(مقالهٔ پژوهشی)

شناسایی و تعیین مقدار اوکراتوکسین A در آرد گندم کارخانه‌های آرد شهر اهواز با استفاده از HPLC

عبدالعظیم بهفر[1]، زهرا نظری[2*]، رضا حیدری[3]

۱-دانشیار گروه آب‌شناسی و مواد خوراکی.
۲- مربی گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی.
۳- داروساز.

۱- دانشکدهٔ داروسازی، مرکز تحقیقات ارزیابی ایمنی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، ایران.
۲- گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی، دانشکدهٔ داروسازی، مرکز تحقیقات ارزیابی ایمنی، دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز، ایران.

* نویسندهٔ مسؤول:
زهرا نظری خوراسگانی، گروه فارماکولوژی و سم شناسی، دانشکدهٔ داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی-شاپور اهواز، ایران.
تلفن: ۰۰۹۸۹۱۶۱۱۱۸۱۰۸
Email: znazarikh@yahoo.com

چکیده

زمینه و هدف: اکراتوکسین A سمی‌ترین نوع از اکراتوکسین‌هابا اثر سمیت کلیوی و سرطان‌زایی می باشد. این مطالعه به منظور شناسایی و تعیین مقدار اکراتوکسین A در آرد گندم کارخانه‌های آرد شهر اهواز به روش HPLC، انجام شد.

روش بررسی: به منظور شناسایی و تعیین اکراتوکسن A در آردهای تولیدی ۴ کارخانه ی آرد شهر اهواز، هشت بار و هر بار یک نمونه‌ی مرکب مشتمل بر ۲۰ نمونه از آرد هر یک از کارخانه ها جمع آوری می شد. مقدار مناسبی از هر نمونه ها با محلول متانول و بافر مخلوط و از کاغذ صافی عبور و مقداری از محلول زیر صافی پس از رقیق سازی، از ستونهای مونوافینیتی مخصوص اکراتوکسین عبور داده شد. آنگاه ستون را با آب مقطر شسته و سرانجام اکراتوکسین باند شده به مادهٔ جاذب ستون با متانول جداسازی شد. محلول متانولی توسط ازت تبخیر و باقیمانده در فاز متحرک حل و با تزریق هریک از آنها به دستگاه HPLC مجهز به ستون C۱۸ (ابعاد ۱۵۰×۴/۶mm، اندازهٔ ذره‌ای ۵μm)، دتکتور فلورسانس (طول موج بر انگیختگی ۳۳۳nm، نشر ۴۶۰nm)، استفادهٔ آب: استونیتریل و استیک اسید گلاسیال (۴۹/۵: ۴۹/۵: ۱) به‌عنوان فاز متحرک با سرعت جریان ۱/۵ml/min، آنالیز شدند.

یافته‌ها: ۹۳/۷۵درصد نمونه‌ها (۳۰ نمونه از ۳۲ نمونه آرد مورد بررسی) به اکراتوکسین A در محدودهٔ غلظت۰/۸۰۹ng/g-۰/۰۰۴ و میانگین ۰/۰۹ng/g آلودگی داشتند.

نتیجه‌گیری: سطح اکراتوکسن A در همهٔ نمونه‌ها کمتر از حد مجاز تعیین شده توسط مؤسسهٔ استاندارد ملی و تحقیقات صنعتی ایران (۵ppb) و WHO بود.

کلید واژگان: اکراتوکسین A، HPLC، آرد.

دریافت مقاله: ۱۳۹۰/۵/۲۳ دریافت مقالهٔ اصلاح‌شده: ۱۳۹۱/۱۱/۲۳ اعلام قبولی: ۱۳۹۱/۱۲/۲۰

مقدمه

گندم محصولی استراتژیک و مهم در زندگی انسان محسوب می‌شود و با اطمینان می توان گفت که پر مصرف-ترین محصول کشاورزی است که در صورت آلودگی، در به خطر انداختن سلامت انسان می تواند نقش مهمی ایفا نماید. گندم در مزرعه و انبار می‌تواند به وسیلهٔ میکروارگانیسم‌های مختلف به ویژه قارچ‌ها، مورد تهاجم قرار گیرد. اکراتوکسین‌ها (Ochratoxins) گروهی از مایکوتوکسین‌ها هستند که به وسیلهٔ گونه هایی از قارچ‌های آسپرژیلوس و پنی‌سیلیوم مانند آسپرژیلوس اوخراسئوس (Aspergillus Ochraceus) و پنی سیلیوم یریدیکاتوم (Penicillium Viridicatom)، تولید می‌شوند (۱-۵).

انواع اکراتوکسین ها عبارت اند از: A، Bو C که در این میان، اکراتوکسین A سمی ترین نوع اکراتوکسین است و به عنوان آلایندهٔ طبیعی اغذیهٔ انسانی و حیوانی به ویژه محصولات گیاهی نظیر: غلات، باقلا و لوبیا و همچنین گوشت و ماهی خشک شده، محسوب می‌شود. قارچ‌های مولد اکراتوکسین A، اغلب در خاک و ضایعات کشاورزی حضور دارند و باعث آلودگی شدید بسیاری از محصولات کشاورزی انباری می‌شوند(۶-۹) .

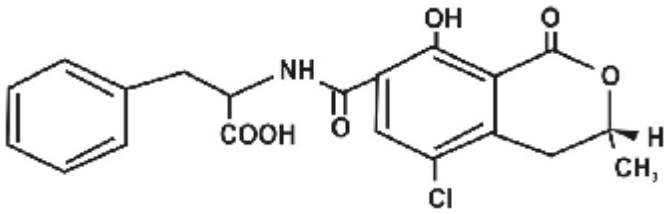
اکراتوکسین A یک ترکیب بی‌رنگ بلوری شکل با وزن مولکولی ۴۰۳/۸۲ دالتون و دارای فرمول مولکولی $C_{20}H_{18}NClO_6$ می باشد. اکراتوکسین A جزو ترکیبات فنیل‌آلانینی بوده که دارای یک هستهٔ ایزوکومارینی می‌باشد (شکل ۱) (۴، ۱۰).

اکراتوکسین A یکی از عوامل مرگ‌و میر انسان و حیوانات در نواحی واجد آلودگی می‌باشد. این ترکیب با فرآیندهای مختلف سلولی نظیر سنتز پروتئین‌ها، متابولیسم انرژی و فعالیت‌های مختلف آنزیمی تداخل دارد. ژنوتوکسیسیته (Genotoxicity)، سمیت کلیوی، ناقص الخلقه‌زایی (Teratogenicity) و سرطان‌زایی از اثرات سمی اکراتوکسین A می‌باشند (۴، ۱۱، ۱۲). طبق طبقه‌بندی آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان (International Agency for Research on Cancer) اکراتوکسین A جزو گروه B ۲ می‌باشد (۱۳). اکراتوکسین A ترکیبی نسبتاً مقاوم در برابر حرارت است که از طریق زنجیرهٔ غذایی به انسان منتقل می‌گردد (۱۴، ۱۵). جدول ۱ خلاصه‌ای از نتایج تحقیقات آلودگی به اکراتوکسین A نمونه‌های انواع گندم و فرآورده‌های آن را در کشورهای مختلف طی سال‌های ۱۹۹۰ تا ۱۹۹۸ را نشان می‌دهد. در برخی موارد، میزان آلودگی کمتر از (۵ µg/kg) از حد مجاز تعیین شدهٔ اتحادیهٔ اروپا بوده و در مواردی بالاتر از این حد اعلام شده، است(۱۳).

جلوگیری از رشد قارچ‌های مولد سم در محصولات کشاوزی به جلوگیری از تولید مایکوتوکسین‌ها خواهد انجامید. این عامل در شرایط انباری، معمولاً با استفاده از تغییر محیط داخلی شامل تغییرات رطوبت، دما و اتمسفر انجام می‌گیرد. روش‌های مختلف خشک کردن در دمای پایین، خشک کردن در دمای بالا و غیره برای کاهش سطح رطوبت محصول به کار گرفته شده است(۱۶).

معمولاً روش‌های سوکسله، استخراج مایع- مایع یا استخراج بر فاز جامد (SPE) و یا ستون های ایمونوافینیتی حاوی آنتی‌بادی‌های اختصاصی (IAC) برای جداسازی اکراتوکسین‌ها از سایر ترکیبات احتمالی موجود در ماتریکس‌های مواد غذایی، آب و خاک و ... استفاده می‌شود. استفاده از IAC به دلیل اختصاصیت، فاکتور تغلیظ، نیاز کمتر به حلال، نداشتن مشکل با امتزاج‌پذیری حلال‌ها، اجتناب از برخورد با مسایلی نظیر جداسازی ناقص فازها، بازیافت‌هایی کمتر از حد قابل قبول جهت تعیین مقدار و تشکیل امولسیون که خاص روش استخراج مایع- مایع می-باشد، برتری دارد و در این بررسی از آن استفاده شده است.

از روش‌های متداول جهت تعیین مقدار اکراتوکسین‌ها، می‌توان از کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC)، کروماتوگرافی بر لایهٔ نازک (TLC) و روش های ایمونولوژیک نظیر آلایزا (ELISA) نام برد. در این تحقیق، شناسایی و تعیین مقدار اوکراتوکسین A در آرد گندم کارخانه‌های آرد شهر اهواز با به‌کارگیری روش HPLC، انجام شد.



شکل ۱: ساختمان شیمیایی اکراتوکسین A (۴).

جدول ۱: آلودگی انواع نمونه‌های گندم و آرد آن به اکراتوکسین A در برخی از کشورها در سال‌های مورد بررسی

کشور	کالا	سال	تعداد نمونه	LOQ (ppb)	<LOQ	میانگین-ماگزیمم
آلمان	دانهٔ گندم	۹۸-۱۹۹۵	۳۵	۰/۰۱	۲۱	۰/۱۱-۰/۶۵
	آرد گندم	۹۸-۱۹۹۵	۹۸	۰/۰۱	۱۶	۰/۱۰-۱
		۹۸-۱۹۹۵	۸۳	۰/۰۱	۶	۰/۲۰-۱/۷۳
	آرد سبوس گندم	۹۸-۱۹۹۵	۱۸	۰/۰۱	۰	۰/۲۰-۱/۲
هلند	گندم محلی	۱۹۹۵	۷	۱/۰۰۰	۷	۰-۰
	کندم وارداتی	۱۹۹۵	۲۴	۱/۰۰۰	۲۳	۰/۳۶-۸/۷
	آرد سفید گندم	۱۹۹۹	۳۱	۰/۲۵۰	۳۰	۰/۰۴۸-۱/۵
	گندم کنجاله	۱۹۹۹	۱۹	۰/۲۵۰	۱۹	۰-۰
سوئد	دانهٔ گندم	۹۸-۱۹۹۶	۵۷	۰/۱	۴۱	۰/۲۴-۲/۳
		۱۹۹۹	۷۵	۰/۰۵	۳۶	۰/۳۷-۵/۲
برزیل	دانهٔ گندم	۹۰-۱۹۸۸	۱۶	۵	۱۵	۲/۵-۴۰
		۱۹۹۰	۲۰	۵	۲۰	۰-۰
	فرآورده‌های گندم	۱۹۹۱	۳۸	۵	۳۸	۰-۰
آمریکا	دانهٔ گندم	۱۹۹۷	۳۸۳	۰/۰۳	۳۲۷	NR-۳۱/۴
فنلاند	دانهٔ گندم	۱۹۹۶	۳۴	۰/۸۰۰	۳۲	۱۸/۲-۴۳۰
دبی	آرد گندم	گزارش نشده	۱۱	۰/۵۰۰	۱۰	۰/۰۲۳-۰/۲۵
اروگوئه	دانهٔ گندم	۹۵-۱۹۹۳	۱۲۳	۵۰	۱۲۳	۰-۰
انگلیس	دانهٔ گندم	۹۸-۱۹۹۷	۱۴۸	۰/۲۰۰	۱۲۶	۰/۳-۹/۲
		۱۹۹۶	۷۶	۰/۲۰۰	۷۴	۰/۰۴۲-۲/۴
	غلات و آرد	۱۹۹۶	۶۷	۰/۲۰۰	۳۰	NA-۶/۴

روش بررسی

با کمک نرم‌افزار Gpower و با توجه به تعداد ۴ کارخانهٔ آرد فعال موجود در استان خوزستان (شرکت آرد مهزیار، شرکت آرد اهواز، شرکت آرد جنوب، شرکت آرد خوزستان) حجم نمونه‌های مورد نیاز، کلاً ۳۲ نمونه آرد مرکب Composite (هشت نمونه از هریک از کارخانه‌ها) برآورد شد که از محل کارخانه‌ها جمع‌آوری می‌گردید. بدین ترتیب که به هر یک از کارخانه‌های فوق، هشت بار در روزهای متفاوت از دو ماه (در زمستان سال ۱۳۸۸) مراجعه می‌شد و در هر بار مراجعه از ۱۰ کیسه آرد و از هر کیسه، ۲۵۰ گرم آرد برداشته و سپس با هم مخلوط می‌شد و یک نمونهٔ مرکب تهیه و عملیات بر روی این نمونه‌های مرکب انجام می‌شد.

کلیهٔ ظروف به‌کار رفته در این بررسی، ابتدا چندین ساعت در محلول ۲ مولار اسید سولفوریک خیسانده می‌شدند و پس از چندین بار شست‌وشو 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 شیماتزو ژاپن مدل 10ADvp مجهز به دتکتور فلورسانس RF-10AXL و کنترل‌کنندهٔ سیستم 10Avp و حباب‌گیر 14A و کنترل‌کنندهٔ جریان 10ALvp و ستون C۱۸ به ابعاد ۱۵۰×۴/۶mm، اندازهٔ ذره‌ای ۵µm (شرکت Capital انگلیس) و نرم‌افزار LC-solution استفاده شد.

متانول، اسید استیک گلاسیال، استونیتریل و محلول ذخیرهٔ استاندارد اکراتوکسین A با غلظت ppb ۱۰۰۰ 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.

برای تهیهٔ بافر نمکی فسفات (PBS) با pH = ۷/۴، ۰/۲ گرم کلرید پتاسیم، ۰/۲ گرم پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات بدون آب، ۲/۲ گرم دی‌سدیم هیدروژن فسفات ۷ مولکول آبه و ۸ گرم کلرور سدیم در ۹۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر حل و با استفاده از سود ۰/۱ و یا اسید کلریدریک ۰/۱ مولار، pH آن روی ۷/۴ تنظیم کرده، سپس به حجم یک لیتر رسانده شد.

از مخلوط استونیتریل، آب دیونیزه و استیک اسید گلاسیال به ترتیب به نسبت‌های حجمی (۴۹/۵ : ۴۹/۵ :۱) با سرعت جریان ml/min ۱/۵ به‌عنوان فاز متحرک، استفاده شد.

برای رسم منحنی کالیبراسیون و تعیین رابطهٔ بین سطوح زیر منحنی پیک‌ها و غلظت‌های مختلف محلول استانداردهای مصرفی اکراتوکسین A، غلظت‌های۰/۱، ۲/۵، ۵ و ppb ۱۰ از محلول ذخیرهٔ استاندارد اکراتوکسین A تهیه و به دستگاه HPLC تزریق گردید. رابطهٔ خط به دست آمده و ضریب همبستگی (۱) نشان‌دهندهٔ رابطهٔ خطی مطلوب بین غلظت‌ها و سطوح زیر منحنی پیک‌ها در این محدودهٔ کاری بود (نمودار ۱).

در روش به‌کار رفته، حداقل غلظت قابل تشخیص (LOD) بر اساس نسبت پاسخ دستگاه به نوسانات زمینه‌ای (S/N =۳)، برابر ng/g ۰/۰۰۷۵ و حداقل غلظت قابل تعیین مقدار (LOD) با توجه به نسبت (S/N =۱۰)، ng/g ۰/۰۲۵ تعیین شد. منظور از S پاسخ دستگاه و N نوسانات زمینه‌ای دستگاه می‌باشد.

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 بقیهٔ روزها یک بـار، و تعیین درصد انحراف معیار نسبی بررسـی شـد (جـدول ۲). برای تعیـین کـارایی روش در اسـتخراج اکراتوکسـین A از نمونه‌های آرد مورد بررسی، ابتـدا یکـی از نمونـه‌هـا بـدون هیچ‌گونه افزایشی از استاندارد اکراتوکسین A بـه آن نمونـه، مطابق روش کار، استخراج و آنالیز گردید (این عمل سه بـار انجام شد). سپس یک میلی‌لیتر بـه ترتیـب از اسـتانداردهای ۰/۱، ۲/۵، ۵ ppb توسط گاز خلاء خشک شد و سـپس بـه هر یک از غلظت‌ها، ۲۰ میلی‌لیتر از نمونه زیر صـافی اضـافه و مطابق روش کار استخراج و آنالیز شدند و این عمل بـرای هر غلظت شش بار تکرار شد (جدول ۳).

به منظور استخراج اکراتوکسین A از هر یـک از نمونـه-های آرد جمع‌آوری شده، به ۲۰ گرم از هـر نمونـه آرد، ml ۱۰۰ از مخلوط متانول و بافر به نسبت (۵۰:۵۰) اضـافه و در مخلوط‌کن به مدت دو دقیقه مخلوط و از کاغذ صافی عبـور داده می‌شدند. پس از افزایش ml ۳۰ از محلـول PBS بـه ۲۰ml از هر یک از محلول‌های زیـر صـافی، از سـتون‌هـای ایمونوافینیتی مخصوص اکراتوکسین A با سرعت دو تا سـه میلی‌متر در دقیقه عبور داده می‌شدند. ستون‌ها بـا ۱۰ میلـی-لیتر آب شسته شده و سـپس اکراتوکسـین A از هـر یـک از ستون‌ها توسط ۳ml متانول مخصوص HPLC جدا شـدند. محلول‌های متانولی توسـط گـاز ازت تبخیـر و باقیمانـده‌هـا هریک در ml ۱ فاز متحرک حل و با تزریق ۲۰۰ میکرولیتـر از آنها به دستگاه HPLC آنالیز شدند (۱۷).

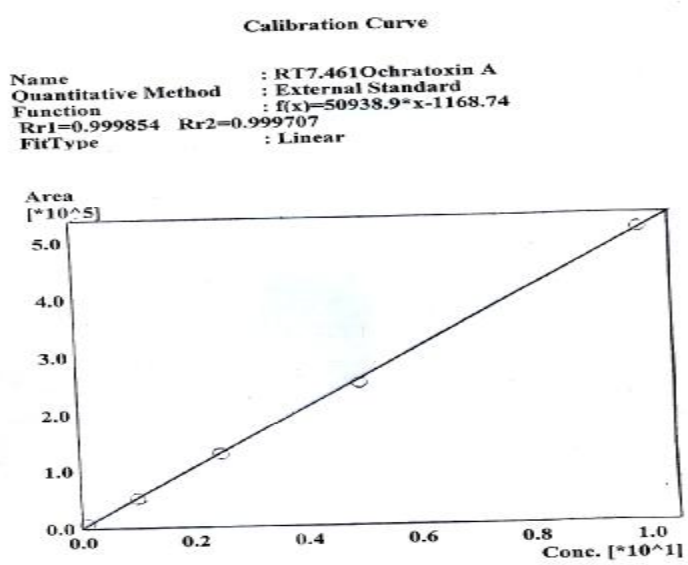
حضور اکراتوکسـین A در نمونـه‌هـای آرد، بـا تکنیـک مقایسهٔ مستقیم با استفاده از استاندارد خارجی تأییـد (شـکل ۲و۳) و غلظت آنها از منحنـی کالیبراسـیون توسـط دسـتگاه HPLC بر حسب ng/ml تعیین می‌گردید (جدول ۴).

برای بیان این غلظت بر حسب نانو گرم اکراتوکسـین A در هر گرم آرد، چون ۲۰ میلی‌لیتر از ۱۰۰ میلی‌لیتـر محلـول استخراجی به‌کار برده شده جهت اسـتخراج ۲۰ گـرم نمونـهٔ آرد، از ستون عبور داده شد (یک پـنجم از ۲۰ گـرم نمونـه، یعنی ۴ گـرم آرد)، اعـداد حاصـل از دسـتگاه را بـر عـدد ۴ تقسیم و غلظت‌های اکراتوکسین در نمونه‌ها بر حسب ng/g آرد محاسبه شدند.

آنـالیز آمـاری داده‌هـا بـه کـمک نـرم‌افـزار آمـاری $SPSS_{18}$ انجام شـد. بـه منظـور مقایسـهٔ میـانگین سـطوح اکراتوکسین A در نمونه‌های آرد تولیدی کارخانه‌های مـورد بررسی بـا حـد مجـاز تعیین شده در استاندارد ملی ایـران (۵ µg/kg) از آزمـون One sample- T Test و بـرای مقایسهٔ میزان آلودگی نمونه‌های مورد بررسی از کارخانه‌ها با یکدیگر از آزمون ANOVA استفاده شد.

یافته‌ها

نمـودار ۱ منحنـی کالیبراسـیون بـرای تعیـین غلظـت اکراتوکسـین A و جـداول ۲و۳ ترتیـب تکرارپـذیری و تجدیدپذیری نتایج و درصد بازیافت اکراتوکسـین A از آرد در سه سطح غلظتی مختلف را نشان می‌دهند. مقادیر غلظت اکراتوکسین در نمونه‌های آرد مورد بررسی در جـدول ارائـه شده است. شـکل‌هـای ۲و ۳ بـه ترتیـب کروماتوگرام‌هـای مربوط به استاندارد اکراتوکسـین A (۱۰ppb) و نمونـهٔ آرد گندم آلوده به اکراتوکسین می‌باشد.



نمودار ۱: منحنی کالیبراسیون اکراتوکسین A در ناحیهٔ غلظتی ppb۱۰ – ۰/۱

جدول ۲: تکرارپذیری و تجدیدپذیری نتایج اکراتوکسین A (نتایج میانگین شش‌بار تزریق)

غلظت OTA ppb	میانگین سطح $(mV*S)$ بین یک روز	میانگین سطح $(mV*S)$ درون روزها	RSD(%). بین یک روز	RSD(%) درون روزها
۰/۱	۶۵۱۸/۴	۶۲۹۲/۴	۱۵/۰۸۷	۱۴/۹۸۳
۱	۴۹۹۳۳/۴	۴۹۷۲۲/۳	۲/۵۱۵	۲/۵۸۱
۲/۵	۱۲۶۴۰۹/۹	۱۲۶۴۸۰/۴	۲/۲۸۷	۲/۳۲۷
۵	۲۴۷۷۵۰/۶	۲۴۴۷۲۶/۲	۱/۲۲۳	۱/۵۷۰
۱۰	۵۱۱۰۰۸/۳	۵۰۷۰۲۴/۹	۰/۶۴۲	۱/۱۲۱

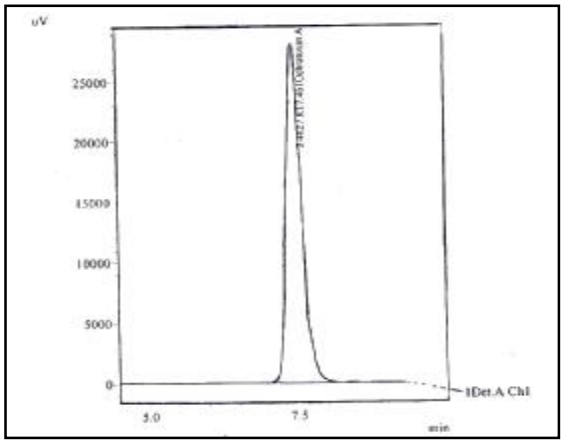
جدول۳: درصد بازیافت اکراتوکسین A در آرد در سه سطح غلظتی مختلف ۰/۱، ۲/۵ و ۵ ppb (نتایج میانگین ۶ اندازه‌گیری برای هر فرآورده).

فرآورده	مقدار اکراتوکسین A اضافه شده (ppb)	مقدار اکراتوکسین A به‌دست آمده (ppb)	بازیافت ٪
آردگندم	۰/۱	۰/۱۰۱	۱۰۱
	۲/۵	۲/۲	۸۸
	۵	۴/۷۵	۹۵

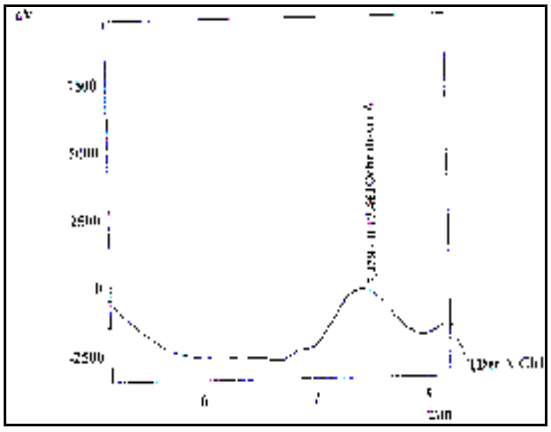
جدول ۴: میزان آلودگی به اکراتوکسین A بر حسب ng/g در نمونه‌های آرد گندم کارخانه‌های مورد بررسی

نام کارخانه	تعداد نمونهٔ مورد بررسی	نمونه‌های آلوده		تعداد نمونه‌های دارای آلودگی کمتر از LOD*	دامنهٔ آلودگی (ng/g)	آلودگی	
		تعداد (n)	درصد(٪)			میانگین ($\bar{x}$)	انحراف معیار(SD)
آرد مهزیار	۸	۷	۸۷/۵	–	۰/۰۶–۰/۸۰۹	۰/۲۴۰	۰/۲۸۶
آرد جنوب	۸	۷	۸۷/۵	۱	۰/۰۰۴–۰/۰۸۳	۰/۰۳۲	۰/۰۲۵
آرد خوزستان	۸	۸	۱۰۰	–	۰/۰۵۴–۰/۰۹۱	۰/۰۷۲	۰/۰۱۴
آرد اهواز	۸	۸	۱۰۰	–	۰/۰۰۸–۰/۰۲۵	۰/۰۱۶	۰/۰۰۶
مجموع کارخانه‌ها	۳۲	۳۰	۹۳/۷۵	۱	۰/۰۰۴–۰/۸۰۹	۰/۰۹۰	۰/۱۶۴

LOD* = limit of detection (0.0075ng/g)



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



شکل۳: کروماتوگرام مربوط به نمونهٔ آرد گندم

بحث

از ۳۲ نمونه آرد گندم جمع‌آوری شده از کارخانجات آرد استان خوزستان در زمستان سال ۱۳۸۸، ۳۰ نمونه در غلظتی با میانگین ۰/۰۹ ppb و ماکزیمم ۰/۸۰۹ppb به اکراتوکسین A آلودگی داشتند. خوشبختانه میزان آلودگی نمونه‌های مورد بررسی از تمامی کارخانه‌ها به طور معناداری از حداکثر حد مجاز تعیین شده (۵ ng/g) پایین‌تر بود. میزان آلودگی به اکراتوکسین A در نمونه‌های شرکت آرد مهزیار با نمونه‌های سه شرکت دیگر اختلاف معناداری نداشتند، در حالی‌که میزان آلودگی نمونه‌های شرکت آرد خوزستان در مقایسه با نمونه‌های شرکت آرد جنوب و شرکت آرد اهواز، دارای اختلاف معناداری بوده، سطوح آلودگی بالاتری داشتند. میزان آلودگی نمونه‌های شرکت آرد جنوب و شرکت آرد اهواز با هم اختلاف معناداری نداشتند.

در ایران مطالعه‌ای بر شیوع اکراتوکسین A در گندم و یا آرد آن انجام نشده است، ولی در سال ۱۳۸۶ زهرا هادیان و همکارانش مطالعه‌ای بر میزان شیوع اکراتوکسین A در برنج فروشگاه‌های زنجیره‌ای شهر تهران انجام داده‌اند. آنها برای این منظور از ۱۳ فروشگاه زنجیره‌ای شهر تهران به روش تصادفی ساده ۱۰۰ نمونه برنج بسته‌بندی شده و باز خریداری کردند که ۸۰ نمونه، برنج داخلی و ۲۰ نمونه، برنج وارداتی بود. بر اساس نتایج آنها، میزان آلودگی به اکراتوکسین A در ۹۷ درصد نمونه‌های برنج مورد بررسی کمتر از حد مجاز تعیین شده اکراتوکسین در گندم (µg/kg ۵) توسط استاندارد ملی و تحقیقات صنعتی ایران، بود. در تحقیق حاضر، سطوح آلودگی به اکراتوکسین A نمونه‌های برنج وارداتی، کمتر از انواع داخلی بود. دامنهٔ تغییرات آلودگی به اکراتوکسین A در انواع برنج وارداتی ۱/۰۷ – ۰/۱۵و در انواع برنج داخلی۴۶/۷۶ – ۰/۱۵ میکروگرم به ازای هر کیلوگرم بود (۱۸).

نتایج بررسی شاتول (Shotwell) و همکارانش بر روی ۱۴۲ نمونهٔ 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 (۱۹).

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 ۹۰درصد نمونه‌ها حداقل به یکی از مایکوتوکسین-های مورد بررسی آلودگی داشتند. ولی فوموزین و اکراتوکسین A در هیچ‌یک از غلات مورد بررسی مشاهده نشد (۲). نتایج این تحقیق نیز با نتایج مطالعهٔ حاضر 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 جمع-آوری نتایج سایر مطالعات انجام شده در این خصوص و الگوی مصرفی در کره، دریافت احتمالی روزانهٔ اکراتوکسین A را در برای همهٔ افراد کره‌ای، در محدودهٔ ۴/۱ – ۰/۸ برآورد کردند. در حالی‌که برای مصرف‌کنندگان سنگین‌وزن ۹/۱ – ۱/۷ نانو گرم بر کیلوگرم وزن بدن برآورد کردند (۶). آنها 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 (۶).

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 µg/kg ۵ تعیین شده است، در حالی‌که برای فرآورده‌های غلات حداکثر حد مجاز ng/g ۳ تعیین شده است.

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 (۲۰). کلستیرآمین نیز باعث دفع اکراتوکسین از طریق مدفوع می‌شود (۲۱). البته موارد فوق در مرحلهٔ آزمایشگاهی ثابت شده‌اند و هنوز برای انسان ایمنی و بی‌خطری آنها به طور کامل مشخص نشده است.

نتیجه‌گیری

با برجسته‌شدن مفهوم توسعهٔ 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(WTO) (World Trade Organization) صورت خواهد گرفت و رعایت استانداردهای بین‌المللی در مورد کالاهای تجاری امری اجتناب‌ناپذیر است. ایران در آستانهٔ پیوستن به WTO قرار گرفته است، بنابراین باید، بر اساس قوانین تجاری، کالاهای خود را صادر نماید. در این راستا شناخت سیستم HACCP (Hazard Analysis Critical Control Point(HACCP))، اصول و کاربرد آن در صنعت غذا امری ضروری است. چرا که HACCP یک سیستم آگاهی-دهندهٔ مداوم و جامع دربارهٔ ایمنی غذا است که برای پیش-گیری از پیشرفت خطرات در صنعت، طراحی شده و بنابراین درجهٔ بالایی از ایمنی غذا را تضمین می‌کند. با کاربرد سیستم HACCP می‌توان از فساد محصولات و به هدر رفتن آنها جلوگیری کرده و اقتصاد جامعه را بهبود بخشید (۲۲). نیاز اولیه جهت کاربرد سیستم HACCP، آگاهی از وضعیت کیفی و کمی آلودگی اقلام غذایی به آلاینده‌ها می‌باشد.

مأموریت اصلی وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی بر اساس سند چشم‌انداز بیست ساله و قانون برنامهٔ چهارم توسعه، تأمین سلامت، تضمین ایمنی حیات مردم و توجه به پیش‌گیری و بهداشت است. این در شرایطی است که بهداشت و ایمنی غذا نیز متضمن سلامت مردم محسوب می‌شود و توجه به آن از درجهٔ اهمیت بالایی برخوردار است. به نحوی که کشورهای مختلف دنیا در این خصوص، سرمایه‌گذاری‌های کلانی را کرده‌اند.

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 روز افزون به بررسی سطوح آنها به‌طور پیوسته در مواد غذایی، آب و گیاهان برای تعیین دریافت مجاز روزانه، جلب می‌نماید.

قدردانی

این مقاله از پایان‌نامهٔ آقای رضا حیدری فارغ‌التحصیل دکترای حرفه‌ای داروسازی استخراج گردیده که به عنوان طرح تحقیقاتی با کد ۸۹۰۰۱ U تصویب و از طرف معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز تأمین اعتبار، و در دانشکدهٔ داروسازی اجرا شد. بدین‌وسیله از دانشکدهٔ داروسازی و کلیهٔ همکاران گرامی در معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تقدیر و تشکر می‌گردد.

منابع

1-Cabañas R, Bragulat MR, Abarca ML, Castellá G, Cabañes FJ. Occurrence of Penicillium verrucosum in retail wheat flours from the Spanish market. Food Microbiol 2008;25(5):642-7.

2-Tabuc C, Marin D, Guerre P, Sesan T, Bailly JD. Molds and mycotoxin content of cereals in southeastern Romania. J Food Prot 2009;72(3):662-5.

3-Prange A, Modrow H, Hormes J, Krämer J, Köhler P. Influence of mycotoxin producing fungi (Fusarium, Aspergillus, Penicillium) on gluten proteins during suboptimal storage of wheat after harvest and competitive interactions between field and storage fungi. J Agric Food Chem 2005;53(17):6930-8.

4-Anli E, Alkis IM. Ochratoxin A and Brewing Technology: A Review. J I Brewing 2010;116(1):23-32.

5-Czaban J, Wróblewska B, Stochmal A, Janda B. Growth of Penicillium verrucosum and production of ochratoxin A on nonsterilized wheat grain incubated at different temperatures and water content. Pol J Microbiol 2006;55(4):321-31.

6-Park JW, Chung SH, Kim YB. Ochratoxin A in Korean food commodities: occurrence and safety evaluation. J Agric Food Chem 2005;53(11):4637-42.

7-Tangni EK, Pussemier L. Ochratoxin A and citrinin loads in stored wheat grains: impact of grain dust and possible prediction using ergosterol measurement. Food Addit Contam 2006;23(2):181-9.

8-Beltrán E, Ibáñez M, Sancho JV, Hernández F. Determination of mycotoxins in different food commodities by ultra-high-pressure liquid chromatography coupled to triple quadrupole mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom 2009;23(12):1801-9.

9-Magan N, Aldred D, Mylona K, Lambert RJ. Limiting mycotoxins in stored wheat. Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess 2010;27(5):644-50.

10-O'Callaghan J, Dobson ADW. Molecular Characterization of Ochratoxin A Biosynthesis and Producing Fungi. In: Allen I, Laskin JWBGMG, Sima S, editors. Advances in Applied Microbiology. New York: Academic Press; 2005. p. 227-43. (Vol 58)

11-Zain ME. Impact of mycotoxins on humans and animals. J Saudi Chem Soc 2011;15(2):129-44.

12-Vrabcheva T, Usleber E, Dietrich R, Märtlbauer E. Co-occurrence of ochratoxin A and citrinin in cereals from Bulgarian villages with a history of Balkan endemic nephropathy. J Agric Food Chem 2000;48(6):2483-8.

13-International Agency for Research on Cancer (IARC) Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans Number 56. Lyon (France): IARC Press; 1993. Some naturally occurring substances: Food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins; pp. 489–521.

14-Osborne BG, Ibe F, Brown GL, Petagine F, Scudamore KA, Banks JN, et al. The effects of milling and processing on wheat contaminated with ochratoxin A. Food Addit Contam 1996;13(2):141-53.

15-Frohlich AA, Marquardt RR, Ominski KH. Ochratoxin A as a contaminant in the human food chain: a Canadian perspective. IARC Sci Publ 1991;(115):139-43.

16-Creppy EE. Update of survey, regulation and toxic effects of mycotoxins in Europe. Toxicol Lett 2002;127(1–3):19-28.

17-Bento JMV, Pena A, Lino CM, Pereira JA. Determination of ochratoxin A content in wheat bread samples collected from the Algarve and Bragança regions, Portugal: Winter 2007. Microchem J 2009;91(2):165-9.

18-Hadian Z, Yazdanpanah H, Azizi MH, Seyedahmaian F, Kooshki MR, Hosseinipanjaki SM, et al. Occurrence of ochratoxin A in rice sold in chain stores in Tehran, 2007. J Nutr Sci Food Technol 2009;42(2):53-9. [In Persian]

19-Shotwell OL, Goulden ML, Bennett GA, Plattner RD, Hesseltine CW. Survey of 1975 wheat and soybeans for aflatoxin, zearalenone, and ochratoxin. J Assoc Off Anal Chem 1977;60(4):778-83.

20-Creppy EE, Baudrimont I, Betbeder AM. Prevention of nephrotoxicity of ochratoxin A, a food contaminant. Toxicol Lett 1995;82-83:869-77.

21-Madhyastha MS, FrohlichAA, Marquardt RR. Effect of dietary cholestyramine on the elimination pattern of ochratoxin A in rats. Food Chem Toxicol 1992;30(8):709-14.

22-Majewski MC. Food safety: the HACCP approach to hazard control. Commun Dis Rep CDR Rev 1992;2(9):R105-8.

Identification and Determination of Ochratoxcin A Concentration in Wheat Flour of Flour Factories in The Ahvaz city Using HPLC

Abdolazim Behfar[1], Zahra Nazari[2] *, Reza Heydari [3]

1-Associate of Food Science and Medical Hydrology.
2-Lecturer of Toxicology.
3-Pharmacist.

1-Department of Food Science and Medical Hydrology, Pharmacy School, Research Center for Safety Assessment, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.
2-Department of Pharmacology & Toxicolog, Pharmacy School, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.
3-Pharmacist.

**Corresponding author:*
Zahra Nazari Khorasgani, Department of Pharmacology & Toxicolog, School of Pharmacy, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.
Tel:+989161118108
Email:znazarikh@yahoo.com

Abstract

Background and Objective: Ochratoxin A (OTA) is the most poisonous of ochratoxins, with nephrotoxicity and carcinogenicity toxic effects. This study was carried out to identify and determine the concentration of OTA in wheat flour produced by four factories in Ahvaz city using HPLC method.

Subjects and Methods: In order to separation and quantification of OTA in produced wheat flour of 4 factories in Ahvaz, 8 times, each time, one composite samples from wheat flour of each factory which comprising 20 grab samples was taken. An adequate of each sample mixed with methanol- phosphate buffer, filtered; an aliquot of the filtered was diluted and purified by running through a immunoaffinity column. The column was washed with water; then OTA was eluted by methanol. The eluted was concentrated to dryness under a gentle nitrogen stream. Finally, the residue was dissolved in mobile phase and analyzed by HPLC using column (150 mm ×4.6 mm ID, 5 µm C18 stationary phase) with a fluorescence detector (excitation and emission wavelength was 333 nm 460 nm respectively), mobile phase of acetonitrile-water-glacial acetic acid (49.5:49.5:1) and at flow rate of 1.5 mL/min The limits of detection and quantification were 0.0075 and 0.025 ng/g, respectively.

Results: Thirty (93.75%) out of 32 samples were contaminated with OTA, at concentration ranging from 0.004 to 0.809 ng/g, with an average of 0.09 ng/g.

Conclusion: The results showed that all of the samples had lower levels of OTA than maximum tolerable limit of 5 ng/g assigned by Institute of Standard and Industrial Research of Iran(ISIRI) for wheat and WHO guidelines.

Keywords: OchratoxinA, HPLC, Flour.

►*Please cite this paper as:*
Identification and Determination of Ochratoxcin A Concentration in Wheat Flour of Flour Factories in The Ahvaz city Using HPLC.Behfar A, Nazari Z, Heydari R. Jundishapur Sci Med J 2013;12(2):217-227

Received: Aug 14, 2011 **Revised: Feb 11, 2013** **Accepted: Mar 10, 2013**