

## بررسی میزان آفلاتوکسین در پسته، بادام، فندق و گردو در شهر اصفهان

زهرا شاکری<sup>۱</sup>، ابراهیم رحیمی<sup>۲\*</sup>، امیر شاکریان<sup>۳</sup>

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
  ۲. استاد گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران؛ مرکز تحقیقات تغذیه و محصولات ارگانیک، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
  ۳. استاد گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران؛ تحقیقات تغذیه و محصولات ارگانیک، واحد شهرکرد، دانشگاه آزاد اسلامی، شهرکرد، ایران
- \*نویسنده مسئول مکاتبات: ebrahimrahimi55@yahoo.com  
(دریافت مقاله: ۹۵/۸/۲ پذیرش نهایی: ۹۸/۵/۱۲)

### چکیده

آفلاتوکسین‌ها، گروهی از متابولیت‌های ثانویه سرطان‌زا هستند که به وسیله برخی از گونه‌های کپک اسپرژیلوس تولید می‌شوند. این مطالعه با هدف تعیین وضعیت آلودگی مغزها به آفلاتوکسین‌ها انجام شد. در مجموع ۸۰ نمونه مغزها شامل پسته (۲۰)، بادام (۲۰)، فندق (۲۰) و گردو (۲۰) عرضه شده در شهرستان اصفهان در سال ۱۳۹۵ از نظر حضور آفلاتوکسین‌های B و G به وسیله روش HPLC آنالیز شدند. بر پایه نتایج مطالعه حاضر به ترتیب ۲/۵، ۵/۵، ۵/۷، ۷/۲ و ۱۰ درصد از نمونه‌ها به آفلاتوکسین‌های B1, B2, G1, G2 و Total آلوده بودند. میانگین غلظت آفلاتوکسین در نمونه‌ها به ترتیب ۸/۳۲، ۵/۶۳۵، ۳/۰۶۷، ۱/۷۰۵ و ۱۰/۳۷۵ میکروگرم در گرم بود. غلظت آفلاتوکسین B1 در ۶۶/۶۷ درصد نمونه‌ها و غلظت آفلاتوکسین کل در ۳۷/۵ درصد از نمونه‌های مثبت بالاتر از حد مجاز استاندارد ملی ایران (۵ ppb) بود. درصد آلودگی نمونه‌های پسته به آفلاتوکسین‌ها به‌طور معناداری ( $p < 0.05$ ) بیشتر از سایر مغزها (بادام، فندق و گردو) بود. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد وضعیت آلودگی مغزها خصوصاً پسته به آفلاتوکسین‌ها مطلوب نبوده و می‌تواند سلامت مصرف‌کننده را به مخاطره اندازد.

واژه‌های کلیدی: پسته، بادام، فندق، گردو، آفلاتوکسین، HPLC

## مقدمه

امروزه محصولات گیاهی، انواع آجیل‌ها و مغزها در زمره غذاهای سالم قرار دارند و تقاضای بالایی برای مصرف آن‌ها وجود دارد. زیرا با وجود حجم کم، حاوی پروتئین بالا، چربی مفید، مواد معدنی و ریز مغذی‌های فراوان می‌باشند (Georgiadou et al., 2012) از طرفی آلودگی این محصولات با آفلاتوکسین‌ها و سایر سموم باعث بروز نگرانی اساسی برای سلامت انسان شده است. آفلاتوکسین‌ها یک گروه از متابولیت‌های ثانویه هستند که توسط آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس پارازیتیکوس و آسپرژیلوس نومیوس تولید می‌شوند. سموم قارچی به‌دنبال رشد این کپک‌ها بر روی محصولات مختلف از جمله مغزها، دانه کتان، ذرت، ادویه‌جات و غلات (در صورت مناسب بودن شرایط) تولید خواهند شد (EI tawila et al., 1992; Cheraghali et al., 2007; Feizy et al., 2010). عوامل زیادی در میزان رشد قارچ‌ها بر روی مغزها و به‌دنبال آن، تولید آفلاتوکسین نقش دارند که می‌توان به درصد مواد مغذی در محصول، رطوبت و دمای محل نگهداری، زمان برداشت و وجود یا عدم وجود پوسته بر روی محصول اشاره نمود (Cheraghali Feizy et al., 2010; EI tawila et al., 1992; et al., 2007).

آفلاتوکسین B1 از نظر آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان (IARC) در گروه اول مواد سرطان‌زا قرار دارد و بر اساس مطالعات انجام شده باعث هپاتیت حاد و سرطان کبد می‌شود (EI Tawila et al., 1992; Li et al., 2001; Park et al., 2004). اگرچه انواع آفلاتوکسین G1، G2 و B2 هنوز در گروه اصلی مواد سرطان‌زا قرار ندارند اما از پتانسیل مسمومیت غذایی

بالایی برخوردارند (EI tawila et al., 1992). کمیسیون اروپا در سال ۱۹۹۸ محدوده خطرزا را به‌ترتیب برای آفلاتوکسین کل و آفلاتوکسین B1 در انواع غلات و مغزها ۴ و ۲ میکروگرم بر کیلوگرم بیان نمود. سازمان JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives) پتانسیل سرطان‌زایی آفلاتوکسین و ارتباط آن با دریافت این متابولیت را تخمین می‌زند. بر پایه گزارشات این سازمان در کشورهای اروپایی سطح آلودگی مواد غذایی به آفلاتوکسین پایین است و حدود ۱ درصد مردم به هپاتیت B مبتلا می‌شوند و در هر ۱۰۰ هزار نفر، ۴۱ مورد سرطان دیده می‌شود. حال اگر استاندارد از ۵ ppb به ۱۰ ppb افزایش یابد، به ۳۹ مورد سرطان در هر ۱۰۰ هزار نفر افزایش می‌یابد (Arino et al., 2009). مقاومت به حرارت و حلالیت در محیط‌های قطبی، باعث شده حذف کامل آفلاتوکسین‌ها از مواد غذایی مشکل باشد ولی تلاش‌های زیادی برای سم‌زدایی آفلاتوکسین به روش‌های بیولوژیکی، شیمیایی و فیزیکی انجام گرفته است (Arrus et al., 2005). از جمله این روش‌ها می‌توان به استفاده از حرارت بسیار بالا، اشعه دهی، ترکیبات فنلی و استخراج سم با استفاده از حلال اشاره کرد (Arrus et al., 2005). لذا مهم‌ترین راه پیشگیری از مسمومیت با آفلاتوکسین‌ها جلوگیری از رشد قارچ و تولید مایکو توکسین‌ها در سطح محصولات می‌باشد. ارزش تجاری و تغذیه‌ای بالای مغزها و از طرفی سمیت بالای آفلاتوکسین‌ها باعث شد، مطالعات زیادی در جهان به خصوص ردیابی و پایش این سموم در مواد غذایی انجام پذیرد، با این وجود مطالعات محدودی در خصوص بررسی آلودگی مغزها مختلف در ایران (به

استثنا؛ پسته) انجام شده است، لذا مطالعه حاضر با هدف تعیین غلظت آفلاتوکسین‌های مختلف در پسته، بادام، فندق، گردو به روش HPLC انجام شد.

## مواد و روش‌ها

### - روش نمونه‌گیری

به منظور تعیین غلظت آفلاتوکسین در مغزها، تعداد ۸۰ نمونه در سال ۱۳۹۵ از انواع مغزها شامل پسته (۲۰)، بادام (۲۰)، گردو (۲۰) و فندق (۲۰) به صورت تصادفی ساده از مراکز تهیه و توزیع این مغزها در شهرستان اصفهان نمونه‌گیری شد. در هر مرحله نمونه‌گیری از هر محصول، نیم کیلوگرم اخذ شد.

### - تعیین مقدار آفلاتوکسین در نمونه‌ها

نمونه‌ها آسیاب شدند و ۲ گرم نمونه آسیاب شده با ۶ گرم آب مقطر مخلوط شده، سپس به آن ۱ گرم از NaCl، ۲۴ میلی‌لیتر MeOH ۱۰۰ درصد و ۱۵ میلی‌لیتر n-هگزان نرمال (Merk, Germany) ۱۰۰ درصد اضافه کرده و به مدت ۳۰ دقیقه مخلوط شد. در ادامه با کاغذ صافی معمولی آن را صاف کرده تا n-هگزان از آن جدا شود. به ۹ میلی‌لیتر از محلول فیلتر شده، ۴۱ میلی‌لیتر محلول بافر فسفات (PBS) اضافه و به شدت تکان داده شد. سوسپانسیون حاصله از کاغذ صافی GFF عبور داده شد. ۵۰ میلی‌لیتر از عصاره رقیق شده از ستون ایونوآفینیتی با سرعت یک قطره در ثانیه عبور داده شد.

(فاز متحرک عبارت بود از استونیتریل: متانول: آب با نسبت ۱۷:۲۹:۵۴) سپس ستون با ۱۵ میلی‌لیتر PBS شستشو شد. ستون با عبور فشار ملایم هوا به مدت ۱۵- ۱۰ ثانیه خشک و ۵۰۰ میکرولیتر MeOH-HPLC به ستون اضافه و در ویالی جمع‌آوری شد. پس از ۱ دقیقه توقف مجدداً ۷۵۰ میکرولیتر MeOH-HPLC به ستون اضافه و در ویالی جمع‌آوری شده این عمل برای بار سوم تکرار شد و نهایتاً محلول جمع‌آوری شده با ورتکس مخلوط شد. در صورت وجود کدورت با صافی ۰/۴۵ میکرومتر صاف شد. ۳۰۰ میکرو لیتر از محلول حاصل به دستگاه HPLC تزریق شد و مقدار آفلاتوکسین با دتکتور فلورسانس با مشخصات،  $\lambda_{em}=435$ ،  $\lambda_{ex}=365$ ،  $Gain=1000$ ،  $attn=16$  تعیین گردید. تعیین مقدار از طریق مقایسه سطح زیر منحنی نمونه‌ها و استانداردها با احتساب ضریب رقت ۵۴ صورت پذیرفت (Feizy et al., 2010).

### - تعیین درصد ریکاوری

جهت تعیین درصد ریکاوری، ۲۰۰ میکرولیتر از نمونه‌های استاندارد آفلاتوکسین B1 و G1 با غلظت ۵ ppm و نمونه‌های استاندارد آفلاتوکسین B2 و G2 با غلظت ۱ ppm به دستگاه HPLC تزریق شد، که نتایج حاصل از آن در جدول (۱) آورده شده است.

جدول (۱) - مطالعه درصد باز یافت نمونه های آلوده شده به آفلاتوکسین B1, B2, G1, G2

آفلاتوکسین	غلظت آفلاتوکسین اضافه شده به نمونه (ppb)	درصد ریکاوری
B1	۵	۱۱۲/۵
B2	۱	۱۰۶/۹
G1	۵	۱۱۴/۸
G2	۱	۱۰۹/۳
total	۱۲	۱۱۲/۷

## - تعیین صحت دستگاه HPLC

HPLC تعیین شد و معادله خط و ضریب رگرسیون

مربوط به استانداردهای آفلاتوکسین ها مشخص شد.

در جدول (۲) شاخص های LOD و LOQ برای

آفلاتوکسین های B1, B2, G1, G2 توسط دستگاه

جدول (۲) - صحت آزمون جهت آفلاتوکسین های موجود در نمونه ها به وسیله دستگاه HPLC

آفلاتوکسین	LOD	LOQ	معادله خط	R <sup>2</sup>
B1	۰/۰۲۰	۰/۳۶۰	y = 3E+07x-18092	۰/۹۹۹
B2	۰/۰۰۴	۰/۰۷۲	y = 3E+07x-1848	۰/۹۹۸
G1	۰/۰۲۰	۰/۳۶۰	y = 1E+07x-49473	۰/۹۹۸
G2	۰/۰۰۴	۰/۰۷۲	y = 2E+07x-9853	۰/۹۹۶

LOQ = 10 sxy/slop

And

LOD = 3.3 sxy/slop

## یافته ها

## تجزیه و تحلیل آماری

نتایج مطالعه حاضر به طور خلاصه در جداول (۳) تا

(۵) آورده شده است.

داده ها با استفاده از نرم افزار SPSS (V18) و

آزمون های آماری ANOVA (تحلیل واریانس یک طرفه)

و توکی تحلیل شدند.

جدول (۳) - نتایج میزان غلظت آفلاتوکسین B1 در نمونه های پسته، بادام، فندق و گردو

نمونه آلوده	تعداد آلوده	تعداد نمونه های	درصد نمونه های	میان	میانگین	انحراف معیار	محدوده آلودگی	تعداد نمونه های بالاتر از حد استاندارد (ppb5)
پسته	۲۰	۳	۱۵	۷/۹۳	۷/۳۴	۶/۷۷۴	(۰/۲۹-۱۳/۸۰)	۲
بادام	۲۰	۱	۱۵	۳/۴۳	۳/۴۳	۰	۳/۴۳	۰
فندق	۲۰	-	-	-	-	-	-	-
گردو	۲۰	۲	۱۰	۱۲/۲۳۵	۱۲/۲۳۵	۱۰/۰۶۲	(۵/۱۲-۱۹/۳۵)	۲
مجموع	۸۰	۶	۷/۵	۶/۵۲۵	۸/۳۲	۷/۰۷۷	(۰/۲۹-۱۹/۳۵)	۴

فراوانی را داشته است (۱۵ درصد). در صورتی که هیچ

یک از نمونه های فندق آلوده به آفلاتوکسین B1 نبود.

همان طور که نتایج جدول (۳) نشان می دهد

نمونه های پسته از نظر وجود آفلاتوکسین B1 بیشترین

جدول (۴) - نتایج میزان غلظت آفلاتوکسین B2 در نمونه های پسته، بادام، فندق و گردو

نمونه	تعداد	تعداد نمونه‌های آلوده	درصد نمونه‌های آلوده	میانه (ppb)	میانگین (ppb)	انحراف معیار	محدوده آلودگی (ppb)
پسته	۲۰	۱	۵	۴/۱۹	۴/۱۹	۰	(۴/۱۹)
بادام	۲۰	-	-	-	-	-	-
فندق	۲۰	-	-	-	-	-	-
گردو	۲۰	۱	۵	۷/۰۸	۷/۰۸	۰	(۷/۰۸)
مجموع	۸۰	۲	۲/۵	۵/۶۳۵	۵/۶۳۵	۱/۰۸۴	(۴/۱۹-۷/۰۸)

همان‌طور که نتایج جدول (۴) نشان می‌دهد بیشترین فراوانی را دارا بودند (۵درصد) و هیچ یک از نمونه‌های پسته و گردو از نظر وجود آفلاتوکسین B2 نبودند.

جدول (۵) - نتایج میزان غلظت آفلاتوکسین G1 در نمونه‌های پسته، بادام، فندق و گردو

نمونه	تعداد	تعداد نمونه‌های آلوده	درصد نمونه‌های آلوده	میانه (ppb)	میانگین (ppb)	انحراف معیار	محدوده آلودگی (ppb)
پسته	۲۰	۳	۱۵	۳/۸۱	۳/۹۹۷	۰/۹۴۳	(۲/۳۶)
بادام	۲۰	۱	۵	۲/۳۶	۲/۳۶	۰	(۰/۱۷)
فندق	۲۰	۱	۵	۰/۱۷	۰/۱۷	۰	(۳/۸۸)
گردو	۲۰	۱	۵	۳/۸۸	۳/۸۸	۰	(۳/۸۸)
مجموع	۸۰	۶	۷/۵	۳/۰۸۵	۳/۰۶۷	۲/۹۴۱	(۰/۱۵-۸/۰۳)

با توجه به نتایج جدول (۵) در همه انواع نمونه‌های مورد بررسی اعم از پسته، بادام، فندق و گردو این توکسین مشاهده شد و پسته از نظر وجود آفلاتوکسین دارای بیشترین میزان آلودگی (۳درصد)، با غلظت ۸/۰۳ بود.

جدول (۶) - نتایج میزان غلظت آفلاتوکسین G2 در نمونه های پسته، بادام، فندق و گردو

نمونه	تعداد	تعداد نمونه‌های آلوده	درصد نمونه‌های آلوده	میانه (ppb)	میانگین (ppb)	انحراف معیار	محدوده آلودگی (ppb)
پسته	۲۰	۱	۵	۰/۸۳	۰/۸۳	۰	(۰/۸۳)
بادام	۲۰	-	-	-	-	-	-
فندق	۲۰	-	-	-	-	-	-
گردو	۲۰	۱	۵	۲/۵۸	۲/۵۸	۰	(۲/۵۸)
مجموع	۸۰	۲	۲/۵	۱/۷۰۵	۱/۷۰۵	۱/۸۰۷	(۰/۸۳-۲/۵۸)

با توجه به نتایج جدول (۶) با بیشترین آلودگی آفلاتوکسین G2 مربوط به نمونه گردو با ۲/۵۸ و کمترین آلودگی مربوط به نمونه پسته با ۰/۸۳ ppb بود.

جدول (۷) - نتایج میزان غلظت آفلاتوکسین کل در نمونه های پسته، بادام، فندق و گردو

نمونه	تعداد	تعداد نمونه‌های آلوده	درصد نمونه‌های آلوده	میانگین (ppb)	میانگین (ppb)	انحراف معیار	محدوده آلودگی (ppb)
پسته	۲۰	۴	۲۰	۱۱/۰۶	۰/۷۵۷	(۰/۱۵-۱۶/۷۶)	۱
بادام	۲۰	۱	۵	۵/۷۹	۵/۷۹	(۰/۷۹)	۰
فندق	۲۰	۱	۵	۰/۱۷	۰/۱۷	(۰/۱۷)	۰
گردو	۲۰	۲	۱۰	۱۹/۰۱	۱۹/۰۰۵	(۱۸/۶۶-۱۹/۳۵)	۲
مجموع	۸۰	۸	۱۰	۱۱/۰۶	۱۰/۳۷۸	(۰/۱۵-۱۹/۳۵)	۳

نتایج جدول (۷) نشان می‌دهد که در همه انواع نمونه‌های مورد بررسی آفلاتوکسین کل مثبت بودند. نمونه پسته از نظر وجود آفلاتوکسین کل دارای بیشترین میزان آلودگی و نمونه‌های بادام و فندق با ۵ درصد کمترین میزان آلودگی به آفلاتوکسین کل را نشان دادند. طبق استاندارد ملی ایران، بیشینه آفلاتوکسین کل مورد پذیرش ۱۵ ppb

می‌باشد. از بین نمونه‌های مورد بررسی از ۸ نمونه آلوده، ۳ نمونه بالاتراز محدوده استاندارد ایران بود. با توجه به آزمون ANOV اختلاف آماری معناداری بین میانگین آلودگی انواع مغزها به آفلاتوکسین کل وجود نداشت ( $P \leq 0/05$ ). (ISIRI, 5925).

## Evaluation of aflatoxin content in pistachio, almond, hazelnut and walnut in Isfahan

Shakeri, Z.<sup>1</sup>, Rahimi, E.<sup>2\*</sup>, Shakerian, A.<sup>3</sup>

1. M.Sc Graduate of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
2. Professor of Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran; Research Center of Nutrition and Organic Products (R.C.N.O.P), Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran
3. Professor of Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran; . Research Center of Nutrition and Organic Products (R.C.N.O.P), Shahrekord Branch, Islamic Azad University, Shahrekord, Iran

\*Corresponding Author's: ebrahimrahimi55@yahoo.com

(Received: 2016/10/23 Accepted: 2019/8/3)

### Abstract

Aflatoxins are, a group of closely related carcinogenic metabolites produced by certain species of *Aspergillus*. The objective of this study was to detect the level of aflatoxins in nuts. A total of 80 samples of nuts including, pistachio (20), almond (20), hazelnut (20) and walnut (20) were collected analyzed for AFB and AFG in Isfahan in 2016 using HPLC. The aflatoxins B1, B2, G1, G2 and Total were found in 2.5%, 5.5%, 5.7%, 7.2%, and 10% of the analyzed sample by an average concentration of 8.32, 5.635, 3.067, 1.705 and 10.375 ppb, respectively. The concentration of AFB1 in 66.67% and the concentration of AFT in 37.5% from positive samples Iran were higher standard (5ppm). The percentage of pistachio AF-positive nuts samples was significantly ( $p < 0.05$ ) more than other nuts (almond, hazelnut and walnut). The results showed that contamination of nuts especially pistachio to aflatoxins not good and can compromising consumer health.

**Conflict of interest:** None declared.

**Keywords:** Pistachio, Almond, Hazelnut, Walnut, Aflatoxins, HPLC