مجله سلامت و محیط، فصلنامه‌ی علمی پژوهشی
انجمن علمی بهداشت محیط ایران
دوره ششم, شماره چهارم, زمستان ۱۳۹۲, صفحات ۵۰۳ تا ۵۱۴

تعیین میزان آلودگی مایکوتوکسین‌ها و فلزات سنگین در برنج‌های خوراکی وارداتی به استان گلستان

مهدیس مسیبی[۱]، حبیب ا... میرزایی[۲]

دریافت: ۹۱/۱۰/۲۵ پذیرش: ۹۲/۰۱/۲۰

چکیده

زمینه و هدف: *برنج یکی از اقلام پرمصرف غذایی است که در معرض آلودگی به مایکوتوکسین‌ها و فلزات سنگین قرار دارد. با توجه به خاصیت تجمع‌پذیری فلزات سنگین در بافت‌های بدن انسان و اثرات سوء آن بر بدن و سرطان‌زایی و جهش‌زا بودن مایکوتوکسین‌ها، بررسی حاضر به منظور تعیین آلودگی برنج‌های وارداتی به استان گلستان انجام پذیرفت.*

روش بررسی: *در این مطالعه تعداد ۸۰ نمونه برنج وارداتی از کشورهای هندوستان و پاکستان در مرز اینچه برون واقع در استان گلستان در فاصله زمانی دی ماه ۹۰ تا مرداد ماه ۹۱ نمونه‌برداری و از نظر میزان مایکوتوکسین‌ها (آفلاتوکسین‌های B1، B2، G1،G2 و مجموع آفلاتوکسین ها ، اکراتوکسین A، زرالنون و داکسی نیوالنول) و فلزات سنگین (سرب، آرسنیک و کادمیوم) مورد آزمون قرار گرفتند. تمامی نمونه‌ها از نظر میزان مایکوتوکسین‌ها توسط دستگاه HPLC و خالص‌سازی با ستون ایمونوافینیتی (خالص‌سازی داکسی نیوالنول با ستون فازجامد انجام شد) آزمون شدند. برای اندازه‌گیری آرسنیک از دستگاه بیناب سنجی جذب اتمی بر مبنای تولید هیدرید و برای تعیین مقدار سرب و کادمیوم از روش طیف سنجی نوری جذب اتمی با کوره گرافیتی بر طبق استاندارد AOAC.۹۸۶.۱۵ استفاده شد .*

یافته‌ها: *نتایج این مطالعه نشان داد که میانگین میزان آفلاتوکسین B1 ، B2، اکراتوکسین A و آفلاتوکسین توتال به ترتیب ۰/۹۳ ، ۰/۰۳۶ ، ۰/۰۳۳ و ng/g ۰/۹۶ بود. آفلاتوکسین‌های G1، G2 و داکسی نیوالنول در هیچ یک از نمونه‌ها مشاهده نشد. میانگین غلظت سرب ،آرسنیک و کادمیوم در نمونه‌ها نیز به ترتیب ۰/۰۶۷ ،۰/۰۰۷ و mg/kg ۰/۰۲۴ بود.*

نتیجه‌گیری: *همه نمونه‌ها با بیشینه مجاز تعیین‌شده برای مایکوتوکسین‌ها و فلزات سنگین برنج در استانداردهای ملی ایران مطابقت داشتند.*

واژگان کلیدی: امنیت غذایی، برنج، فلزات سنگین، مایکوتوکسین، واردات

۱- **(نویسنده مسئول)**: دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی کشاورزی- علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه آزاد اسلامی واحد آزادشهر، کارشناس مسئول صنایع کشاورزی، سلولزی و غذا اداره کل استاندارد گلستان
mahdis_mosayebi@yahoo.com

۲- دکتری مهندسی صنایع غذایی ، دانشیار دانشکده کشاورزی و منابع طبیعی دانشگاه آزاد اسلامی واحد آزادشهر

Archive of SID

www.SID.ir

مقدمه

برنج (Oryza sativa L.)، یک محصول مهم جهانی همراه با گندم و ذرت بوده و از زمان‌های قدیم، به عنوان غذای اصلی و منبع اساسی کربوهیدرات در رژیم غذایی در چندین کشور آسیایی از جمله ایران است. اگرچه مصرف برنج، به واسطه تغییر عادات و الگوی تغذیه‌ای در نتیجه صنعتی شدن رو به کاهش هست، ولی برنج غذای اصلی حدود ۲/۴ بیلیون نفر از جمعیت جهان است، از نظر سطح زیر کشت پس از گندم قرار دارد و ۸۵٪ از کل تولید آن به مصرف تغذیه انسان می‌رسد. در ایران سرانه مصرف برنج ۴۲/۵ Kg برآورد می‌شود که در واقع دومین محصول پرمصرف کشور است. در حال حاضر کشورمان یکی از مهم‌ترین وارد کنندگان این محصول محسوب می‌گردد. چون تولید این محصول در کشور با هزینه بالایی انجام می‌شود که عدم مزیت نسبی در تولید این محصول را نشان می‌دهد(۱و۲).

ارزش تغذیه‌ای برنج (به عنوان یک منبع انرژی:۲۳۴۵ Kcal/Kg) و قدرت بالای جذب رطوبت در برنج، آن را به یک سوبسترای ایده‌آل برای ایجاد و رشد گونه های قارچی به ویژه قارچ های مولد سم که می توانند مایکوتوکسین‌هایی مانند آفلاتوکسین‌ها را تولید نمایند، تبدیل نموده است. فاکتورهایی مانند محتوای رطوبت، فعالیت آبی، دما، مدت انبارداری، شرایط اکولوژیکی، میزان اولیه آلودگی، توانایی تولید سم گونه‌های قارچی و ماهیت ماده بر تولید مایکوتوکسین‌ها تاثیر می‌گذارند. به علاوه در طی مدت انبارداری، قارچ‌ها سبب تغییرات ارگانولپتیک و رنگ در دانه می‌شوند(۱). مطالعات زیادی نشان داده است که آلودگی محصولات کشاورزی به مایکوتوکسین‌ها، چالشی برای سلامت افراد به ویژه در کشورهای درحال توسعه است. آلودگی برنج به مایکوتوکسین‌ها از گندم و ذرت کمتر است. برنج قبل از برداشت می‌تواند با قارچ‌های مزرعه مانند گونه‌های فوزاریوم و در طی حمل و نقل و مدت انبارداری با قارچ‌های انباری از قبیل گونه‌های آسپرژیلوس و پنی‌سیلیوم آلوده شود. سه جنس مذکور، نه تنها به خاطر توانایی آنها در تولید مایکوتوکسین‌های بسیار مختلف از قبیل آفلاتوکسین B_1 (AFB_1)، فومانایزین B_1 (FB_1)، اکراتوکسین A (OTA)، تریکودسن‌ها و زرالنون (ZEN)، بلکه به دلیل اینکه در همه جا حضور دارند، از مهم‌ترین قارچ‌ها در غلات و غذاها درنظر گرفته می‌شوند. آنها برای مهره‌داران نظیر انسان و دام در غلظت‌های کم سمی هستند. Vainio و همکاران(۱) در سال ۱۹۹۳ AFB_1، FB_1 و OTA، به عنوان «احتمالا جهش زا» برای انسان طبقه‌بندی نمودند. مطالعات اپیدمولوژیکی بعدی، AFB_1، FB_1 و OTA را به ترتیب از عوامل بیماری‌های کارسینوم سلول کبدی، سرطان مری، نفروپاتی بومی بالکان در انسان نشان داد. آلودگی غلات به تریکودسن‌ها، به ویژه دی اکسی نیوالنول (DON) و نیوالنول (NIV) نیز مورد توجه جهانی است. بنابراین، اطلاعات درباره مایکو فلورای قارچی در برنج، پیش نیاز ایجاد برنامه‌های کنترل مایکوتوکسین‌ها است. همه مایکوتوکسین‌ها، فرآورده های طبیعی با وزن مولکولی پایین(یعنی مولکول‌های کوچک) هستند که به عنوان متابولیت‌های ثانویه توسط قارچ‌های رشته‌ای تولید می‌شوند. درحالی‌که همه مایکوتوکسین‌ها منشا قارچی دارند، ولی همه ترکیبات سمی تولید شده توسط قارچ‌ها، از گروه مایکوتوکسین‌ها نیستند (۳). از اثرات سمی مایکوتوکسین‌ها بر روی سلامت انسان و حیوان تحت عنوان «مایکوتوکسینوسیس» یاد می‌شود که شدت آن به میزان سمیت مایکوتوکسین، میزان قرار گرفتن در معرض سم، سن و وضعیت تغذیه‌ای فرد و اثرات احتمالی تشدیدکنندگی مواد شیمیایی دیگر با سمی که فرد در معرض آن قرار می‌گیرد، بستگی دارد (۴). مایکوتوکسین‌ها (به جز FB) عموما لیپوفیلیک هستند و بنابراین تمایل به ذخیره و تجمع در قسمت‌های چرب بدن را دارند (۵). آفلاتوکسین‌ها، گروهی از متابولیت‌های ثانویه پلی کتید (یک گروه بزرگ و مهم ترکیبات طبیعی) جهش‌زا و سمی هستند که توسط گونه‌هایی از آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس پارازیتیکوس، آسپرژیلوس نومیوس و آسپرژیلوس پزودوتاماری تولید می‌شوند(۶) آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان(IRAC) آفلاتوکسین B_1 را در گروه یک جهش‌زاهای انسانی طبقه‌بندی می‌کند که عضو هدف آنها جهت سمیت و جهش‌زایی، کبد است (۷). در بین ۱۸ نوع آفلاتوکسین‌های متفاوت شناسایی شده، اعضای اصلی این گروه، شامل آفلاتوکسین‌های B_1، B_2، G_1، G_2، M_1

Archive of SID

www.SID.ir

و M_2، فراوانی و شـدت سـمیت آفلاتوکسین B_1 در بین انواع آفلاتوکسـین ها از همه بیشتر است و بعد از آن به ترتیب G_1 ، B_2 و G_2 قرار دارند.آفلاتوکسـین B_1 ، قوی ترین ماده شـناخته شده جهت هپاتوکارسینوژنیک بوده و اخیرا ثابت شده است که تراتوژنیک ، موتاژنیک و ژنوتوکسـیک نیز هست. در دام های شیری از تغییرشکل آفلاتوکسین‌های B_1 و B_2 به متابولیت‌های هیدروکسیله، آفلاتوکسین M_1 و M_2 حاصل می‌شود که در شیر و فرآورده‌های لبنی وجود دارند(۶). آفلاتوکسین‌ها مانند دیگر ترکیبات هتروسیکلی ، نور فلوئورسانس تولید می‌کنند و توسط خاصیت فلوئورسـانس آنها تشـخیص داده می‌شوند. AFB_1 و AFB_2 نـور فلوئورسـانس آبی تولید می‌کننـد و AFG_1 و AFG_2 در زیر نور اولترا ویوله، نور زرد-سبز تولید می‌نمایند(۵). اکراتوکسین A(OTA)، نیز یک متابولیت ثانویه است که توسط چند گونه از آسپرژیلوس و پنی‌سیلیوم تولید می‌شود. این سم، که یک ترکیب نفروتوکسیک و نفروکارسینوژنیک هست، اساسا در غلات و همچنیـن در ترکیبات دیگر مانند قهوه، میوه‌جات خشـک و آب انگور یافت شـده است. در انسـان تومورها را توسـعه می‌دهد و عامل تومورهای اپی‌تلیال در دستگاه ادراری فوقانـی در ناحیه بالکان بود (۳). زرالنون(ZEN)، یک ترکیب غیر اسـتروئیدی اسـت که همراه با دی اکسـی والنول وجود دارد(۸). زیرالنون به واسـطه اثر استروژنیک آن روی حیوانات شناخته شده اسـت. زیرالنون به رسـپتورهای استروژنی موثر بر رونویسـی وابسته به اسـتروژن در هسـته تاثیر می‌گذارند، متصل می‌شود. رسـپتورهای باند شده توسط ZEN، از متصل شـدن هورمون‌های اسـتروژنیک به آن در بافت‌های مربوط به پسـتاندارانی مانند موش جلوگیـری می‌کند. مطالعات اخیر در سـال ۲۰۰۱ توانمندی ZEN برای تحریک رشـد سلول های سرطانی پستان که شامل رسـپتورهای گیرنده استروژن بودند، را نشـان داده است(۵). فومانایزین‌ها (B_1 و B_2)، توسعه‌دهنده تومورهـا و متابولیت‌هـای قارچ فوزاریوم هسـتند که زنجیره بلنـد هیدروکربنی دارند که در سـمیت آنها نقش ایفاء می‌کند. فومانایزین B_1 از همه سـمی‌تر است و در موش‌ها تومورها را افزایش دادند. مصرف فومانایزین‌ها مصادف با وقوع سـرطان حلقی در قسـمت‌های مختلف آفریقا، آمریکای مرکزی و آسیا و در بین جمعیت سـیاه پوست چارلسـتون، کارولینای جنوبی در آمریکا شـده است.چون فومانایزین B_1 جذب فولات را در سطوح سلولی کاهش می‌دهد، مصرف فومانایزین باعث نقص لوله‌های عصبی در نوزادان انسـان می‌شـود(۴). تریکودسن‌ها (TCT)، یک گروه وسیع متشـکل از ۱۰۰ متابولیت قارچی با ساختمان اصلی یکسان را تشکیل می‌دهند. در سطح سلولی، اثر اصلی سـمی مایکوتوکسین‌های TCT، به صورت بازدارندگی مقدماتی از سـنتز پروتئین‌ها ظاهر می‌شـود. ترکودسـن‌ها، بر سلول‌های تقسیم‌شـونده فعال مانند سلول‌هایی که در دستگاه گوارش، پوسـت و لنفوئیدها و سلول‌های اریتروئید قراردارند ، تاثیر می‌گذارد. فعالیت سـمی TCT، باعث نکروزه گسـترده در موکـوس دهانی و پوسـت در تماس با این سـم، اثر حاد روی دسـتگاه گوارش، کاهش مغز اسـتخوان و فعالیت ایمنی می‌گردد. مایکوتوکسـین‌های تریکودسـن، به طور گسترده در غـلات و غذاهای دیگـر وجود دارند. تولید سـم در رطوبت بالا و دمای ^{o}C ۲۴-۶ از همه بیشـتر است. شیوع طبیعی TCT در آسـیا، آفریقا، آمریـکای جنوبی، اروپا و آمریکای شـمالی گزارش شده است. تریکودسن‌ها در ذرت، گندم، جو، یولاف، برنج، چاودار، سبزیجات و دیگر محصولات کشاورزی آشکار شـدند. مثال‌هایـی از تریکودسـن‌های نوع A شـامل(T-2) diacetoxyscirpenol،HT-2 toxin (HT-2)،T-2 toxin (DAS) اسـت. dexynivalenol،Fusarenone-X(FUX) (DON) و nivalenol (NIV) مثال‌هایـی از متداول‌تریـن تریکودسـن‌های نوع B هستند(۳).آژانس بین المللی تحقیقات سـرطان در سال ۱۹۹۳، اکراتوکسـین A و فومانایزین‌ها را در گروه احتمالا جهش‌زا (گروه 2B) و تریکودسـن‌ها و زیرالنون در گروه ۳ که برای انسـان جهش‌زا نیسـتند، طبقه‌بندی نموده است(۷).

از سـوی دیگر کنترل بیشـینه رواداری فلزات سنگین در برنج یکی از مواردی اسـت که برای حفظ سـلامت مصرف‌کنندگان و نیـل به ایمنی غذایی باید مورد توجه قـرار گیرد. با توجه به عوارض جبران‌ناپذیرحاد و مزمن فلزات سـنگین در بدن انسان که از تاثیر بر سیسـتم عصبی تا سرطان‌زایی طبقه‌بندی می‌شوند موجب شـده تا حساسـیت و اهمیت این موضوع را دو چندان

Archive of SID
www.SID.ir

نمایـد. تقریبا تمام فلزات سـنگین در بدن اثـرات زیان بار به جـا می‌گذارند. بعضی از ایـن عناصر مانند سـرب، کادمیوم، نیـکل و جیوه حتی در مقادیر ناچیز نیز برای سـلامتی انسـان سـمی و خطرناکند و باعث مشـکلات بهداشتی مختلفی مانند تخریب کلیه، مشـکلات ریوی، صدمات اسـتخوانی و سرطان و غیره می‌شـوند (۹و۱۰). آلودگی محصولات کشـاورزی به فلزات سـنگین، علاوه بر منشـا طبیعی، به طور عمده درنتیجه فعالیت‌های انسان (آنتروپوژنیک) از قبیل کشاورزی، استخراج معدن، سـاخت و ساز، کودهای شـیمیایی، آبیاری با فاضلاب، کاربرد لجن فاضلاب در زمین‌های کشـاورزی، کودهای دامی، کاربرد سـموم دفع آفات نباتـی، فرایندهای صنعتی و از طریق آب، هوا و خاک آلوده اسـت(۱۱و۱۲). در تحقیقی که توسـط Yap و همـکاران(۱۱) در سـال ۲۰۰۹ در مالزی انجام شـد، متوسط غلظت فلزات سنگین در قسمت‌های مختلف گیاه برنج نشـان داد که همه فلزات سنگین مورد مطالعه (شامل کادمیوم، کروم، مس، آهن، منگنز، سرب و روی) در گیاه وجود دارند به جز سـرب که فقط در ریشه گیاه آشکار شد. بیشترفلزات مورد مطالعه در ریشـه ذخیره شدند به جز منگنز که بیشترین غلظت را در برگ‌ها داشـت. در حالی‌که کادمیوم به طور یکنواخت در سرتاسر گیاه توزیع شـد. به علاوه مس در بالاترین غلظت در ریشه گیاه برنج انباشته شد.

بـا توجه بـه مصرف روز افـزون برنج‌هـای وارداتی هندی و پاکستانی در ایران، این تحقیق، با هدف شناسایی آلودگی برنج به مایکوتوکسـین ها شامل آفلاتوکسـین B1،B2،G1،G2 و مجموع آفلاتوکسـین‌ها و فلزات سنگین شامل سرب، کادمیوم و آرسنیک در برنج‌های وارداتی به استان گلستان به عنوان یکی از گروه‌های غذایی مهم در سبد غذایی خانوار و اهمیت تامین امنیت غذایی انجام شد.

مواد و روش‌ها

۱- نمونه‌برداری:

واردات برنج از مرز اینچه برون در اسـتان گلسـتان و در بازه زمانی مورد مطالعه، از کشـورهای پاکستان و هندوستان انجام گرفـت. نمونه‌ها در مبدا ورود محموله به کشـور، به تعداد ۸۰ نمونـه در فاصله زمانی دی ۹۰ – مرداد ۹۱ جمع‌آوری گردید. نمونه‌بـرداری طبق اسـتاندارد ملی ایران شـماره ۲۵۸۱«روش نمونه‌بـرداری از محصـولات کشـاورزی جهـت آزمـون آفلاتوکسین» انجام شـد(۱۳). قابل ذکر است که محموله‌های وارداتی برنج در بسته‌بندی‌های کیسه Kg۴۰ بودند.

نمونه‌های گرفته شـده از هر بهر با هم مخلوط شده و در انتها یـک نمونه پنج کیلوگرمـی جهت آزمون مایکوتوکسـین‌ها و فلزات سنگین به آزمایشگاه ارسال گردید.

۲-آزمون مایکوتوکسین‌ها:

۲-۱ آماده‌سـازی نمونـه: جهـت کاهش خطـای حاصل از نمونه‌برداری، نمونه‌های برنج توسـط آسیاب، به خوبی آسیاب و یکنواخت شدند، به طوری که ذرات آنها از الک با قطر چشمه ۲ mm عبور نماید. سـپس در کیسـه پلاسـتیکی یا پارچه‌ای تمیز نگهداری شـدند. ۵۰g از نمونه آسیاب شده جهت آزمون مایکوتوکسـین‌ها طبق اسـتاندارد ملی ایران به شـماره ۶۸۷۲ «خوراک انسـان – دام، اندازه‌گیری آفلاتوکسین‌های گروه B و G به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و خالص‌سـازی با سـتون ایمونو افینیتی» (۱۴) و ۹۲۳۸ «غلات و فرآورده‌های آن – اندازه‌گیـری اکراتوکسـین A بـه روش کروماتوگرافـی مایـع با کارایی بالا و خالص‌سـازی با سـتون ایمونو افینیتی- روش آزمـون»(۱۵) و ۹۲۳۹ «غـلات و فرآورده‌هـای آن – اندازه‌گیـری زیرالنون به روش کروماتوگرافـی مایع با کارایی بالا و خالص‌سازی با ستون ایمونوافینیتی- روش آزمون»(۱۶) و ۱۰۲۱۵ «غـلات و فرآورده‌های آن–اندازه‌گیری نیووالنول به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و خالص‌سـازی ستون فازجامد-روش آزمون» مورد آزمون قرار گرفت (۱۷).

۲-۲ اسـاس روش: اسـتخراج سـم از نمونه‌ها توسط حلال اسـتخراج انجام شد. عصاره بدسـت آمده پس از صاف شدن توسـط کاغذ صافی، با حجم مشخصی از آب مقطر تا رسیدن به یک غلظت معین رقیق شـد و پس از صاف شـدن با کاغذ صافی با رشـته‌های شیشـه (Glass Microfiber Filter)، از ستون ایمونوافینیتی که دارای آنتی بادی‌های اختصاصی است، با سـرعت یک قطره در ثانیه عبور داده شـد. بـا عبور عصاره رقیق شده از ستون، آنتی‌ژن موجود در عصاره به آنتی بادی‌های

Archive of SID

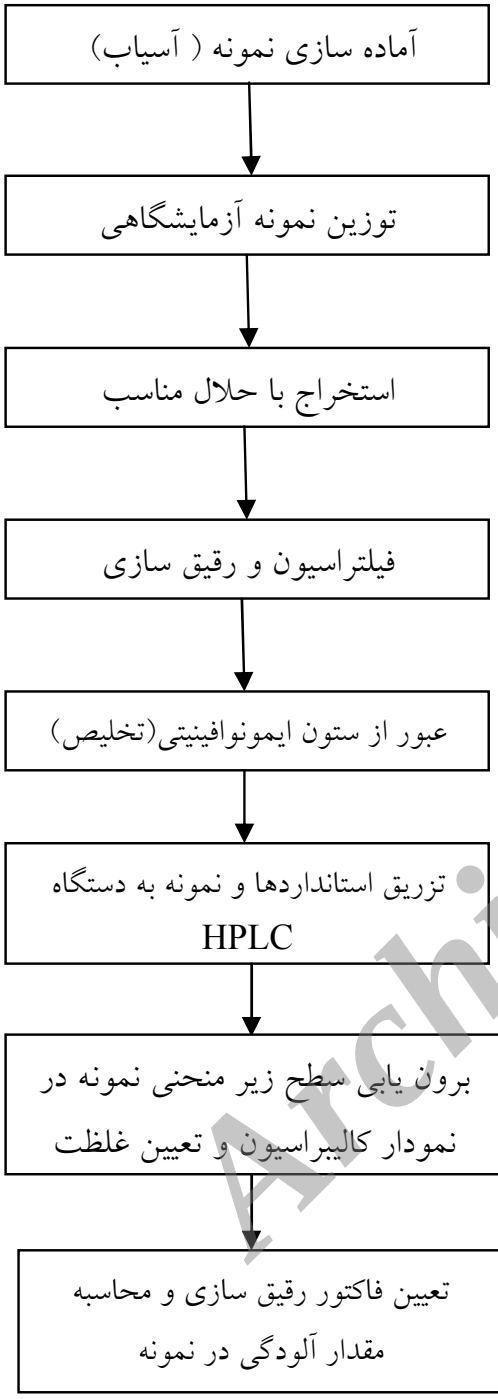
www.SID.ir

اختصاصی درون ستون متصل شد. آنتی ژن متصل شده به آنتی بادی در درون ستون توسط عبور متانول از داخل ستون، شسته و در درون ویال جمع‌آوری و با آب رقیق شد. تزریق، جداسازی، تشخیص و تعیین مقدار با روش فاز معکوس کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا به ترتیب با استفاده از ستون فاز معکوس، مشتق‌ساز و دتکتور فلوئورسانس، مقایسه سطح زیر منحنی استاندارد با نمونه مجهول و ضریب رقت میزان آلودگی برحسب نانوگرم بر گرم محاسبه شد. جهت تهیه منحنی‌های استاندارد کالیبراسیون، قبل از تزریق نمونه ابتدا غلظت‌های معین از محلول‌های استاندارد مایکوتوکسین مورد اندازه‌گیری به دستگاه HPLC (از کمپانی واترز، آمریکا، مدل آلیانس ۲۶۹۵) تزریق شد.

۳- آزمون فلزات سنگین:

ظروف شیشه ای، قبل از استفاده با محلول اسید نیتریک (۱:۱) و سپس با آب مقطر شستشو شد. ظروف مورد استفاده برای انجام عمل هضم نیز ابتدا با واکنشگرهایی که در فرآیند هضم استفاده می‌شدند، شستشو و سپس کاملا با آب مقطر آبکشی گردید. جهت اندازه‌گیری آرسنیک از روش بیناب سنجی جذب اتمی بر مبنای تولید هیدرید و برای تعیین مقدار سرب و کادمیوم از روش طیف‌سنجی نوری جذب اتمی با کوره گرافیتی (واریان، آمریکا) طبق استاندارد AOAC.۹۸۶.۱۵ استفاده شد(۱۸).

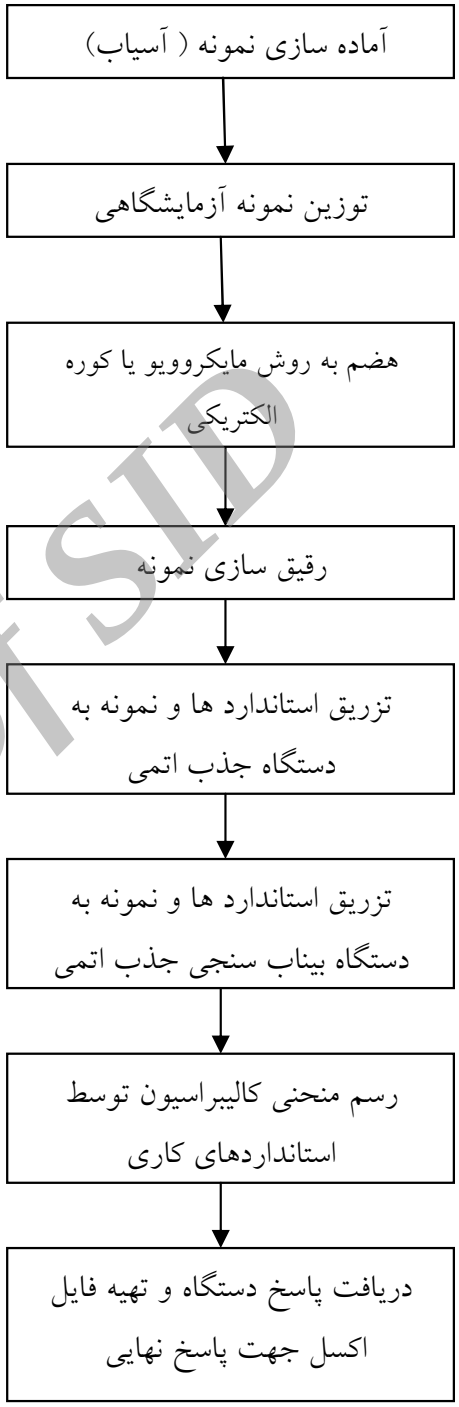
اساس کار در روش اول متلاشی شدن مواد آلی در اثر هضم با اسید نیتریک در یک سیستم بسته است، بدین ترتیب که یون آرسنیک پنج ظرفیتی در مجاورت یدید پتاسیم به یون آرسنیک سه ظرفیتی کاهش می‌یابد. هیدرید آرسنیک توسط سدیم بورو هیدرید و پیش از اتمی شدن در سلول کوارتز گرم شده با شعله تولید می‌شود. اندازه‌گیری به روش بیناب سنجی جذب اتمی مجهز به لامپ دوتریوم در طول موج ۱۹۳/۷nm انجام می گیرد. در روش دوم، ابتدا آزمونه خشک شده و سپس با افزایش تدریجی دما، در محدوده دمایی ۵۰۰ ±۵۰°C خاکستر می‌شود. در این مرحله محلول اسید کلریدریک M ۶ (۱+۱) اضافه شده و تا حد خشک شدن تبخیر می‌گردد. باقیمانده در محلول اسید نیتریک ۰/۱M حل شده، و در ادامه تعیین مقدار عناصر به روش بیناب‌سنجی جذب اتمی، با استفاده از کوره



نمودار ۱: مراحل انجام آزمون اندازه‌گیری مایکوتوکسین‌ها به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و خالص‌سازی با ستون ایمونو افینیتی

Archive of SID

www.SID.ir

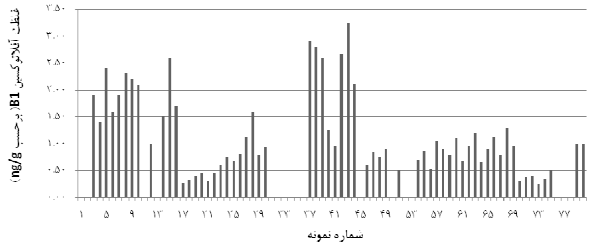


نمودار ۲: مراحل انجام آزمون اندازه‌گیری فلزات سنگین به روش بیناب‌سنجی جذب اتمی با روش هضم کوره الکتریکی

گرافیتی در طول موج مربوط به هر عنصر انجام می‌شود.

یافته‌ها

نتایج این مطالعه نشان داد که در بین ۸۰ نمونه مورد آنالیز، ۱۷ نمونه (۲۱/۲۵٪) آلودگی به AFB1 نداشتند {کوچکتر از حد تعیین مقدار یا(Limit of Quantification(LOQ}. حد تعیین مقدار برای آفلاتوکسین‌های B1 و G1 برابر با ۱ng/g و برای آفلاتوکسین‌های B2 و G2 برابر ng/g ۰/ ۲ است. در ۷۸/۷۵٪ نمونه‌ها، AFB1 مشاهده شد. بیشترین مقدار آن، ۳/۲۴ در برنج شماره ۴۳ و کمترین مقدار ۰/۲۵ در برنج شماره ۷۳ و میانگین آن ۰/ ۹۳ng/g بود که میزان آلودگی در حد مجاز استاندارد ایران (۵ng/g) بود (شکل ۱).



شکل ۱- میزان آفلاتوکسین B1 در نمونه‌های برنج مورد آزمون از دی۹۰-مرداد ۹۱

در ۶۵ نمونه مورد آزمون (۸۱/۲۵٪)، AFB2 کمتر از حد تعیین مقدار بود. کمترین مقدار AFB2 ، ۰/۱ در برنج با شماره‌های ۶۴، ۶۶ و ۶۹ و بیشترین مقدار آن ۰/۳ در برنج با شماره‌های ۱۵ و ۳۷ و میانگین آن در کل نمونه‌ها، ng/g ۰/۰۳۶ بود. آفلاتوکسین‌های G1، G2، زیرالنون و داکسی نیوالنول در هیچ یک از نمونه‌های مورد آزمون مشاهده نشد(شکل ۲).

شکل ۲- میزان آفلاتوکسین B۲ در نمونه‌های برنج مورد آزمون از دی۹۰-مرداد ۹۱

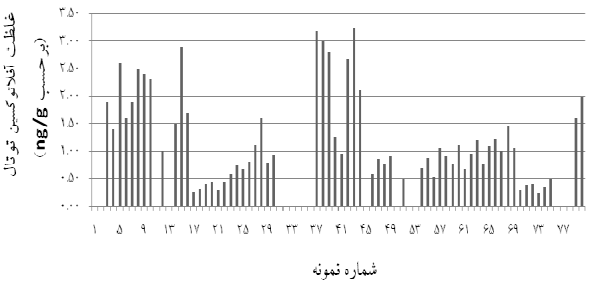
Archive of SID

www.SID.ir

اکراتوکسین A، تنها در ۶ نمونه برنج (۷/۵٪ از کل نمونه‌ها) مشاهده شد و کمترین مقدار آن ۰/۲۷ در نمونه برنج شماره ۶۴ و بیشترین مقدار آن ۰/۶ در نمونه برنج شماره ۶۹ و میانگین آن ۰/۰۳۳ ng/g بود که میزان آلودگی نمونه‌ها در حد مجاز استاندارد ایران (۵ ng/g) بود(شکل ۳).

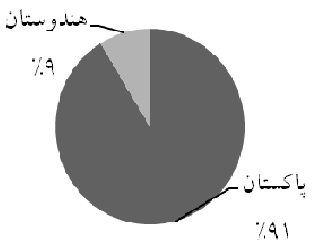
شکل ۳ - میزان اکراتوکسین A در نمونه‌های برنج مورد آزمون از دی۹۰-مرداد ۹۱

آفلاتوکسین توتال در ۶۳ نمونه (۷۸/۷۵ ٪ کل نمونه‌ها) مشاهده شد. کمترین مقدار آن ۰/۲۵ ng/g در نمونه برنج شماره ۷۳ و بیشترین مقدارآن ۳/۲۴ ng/g در نمونه برنج شماره ۴۳، بود که از کمتر از حد مجاز تعیین شده در استاندارد ملی ایران(۳۰ng/g) بود. در ۱۷ نمونه نیز، آفلاتوکسین توتال مشاهده نشد. میانگین آفلاتوکسین توتال در نمونه‌ها، ۰/۹۶ ng/g بود(شکل ۴).



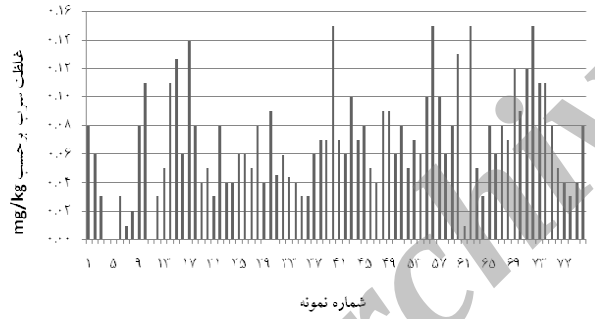
شکل ۴- غلظت مجموع آفلاتوکسین‌ها در نمونه‌های برنج مورد آزمون از دی۹۰-مرداد ۹۱

از ۸۰ نمونه مورد آزمون ،۷۰ نمونه برنج از محموله‌های وارداتی ازکشور هندوستان و۷۳ نمونه برنج از محموله‌های وارداتی از کشور پاکستان نمونه‌برداری گردیده بود. بنابراین ۹۰٪ واردات برنج ازمبادی ورودی استان گلستان، از کشور پاکستان انجام شده است(شکل ۵).

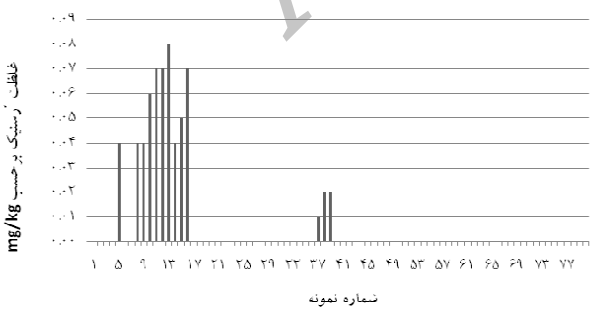


شکل۵- تفکیک نمونه‌های برنج وارداتی بر اساس مبداء ورود به کشور در بازه زمانی دی۹۰-مرداد ۹۱

میزان فلزات سنگین سرب، آرسنیک و کادمیوم در ۸۰ نمونه برنج مورد آنالیز به ترتیب بیشترین مقدار آن ۰/۱۵، ۰/۰۸ و ۰/۰۶ و کمترین مقدار آن برای هر سه ۰/۰۱ و میانگین کل در نمونه‌ها ۰/۰،۰۰۷/۰۶۷ mg/kg و ۰/۰۲۴ بود. بر طبق نتایج این بررسی و استاندارد ملی موجود برای بیشینه رواداری فلزات سنگین سرب، آرسنیک و کادمیوم در برنج (۱۹) که به ترتیب برابر ۰/۱۵ mg/kg، ۰/۱۵ و ۰/۰۶ تعیین شده است، کلیه نمونه‌ها در حد مجاز استاندارد بودند(شکل‌های ۷،۶و۸).



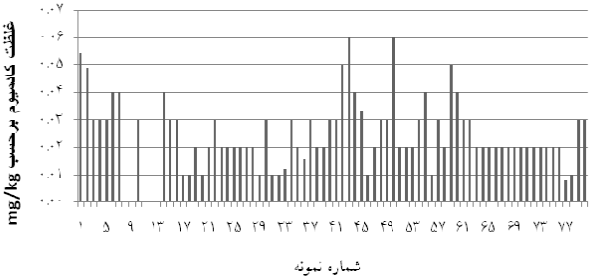
شکل۶ - میزان سرب در نمونه‌های برنج مورد آزمون از دی۹۰-مرداد ۹۱



شکل۷ - میزان آرسنیک در نمونه‌های برنج مورد آزمون از دی۹۰-مرداد۹۱

Archive of SID

www.SID.ir



شکل۸ - میزان کادمیوم در نمونه‌های برنج مورد آزمون از دی۹۰-مرداد ۹۱

بحث

یافته‌های این مطالعه نشان داد میزان آلودگی برنج به مایکوتوکسین‌ها و فلزات سنگین وارد شده از کشورهای پاکستان و هندوستان به استان گلستان جهت مصارف خوراکی بر طبق استاندارد ملی ایران درحد قابل قبول قرار داشتند. بررسی Hadian و همکاران (۲۰) در سال ۱۳۸۶ بر روی میزان شیوع اکراتوکسین A در برنج‌های داخلی و وارداتی فروشگاه‌های زنجیره‌ای شهر تهران، نشان داد که میزان آلودگی به اکراتوکسین A در ۹۷٪ نمونه‌ها، کمتراز حد مجاز تعیین شده در استاندارد ملی ایران بود. سطوح آلودگی به اکراتوکسین A در نمونه‌های برنج وارداتی از برنج‌های داخلی کمتر بود. دامنه تغییرات آلودگی به اکراتوکسین A در انواع برنج وارداتی ۱/۰۷ تا ۰/۱۵ و در انواع برنج داخلی µg/kg ۴۶/۷۶-۰/۱۵ بود.

در تحقیقی که توسط Faraji و همکاران (۲۱) در سال ۱۳۸۹ بر روی آفلاتوکسین‌های برنج مصرفی مشهد در دو فصل تابستان و زمستان و مقایسه آن با برنج‌های وارداتی انجام شد، نشان داد که میزان آفلاتوکسین توتال در ۸/۳ ٪ از نمونه‌ها بالاتر از حد مجاز استاندارد ملی ایران بود. همچنین برنج‌های ایرانی از نظر میزان آفلاتوکسین در سطح مطلوب‌تری قرار داشتند و میانگین میزان آفلاتوکسین در نمونه‌ها در فصل تابستان بیش از فصل زمستان است که علت آن اثر کاهش دما و رطوبت در فصل زمستان است که مانع از رشد و فعالیت قارچ‌ها می‌شود. میزان آفلاتوکسین‌های G1 و G2 نیز نزدیک به صفر و قابل اغماض بود که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد.

مطالعه Park و همکاران (۱) در سال ۲۰۰۵ در کره جنوبی نشانگر این است که Penicillium citrinum و Aspergillus candidus گونه‌های غالب در نمونه‌های برنج بودند. اکراتوکسین A، شایع‌ترین مایکوتوکسین شناسایی شده، در برخی از نمونه‌ها بالاتر از حد مجاز اتحادیه اروپا (ng/g۵) بود. در تحقیق دیگری که Salem و همکاران(۲۲) در سال ۲۰۰۸ تا ۲۰۰۹ روی وجود مایکوتوکسین‌ها در غذاهایی که بیشترین میزان مصرف را در اردن داشتند انجام شد، وجود اکراتوکسین A در برنج (۴/۳٪) بعد از گندم(۲۹٪) و جو (۱۲/۵٪) و کمتر از بیشینه حد قابل تحمل اکراتوکسین A(µg/kg ۵) که توسط کمیسیون اتحادیه اروپا برای دانه‌های خام غلات وضع شده است، قرارداشت. افلاتوکسین توتال نیز در ۳٪ نمونه‌های آنالیز شده با میانگین µg/kg ۹/۶۲ در بادام زمینی و برنج مشاهده شد. داکسی نیوالنول و فومونایزین‌ها به ترتیب در ۴٪ و ۲٪ از نمونه‌ها اندازه‌گیری شد، ولی مقدار آنها در حد مجاز کمیسیون اتحادیه اروپا بود.

بررسی Nguyen و همکاران (۲۳) که در سال ۲۰۰۷ در پنج ایالت ویتنام انجام شد، مشخص نمود که AFB1 در ۵۱٪ نمونه‌ها مشاهده شد و مقدار آن در همه ایالت‌ها در فصول بارانی، بیشتر از فصول خشک بود و تا هفت برابر هم می‌رسید. همه نمونه‌ها در حد مجاز مقررات WHO (ng/g۳۰) بودند، ولی مقایسه نتایج با مقررات کمیسیون اتحادیه اروپا برای AFB1(ng/g۲) ۱۰ نمونه بالاتر از حد مجاز بودند. اکراتوکسین A نیز در فصول خشک در دو ایالتBinh Dinh و Phu Yen، به ترتیب بیشینه ۱/۶۳ و ng/g ۱/۸۷ و در فصول بارانی ۰/۳۵ و ng/g۰/۲۹ بود. در میان نمونه‌های برنجی که هم‌زمان توسط AFB1 و OTA آلوده شده بودند، به ترتیب ۶۹/۲۳٪ و ۶۱/۵۴٪ آنها توسط سیترینین نیز آلودگی داشتند که به اثر تشدیدکنندگی و هم افزایی این مایکوتوکسین‌ها بر همدیگر اشاره دارد.

تفاوت در نتایج برخی از تحقیقات یاد شده با تحقیق حاضر از نظر آلودگی به مایکوتوکسین‌ها می‌تواند متاثر از شرایط محیطی نظیر دما، رطوبت، فعالیت آبی و شرایط جابه جایی و حمل و نقل و انبارداری تا زمان مصرف، میزان حساسیت یک محصول به تهاجم انواع قارچ‌ها در کلیه مراحل کاشت، داشت، برداشت و فرآوری باشد.

Archive of SID

www.SID.ir

بررسی Malakootian و همکاران (۲۴) در سال ۱۳۹۰ بر روی فلزات سنگین در برنج‌های هندی وارداتی به ایران، نشان‌گر آن است که کادمیوم در کلیه نمونه‌های برنج کمتر از حد قابل تشخیص بود. میانگین میزان سرب ۰/۳۶۴mg/kg، کروم ۰/۶۵۳ mg/kg و نیکل ۰/۰۱۹ mg/kg بود.

مطالعه دیگری که توسط Hedayatifar و همکاران(۲۵) در سال ۸۹ روی میزان سرب و کادمیوم برنج‌های طارم و دمسیاه کشت شده در استان لرستان انجام شد، میزان کادمیوم و سرب به ترتیب ۰/۰۶mg/kg ±۰/۰۳۷ و ۰/۰۸ mg/kg ±۰/۰۷۷ بود. کشورهای جنوب و جنوب شرقی آسیا از جمله شبه جزیره مالزی، ویتنام، هند، تایلند، فیلیپین، اندونزی، بنگلادش و پاکستان توجه زیادی به آلودگی خاک و محصولات کشاورزی توسط فلزات سنگین با توجه به اثرات بالقوه بر سلامت انسان و پایداری درازمدت تولید مواد غذایی در مناطق آلوده داشته‌اند. Jo و همکاران (۲۶) در سال ۲۰۰۴ گزارش کردند که در کره، متوسط غلظت کادمیوم، مس، سرب و روی در لایه سطحی (۱۵cm-۰) خاک شالیزارهای برنج به ترتیب ۰/۱۱ mg/kg (دامنه تغییرات: ۱/۰۱-۰) ، ۰/۴۷ mg/kg (دامنه تغییرات: ۴۱/۶-۰)، ۴/۸۴ mg/kg (دامنه تغییرات: ۶۶/۴-۰)، ۴/۴۷mg/kg (دامنه تغییرات :۹۶/۷-۰) بود. Herawati و همکاران (۲۷)در سال ۲۰۰۶ در ژاپن تخمین زدند سطح متوسط کادمیوم، مس و روی در برنج به ترتیب۷۵/۹، ۳/۷۱، ۲۲/۹ mg/kg و سطوح متوسط کادمیوم، مس و روی در شالیزارهای برنج به ترتیب ۱۹/۴۴۶،۵ mg/kg و ۹۶/۴ بود. چین با مشکلات آلودگی خاک به ویژه آلودگی به فلزات سنگین مواجه است. در سال ۲۰۰۱ برآورد شد که نزدیک به بیست میلیون هکتار خاک زراعی (تقریبا یک پنجم از کل مناطق از زمین‌های کشاورزی) در چین آلوده به فلزات سنگین بود که منجر به کاهش تولید ده میلیون تن مواد غذایی به طور سالانه می‌شود(۱۲).

با توجه به مصرف برنج در سبد غذایی خانوارهای ایرانی به میزان ۱۱۰g در روز، میزان دریافت قابل تحمل روزانه موقتی فلزات سنگین (PTDI) و میزان دریافت قابل تحمل هفتگی موقتی (PTWI) آنها که توسط کمیته مشترک متخصصان سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد و سازمان بهداشت جهانی در خصوص افزودنی‌های خوراکی (JECFA) برای میانگین وزن بدن فرد بالغ (۶۰ kg) تعیین شده، نتایج کلی نشان‌دهنده میزان آلودگی به فلزات سنگین کمتر از حد مجاز استاندارد بود و خطری برای مصرف از نظر بهداشتی و ایمنی ندارند. از طرفی بررسی انجام شده توسط کمیته اروپایی تهیه مواد غذایی نشان می‌دهد که متوسط مقدار مایکوتوکسین مصرف شده توسط افراد (به خصوص براساس مقدار سم به کیلوگرم وزن بدن) کم است، لیکن نمی‌توان حداکثر مقدار سم خورده شده یا مجموع سموم خورده شده و میزان آن را محاسبه کرد.

به هر حال تعیین یک ارتباط علت و معلولی بین مایکوتوکسین‌ها با بیماری‌های انسان به دلیل بسیاری از مشکلات در مطالعات اپیدمیولوژی انسانی کار بسیار دشواری است. یک صد کشور در دنیا از جمله ایران مرز بیشینه مجاز جهت مایکوتوکسین‌ها در انواع مواد غذایی وضع کردند. جهت به حداقل رساندن آلودگی برنج به انواع مایکوتوکسین‌ها، رعایت یک چرخه کنترل بهداشتی از مزرعه تا میز مصرف‌کننده ضروری است. به خصوص در برنج‌های وارداتی، رعایت شرایط خوب جابه جایی و حمل و نقل و رعایت شرایط خوب انبارداری (GSP) نظیر کنترل درجه حرارت انبارهای نگهداری آن در زیر ۲۰ ^{o}C و کنترل رطوبت در کاهش میزان آلودگی قارچی در برنج از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.(۲۸)

نتیجه‌گیری

نتایج بدست آمده از نمونه‌های مورد مطالعه در این پژوهش، بیانگر آن است که میزان آلودگی به انواع مایکوتوکسین‌ها و فلزات سنگین در برنج‌های وارداتی کمتر از حد مجاز استاندارد بود و به لحاظ مصارف خوراکی از نظر سلامت و ایمنی مصرف‌کننده در حد قابل قبول قرار دارند.

تشکر و قدردانی

از مساعدت های اداره کل استانداری استان گلستان در انجام این پژوهش، صمیمانه قدردانی و سپاسگزاری می گردد.

Archive of SID
www.SID.ir

منابع

1.Park JW, Choi S-Y, Hwang H-J, Kim Y-B. Fungal mycoflora and mycotoxins in Korean polished rice destined for humans. International Journal of Food Microbiology. 2005;103(3):303-14.

2. Noori K. A study on market distortions and its effects on rice supply, demand and import in Iran. Journal of Pajouhesh and sazandegi. 2007;73:17-25(in Persian).

3. Zain ME. Impact of mycotoxins on humans and animals. Journal of Saudi Chemical Society. 2011;15(2):129-44.

4. Peraica M, Radić B, Lucić A, Palvović M. Toxic effects of mycotoxins in humans. Bulletin of the World Health Organization. 1999;77(9):754-66.

5. Hussein SH, Brasel JM. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals-review. Journal of Toxicology. 2001;167:131-34.

6. Hussain A, Ali J, Shafqatullah. Studies on contamination level of aflatoxins in Pakistani rice. Journal of Chemistry Society of Pakistan. 2011;33:481-84.

7. IARC (International Agency for Research on Cancer), IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. volume 56. Lyon, France: IARC; 1993.

8. Richard JL. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses-an overview. International Journal of Food Microbiology. 2007;119(1-2):3-10.

9. Lin HT, Wong S-S, Li G-Ch. Heavy metal content of rice and shellfish in Taiwan. Journal of Food and Drug Analysis. 2004;12(2):167-74.

10.Zazouli MA, Bandpei AM, Maleki A, Saberian M, Izanloo H. Determination of cadmium and lead contents in black tea and tea liquor from Iran. Asia Journal of Chemistry. 2010;22(2):1387-93.

11.Yap DW, Adezrian J, Khairiah J, Ismail BS, Ahmad-Mahir R. The uptake of heavy metals by paddy plants (Oryza sativa) in Kota Marudu, Sabah, Malaysia. American-Eurasian Journal of Agriculture and Environment Science. 2009;6(1):16-19.

12. Luo Y, Wu l, Liu L, Han C, Li Z. Heavy metal contamination and remediation in Asian agricultural land, key laboratory of soil environment and pollution remediation. China: Chinese Academy of Sciences; 2009.

13. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Analysis sampling of agricultural crops for aflatoxin. ISIRI No. 2581. 2nd ed. Karaj: ISIRI; 1985 (in Persian).

14. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Food and feed stuffs: Determination of aflatoxins B&G by HPLC method using immunoaffinity column clean up-Test method. ISIRI No. 6872. Karaj: ISIRI; 2012 (in Persian).

15. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Foodstuffs- Cereal and cereals Products: Determination of ochratoxin A by HPLC method and immunoaffinity column clean up-Test method. ISIRI No. 9238. Karaj: ISIRI; 2012 (in Persian).

16. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Foodstuffs- Cereal and cereals products: Determination of zearalenon by HPLC method and immunoaffinity column clean up-Test method. ISIRI No. 9239. Karaj: ISIRI; 2012 (in Persian).

17. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Cereal and cereal products: Determination of deoxynivalenole by HPLC method and DONSPE column clean up-Test method. ISIRI No. 10215. Karaj: ISIRI; 2012 (in Persian).

18. Metals and Other Elements at Trace Levels in Foods .AOAC Official Method 986.15.2005.

19. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Food & Feed-Maximum limit of heavy metals. ISIRI No. 12968. Karaj: ISIRI; 2011 (in Persian).

20.Hadian Z, Yazdanpanah H, Azizi MH, Seyedahmadian F, Koshki MR, Hosseini SM, et al. Occurrence of ochratoxin A in rice sold in chain stores in Tehran, 2007. Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology. 2009;2:53-59 (in Persian).

21. Faraji H, Tabatabai Yazdi F, Kafilzadeh F, Nasiri Mohallati M. Investigation of total aflatoxins in consumed rice at Mashhad city in the summer and winter. Journal of Food Science and Technology. 2010;2:11-16 (in Persian).

22. Salem NM, Rafat A. Mycotoxins in food from Jordan: preliminary survey. Food Control. 2010;21(8):1099-103.

23.Nguyen MT, Tozlovanu M, Tran TL, Pfohl-Leszkowicz A. Occurrence of aflatoxin B1, citrinin and ochratoxin A in rice in five provinces of the central region of Vietnam. Food Chemistry. 2007;105(1):42-47.

Archive of SID

www.SID.ir

24. Malakootian M, Yaghmaeian K, Meserghani M, Mahvi AH, Daneshpajouh M. Determination of Pb, Cd, Cr and Ni concentration in imported Indian rice to Iran. Iranian Journal of Health and Environment. 2010;4(1):77-84 (in Persian).
25. Hedayatifar R, Falahi A, Birjandi M. Determination of cadmium and lead levels in high consumed rice (Oryza Sativa L.) cultivated in Lorestan province and its comparison with national standards. Journal of Lorestan University of Medical Sciences. 2011;4:15-22 (in Persian).
26. Jo IS, Koh MH. Chemical changes in agricultural soils of Korea: date review and suggested countermeasures. Environmental Geochemistry and Health. 2004;26(2):105-17.
27. Herawati N, Suzuki S, Hayashi K, Rivai IF, Koyama H. Cadmium, copper, and zinc levels in rice and soil of Japan, Indonesia, and China by soil type. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 2000;64(1):33-39.
28. Institute of Standards and Industrial Research of Iran .Cereals – Prevention and reduction of mycotoxins - Code of hygienic practice. ISIRI No. 9391. Karaj: ISIRI; 2008 (in Persian).

Archive of SID

www.SID.ir

Determination of Mycotoxin Contamination and Heavy Metals in Edible Rice Imported to Golestan Province

Mahdis Mosayebi[1*] , Habiballah Mirzaee [2]

[1]MSc student of agricultural engineering-food science & industry, Department of food science , Faculty of Agriculture & natural resources,Islamic Azad University, Azadshahr Branch ,expert in Standard Office of Golestan,Golestan ,Iran

[2] Ph.D. in food engineering ,Associated Professor , Department of Food Science ,Faculty of Agriculture & natural resources, Islamic Azad University, Azadshahr Branch,Golestan,Iran

Received: 14 January 2013 ; Accepted: 9 April 2013

ABSTRACT

Background and Objective: Rice is one of the most consumed food items that is exposed to mycotoxins and heavy metals contamination. Due to the accumulation of heavy metals in the tissues of human body and its side effects on the body and being carcinogenic and mutagenic mycotoxin, the present study was conducted to determine contamination of rice imported in Golestan Province.

Materials and Methods: We collected 80 samples of imported rice from India and Pakistan on the Inche boron border in Golestan province between January 2011 and August 2012. We analyzed each sample for the amount of mycotoxins (aflatoxins B1, B2, G1, G2 and total aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone and dexynivalenol) and heavy metals (lead, arsenic, and cadmium). We used HPLC to measure mycotoxins and immunoaffinity column (Dexynivalenol purification was conducted using DONSPE column) for purifying. Hydride generation atomic absorption based optical spectroscopy technique was used for determining arsenic. Graphite furnace atomic absorption according AOAC.986.15 was used to determine lead and cadmium.

Results: We found that the average level of aflatoxin B1, B2, ochratoxin A, and total aflatoxin were 0.93, 0.036, 0.033 and 0.96 ng/g respectively. Aflatoxin G1, G2 and dexynivalenol was not observed in any of the samples. Average concentrations of lead, arsenic, and cadmium in the samples were 0.067, 0.007, 0.024 mg/kg respectively.

Conclusions: All samples were within the accepted maximum limits of Iran National Standards for heavy metals and mycotoxins in rice.

Keywords: Food security; rice; mycotoxin; heavy metals; imports.

***Corresponding Author:** *mahdis_mosayebi@yahoo.com*
Tel: *+98 171 2345623-25,* **Fax:** *+98* ----------

Archive of SID

www.SID.ir