

(مقاله پژوهشی)

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

عبدالعظیم بهفر^۱، زهرا نظری^{۲*}، رضا حیدری^۳

چکیده

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

روش بررسی: به منظور شناسایی و تعیین اوکراتوکسین 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 مونوآفینیتی مخصوص اوکراتوکسین عبور داده شد. آنگاه ستون را با آب مقطر شسته و سرانجام اوکراتوکسین باند شده به ماده 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 C18 (ابعاد ۱۵۰×۴/۶mm، اندازه ذره‌ای ۵μm)، دتکتور فلورسانس (طول موج برانگیختگی ۳۳۳nm، نشر ۴۶۰nm)، استفاده آب: استونیتریل و استیک اسید گلاسیال (۴۹/۵:۱) به‌عنوان فاز متحرک با سرعت جریان ۱/۵ml/min، آنالیز شدند.

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

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

کلید واژگان: اوکراتوکسین A، HPLC، آرد.

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

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

* نویسنده مسؤول:

زهرا نظری خوراسگانی، گروه فارماکولوژی و سم‌شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی-شاپور اهواز، ایران.

تلفن: ۰۰۹۸۹۱۶۱۱۱۸۱۰۸

Email: znazarikh@yahoo.com

مقدمه

سمی اوکراتوکسین A می‌باشند (۴، ۱۱، ۱۲). طبق طبقه‌بندی آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان (International Agency for Research on Cancer) اوکراتوکسین A جزو گروه B ۲ می‌باشد (۱۳). اوکراتوکسین A ترکیبی نسبتاً مقاوم در برابر حرارت است که از طریق زنجیره غذایی به انسان منتقل می‌گردد (۱۴، ۱۵). جدول ۱ خلاصه‌ای از نتایج تحقیقات آلودگی به اوکراتوکسین 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 $\mu\text{g}/\text{kg}$) از حد مجاز تعیین شده اتحادیه اروپا بوده و در مواردی بالاتر از این حد اعلام شده، است (۱۳).

جلوگیری از رشد قارچ‌های مولد سم در محصولات کشاورزی به جلوگیری از تولید میکوتوکسین‌ها 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 ستون‌های ایمونوآفینیتی حاوی آنتی‌بادی‌های اختصاصی (IAC) برای جداسازی اوکراتوکسین‌ها 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 مسائلی نظیر جداسازی ناقص فازها، بازیافت‌هایی کمتر از حد قابل قبول جهت تعیین مقدار و تشکیل امولسیون که خاص روش استخراج مایع-مایع می‌باشد، برتری دارد و در این بررسی از آن استفاده شده است.

گندم محصولی استراتژیک و مهم در زندگی انسان محسوب می‌شود و با اطمینان می‌توان گفت که پر مصرف-ترین محصول کشاورزی است که در صورت آلودگی، در به خطر انداختن سلامت انسان می‌تواند نقش مهمی ایفا نماید. گندم در مزرعه و انبار می‌تواند به وسیله میکروارگانسیم‌های مختلف به ویژه قارچ‌ها، مورد تهاجم قرار گیرد. اوکراتوکسین‌ها (Ochratoxins) گروهی از میکوتوکسین‌ها هستند که به وسیله گونه‌هایی از قارچ‌های اسپرزیلوس و پنی‌سیلیوم مانند اسپرزیلوس اوخراسئوس (*Aspergillus ochraceus*) و پنی‌سیلیوم یریدیکاتوم (*Penicillium viridicatum*)، تولید می‌شوند (۱-۵).

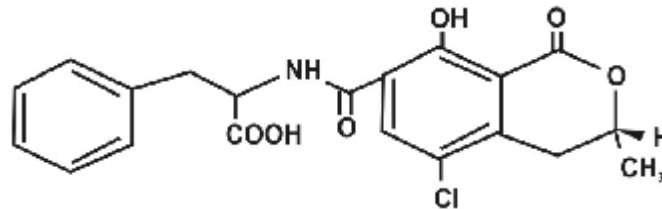
انواع اوکراتوکسین‌ها عبارتند از: A، B و C که در این میان، اوکراتوکسین A سمی‌ترین نوع اوکراتوکسین است و به عنوان آلاینده طبیعی غذایی انسانی و حیوانی به ویژه محصولات گیاهی نظیر: غلات، باقلا و لوبیا و همچنین گوشت و ماهی خشک شده، محسوب می‌شود. قارچ‌های مولد اوکراتوکسین A، اغلب در خاک و ضایعات کشاورزی حضور دارند و باعث آلودگی شدید بسیاری از محصولات کشاورزی انباری می‌شوند (۶-۹).

اوکراتوکسین A یک ترکیب بی‌رنگ بلوری شکل با وزن مولکولی $403/82$ دالتون و دارای فرمول مولکولی $C_{20}H_{18}NClO_6$ می‌باشد. اوکراتوکسین A جزو ترکیبات فنیل آلانینی بوده که دارای یک هسته ایزوکومارینی می‌باشد (شکل ۱) (۴، ۱۰).

اوکراتوکسین A یکی از عوامل مرگ و میر انسان و حیوانات در نواحی واجد آلودگی می‌باشد. این ترکیب با فرایندهای مختلف سلولی نظیر سنتز پروتئین‌ها، متابولیسم انرژی و فعالیت‌های مختلف آنزیمی تداخل دارد. ژنوتوکسیسیته (Genotoxicity)، سمیت کلیوی، ناقص الخلقه‌زایی (Teratogenicity) و سرطان‌زایی از اثرات

شناسایی و تعیین مقدار اکرآتوکسین A در آرد گندم کارخانه‌های آرد شهر اهواز با به‌کارگیری روش HPLC، انجام شد.

از روش‌های متداول جهت تعیین مقدار اکرآتوکسین‌ها، می‌توان از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)، کروماتوگرافی بر لایه نازک (TLC) و روش‌های ایمنولوژیک نظیر آلیزا (ELISA) نام برد. در این تحقیق،



شکل ۱: ساختمان شیمیایی اکرآتوکسین A (۴).

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

کشور	کالا	سال	تعداد نمونه	LOQ (ppb)	<LOQ	میانگین-ماکزیمم
آلمان	دانه گندم	۱۹۹۵-۹۸	۳۵	۰/۰۱	۲۱	۰/۱۱-۰/۶۵
	آرد گندم	۱۹۹۵-۹۸	۹۸	۰/۰۱	۱۶	۰/۱۰-۱
	آرد سبوس گندم	۱۹۹۵-۹۸	۸۳	۰/۰۱	۶	۰/۲۰-۱/۷۳
	گندم محلی	۱۹۹۵	۷	۱/۰۰۰	۷	۰-۰
هلند	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	دانه گندم	۱۹۹۹	۷۵	۰/۰۵	۳۶	۰/۳۷-۵/۲
	دانه گندم	۱۹۹۸-۹۰	۱۶	۵	۱۵	۲/۵-۴۰
برزیل	دانه گندم	۱۹۹۰	۲۰	۵	۲۰	۰-۰
	فرآورده‌های گندم	۱۹۹۱	۳۸	۵	۳۸	۰-۰
آمریکا	دانه گندم	۱۹۹۷	۳۸۳	۰/۰۳	۳۲۷	NR-۳۱/۴
فنلاند	دانه گندم	۱۹۹۶	۳۴	۰/۸۰۰	۳۲	۱۸/۲-۴۳۰
دبی	آرد گندم	گزارش نشده	۱۱	۰/۵۰۰	۱۰	۰/۰۲۳-۰/۲۵
	دانه گندم	۱۹۹۳-۹۵	۱۲۳	۵۰	۱۲۳	۰-۰
انگلیس	دانه گندم	۱۹۹۷-۹۸	۱۴۸	۰/۲۰۰	۱۲۶	۰/۳-۹/۲
	دانه گندم	۱۹۹۶	۷۶	۰/۲۰۰	۷۴	۰/۰۴۲-۲/۴
	غلات و آرد	۱۹۹۶	۶۷	۰/۲۰۰	۳۰	NA-۶/۴

روش بررسی

با کمک نرم افزار Gpower و با توجه به تعداد ۴ کارخانه 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 هر یک 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 نمونه مرکب تهیه و عملیات بر روی این نمونه‌های مرکب انجام می‌شد.

کلیه 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 کنترل‌کننده سیستم 10Avp و حباب‌گیر 14A و کنترل‌کننده جریان 10ALvp و ستون C₁₈ به ابعاد ۱۵۰×۴/۶mm، اندازه ذره‌ای ۵μm (شرکت Capital انگلیس) و نرم افزار LC-solution استفاده شد.

متانول، اسید استیک گلاسیال، استونیتریل و محلول ذخیره استاندارد اکرآتوکسین A با غلظت ۱۰۰۰ ppb در متانول با درجه خلوص بسیار بالا و مخصوص دستگاه HPLC از نمایندگی شرکت Sigma و ستون‌های ایمونوآفینیتهی مخصوص اکرآتوکسین A به نام پوری فست

(Puri-Fast) از نمایندگی شرکت BIOS-LI در ایران تهیه شد.

برای تهیه 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 آب 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 ۱/۵ ml/min به‌عنوان فاز متحرک، استفاده شد.

برای رسم منحنی کالیبراسیون و تعیین رابطه بین سطوح زیر منحنی پیک‌ها و غلظت‌های مختلف محلول استاندارد‌های مصرفی اکرآتوکسین A، غلظت‌های ۰/۱، ۲/۵، ۵ و ۱۰ ppb از محلول ذخیره استاندارد اکرآتوکسین A تهیه و به دستگاه HPLC تزریق گردید. رابطه خط به دست آمده و ضریب همبستگی (۱) نشان‌دهنده رابطه خطی مطلوب بین غلظت‌ها و سطوح زیر منحنی پیک‌ها در این محدوده 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 ۰/۰۰۷۵ng/g و حداقل غلظت قابل تعیین مقدار (LOD) با توجه به نسبت (S/N = ۱۰)، ۰/۰۲۵ ng/g تعیین شد. منظور از S پاسخ دستگاه و N نوسانات زمینه‌ای دستگاه می‌باشد.

تکرارپذیری و تجدیدپذیری روش با تزریق محلول استاندارد اکرآتوکسین A به دستگاه HPLC، در غلظت‌های ۰/۱، ۱، ۲، ۵/۵ و ۱۰ ppb در هفت روز متوالی، در روز اول

۳ و ۲) و غلظت آنها از منحنی کالیبراسیون توسط دستگاه HPLC بر حسب ng/ml تعیین می‌گردید (جدول ۴). برای بیان این غلظت بر حسب نانو گرم اکراتوکسین A در هر گرم آرد، چون ۲۰ میلی‌لیتر از ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول استخراجی به کار برده شده جهت استخراج ۲۰ گرم نمونه آرد، از ستون عبور داده شد (یک پنجم از ۲۰ گرم نمونه، یعنی ۴ گرم آرد)، اعداد حاصل از دستگاه را بر عدد ۴ تقسیم و غلظت‌های اکراتوکسین در نمونه‌ها بر حسب ng/g آرد محاسبه شدند.

آنالیز آماری داده‌ها به کمک نرم‌افزار آماری SPSS18 انجام شد. به منظور مقایسه میانگین سطوح اکراتوکسین A در نمونه‌های آرد تولیدی کارخانه‌های مورد بررسی با حد مجاز تعیین شده در استاندارد ملی ایران ($5 \mu\text{g}/\text{kg}$) از آزمون One sample- T Test و برای مقایسه میزان آلودگی نمونه‌های مورد بررسی از کارخانه‌ها با یکدیگر از آزمون ANOVA استفاده شد.

یافته‌ها

نمودار ۱ منحنی کالیبراسیون برای تعیین غلظت اکراتوکسین A و جداول ۳ و ۲ ترتیب تکرارپذیری و تجدیدپذیری نتایج و درصد بازیافت اکراتوکسین A از آرد در سه سطح غلظتی مختلف را نشان می‌دهند. مقادیر غلظت اکراتوکسین در نمونه‌های آرد مورد بررسی در جدول ارائه شده است. شکل‌های ۲ و ۳ به ترتیب کروماتوگرام‌های مربوط به استاندارد اکراتوکسین A (۱۰ ppb) و نمونه آرد گندم آلوده به اکراتوکسین می‌باشد.

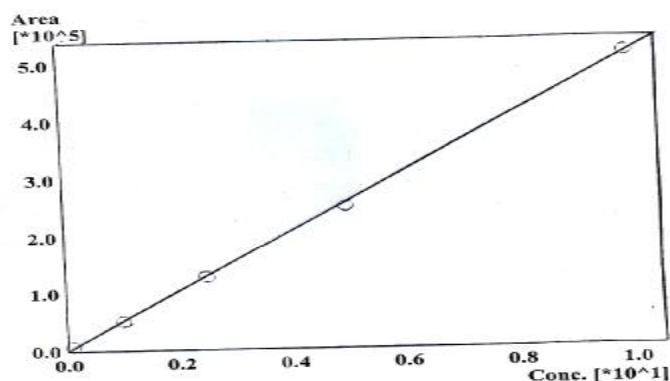
از هر غلظت استاندارد شش بار و در بقیه روزها یک بار، و تعیین درصد انحراف معیار نسبی بررسی شد (جدول ۲). برای تعیین کارایی روش در استخراج اکراتوکسین A از نمونه‌های آرد مورد بررسی، ابتدا یکی از نمونه‌ها بدون هیچ‌گونه افزایشی از استاندارد اکراتوکسین A به آن نمونه، مطابق روش کار، استخراج و آنالیز گردید (این عمل سه بار انجام شد). سپس یک میلی‌لیتر به ترتیب از استانداردهای ۰/۱، ۲/۵، ۵ ppb توسط گاز خلاء خشک شد و سپس به هر یک از غلظت‌ها، ۲۰ میلی‌لیتر از نمونه زیر صافی اضافه و مطابق روش کار استخراج و آنالیز شدند و این عمل برای هر غلظت شش بار تکرار شد (جدول ۳).

به منظور استخراج اکراتوکسین A از هر یک از نمونه‌های آرد جمع‌آوری شده، به ۲۰ گرم از هر نمونه آرد، ml ۱۰۰ از مخلوط متانول و بافر به نسبت (۵۰:۵۰) اضافه و در مخلوط‌کن به مدت دو دقیقه مخلوط و از کاغذ صافی عبور داده می‌شدند. پس از افزایش ml ۳۰ از محلول PBS به ml ۲۰ از هر یک از محلول‌های زیر صافی، از ستون‌های ایمونوآفینیتی مخصوص اکراتوکسین A با سرعت دو تا سه میلی‌متر در دقیقه عبور داده می‌شدند. ستون‌ها با ۱۰ میلی‌لیتر آب شسته شده و سپس اکراتوکسین A از هر یک از ستون‌ها توسط ml ۳ متانول مخصوص HPLC جدا شدند. محلول‌های متانولی توسط گاز ازت تبخیر و باقیمانده‌ها هر یک در ml ۱ فاز متحرک حل و با تزریق ۲۰۰ میکرولیتر از آنها به دستگاه HPLC آنالیز شدند (۱۷).

حضور اکراتوکسین A در نمونه‌های آرد، با تکنیک مقایسه مستقیم با استفاده از استاندارد خارجی تأیید (شکل

Calibration Curve

Name : RT7.461Ochratoxin A
 Quantitative Method : External Standard
 Function : f(x)=50938.9*x-1168.74
 Rr1=0.999854 Rr2=0.999707
 FitType : Linear



نمودار ۱: منحنی کالیبراسیون اکراتوکسین A در ناحیه غلظتی ۰/۱ - ۱۰ ppb

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

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

جدول ۳: درصد بازیافت اکراتوکسین A در آرد در سه سطح غلظتی مختلف ۰/۱، ۲/۵ و ۵ ppb

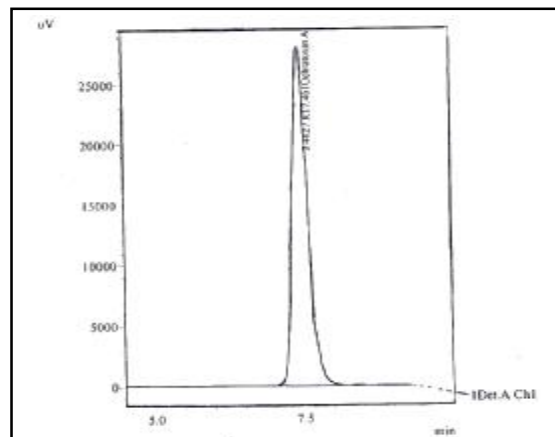
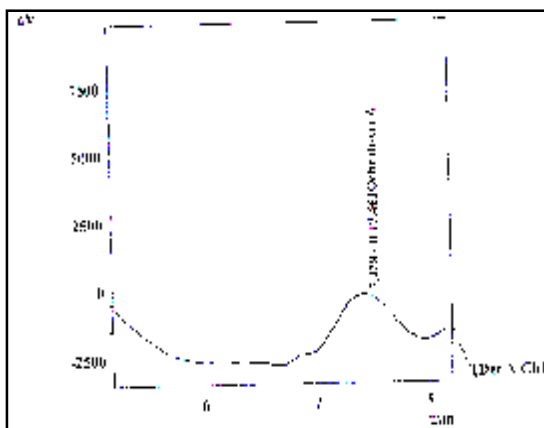
(نتایج میانگین ۶ اندازه‌گیری برای هر فرآورده).

فرآورده	مقدار اکراتوکسین A اضافه شده (ppb)	مقدار اکراتوکسین A به دست آمده (ppb)	بازیافت %
آرد گندم	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 نمونه مورد بررسی	نمونه‌های آلوده		تعداد نمونه‌های دارای آلودگی کمتر از LOD*	دامنه 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 (۱۰ ppb) شکل ۳: کروماتوگرام مربوط به نمونه آرد گندم

بحث

مهزیار با نمونه‌های سه شرکت دیگر اختلاف معناداری نداشتند، در حالی که 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.

از ۳۲ نمونه آرد گندم جمع‌آوری شده از کارخانجات آرد استان خوزستان در زمستان سال ۱۳۸۸، ۳۰ نمونه در غلظتی با میانگین 0.09 ppb و ماکزیمم 0.809 ppb به اکراتوکسین A آلودگی داشتند. خوشبختانه میزان آلودگی نمونه‌های مورد بررسی از تمامی کارخانه‌ها به طور معناداری از حداکثر حد مجاز تعیین شده (5 ng/g) پایین‌تر بود. میزان آلودگی به اکراتوکسین A در نمونه‌های شرکت آرد

نشد (۲). نتایج این تحقیق نیز با نتایج مطالعه حاضر همخوانی ندارد.

پارک (Park) و همکارانش در سال ۲۰۰۳ میزان اوکراتوکسین A را در اقلام مختلف مواد غذایی (برنج، آرد گندم جو، آبجو) کشور کره بررسی کرده‌اند. آنها با جمع‌آوری نتایج سایر مطالعات انجام شده در این خصوص و الگوی مصرفی در کره، دریافت احتمالی روزانه اوکراتوکسین A را در برای همه افراد کره‌ای، در محدوده $۰/۸ - ۴/۱$ برآورد کردند. در حالی که 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 توجهی از تماس با اوکراتوکسین A برای مصرف‌کنندگان متوسط کره‌ای، وجود ندارد (۶).

با توجه به آلودگی اکثر نمونه‌ها به اوکراتوکسین A، ضرورت توجه به این موضوع نمایان می‌شود. حداکثر حد مجاز آلودگی غلات به اوکراتوکسین A در کشورهای اروپایی و برزیل و آمریکا $۵ \mu\text{g}/\text{kg}$ تعیین شده است، در حالی که برای فرآورده‌های غلات حداکثر حد مجاز $۳ \text{ng}/\text{g}$ 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 جیره 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 اوکراتوکسین و آفلاتوکسین بررسی شوند. در حال حاضر بهترین روش برای مقابله با آلودگی به اوکراتوکسین‌ها پیش‌گیری از آلودگی می‌باشد. با تغییر دما، کاهش رطوبت نسبی هوا، کاهش

در ایران مطالعه‌ای بر شیوع اوکراتوکسین A در گندم و یا آرد آن انجام نشده است، ولی در سال ۱۳۸۶ زهرا هادیان و همکارانش مطالعه‌ای بر میزان شیوع اوکراتوکسین 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 اوکراتوکسین A در ۹۷ درصد نمونه‌های برنج مورد بررسی کمتر از حد مجاز تعیین شده اوکراتوکسین در گندم ($\mu\text{g}/\text{kg}$ ۵) توسط استاندارد ملی و تحقیقات صنعتی ایران، بود. در تحقیق حاضر، سطوح آلودگی به اوکراتوکسین A نمونه‌های برنج وارداتی، کمتر از انواع داخلی بود. دامنه تغییرات آلودگی به اوکراتوکسین A در انواع برنج وارداتی $۱/۰۷ - ۰/۱۵$ و در انواع برنج داخلی $۴۶/۷۶ - ۰/۱۵$ میکروگرم به ازای هر کیلوگرم بود (۱۸).

نتایج بررسی شات‌ول (Shotwell) و همکارانش بر روی ۱۴۲ نمونه گندم جمع‌آوری شده از ویرجینیا، کارولینای شمالی، جنوب ایلینویز، کنتاکی و جنوب شرقی میسوری حاکی از عدم آلودگی نمونه‌های مورد بررسی به اوکراتوکسین A بود (۱۹).

تابوک (Tabuc) و همکارانش در سال‌های ۲۰۰۴ - ۲۰۰۲ قارچ‌ها و مایکوتوکسین‌های (آفلاتوکسین، دزوکسی نیوالنول، زیرالنون، فوموزین و اوکراتوکسین A) موجود در ۱۱۰ نمونه غلات (۳۵ گندم، ۵۴ ذرت و ۲۱ جو) از جنوب شرقی رومانی را مطالعه کردند. بر اساس نتایج آنها بیشترین آلودگی تعلق به قارچ‌های آسپرژیلوس و فوزاریوم داشت. بیش از ۹۰ درصد نمونه‌ها حداقل به یکی از مایکوتوکسین‌های مورد بررسی آلودگی داشتند. ولی فوموزین و اوکراتوکسین A در هیچ‌یک از غلات مورد بررسی مشاهده

گیری از پیشرفت خطرات در صنعت، طراحی شده و بنابراین درجه 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 برنامه 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 درجه 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 میکروتوکسین‌ها متناسب با عادات غذایی مردم ایران صورت نگرفته است، توجه مقامات بهداشتی را به تأثیر فزاینده 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 پایان‌نامه آقای رضا حیدری فارغ‌التحصیل دکترای حرفه‌ای داروسازی استخراج گردیده که به عنوان طرح تحقیقاتی با کد U ۸۹۰۰۱ تصویب و از طرف معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی جندی‌شاپور اهواز تأمین اعتبار، و در دانشکده داروسازی اجرا شد. بدین وسیله از دانشکده داروسازی و کلیه همکاران گرامی در معاونت محترم پژوهشی دانشگاه تقدیر و تشکر می‌گردد.

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 اسپارتام به صورت خوراکی استفاده شود، اسپارتام از اتصال اکراتوکسین A به پروتئین‌های پلاسما جلوگیری کرده و باعث دفع آن می‌شود بدون اینکه اثر جانبی ایجاد نماید (۲۰). کلستیرامین نیز باعث دفع اکراتوکسین از طریق مدفوع می‌شود (۲۱). البته موارد فوق در مرحله آزمایشگاهی ثابت شده‌اند و هنوز برای انسان ایمنی و بی‌خطری آنها به طور کامل مشخص نشده است.

نتیجه‌گیری

با برجسته‌شدن مفهوم توسعه انسانی در سطح جهان، مسأله امنیت و ایمنی غذایی که از دیرباز مطرح بوده ابعاد تازه‌ای به خود گرفته و تحت تأثیر فعالیت سازمان ملل مورد توجه خاص قرار گرفته است. با گسترش ارتباطات و پدیده 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 آستانه 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)، اصول و کاربرد آن در صنعت غذا امری ضروری است. چرا که HACCP یک سیستم آگاهی-دهنده مداوم و جامع درباره ایمنی غذا است که برای پیش-

منابع

- 1-Cabañas R, Bragulat MR, Abarca ML, Castellá G, Cabañas 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, Märtilbauer 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 Ochratoxin A Concentration in Wheat Flour of Flour Factories in The Ahvaz city Using HPLC

Abdolazim Behfar¹, Zahra Nazari^{2*}, Reza Heydari³

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 & Toxicology, Pharmacy School, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran.
3-Pharmacist.

*Corresponding author:
Zahra Nazari Khorasgani,
Department of Pharmacology & Toxicology, 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 Ochratoxin 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