم دان آلوده بودند، اما مقدار دان در هیچ‌یک از ۳۰ نمونه آلوده، از حد مجاز آن (۱۰۰۰ ng/g) بیشتر نبود. بیشترین میزان آلودگی (۷۲٤/۳ ng/g) در یک نمونه برنج مشاهده شد. این بررسی نشان داد که گرچه ستون ایمونوافینیتی در اندازه‌گیری دان قابلیت اطمینان بیشتری داشت اما نتایج بازیافت مایکوسپ ۲۲۵ نیز کاملاً رضایت‌بخش بود. علاوه بر آن مقدار سم دان باید به‌طور مداوم در فرآورده‌های غلات توسط سازمان‌های قانون‌گذار اندازه‌گیری شده و احتیاط‌های لازم به عمل آید.

واژه‌های کلیدی: داکسی نیوالنول، تخلیص، فرآورده‌های غلات

مقدمه

تریکوتسن‌ها یک گروه مهم از سموم کپکی هستند که به‌ویژه توسط گونه‌های کپک فوزاریوم تولید می‌شوند. این سم به‌طور کلی در غلاتی مانند گندم، برنج، جو و ذرت تولید می‌شود و هم‌چنین در مواد غذایی که بر پایه غلات تهیه می‌شوند، وجود دارد. در واقع غلات مهم‌ترین منبع ورود این سم به مواد غذایی و خوراک دام هستند (Trombete *et al.*, 2016; Kazan *et al.*, 2012). داکسی نیوالنول (شکل ۱) که به نام‌های دان و وومیتوکسین نیز نامیده می‌شود، شایع‌ترین مایکوتوکسین در گروه تریکوتسن‌ها بوده و توسط فوزاریوم *گرامینئاروم* و *فوزاریوم کولموروم* تولید می‌شود (Ji *et al.*, 2015).



شکل (۱)- ساختمان شیمیایی داکسی‌نیوالنول

وجود این سم در غلات شایع است و گزارشات منتشر شده از آمریکای جنوبی، کانادا، چین و بسیاری از کشورهای اروپایی نشان داده است که سطح آلودگی به دان در جو و گندم بیش از ۵۰٪ است (Jaukovic *et al.*, 2014). در کشورهای توسعه‌یافته که غلات را معمولاً تا رطوبت کمتر از ۱۳٪ خشک می‌کنند، از رشد کپک‌ها جلوگیری شده و به‌همین دلیل آلودگی به دان بیشتر یک مشکل قبل از برداشت محسوب می‌شود و معمولاً در مزرعه اتفاق می‌افتد. با این‌حال، در انبارهایی که مقدار رطوبت و دما به‌دقت کنترل نمی‌شود، این سم می‌تواند در طی نگهداری غلات در انبار، تولید شود (Farahany and Jinap, 2009). در یک بررسی نشان داده شد که کپک فوزاریوم *گرامینئاروم* در فعالیت آبی ۰/۹۹۵-۰/۹۰ به‌خوبی رشد می‌کند اما تولید سم دان در فعالیت آبی محدودتری (۰/۹۹۵-۰/۹۵) تولید می‌شود. همچنین با افزایش دما از ۲۵ به ۳۰ درجه سلسیوس مقدار تولید سم افزایش می‌یابد (Ramirez *et al.*, 2006).

از نظر اثر بر سلامتی، دان سبب تخریب ساختمان سلول‌ها شده و به‌واسطه اتصال به ریبوزوم مانع سنتز پروتئین می‌شود. همچنین این سم، بسته به دوز ورودی به بدن و مدت قرارگیری در معرض آن، باعث اختلال در سیستم ایمنی بدن می‌شود (Pinton and Oswald, 2014). گرچه این اثرات بیشتر در موش بررسی‌شده‌اند اما تحقیقات نشان داده است که در سایر حیوانات خانگی نیز ممکن است ایجاد شوند. علائم مسمومیت حاد ناشی از این سم عبارت از افزایش بزاق، ضعف، اسهال، تهوع و استفراغ و بی‌اشتهایی می‌باشد. علاوه بر

آن، شایع‌ترین اثرات مطالعات سمیت مزمن در حیوانات آزمایشگاهی، کاهش وزن، بی‌اشتهایی و کاهش کارایی تغذیه‌ای است (Bonnet *et al.*, 2012). ارتباط مستقیمی بین دان کل (دان آزاد و دان متصل با گلوکورونیدها) موجود در ادرار و میزان دان در رژیم غذایی مشاهده شده است (Deng *et al.*, 2018). اگرچه دان در میان سایر تریکوتسن‌ها کمترین سمیت را داراست، اما شیوع بیشتری دارد و وجود آن به‌عنوان شاخص حضور احتمالی تریکوتسن‌های سمی‌تر محسوب می‌شود (Moretti *et al.*, 2014). حتی مصرف مواد غذایی که آلودگی کمی به این سم دارند، اثرات نامطلوبی ازجمله کاهش وزن، اسهال و تهوع در پی داشته و در آلودگی بیشتر، حتی با توقف رشد همراه است (EFSA, 2013). سازمان غذا و داروی آمریکا و استاندارد ملی ایران، حد مجاز ng/g ۱۰۰۰ را در غلات و فرآورده‌های آن تعیین کرده است در حالی‌که اتحادیه اروپا حد مجاز بین ng/g ۱۰۰۰-۱۰۰ را در مواد غذایی انسانی و حد ng/g۵۰۰- ٤۰۰ را برای خوراک دام تعیین نموده است (FDA, 2011). از نظر ساختاری، دان یک ترکیب قطبی است که خاصیت فلورسنت ندارد. روش‌های تجزیه‌ای بسیاری برای اندازه‌گیری دان در مواد غذایی و خوراک دام به‌کار رفته است که از آن جمله می‌توان به کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، کروماتوگرافی گازی، کروماتوگرافی لایه‌نازک و الایزا اشاره نمود (Koppen *et al.*, 2010). در بین این روش‌ها کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و کروماتوگرافی گازی بیش از سایر روش‌ها به‌کار رفته‌اند. گرچه، حتی محققینی که از روش‌های یکسانی برای اندازه‌گیری دان استفاده نموده‌اند، گزارشات متفاوتی در مورد دقت و صحت روش ارائه داده‌اند. برای اندازه‌گیری دان در آرد گندم و یا محصولات وابسته به آن و یا سایر مواد غذایی با استفاده از روش‌های کروماتوگرافی، ابتدا باید سم را از ماده غذایی استخراج نمود و سپس با استفاده از ستون‌های مختلف آن را تخلیص کرد. معمولاً جذب دان در طول‌موجی اتفاق می‌افتد که ناخالص‌های ماتریس غلات نیز حداکثر جذب را در آن طول‌موج دارند؛ بنابراین، هنگامی‌که از آشکارساز ماوراءبنفش استفاده می‌شود، باید یک روش خالص‌سازی مناسب به‌کار گرفته شود (Geng *et al.*, 2014). خالص‌سازی در واقع یکی از مراحل آماده‌سازی نمونه است که سبب می‌شود ناخالصی‌ها تا حد امکان از نمونه حذف‌شده و سم خالص باقی بماند (Jalili *et al.*, 2010). متداول‌ترین ستون‌هایی که برای تخلیص دان به‌کار می‌روند، شامل ستون‌های ایمونوافینیتی (IAC) و ستون‌های مایکوسپ چندمنظوره (مانند مایکوسپ ۲۲۵ و ۲۲۷) می‌باشند (Farahany and Jinap, 2009). ستون‌های ایمونوافینیتی با آنتی‌بادی اختصاصی آن مایکوتوکسین (در اینجا دان) پر شده و در نتیجه واکنش بین آنتی‌بادی و آنتی‌ژن بسیار اختصاصی است اما اساس ستون‌های مایکوسپ بر پایه تعویض یونی استوار است که در آن، ترکیبات مداخله‌گر در ستون باقی‌مانده و مایکوتوکسین دان تخلیص شده از ستون خارج می‌شود (Jalili and Scotter, 2015). هدف از این بررسی، مقایسه کارایی سه نوع ستون مختلف در اندازه‌گیری دان و تعیین مقدار این سم در فرآورده‌های غلات شامل آرد گندم، برنج، نودل، نان مسطح، آرد جو و ذرت بود.

مواد و روش‌ها

- تهیه نمونه‌ها

تعداد ٦٠ نمونه فرآورده غلات شامل آرد گندم (١٠ نمونه)، برنج (١٠ نمونه)، آرد جو (١٠ نمونه)، نودل (١٠ نمونه) و نان مسطح (١٠ نمونه) از بازار مصرف جمع‌آوری و بلافاصله (در شرایط محیط) به آزمایشگاه منتقل شد تا مقدار سم دان در آن‌ها اندازه‌گیری شود. نمونه‌ها تا زمان آزمون در یخچال نگهداری شدند. مقدار دان با استفاده از دستگاه HPLC (با سه بار تکرار) اندازه‌گیری شد.

- روش استخراج دان با استفاده از ستون ایمنوافینیتی

استخراج دان از ستون ایمونوافینیتی بر اساس یک روش قبلی با کمی تغییرات انجام شد (Farahany and Jinap, 2009). حدود ٢٥ گرم از نمونه آسیاب شده به‌دقت با ترازو وزن شد و به آن ٢٠٠ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و در دستگاه مخلوط‌کن مدل (Waring, Torrington, USA) به‌مدت ٣ دقیقه مخلوط شد. سپس محتویات مخلوط‌کن از کاغذ صافی ١٢٥ میلی‌متری (0.13 mg/circle, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Japan) عبور داده شد. از ستون ایمونوافینیتی ابتدا ١٠ میلی‌لیتر محلول نمکی بافر فسفات (Watertown, USA)، با سرعت ٢ تا ٣ قطره در دقیقه عبور داده شد و سپس ٣ میلی‌لیتر از محلول صاف‌شده از ستون ایمونوافینیتی (Watertown DON-test-HPLC, USA) با سرعت ١ قطره در هر ثانیه عبور داده شد تا سم موجود در عصاره (آنتی‌ژن) به آنتی‌بادی‌های درون ستون متصل شود. سپس ستون با ٥ میلی‌لیتر آب مقطر شستشو شده و پس از آن، ١/٥ میلی‌لیتر متانول از آن عبور داده‌شده و در یک ویال جمع‌آوری شد. سپس ویال در یک حمام آب با دمای ٤٠ درجه سلسیوس قرار گرفت و پس از این‌که کاملاً خشک شد در مخلوط آب و استونیتریل حل گردید. مقدار ٢٠٠ میکرولیتر از این مخلوط به دستگاه تزریق شد.

- روش استخراج دان با استفاده از مایکوسپ ٢٢٥ و ٢٢٧

برای استخراج دان با استفاده از هر دو ستون مایکوسپ بر اساس دستور کار شرکت سازنده انجام شد. ابتدا حدود ٢٥ گرم از نمونه با ١٠٠ میلی‌لیتر از ترکیب دو حلال آب و استونیتریل به نسبت ٨٤ به ١٦ درصد حجمی/حجمی مخلوط شد و به‌مدت ٩٠ دقیقه با استفاده از یک همزن مغناطیسی به‌هم زده شد و سپس با کاغذ صافی، صاف گردید. مقدار ٥ میلی‌لیتر از مایع فیلتر شده به ستون مایکوسپ (MycoSep™ #225 و MycoSep™ #227) که از شرکت آزمایشگاه‌های رومر (Romer Laboratories, USA) خریداری شده بودند، اضافه شد و با استفاده از پیستون از ستون عبور داده شد. سپس ٢ میلی‌لیتر از محلول خارج شده از ستون (که حاوی سم دان است)، به یک ارلن منتقل و تحت گاز نیتروژن خشک شد تا حلال آن کاملاً خارج شود. دان باقیمانده در ارلن در ٥٠٠ میکرولیتر متانول حل شد و سپس به دستگاه کروماتوگرافی تزریق گردید.

مراحل استخراج دان با استفاده از مایکوسپ ٢٢٧ کاملاً مشابه استخراج با مایکوسپ ٢٢٥ بود و تنها در مایکوسپ ٢٢٧، مقدار ٨ میلی‌لیتر (به‌جای ٥ میلی‌لیتر) از محلول حاوی دان از ستون عبور داده شد.

- اعتباربخشی روش آزمون

برای اعتباربخشی روش، از دان (Supelco, USA) به‌عنوان استاندارد خارجی استفاده شد. یک منحنی کالیبراسیون ٥ نقطه‌ای در محدوده غلظت ١٠٠ تا ١٥٠٠

نانوگرم بر گرم از سم دان با استفاده از سطح زیر پیک ترسیم و سپس معادله رگرسیون (y=ax+b) در محدودهٔ خطی منحنی کالیبراسیون، محاسبه شد. از این منحنی در تعیین مقدار دان در اندازه‌گیری‌های کمی استفاده شد. به‌منظور تعیین حد شناسایی (LOD) و حد تعیین مقدار کمی (LOQ)، سری غلظت‌های بسیار کم از سم دان به دستگاه تزریق و آن غلظتی که ارتفاع پیک حاصل از آن حداقل سه برابر از بلندترین نویز دستگاه بیشتر بود، به‌عنوان حد شناسایی و غلظتی که ارتفاع پیک حاصل از آن ۱۰ برابر بلندترین نویز دستگاه بود به‌عنوان حد تعیین مقدار کمی در نظر گرفته شد.

- دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

برای اندازه‌گیری دان از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) مدل Waters 600، مجهز به آشکارگر از نوع طیف‌سنجی نوری با آرایش دیودی (PDA) مدل (Milford Waters 486, USA) استفاده شد. ستون مورد استفاده از نوع C18 فازمعکوس (WAT 046980) و به طول ۱۵ cm بود. فاز متحرک از ترکیب استونیتریل و متانول (Merck, Germany) به نسبت حجمی ۸۶ به ۱۴ تهیه شد و با سرعت ۱ میلی‌لیتر در دقیقه از ستون عبور داده شد. دمای ستون بر روی ۳۰ درجه سلسیوس تنظیم و طول‌موج دستگاه روی ۲۱۸ نانومتر تنظیم گردید.

- اندازه‌گیری بازیافت و تکرارپذیری روش

سه نوع ستون متداول (ایمونوافینیتی، مایکوسپ ۲۲۵ و مایکوسپ ۲۲۷) برای اندازه‌گیری دان در فرآورده‌های غلات مورداستفاده قرارگرفته و از نظر اثر بر کارایی استخراج و تخلیص باهم مقایسه شدند. به‌منظور اندازه‌گیری بازیافت روش برای هر یک از ستون‌ها، مقدار ۲۵ گرم از نمونه آرد گندم عاری از سم دان به تعدادی ارلن منتقل و هر یک با مقادیر ۲۰۰، ۷۰۰ یا ۱۲۰۰ نانوگرم در گرم از سم دان (Supelco, USA) غنی شدند. سپس بر اساس نوع ستونی که برای استخراج به‌کار می‌رفت، دان از نمونه‌ها استخراج و به دستگاه کروماتوگرافی تزریق شد. سطح زیر پیک هر یک از نمونه‌ها با منحنی استاندارد مقایسه و درصد بازیافت سم برای هر ستون محاسبه شد. برای تعیین تکرارپذیری ستون‌ها یک نمونه آرد گندم عاری از سم دان با مقدار ۵۰۰ نانوگرم بر گرم از سم دان غنی‌شده و در طی یک ماه به‌مدت ٦ مرتبه (با فواصل ۵ روز) مورد آزمون قرار گرفت. سپس مقدار تکرارپذیری برای هر یک از ستون‌ها اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری بازیافت نمونه‌های تهیه شده از بازار، مقدار ۲۵ گرم از هر یک از نمونه‌ها به ارلن‌های جداگانه افزوده شد و با مقادیر ۲۰۰، ۷۰۰ و ۱۲۰۰ نانوگرم در گرم از سم دان غنی شدند. سپس مقدار بازیافت در نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. نتایج به‌صورت میانگین و انحراف از استاندارد به‌عنوان مقدار بازیافت گزارش شد.

- محاسبات آماری

به‌منظور تعیین اختلاف معنی‌دار بین سه نوع ستون، از آنالیز واریانس (ANOVA) و آزمون توکی با سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد (Minitab 17).

یافته‌ها

یک منحنی استاندارد ۵ نقطه‌ای (در محدوده ۱۰۰ تا ۱۲۰۰ نانوگرم بر گرم) ترسیم شد و مقدار r^2 آن ۰/۹۹۷ به‌دست آمد که حاکی از خطی بودن روش داشت.

مقدار حد تشخیص (LOD) و حد تعیین مقدار (LOQ) به‌ترتیب ۱۷ و ۳٤ نانوگرم بر میکرولیتر به‌دست آمد.

- مقایسه اثر نوع ستون بر بازیافت دان در آرد گندم

مقدار بازیافت نمونه آرد گندم به‌دست‌آمده در سه غلظت مختلف برای هر سه نوع ستون محاسبه شد (جدول ۱). مقدار بازیافت سم بین ۲/۵±۸۷/٤۳ تا ۲/۲±۹۵/۱۷ درصد برای ستون ایمینوافینیتی، بین ۲/۳±۸۵/۷۷ تا ٤/۵۵±۹۲/۵۷ درصد برای مایکوسپ ۲۲۵ و بین ۱/۷٦±٦۲/۸۳ تا ۲/٤±۷۰/۲۷ درصد برای ستون مایکوسپ ۲۲۷ متغیر بود. بیشترین مقدار بازیافت برای ستون ایمونوافینیتی به‌دست آمد. نتایج نشان داد گرچه مقدار بازیافت با استفاده از ستون ایمونوافینیتی بیشتر از مایکوسپ ۲۲۵ بود، اما این تفاوت از لحاظ آماری معنی‌دار نبود. کمترین مقدار بازیافت با استفاده از ستون مایکوسپ ۲۲۷ به‌دست آمد و با دو ستون دیگر اختلاف معنی‌داری داشت (P< ۰/۰۵). از سوی دیگر، هنگامی‌که سم دان با استفاده از ستون ایمونوافینیتی و ستون مایکوسپ ۲۲۵ تخلیص شده بود، کروماتوگرام به‌دست آمده از دستگاه مناسب‌تر بود و در اطراف دان پیک‌های مزاحم کمتری وجود داشت در حالی‌که در کروماتوگرام مربوط به ستون مایکوسپ ۲۲۷، پیک‌های متعددی در نزدیکی پیک مربوط به دان مشاهده شد (شکل ۲). تکرارپذیری روش برای ستون ایمونوافینیتی، مایکوسپ ۲۲۵ و مایکوسپ ۲۲۷ به‌ترتیب مقادیر ۵/۳ و ۷/٤ و ۸/٤ برآورد شد.

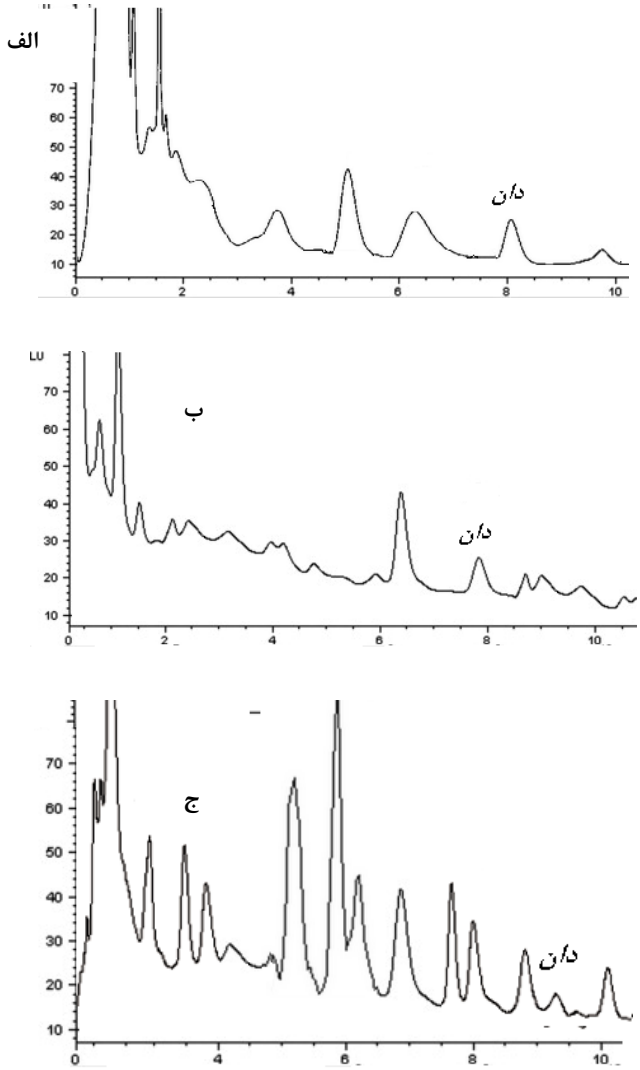
جدول (۱)- درصد بازیافت سم دان با سه نوع ستون ایمونوافینیتی و مایکوسپ ۲۲۵ و ۲۲۷ در آرد گندم

غلظت سم دان (ng/g)	نوع ستون		
	ایمیونوافینیتی	مایکوسپ ۲۲۵	مایکو سپ ۲۲۷
۲۰۰	۲/۵±۸۷/٤۳^{a}	۲/۳±۸۵/۷۷^{a}	۱/٤±٦۷/۹۳^{b}
۷۰۰	۲/۲±۹۵/۱۷^{a}	٤/٦±۹۲/۵۷^{a}	۲/٤±۷۰/۲۷^{b}
۱۲۰۰	۱/۷±۹۰/٦^{a}	۲/۹۵±۸۸/۲۳^{a}	۱/۷٦±٦۲/۸۳^{b}

^{a,b,c}: حروف غیریکسان در هر سطر نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار (p<۰/۰۵) در بین اعداد است.

- اندازه‌گیری مقدار بازیافت در فرآورده‌های غلات با استفاده از ستون مایکوسپ ۲۲۵

مقدار بازیافت دان نمونه‌های مختلف با ستون مایکوسپ ۲۲۵ در جدول (۲) نشان داده شده است. نمونه‌ها در سه سطح ۲۰۰، ۷۰۰ و ۱۲۰۰ نانوگرم بر گرم دان غنی شدند. مقدار بازیافت در نمونه‌ها از ۳/٦±۸٦/٦ درصد (برای نان مسطح غنی‌شده با ۲۰۰ نانوگرم بر گرم سم دان) تا ۵/۳±۱۰۲/٤ درصد (برای نودل غنی‌شده با ۱۲۰۰ نانوگرم بر گرم سم دان) متغیر بود.



شکل (۲)- اندازه‌گیری دان در غلظت ng/g ۲۰۰ در آرد گندم با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع: الف) ستون ایمونوافینیتی، ب) ستون مایکوسپ ۲۲۵، ج) مایکوسپ ۲۲۷.

جدول (۲)- درصد بازیافت سم دان در نمونه‌های مختلف با ستون مایکوسپ ۲۲۵

غلظت دان (نانوگرم بر گرم)	مقدار بازیافت (میانگین ± انحراف معیار)				
	آرد گندم	برنج	آرد جو	نودل	نان مسطح
۲۰۰	۸۷/۴۳±۲/۵	۹۳/۴±۲/۳	۹۵/۷±۳/۴	۹۲/۲±۴/۲	۸۶/۶±۳/۶
۷۰۰	۹۵/۱۷±۲/۲	۸۸/۶±۳/۴	۱۰۰/۵±۴/۴	۹۸/۷±۳/۸	۹۳/۶±۲/۳
۱۲۰۰	۹۰/۶±۱/۷	۱۰۱/۵±۷/۴	۹۳/۵±۳/۷	۱۰۲/۴±۵/۳	۸۹/۸±۳/۷

- اندازه‌گیری دان در فرآورده‌های غلات

نتایج اندازه‌گیری دان در ٦٠ نمونه فرآورده غلات در جدول (٣) نشان داده شده است. در مجموع از بین ٦٠ نمونه موردبررسی، ٣٠ نمونه (٥٠٪) به سم دان آلوده بودند. کمترین و بیشترین تعداد نمونه‌های آلوده به‌ترتیب مربوط به نمونه‌های آرد جو (٢٠٪) و ذرت (٨٠٪) بود. گرچه بیشترین میزان آلودگی (٧٢٤/٣) در یک نمونه برنج مشاهده شد.

جدول (٣)- مقدار دان در نمونه‌های مختلف با ستون مایکوسپ٢٢٥

نمونه	تعداد نمونه	تعداد نمونه آلوده (٪)	میانگین دان (ng/g)	بیشترین مقدار (ng/g)	میانه
آرد گندم	١٠	٥ (٥٠٪)	٩٦/٨	٣٤٨/٥	٤٦/٧
برنج	١٠	٧ (٧٠٪)	١٩٨/٢	٧٢٤/٣	٩٨/٢
نودل	١٠	٤ (٤٠٪)	٨٨/٩	٣٢٥/٧	nd
نان مسطح	١٠	٤ (٤٠٪)	٦٢/٢	٢٣١/٥	nd
آرد جو	١٠	٢ (٢٠٪)	٥٢/٤	٢٨٩/٥	nd
ذرت	١٠	٨ (٨٠٪)	١٤١/٩	٣٤٤/٨	١٠٥/٦
جمع نمونه‌ها	٦٠	٣٠ (٥٠٪)	١٠٥/٢	٧٢٤/٣	٢٩/١

nd: غیرقابل تشخیص

بحث و نتیجه‌گیری

مقادیری که برای LOD و LOQ به‌دست آمد با مقادیر به‌دست‌آمده از مطالعه‌ای مشابه بود (Abramović, 2005) اما از مقادیر به‌دست آمده از مطالعه دیگر (٣١/٣ ng/g و ٩/٥)، بیشتر بود (Trombete *et al.*, 2016).

نتایج اندازه‌گیری بازیافت با استفاده از سه ستون نشان داد که ستون ایمونوافینیتی بیشترین مقدار بازیافت (بیش از ٨٧٪) و در نتیجه کارایی بیشتری داشت. نتایج ستون مایکوسپ ٢٢٥ بیش از ٨٥٪ بود و تفاوت معنی‌داری با ستون ایمونوافینیتی نداشت. از آن‌جایی که بازیافت سم دان با ستون مایکوسپ ٢٢٧ بین ٦٣ تا ٧٠ درصد به‌دست آمد، این ستون از کارایی مناسبی برای اندازه‌گیری دان برخوردار نیست. طبق نتایج، تکرارپذیری برای ستون ایمونوافینیتی، مایکوسپ ٢٢٥ و مایکوسپ ٢٢٧ به‌ترتیب مقادیر ٥/٣ و ٧/٤ و ٨/٤ درصد به‌دست آمد که نشان می‌داد هر سه روش از تکرارپذیری قابل‌قبولی برخوردار بودند. مقدار تکرارپذیری برای هر سه نوع ستون با حدود تعیین شده در استاندارد مطابقت داشت (EC 401, 2006).

نتایج این تحقیق با یافته‌های مطالعه دیگری متفاوت بود. آن‌ها گزارش کردند که بیشترین بازیافت دان (٩٩٪) مربوط به ستون مایکوسپ ٢٢٥ بود. در حالی‌که بازیافت ستون مایکوسپ ٢٢٧ و ستون ایمونوافینیتی به‌ترتیب ٦٥٪ و ٥٣٪ بود. بر اساس نتایج این محققین، بازیافت دان با استفاده از ستون ایمونوافینیتی از سایر ستون‌ها کمتر بود. در حالی‌که در تحقیق حاضر ستون ایمونوافینیتی بیشترین بازیافت را داشت (Farahany

and Jinap, 2009). در تحقیق مشابه دیگری، گزارش کردند که استفاده از ستون ایمونوافینیتی کارایی بیشتری در حذف مواد مداخله‌گر موجود در ماتریس غذایی دارد و سبب می‌شود کروماتوگرام مناسب‌تری برای تعیین مقدار دان به‌دست آید. دقت این روش نیز مناسب و تکرارپذیری آن حدود ۲/۸ درصد بود اما مقدار بازیافت سم فقط ۷۳٪ برآورد شد؛ در حالی‌که بازیافت مقدار دان با استفاده از ستون مایکوسپ ۹۲٪ بود. این محققین گزارش نمودند که ستون مایکوسپ برای اندازه‌گیری دان مناسب‌تر از ستون ایمونوافینیتی است. البته نتایج آن‌ها با نتایج تحقیق حاضر مغایرت نداشت زیرا در این بررسی نیز بازیافت سم با استفاده از ستون مایکوسپ کاملاً رضایت‌بخش بود (بیش از ۸۵٪)، اما بهتر از ستون ایمونوافینیتی نبود (Abramović et al., 2005). استفاده از ستون‌های ایمونوافینیتی برای تخلیص مایکوتوکسین‌ها، سبب می‌شود انتخابی بودن روش افزایش یابد زیرا این ستون‌ها ترکیبات مداخله کننده را از بین برده و بیشتر بر روی تخلیص مایکوتوکسین متمرکز می‌شوند. این محقق بازیافت دان از فرآورده‌های غلات را بین ۹٤/۱٪ تا ۱۱۰/۳٪ مقدار تکرارپذیری را بین ۵/۸ تا ٦/۹ گزارش نمودند (Trombete *et al.*, 2016) که با نتایج به‌دست‌آمده در این تحقیق مطابقت داشت. در تحقیقی مقدار بازیافت سم دان از فرآورده‌های غلات (شامل سمولینای فوری، انواع بیسکویت، ویفر کاکائویی، گندم، جو، ذرت و اسنک نارگیلی) را با ستون مایکوسپ ۲۷۷، بین ۸۳/۳٪ تا ۹۱/۳٪ گزارش نمودند که با نتایج تحقیق حاضر مطابقت نداشت (Lattanzio *et al.*, 2008).

در بررسی حاضر، با توجه به این‌که تفاوت معنی‌داری بین مقدار بازیافت نمونه‌ها با ستون مایکوسپ ۲۲۵ و ستون ایمونوافینیتی وجود نداشت و ازآن‌جایی که قیمت ستون مایکوسپ مقرون به‌صرفه‌تر بود، مقدار دان در نمونه‌های غلات با استفاده از ستون مایکوسپ ۲۲۵ اندازه‌گیری شد. مقدار بازیافت دان در فرآورده‌های غلات مورد بررسی در این تحقیق که با ستون مایکوسپ ۲۲۵ محاسبه شد، مقدار قابل‌قبولی بود (بین ۳/٦±۸٦/٦٪ تا ۵/۳±۱۰/٤٪). این نتایج با یافته‌های سایر محققین مطابقت داشت. طوری‌که مقدار بازیافت دان با ستون مایکوسپ ۲۲۵ از نمونه‌های ذرت را ۹۲/۷٪ گزارش نمودند (Abramović *et al.*, 2005).

بر اساس استاندارد ملی ایران، حداکثر مجاز دان در آرد گندم، ۱۰۰۰ نانوگرم بر گرم می‌باشد (ISIRI, 5925/2002). نتایج نشان داد مقدار دان در هیچ‌یک از ۳۰ نمونه آلوده بیشتر از حد مجاز تعیین‌شده در استاندارد ملی ایران نبود. نتایج این بررسی با نتایج به‌دست آمده توسط سایر محققین مطابقت داشت. در یک بررسی در ایران مقدار دان در ۷۲ نمونه فرآورده غلات از جمله برنج، میان‌وعده ذرت بو داده، آرد گندم و نان لواش (هر کدام ۱۸ نمونه) اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که ۱۰ نمونه (۱/۹٪) از ۷۲ نمونه به دان آلوده بوده و حداکثر مقدار آن ۳٦۸/۷ نانوگرم در گرم بود. مقدار دان در هیچ‌یک از نمونه‌ها از حد استاندارد ملی ایران بالاتر نبود (Yazdanpanah *et al.*, 2014). همچنین در سال ۱۳۹٤، مقدار دان در ۵۲ نمونه گندم وارداتی اندازه‌گیری و گزارش نمودند که ۸۰٪ نمونه‌ها به این سم آلوده بودند (حداکثر ۵/۰۵±۵٤۱/٦۷). گرچه مقدار آن در هیچ‌یک از نمونه‌ها از حد مجاز بالاتر نبود

(Farahmandfar *et al.*, 2018). در خصوص میزان آلودگی فرآورده‌های غذایی به سم دان گزارشات متعددی از سراسر نقاط جهان موجود است. در یک بررسی مقدار دان در ۱۵۰٤ نمونه گندم (که در کشور برزیل کشت شده بود) و فرآورده‌های آن شامل آرد گندم و سبوس اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد ۱۰۰۰ نمونه به سم دان آلوده بوده و در ۲٤۲ نمونه (۱٦/۱٪) مقدار آن از حد مجاز تعیین‌شده در کشور برزیل بیشتر بود. در این بررسی میانگین آلودگی نمونه‌ها ۱۰٤۷ ng/g گزارش شد (Machado *et al.*, 2017). در تحقیق دیگری مقدار دان در ٦۰ نمونه غلات غذای کودک (بر پایه گندم، ذرت، برنج، جو و مخلوط غلات) در اسپانیا اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد ۲۰٪ نمونه‌ها به دان آلوده بودند و در یکی از نمونه‌ها مقدار دان از حد مجاز تعیین شده توسط اتحادیه اروپا (۲۰۰ ng/g) بیشتر بود (Herrera *et al.*, 2019). نتایج گزارش‌های منتشرشده از اندازه‌گیری دان در کشورهای مختلف با یکدیگر متفاوت است. این موضوع احتمالاً ناشی از این است که عوامل متعددی در میزان آلودگی مواد غذایی به مایکوتوکسین‌ها مؤثرند که از آن جمله می‌توان به شرایط آب و هوایی (دما و رطوبت محیط)، روش‌های کشاورزی، فرآیندهای عمل‌آوری مواد غذایی و شرایط نگهداری در انبار و به‌ویژه روش‌های اندازه‌گیری دان در مواد غذایی اشاره نمود. به‌طور کلی روش‌هایی که برای اندازه‌گیری این سم استفاده می‌شوند، از دقت یکسانی برخوردار نیستند.

نتایج این بررسی نشان داد که ستون ایمونوافینیتی در اندازه‌گیری دان قابلیت اطمینان بیشتری دارد. گرچه اختلاف آن با ستون مایکوسپ ۲۲۵ چندان قابل‌توجه نبود و با توجه به این‌که مایکوسپ ۲۲۵ از نظر اقتصادی به‌صرفه‌تر است، می‌توان از آن در اندازه‌گیری دان استفاده نمود. این بررسی همچنین نشان داد که آلودگی نمونه‌های آرد و سایر فرآورده‌های مورد بررسی در این تحقیق از حد مجاز آن بیشتر نبوده و از نظر اثر بر سلامتی انسان نگران‌کننده نیست. گرچه فرآورده‌های غلات مانند انواع آرد و نودل باید از نظر مقدار دان مورد پایش و بررسی مدام قرار گیرند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

منابع

- Abramović, B., Jaji, I., Juri, V., Ferenc, F. and Gaal, F.F. (2005). Optimization of the determination of deoxynivalenol in cornsamples by liquid chromatography and a comparison of two clean-up principles. Journal of the Serbian Chemical Society, 70(7): 1005–1013.
- Bonnet, M., Roux, J., Mounien, L., Dallaporta, M. and Troadec, J.D. (2012). Advances in deoxynivalenol toxicity mechanisms: the brain as a target. Toxins (Basel), 4: 1120–1138.
- Commission Regulation (EC). (2006). Laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in food stuffs, vol. L70, No. 401, 31-34.
- Deng, C., Li, C., Zhou, S., Wang, X., Xu, H., Wang, D. et al. (2018). Risk assessment of deoxynivalenol in high-risk area of China by human biomonitoring using an improved high throughput UPLC-MS/MS method. Scientific Reports, 8: 3901.

- European Food Safety Authority (EFSA) (2013). Scientific opinion on risks for animal and public health related to the presence of nivalenolin food and feed. EFSA, 11: 1–119.
- Farahany, E.M. and Jinap, S. (2009). Optimisation of the determination of deoxynivalenol in wheat flour by HPLC and a comparison of four clean-up procedures. Food Additives and Contaminants: Part A, 26(9): 1290-1297.
- Farahmandfar, R., Rashidaei Abandansari, S., Maghsoudlou, E. and Asnaashari, M. (2018). Determination of mycotoxin contamination in imported wheat to Mazandaran province by high performance liquid chromatography. Iranian Journal of Health and Environment, 11(1): 15-24. [In Persian]
- Food and Drug Administration (FDA) (2011). Mycotoxin regulatory guidance. A guide for grain elevators, feed manufacturers, grain processors and exporters. Compliance Guide-FDA Regulatory Guidance for Mycotoxins, 8-2011.
- Geng, Z., Yang, D., Zhou, M., Zhang, P., Wang, D., Liu, F. et al. (2014). Determination of deoxynivalenol-3-glucoside in cereals by hydrophilic interaction chromatographywith ultraviolet detection. Food Analytical Methods, 7: 1139–1146.
- Herrera, M., Bervis, N., Carramiñana, J.J., Juan, T., Herrera, A., Ariño, A. et al. (2019). Occurrence and exposure assessment of aflatoxins and deoxynivalenol in cereal-based baby foods for Infants. Toxins (Basel), 11(3): 150.
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran (ISIRI), (2002). Food and feed- Mycotoxins-Maximum tolerated level. ISIRI No. 5925. [In Persian]
- Jalili, M., Jinap, S. and Noranizan, M.A. (2010). Effect of gamma radiation on reduction of mycotoxins in black pepper. Food Control, 21: 1388–1393.
- Jalili, M. and Scotter, M. (2015). A review of aflatoxin M1 in liquid milk. Iranian Journal of Health, Safety & Environment, 2(2): 283-295.
- Jaukovic, M., Stanisic N., Nikodijević B. and Krnjaja V. (2014). Effects of temperature and time on deoxynivalenol (don) and zearalenone (ZON) content in corn. Matica Srpska Journal for Natural Sciences, 126, 25-34.
- Ji, F., Wu J, Zhao H., Xu, J. and Shi, J. (2015). Relationship of deoxynivalenolcontent in grain, chaff, and straw with Fusarium head blight severity in wheat varieties with various levels of resistance.Toxins (Basel), 7: 728–742.
- Kazan, K., Gardiner, D.M. and Manners, J.M. (2012). On the trail of a cereal killer: recent advances in *Fusarium graminearum* pathogenomics and hostresistance. Molecular Plant Pathology, 13: 399–413.
- Köppen, R., Koch, M., Siegel, D., Merkel, S., Maul, R. and Nehls, I. (2010). Determination of mycotoxins in foods: current state of analytical methods and limitations. Applied Microbiology and Biotechnology, 86(6): 1595–1612.
- Lattanzio, V.M.T., Solfrizzo, M. and Viscont, A. (2008). Determination of trichothecenes in cereals and derived products by liquid chromatography tandem mass spectrometry, Food Additives and Contaminants, 25(3): 320-330.
- Machado, L.V., Mallmann, C.A., Mallmann, A.O., Coel-ho, R.D. and Copetti, M.V. (2017). Deoxynivalenol in wheat and wheat products from a harvest affected by Fusarium head blight. Food Science and Technology (Campi-nas), 37(1): 8-12.
- Moretti, A., Panzarini, G., Somma, S., Campagna, C., Ravaglia, S., Logrieco, A.F. et al. (2014) Systemic growth of *F. graminearumin* wheat plants and related accumulation ofdeoxynivalenol. Toxins, 6:1308–1324.
- Pinton, P. and Oswald, I.P. (2014) Effect of deoxynivalenol and other type Btrichothecenes on the intestine: a review. Toxins (Basel), 6:1615–1643.

- Ramirez, M.L., Chulze, S. and Magan, N. (2006). Temperature and water activity effects on growth and temporal deoxynivalenol production by two Argentinean strains of *Fusarium graminearum* on irradiated wheat grain. International Journal of Food Microbiology, 106: 291–296.
- Trombete, F., Barros, A., Vieira, M., Saldanha, T., Armando Venâncio, A. and Fraga M. (2016). Simultaneous determination of deoxynivalenol, deoxynivalenol-3-glucoside and nivalenol in wheat grains by HPLC-PDA with immunoaffinity column cleanup. Food Analytical Methods, 9: 2579–2586.
- Yazdanpanah, H., Shafaati, A., Foroutan, S.M., Zarghi, A., Aboul-fathi, F., Khoddam, A. et al. (2014). Occurrence of deoxynivalenol in foods for human consumption from Tehran, Iran. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 13 (Suppl): 87–92.