

[10.30495/JFH.2020.671148](https://doi.org/10.30495/JFH.2020.671148)

«مقاله پژوهشی»

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

مریم جلیلی^{۱*}، ریکا الماسیان^۲، انوشه رحمانی^۳، امیر وره زردی^۴، طیبه بساکی^۵

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
 ۴. 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: ۹۸/۸/۴ پذیرش نهایی: ۹۸/۱۱/۱۷)

چکیده

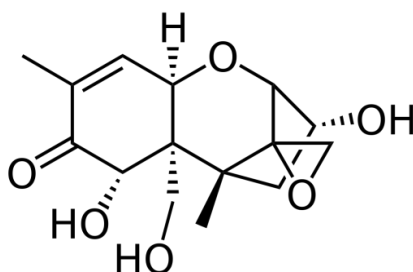
داکسی نیوالنول (دان) یک نوع مایکوتوکسین است که توسط گونه‌های فوزاریوم تولید می‌شود. هدف از این بررسی مقایسه کارایی سه روش تخلیص (شامل ستون‌های ایمونوآفینیتی و مایکوسپ ۲۲۵ و ۲۲۷) در اندازه‌گیری دان با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) و سپس اندازه‌گیری دان در فرآورده‌های غلات بود. ابتدا نمونه‌های آرد گندم در سه غلظت (۱۲۰۰، ۷۰۰، ۲۰۰ ng/g) با سم دان غنی شد و سپس مقدار بازیافت نمونه‌ها پس از تخلیص با ستون‌ها، اندازه‌گیری شد. همچنین مقدار دان در ۶۰ نمونه فرآورده غلات (آرد گندم، برنج، آرد جو، نودل و نان) اندازه‌گیری گردید. نتایج نشان داد بیشترین مقدار بازیافت (بین ۸۷/۴۳±۲/۵ تا ۹۵/۱۷±۲/۲ درصد) مربوط به ستون ایمونوآفینیتی بود. گرچه اختلاف معنی‌داری بین ستون ایمونوآفینیتی و مایکوسپ ۲۲۵ وجود نداشت. کمترین مقدار بازیافت با استفاده از ستون مایکوسپ ۲۲۷ به دست آمد ($P < 0.05$). از بین ۶۰ 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 (۷۲۴/۳ ng/g) در یک نمونه برنج مشاهده شد. این بررسی نشان داد که گرچه ستون ایمونوآفینیتی 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). داکسی‌نیوالنول (شکل ۱) که به نام‌های دان و وومیتوکسین نیز نامیده می‌شود، شایع‌ترین مایکوتوکسین در گروه تریکوتسن‌ها بوده و توسط فوزاریوم *گرامینثاروم* 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 این حال، 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 *گرامینثاروم* در فعالیت آبی

۰/۹۹۵-۰/۹۰ به‌خوبی رشد می‌کند اما تولید سم دان در فعالیت آبی محدودتری (۰/۹۵-۰/۹۰) 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 بررسی شده‌اند اما تحقیقات نشان داده است که در سایر حیوانات خانگی نیز ممکن است ایجاد شوند. علائم مسمومیت

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 طول موجی اتفاق می‌افتد که ناخالص‌های ماتریس غلات نیز حداکثر جذب را در آن طول موج دارند؛ بنابراین، هنگامی که از آشکارساز ماوراءبنفش استفاده می‌شود، باید یک روش خالص‌سازی مناسب به کار گرفته شود (Geng *et al.*, 2014). خالص‌سازی در واقع یکی از مراحل آماده‌سازی نمونه است که سبب می‌شود ناخالصی‌ها تا حد امکان از نمونه حذف شده و سم خالص باقی بماند (Jalili *et al.*, 2010). متداول‌ترین ستون‌هایی که برای تخلیص دان به کار می‌روند، شامل ستون‌های ایمونوآفینیتی (IAC) و ستون‌های مایکوسپ چندمنظوره (مانند مایکوسپ ۲۲۵ و ۲۲۷) می‌باشند (Farahany and Jinap, 2009). ستون‌های ایمونوآفینیتی 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.

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 ترکیوتسن‌ها کمترین سمیت را داراست، اما شیوع بیشتری دارد و وجود آن به‌عنوان شاخص حضور احتمالی ترکیوتسن‌های سمی‌تر محسوب می‌شود (Moretti *et al.*, 2014). حتی مصرف مواد غذایی که آلودگی کمی به این سم دارند، اثرات نامطلوبی از جمله 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 1000 ng/g را در غلات و فرآورده‌های آن تعیین کرده است در حالی که اتحادیه اروپا حد مجاز بین 500 ng/g - 1000 را در مواد غذایی انسانی و حد 400 ng/g 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 به کار رفته است که از آن جمله می‌توان به کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، کروماتوگرافی گازی، کروماتوگرافی لایه‌نازک و الیزا اشاره نمود (Koppen *et al.*, 2010). در بین این روش‌ها کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و کروماتوگرافی گازی بیش از سایر روش‌ها به کار رفته‌اند. گرچه، حتی محققینی که از روش‌های

مواد و روش‌ها

- تهیه نمونه‌ها

تعداد ۶۰ نمونه فرآورده غلات شامل آرد گندم (۱۰ نمونه)، برنج (۱۰ نمونه)، آرد جو (۱۰ نمونه)، نودل (۱۰ نمونه) و نان مسطح (۱۰ 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 ایمونوآفینیتی

استخراج دان از ستون ایمونوآفینیتی بر اساس یک روش قبلی با کمی تغییرات انجام شد (Farahany and Jinap, 2009). حدود ۲۵ گرم از نمونه آسیاب شده به‌دقت با ترازو وزن شد و به آن ۲۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه و در دستگاه مخلوط‌کن مدل (Waring, Torrington, USA) به مدت ۳ دقیقه مخلوط شد. سپس محتویات مخلوط‌کن از کاغذ صافی ۱۲۵ میلی‌متری (0.13 mg/circle, Toyo Roshi Kaisha, Ltd., Japan) عبور داده شد. از ستون ایمونوآفینیتی ابتدا ۱۰ میلی‌لیتر محلول نمکی بافر فسفات (Watertown, USA)، با سرعت ۲ تا ۳ قطره در دقیقه عبور داده شد و سپس ۳ میلی‌لیتر از محلول صاف‌شده از ستون ایمونوآفینیتی (Watertown DON-test-HPLC, USA) با سرعت ۱ قطره در هر ثانیه عبور داده شد تا سم موجود در عصاره (آنتی‌ژن) به آنتی‌بادی‌های درون ستون متصل شود. سپس ستون با ۵ میلی‌لیتر آب مقطر شستشو شده و پس از آن، ۱/۵ میلی‌لیتر متانول از آن عبور داده‌شده و در یک ویال جمع‌آوری شد. سپس ویال در یک حمام آب

با دمای ۴۰ درجه سلسیوس قرار گرفت و پس از این‌که کاملاً خشک شد در مخلوط آب و استونیتریل حل گردید. مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از این مخلوط به دستگاه تزریق شد.

- روش استخراج دان با استفاده از مایکوسپ ۲۲۵ و ۲۲۷
برای استخراج دان با استفاده از هر دو ستون مایکوسپ بر اساس دستور کار شرکت سازنده انجام شد. ابتدا حدود ۲۵ گرم از نمونه با ۱۰۰ میلی‌لیتر از ترکیب دو حلال آب و استونیتریل به نسبت ۸۴ به ۱۶ درصد حجمی/حجمی مخلوط شد و به مدت ۹۰ دقیقه با استفاده از یک همزن مغناطیسی به هم زده شد و سپس با کاغذ صافی، صاف گردید. مقدار ۵ 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 ۲ 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 ۵۰۰ میکرولیتر متانول حل شد و سپس به دستگاه کروماتوگرافی تزریق گردید.

مراحل استخراج دان با استفاده از مایکوسپ ۲۲۷ کاملاً مشابه استخراج با مایکوسپ ۲۲۵ بود و تنها در مایکوسپ ۲۲۷، مقدار ۸ میلی‌لیتر (به جای ۵ 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 ۵ نقطه‌ای در محدوده غلظت ۱۰۰ تا ۱۵۰۰

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 به کار 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 غنی شده و در طی یک ماه به مدت ۶ 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 به صورت میانگین و انحراف از استاندارد به عنوان مقدار بازیافت گزارش شد.

- محاسبات آماری

به منظور تعیین اختلاف معنی دار 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 به دست آمد که حاکی از خطی بودن روش داشت.

نانوگرم بر گرم از سم دان با استفاده از سطح زیر پیک ترسیم و سپس معادله رگرسیون ($y=ax+b$) در محدوده خطی منحنی کالیبراسیون، محاسبه شد. از این منحنی در تعیین مقدار دان در اندازه‌گیری‌های کمی استفاده شد. به منظور 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، به عنوان حد شناسایی و غلظتی که ارتفاع پیک حاصل از آن ۱۰ برابر بلندترین نویز دستگاه بود به عنوان 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 فاز معکوس (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 طول موج دستگاه روی ۲۱۸ نانومتر تنظیم گردید.

- اندازه‌گیری بازیافت و تکرارپذیری روش

سه نوع ستون متداول (ایمونوفینیتی، مایکوسپ ۲۲۵ و مایکوسپ ۲۲۷) برای اندازه‌گیری دان در فرآورده‌های غلات مورد استفاده قرار گرفته و از نظر اثر بر کارایی استخراج و تخلیص باهم مقایسه شدند. به منظور اندازه‌گیری بازیافت روش برای هر یک از ستون‌ها،

آماري معنی‌دار نبود. کمترین مقدار بازیافت با استفاده از ستون مایکوسپ ۲۲۷ به‌دست آمد و با دو ستون دیگر اختلاف معنی‌داری داشت ($P < 0/05$). از سوی دیگر، هنگامی که سم دان با استفاده از ستون ایمونوآفینیتی و ستون مایکوسپ ۲۲۵ تخلیص شده بود، کروماتوگرام به‌دست آمده از دستگاه مناسب‌تر بود و در اطراف دان پیک‌های مزاحم کمتری وجود داشت در حالی که در کروماتوگرام مربوط به ستون مایکوسپ ۲۲۷، پیک‌های متعددی در نزدیکی پیک مربوط به دان مشاهده شد (شکل ۲). تکرارپذیری روش برای ستون ایمونوآفینیتی، مایکوسپ ۲۲۵ و مایکوسپ ۲۲۷ به ترتیب مقادیر ۵/۳ و ۷/۴ و ۸/۴ برآورد شد.

مقدار حد تشخیص (LOD) و حد تعیین مقدار (LOQ) به ترتیب ۱۷ و ۳۴ 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 $87/43 \pm 2/5$ تا $95/17 \pm 2/2$ درصد برای ستون ایمونوآفینیتی، بین $85/77 \pm 2/3$ تا $92/57 \pm 4/55$ درصد برای مایکوسپ ۲۲۵ و بین $62/83 \pm 1/76$ تا $70/27 \pm 2/4$ درصد برای ستون مایکوسپ ۲۲۷ متغیر بود. بیشترین مقدار بازیافت برای ستون ایمونوآفینیتی به‌دست آمد. نتایج نشان داد گرچه مقدار بازیافت با استفاده از ستون ایمونوآفینیتی بیشتر از مایکوسپ ۲۲۵ بود، اما این تفاوت از لحاظ

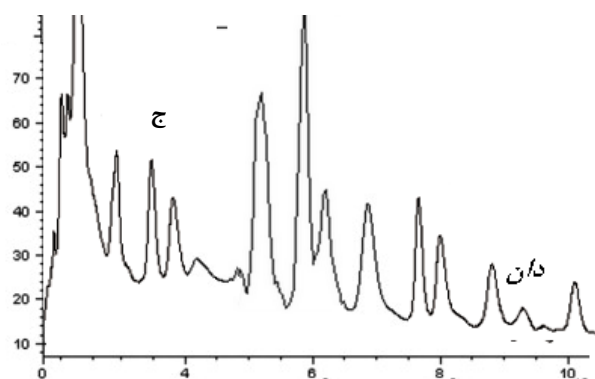
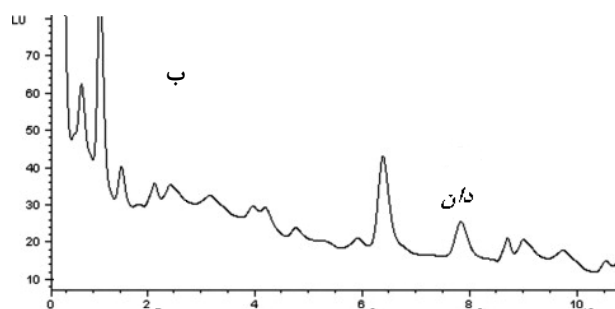
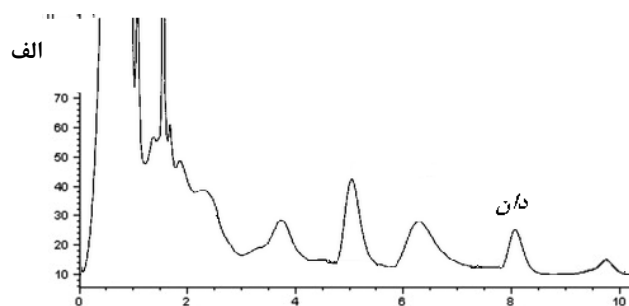
جدول (۱) - درصد بازیافت سم دان با سه نوع ستون ایمونوآفینیتی و مایکوسپ ۲۲۵ و ۲۲۷ در آرد گندم

غلظت سم دان (ng/g)	نوع ستون		ایمونوآفینیتی
	مایکوسپ ۲۲۵	مایکوسپ ۲۲۷	
۲۰۰	$85/77 \pm 2/3^a$	$67/93 \pm 1/4^b$	$87/43 \pm 2/5^a$
۷۰۰	$92/57 \pm 4/6^a$	$70/27 \pm 2/4^b$	$95/17 \pm 2/2^a$
۱۲۰۰	$88/23 \pm 2/95^a$	$62/83 \pm 1/76^b$	$90/6 \pm 1/7^a$

a,b,c حروف غیریکسان در هر سطر نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار ($p < 0/05$) در بین اعداد است.

$86/6 \pm 3/6$ درصد (برای نان مسطح غنی‌شده با ۲۰۰ نانوگرم بر گرم سم دان) تا $102/4 \pm 5/3$ درصد (برای نودل غنی‌شده با ۱۲۰۰ نانوگرم بر گرم سم دان) متغیر بود.

- 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



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

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

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

- اندازه‌گیری دان در فرآورده‌های غلات

به ترتیب مربوط به نمونه‌های آرد جو (۲۰٪) و ذرت (۸۰٪) بود. گرچه بیشترین میزان آلودگی (۷۲۴/۳) در یک نمونه برنج مشاهده شد.

نتایج اندازه‌گیری دان در ۶۰ نمونه فرآورده غلات در جدول (۳) نشان داده شده است. در مجموع از بین ۶۰ نمونه مورد بررسی، ۳۰ نمونه (۵۰٪) به سم دان آلوده بودند. کمترین و بیشترین تعداد نمونه‌های آلوده

جدول (۳) - مقدار دان در نمونه‌های مختلف با ستون مایکوسپ ۲۲۵

نمونه	تعداد نمونه	تعداد نمونه آلوده (%)	میانگین دان (ng/g)	بیشترین مقدار (ng/g)	میان
آرد گندم	۱۰	۵ (۵۰٪)	۹۶/۸	۳۴۸/۵	۴۶/۷
برنج	۱۰	۷ (۷۰٪)	۱۹۸/۲	۷۲۴/۳	۹۸/۲
نودل	۱۰	۴ (۴۰٪)	۸۸/۹	۳۲۵/۷	nd
نان مسطح	۱۰	۴ (۴۰٪)	۶۲/۲	۲۳۱/۵	nd
آرد جو	۱۰	۲ (۲۰٪)	۵۲/۴	۲۸۹/۵	nd
ذرت	۱۰	۸ (۸۰٪)	۱۴۱/۹	۳۴۴/۸	۱۰۵/۶
جمع نمونه‌ها	۶۰	۳۰ (۵۰٪)	۱۰۵/۲	۷۲۴/۳	۲۹/۱

nd غیر قابل تشخیص

بحث و نتیجه‌گیری

تکرارپذیری برای ستون ایمونوفینیتی، مایکوسپ ۲۲۵ و مایکوسپ ۲۲۷ به ترتیب مقادیر ۵/۳ و ۷/۴ و ۸/۴ درصد به دست آمد که نشان می‌داد هر سه روش از تکرارپذیری قابل قبولی 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 (۹۹٪) مربوط به ستون مایکوسپ ۲۲۵ بود. در حالی که بازیافت ستون مایکوسپ ۲۲۷ و ستون ایمونوفینیتی به ترتیب ۶۵٪ و ۵۳٪ بود. بر اساس نتایج این محققین، بازیافت دان با استفاده از ستون ایمونوفینیتی از سایر ستون‌ها کمتر بود. در حالی که در تحقیق حاضر ستون ایمونوفینیتی بیشترین بازیافت را داشت (Farahany

مقادیری که برای LOD و LOQ به دست آمد با مقادیر به دست آمده از مطالعه‌ای مشابه بود (Abramović, 2005) اما از مقادیر به دست آمده از مطالعه دیگر (۳۱/۳ ng/g و ۹/۵)، بیشتر بود (Trombete et al., 2016).

نتایج اندازه‌گیری بازیافت با استفاده از سه ستون نشان داد که ستون ایمونوفینیتی بیشترین مقدار بازیافت (بیش از ۸۷٪) و در نتیجه کارایی بیشتری داشت. نتایج ستون مایکوسپ ۲۲۵ بیش از ۸۵٪ بود و تفاوت معنی‌داری با ستون ایمونوفینیتی نداشت. از آنجایی که بازیافت سم دان با ستون مایکوسپ ۲۲۷ بین ۶۳ تا ۷۰ درصد به دست آمد، این ستون از کارایی مناسبی برای اندازه‌گیری دان برخوردار نیست. طبق نتایج،

در بررسی حاضر، با توجه به این که تفاوت معنی داری بین مقدار بازیافت نمونه‌ها با ستون مایکوسپ ۲۲۵ و ستون ایمونوفینیتی وجود نداشت و از آنجایی که قیمت ستون مایکوسپ مقرون به صرفه‌تر 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 قابل قبولی بود (بین $۸۶/۶ \pm ۳/۶\%$ تا $۱۰/۴ \pm ۵/۳\%$). این نتایج با یافته‌های سایر محققین مطابقت داشت. طوری که 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 تعیین شده در استاندارد ملی ایران نبود. نتایج این بررسی با نتایج به دست 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 $۳۶۸/۷$ نانوگرم در گرم بود. مقدار دان در هیچ‌یک از نمونه‌ها از حد استاندارد ملی ایران بالاتر نبود (Yazdanpanah et al., 2014). همچنین در سال ۱۳۹۴، مقدار دان در ۵۲ نمونه گندم وارداتی اندازه‌گیری و گزارش نمودند که ۸۰% نمونه‌ها به این سم آلوده بودند (حداکثر $۵۴۱/۶۷ \pm ۵/۰۵$). گرچه مقدار آن در هیچ‌یک از نمونه‌ها از حد مجاز بالاتر نبود

(and Jinap, 2009). در تحقیق مشابه دیگری، گزارش کردند که استفاده از ستون ایمونوفینیتی کارایی بیشتری در حذف مواد مداخله‌گر موجود در ماتریس غذایی دارد و سبب می‌شود کروماتوگرام مناسب‌تری برای تعیین مقدار دان به دست آید. دقت این روش نیز مناسب و تکرارپذیری آن حدود $۲/۸$ درصد بود اما مقدار بازیافت سم فقط ۷۳% برآورد شد؛ در حالی که بازیافت مقدار دان با استفاده از ستون مایکوسپ ۹۲% بود. این محققین گزارش نمودند که ستون مایکوسپ برای اندازه‌گیری دان مناسب‌تر از ستون ایمونوفینیتی 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 ایمونوفینیتی نبود (Abramović et al., 2005). استفاده از ستون‌های ایمونوفینیتی برای تخلیص مایکوتوکسین‌ها، سبب می‌شود انتخابی بودن روش افزایش یابد زیرا این ستون‌ها ترکیبات مداخله‌کننده را از بین برده و بیشتر بر روی تخلیص مایکوتوکسین متمرکز می‌شوند. این محقق بازیافت دان از فرآورده‌های غلات را بین $۹۴/۱\%$ تا $۱۱۰/۳\%$ مقدار تکرارپذیری را بین $۵/۸$ تا $۶/۹$ گزارش نمودند (Trombete et al., 2016) که با نتایج به دست آمده 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).

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 ایمونوآفینیتی در اندازه‌گیری دان قابلیت اطمینان بیشتری دارد. گرچه اختلاف آن با ستون مایکوسپ ۲۲۵ چندان قابل توجه 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 منافی برای اعلام ندارند.

(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 ۱۵۰۴ 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 ۲۴۲ نمونه (۱۶/۱٪) مقدار آن از حد مجاز تعیین‌شده در کشور برزیل بیشتر بود. در این بررسی میانگین آلودگی نمونه‌ها ۱۰۴۷ ng/g گزارش شد (Machado *et al.*, 2017). در تحقیق دیگری مقدار دان در ۶۰ 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

منابع

- Abramović, B., Jaji, I., Juri, V., Ferenc, F. and Gaal, F.F. (2005). Optimization of the determination of deoxynivalenol in corn samples 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 chromatography with 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 deoxynivalenol content 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 host resistance. 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 (Campinas), 37(1): 8-12.
 - Moretti, A., Panzarini, G., Somma, S., Campagna, C., Ravaglia, S., Logrieco, A.F. et al. (2014) Systemic growth of *F. graminearum* in wheat plants and related accumulation of deoxynivalenol. Toxins, 6: 1308–1324.
 - Pinton, P. and Oswald, I.P. (2014) Effect of deoxynivalenol and other type B trichothecenes 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.

[10.30495/JFH.2020.671148](https://doi.org/10.30495/JFH.2020.671148)

“Research article”

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, MycoSepTM #225, MycoSepTM #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