آفات و بیماری‌های گیاهی
جلد ۷۳، شماره ۱، شهریور ۱۳۸۴

تعیین مقدار داکسی نیوالنول در آرد گندم با استفاده از ستون ایمنوافینیتی و کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا

Quantification of Deoxynivalenol in wheat flour using Immunoaffinity column and High performance Liquid Chromatography

علیرضا عباداللهی[۱] و محمود قاضی خوانساری[۲]

۱- مؤسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی، تهران

۲- گروه فارماکولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران

(تاریخ دریافت: تیر ۱۳۸۳، تاریخ پذیرش: خرداد ۱۳۸۴)

چکیده

به منظور تعیین مقدار داکسی نیوالنول (DON) در آرد گندم نمونه‌های آرد از ۵ کارخانه بین کارخانجات آرد استان تهران بطور تصادفی انتخاب شد و از هر کارخانه برحسب نوع آرد (آرد کامل، آرد سبوس گرفته، آرد ستاره، آرد نول، و آرد ماکارونی) ۵ نمونه ۱ کیلوگرمی گرفته شد. سپس با استفاده از ستون‌های ایمنوافینیتی (Immunoaffinity) عمل استخراج صورت گرفت. آنالیز دستگاهی توسط دستگاه HPLC مجهز به دتکتور UV و ستون C_{18} با استفاده از فاز حامل استونیتریل– آب به نسبت ۱۰/۹۰ (V/V) روی تمامی نمونه‌ها انجام شد. DON در تمامی ٤٠ نمونهٔ آنالیز شدهٔ آرد وجود داشت. بیشترین مقدار DON در آرد کامل با متوسط میزان آلودگی ۱۳۰/۰۵ µg/g و کمترین مقدار در آرد سبوس گرفته با متوسط میزان آلودگی ۳۹/۹۳ µg/g بدست آمد. آنالیز آماری داده‌ها نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین آرد کامل با آرد ستاره و سبوس گرفته وجود دارد ($p = ۰/۰۱۷۱$).

واژه‌های کلیدی: آرد گندم، داکسی نیوالنول، کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا، ستون‌های ایمنو افینیتی

مقدمه

مایکوتوکسین‌ها در دانه‌ها، آرد و مواد غذایی پتانسیل خطر بالایی برای سلامتی انسان‌ها دارند (Pestka & Bandy, 1990). یکی از مهم‌ترین مایکوتوکسین‌ها، داکسی نیوالنول (DON)[1] می‌باشد که تحت نام وامیتوکسین[2] شناخته شده است. این مایکوتوکسین توسط گونه‌های جنس فوزاریوم ایجاد می‌شود. وجود این مایکوتوکسین در سراسر دنیا روی گندم، جو، ذرت و برنج گزارش شده است (Bhat, 1985). مطالعات انجام شده توسط Zamanizadeh & Khorsandi (1995) که روی گندم‌های استان مازندران انجام گرفته نشان داده است که *Fusarium graminearum* یکی از گونه‌های غالب در مزارع گندم استان مازندران می‌باشد که قادر به تولید مایکوتوکسین DON می‌باشد. بسیاری از کشورها همچون کانادا، روسیه و آمریکا حد مجاز ۰/۵–٤ µg/g را برای این مایکوتوکسین در گندم در نظر می‌گیرند (Jelinek *et al*., 1989). این در حالی است که برای فراورده‌های تمام شدهٔ آن مثل آرد تا ۱ µg/g در نظر گرفته شده است (Anonymous, 1993). هر چند سازمان غذا و داروی آمریکا با توجه به روش‌های مختلف کارخانجات آرد سطح قابل پیشنهادی را برای DON در آرد ارائه نکرده است.

DON در انسان اثرات شناخته شده‌ای را ایجاد می‌کند بطوریکه بعنوان یک عامل ایجاد کننده بیماری ATA (آلوکیای سمی ماده غذایی[3]) شناخته شده است. میزان مرگ و میر حاصل از شیوع این بیماری در اتحاد جماهیر شوروی در سال ۱۹۳۲، ٦۰٪ گزارش شده است (Peraica *et al.*, 1999). علایم این بیماری بصورت درد در ناحیه شکم، ترشحات بزاقی، کاهش گلبول‌های سفید، کاهش گرانولوسیت‌ها، و لکه‌های قرمز پوستی در سطح بدن نمایان می‌شود (Peraica *et al.*, 1999). وجود DON در اکثر نقاط جهان در غلات و فراورده‌های آسیاب شده آن همچون آرد ثابت شده است (Scott, 1990). آرد گندم فراورده‌ای است که در رژیم پرمصرف نان، تهیه غذای کودکان، تهیه بیسکوئیت، شیرینی و ماکارونی اهمیت بالایی داشته و در مطالعات قبلی وجود DON در برخی از این فراورده‌ها ثابت شده است (Daraie *et al*., 1998).

۱– Deoxynivalenol

۲– Vomitoxin

۳– Alimentary Toxic Aleukia

DON همچنین یکی از ارکان جیره غذایی در دامداری‌ها و در صنعت مرغداری محسوب می‌شود، لذا این مطالعه به منظور تعیین مقدار DON در آرد گندم انجام گرفت.

روش بررسی

نمونه‌گیری: نمونه‌گیری بصورت نمونه‌گیری تصادفی لایه‌ای[1] انجام شد، بدین صورت که پس از تهیه لیست، کارخانجات آرد بر اساس ظرفیت کارخانه‌ها به ۵ گروه تقسیم شدند و بر حسب قرعه ۵ کارخانه انتخاب شد. سپس از هر کارخانه بر حسب نوع آرد از قسمت‌های مختلف کارخانه نمونه‌های یک کیلوگرمی انتخاب و با استفاده از سر تاس که قبلاً ضدعفونی شده بود به کیسه‌های نخی منتقل شدند. قبل از هر نمونه‌گیری ابتدا از طریق پرسشنامه مواردی چون نوع آرد، سیستم آسیاب کردن، میزان تولید، منشاء گندم و شرایط انبار کارخانه پرسیده شد، سپس از هر کارخانه از قسمت‌های مختلف بازدید بعمل آمده و اقدام به نمونه‌گیری شد.

روش آزمایش: پس از انتقال نمونه‌های آرد به آزمایشگاه، نمونه‌هایی که از یک دسته (batch) بودند، با هم مخلوط و به نمونه‌های ۱۰۰ گرمی تقیسم سپس این نمونه، به نمونه‌های ۱۰ گرمی برای انجام آنالیز تقسیم شدند.

روش انجام آزمایش بر اساس روش بکار گرفته توسط Kotal & Radova (2002) با اندکی تغییرات بود که شرح آن در ذیل آمده است:

استخراج: ابتدا ۱۰ گرم نمونه آرد را وزن نموده، سپس ٤٠ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر و ۲ گرم پلی‌اتیلن‌گلیکول اضافه شد. مخلوط به مدت یک دقیقه با استفاده از دستگاه هموژنایزر بصورت مخلوط یکنواخت درآمد. سپس از طریق فیلتر Fluted و فیلتر Microfiber عمل صاف کردن صورت گرفت.

پالایش: عمل پالایش با کروماتوگرافی ایمینو افینیتی[2] صورت گرفت. بدین صورت که ۱ میلی‌لیتر از استخراج نهایی را که برابر با ۰/۲۵ گرم از نمونه اصلی بود، برداشته و داخل ستون‌های DON (DON Test Column)[3] قرار گرفت. سپس ۱۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر برای شستن استفاده

۱– Stratified Random Sampling

۲– Immunoaffinity

۳– ستون‌های مذکور با Lot No: 123 (550 µL) از شرکت سبحان دارو نمایندگی شرکت Vicam آمریکا تهیه شد.

شد. شستشوی DON در ستون از طریق اضافه کردن ۱۰ میلی‌لیتر متانول (HPLC grade) ادامه پیدا کرد و حلال اضافه شده از طریق گاز ازت خشک گردید و مجدداً ۳۰۰ میکرولیتر فاز حامل اضافه شد.

تجزیه دستگاهی از طریق HPLC: ۱۰۰ میکرولیتر از نمونه نهایی به دستگاه تزریق شد. فاز حامل مورد استفاده شامل محلول استونیتریل- آب به نسبت ۱/۹ (V/ V ۹۰ :۱۰) بود. میزان جریان حلال برابر با ۱ میلی‌لیتر در دقیقه تنظیم گردید. DON در طول موج ۲۱۸ نانومتر، توسط آشکارساز ماورا بنفش، مشخص گردید.

آزمایش‌های بازیافت (Recovery): آزمایش بازیافت با روش بالا در سه غلظت متفاوت (ppm ۱۰ و ۵، ۲/۵) انجام گرفت، بدین صورت که ۱ میلی‌لیتر از محلول استاندارد[۱] DON با غلظت ppm ۱۰۰ را برداشته به ۱۰ گرم آردی که از طریق آنالیز اولیه به عدم آلودگی آن پی برده شد، اضافه گردید تا غلظت ppm ۱۰ در آرد بدست آید. تهیه سایر غلظت‌ها در آرد نیز بر اساس محاسبات انجام شده از طریق محلول استاندارد کاری با غلظت ppm ۱۰۰ صورت گرفت. برای محاسبه درصد بازیافت ابتدا بازیافت DON را از نمونه اسپایک شده (Spiked) بر اساس معادل سطح زیر پیک منحنی بدست آورده، سپس مقدار بدست آمده را از مقدار DON قبل از اینکه اسپایک شود، کم کرده و در نهایت درصد بازیافت محاسبه گردید.

نتیجه و بحث

نتایج آزمایش درصد بازیافت از نمونه‌های آردی که بطور دستی در آزمایشگاه در سه سطح (µg/g۱۰ و ۵، ۲/۵) و در دو تکرار تیمار شده بودند در جدول ۱ نشان داده شده است. همانطور که در جدول شماره ۱ نشان داده شده است، بیشترین درصد بازیافت در سطح µg/g۵ با متوسط ۱۰۰/۳٪ و کمترین درصد بازیافت در سطح µg/g۲/۵ با متوسط درصد بازیافت ۶۳/۲٪ بدست آمد. نتایج بدست آمده از آزمایش‌های بازیافت در دو سطح (µg/g۱۰ و ۵) با نتایج آزمایش Kotal & Radova (2002) و Cahill *et al*. (1999) که بیشترین درصد بازیافت را در

۱- استاندارد مذکور با (100 µg/ ml) Lot No: 011128 محصول شرکت Romer Labs اتریش، توسط شرکت آموزشی و تحقیقاتی مرجعان خاتم تهیه گردید.

غلظت ppm ۵ و ۱۰ بدست آورده بودند، کاملاً منطبق بود.

جدول ۱- درصد بازیافت DON در سه سطح (µg/g ۱۰، ۵، ۲/۵)

Table 1- Percent recovery of DON in three levels (2.5, 5, 10 µg/g)

شماره تکرار Replication No.	میزان اضافه شده Added µg/g	میزان بدست آمده Obtained Value µg/g	درصد بازیافت %Recovery	متوسط درصد بازیافت The Mean of % Recovery
1	2.50	1.56	62.40	**%63.2**
2	2.50	1.60	64.00	
1	5.00	5.13	102.6	**%100.30**
2	5.00	4.90	98.00	
1	10.00	8.17	81.70	**%82.48**
2	10.00	8.32	83.20	

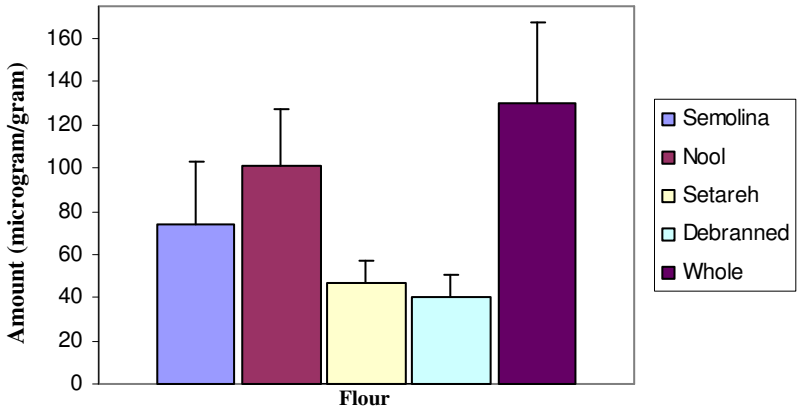
نمونه‌های آردی که از کارخانجات آرد مختلف استان تهران جمع‌آوری شدند و بطور طبیعی با DON آلوده شده بودند جهت تعیین مقدار مورد آنالیز دستگاهی قرار گرفتند. بیشترین مقدار DON در آرد کامل به میزان µg/g ۲٤۹/۵۲ و کمترین آلودگی در آرد سبوس گرفته به میزان µg/g ٦ بدست آمد (جدول ۲).

متوسط میزان DON در ۵ نوع آرد آنالیز شده برای آرد ماکارونی (Semolina)، نول، ستاره، سبوس گرفته و آرد کامل به ترتیب برابر با µg/g ۷۳/۷٦، ۱۰۱/۳۱، ٤۷/۰٤، ۳۹/۹۳ و ۱۳۰/۰۵ بدست آمد (شکل ۱).

جدول ۲- نتایج حاصل از میزان آلودگی DON در انواع نمونه‌های آرد

Table 2- DON level in different kinds of flours

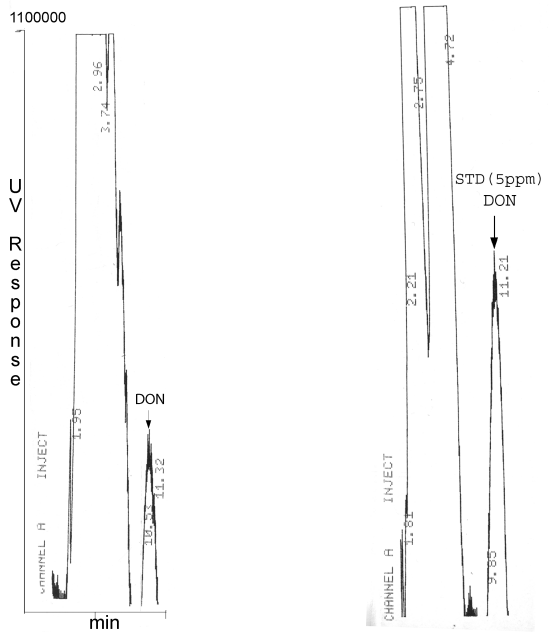
شماره نمونه Sample No.	نوع آرد kind of flour	میزان DON محاسبه شده Calculated DON (µg/g)	شماره نمونه Sample No.	نوع آرد kind of flour	میزان DON محاسبه شده Calculated DON (µg/g)
1	Semolina	131.92	21	Setareh	33.8
2	Semolina	116.00	22	Debranned	6.00
3	Semolina	14.12	23	Debranned	32.24
4	Semolina	33.00	24	Debranned	28.80
5	Nool	54.92	25	Debranned	7.20
6	Nool	34.85	26	Debranned	6.92
7	Nool	230.28	27	Debranned	52.92
8	Nool	128.40	28	Debranned	40.00
9	Nool	46.48	29	Debranned	18.56
10	Nool	65.28	30	Debranned	18.89
11	Nool	55.68	31	Debranned	120.96
12	Nool	194.56	32	Debranned	60.40
13	Setareh	31.8	33	Debranned	104.96
14	Setareh	69.00	34	Whole	21.32
15	Setareh	23.76	35	Whole	60.20
16	Setareh	7.28	36	Whole	49.28
17	Setareh	76.60	37	Whole	119.72
18	Setareh	103.68	38	Whole	239.40
19	Setareh	57.00	39	Whole	249.52
20	Setareh	20.40	40	Whole	62.16



شکل ۱- متوسط میزان DON در ۵ نوع آرد آنالیز شده

Fig. 1- The mean of DON in five kinds of flours

اشکال ۲ و ۳ نیز دو نمونه از کروماتوگرام بدست آمده از استخراج DON در آرد سبوس گرفته و آرد ستاره را در مقابل استاندارد، نشان می‌دهد.

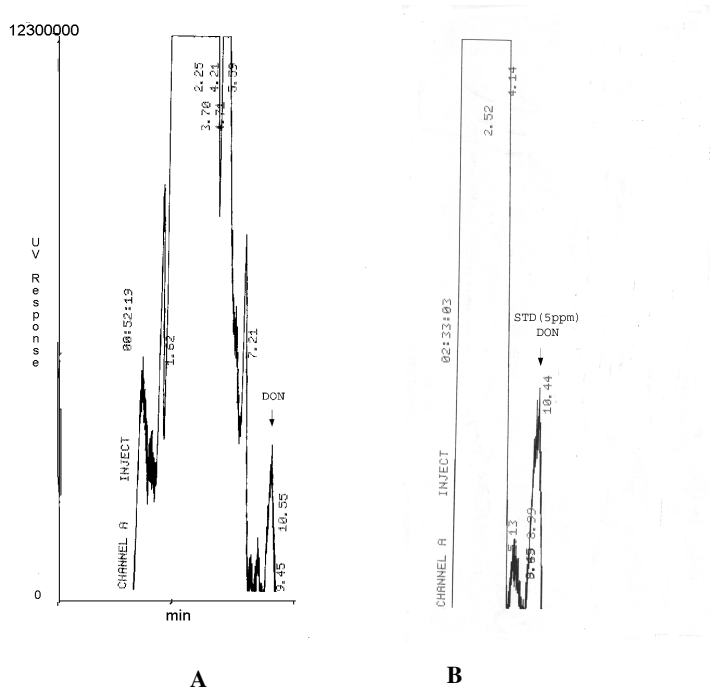


شکل ۲- کروماتوگرام (a) داکسی نیوالنول (٤/٦٤ µg) بدست آمده از استخراج ۰/۲۵ گرم آرد سبوس گرفته در مقابل استاندارد (b)

Fig. 2- Chromatogram of (a) deoxynivalenol (4.64 µg) resulted from 0.25g. of debranned flour compared to Standard (b)

DON در تمامی نمونه‌های آنالیز شده وجود داشت. این بدین معنی است که فرایندهای مختلف بوجاری، الک کردن، تصفیه و بطور کلی اصول آسیاب کردن نتوانسته است از ورود DON به آرد ممانعت نماید. معنای فرایند آسیاب کردن، جداسازی پریکارپ (پوسته)، تستا (دومین پوسته) و جداسازی جوانهٔ لایه آلرون از آندوسپرم می‌باشد (Rajabzadeh, 2002). متوسط میزان باقیمانده در ۵ نوع آرد آنالیز شده برای آرد ماکارونی، نول، ستاره، سبوس گرفته

و آرد کامل به ترتیب برابر با µg/g ٧٣/٧٦، ١٠١/٣١، ٤٧/٠٤، ٣٩/٩٣ و ١٣٠/٠٥ بود. نتایج این بررسی نشان داد که در صورت آلودگی گندم به مایکوتوکسین DON، فرایندهای مختلف ذکر شده عملاً نمی‌تواند از ورود DON به آرد جلوگیری نماید. این نتیجه با نتایج تحقیق بدست آمده توسط Abbas *et al*. (1985) که اثر فرایندآسیاب را در کاهش یا حذف DON بررسی کرده است، منطبق می‌باشد. سطح آلودگی DON در تحقیق فوق بسته به نوع آرد متفاوت بوده است، بطوریکه از ppm ٢١/٣ در سبوس تا ppm ١/١ در آرد صبحانه گزارش شده است. غلظت DON در تحقیق ما نیز طی فرایند آسیاب مقادیر مختلفی داشت، بطوریکه از حداقل ppm ٦ در آرد خبازی تا بیشترین مقدار آن ppm ٢٤٩/٥٢ در آرد کامل متغیر بود.



شکل ٣- کروماتوگرام (a) داکسی نیوالنول (µg ١/٨٢) بدست آمده از استخراج ٠/٢٥ گرم آرد ستاره در مقابل استاندارد (b)

Fig. 3- Chromatogram of (a) deoxynivalenol (1.82 µg) resulted from 0.25g. of Setareh flour compared to standard (b)

علاوه بر مطالب ذکر شده در بالا، مبدا اولیه آلودگی DON نیز در میزان آلودگی آرد بسیار حائز اهمیت می‌باشد. DON مهم‌ترین آلوده کننده غله در جهان است (Scott, 1990) و یکی از مهم‌ترین مایکوتوکسین‌ها در فراورده‌های کشاورزی می‌باشد (Stratton *et al*., 1993). مطالعات انجام گرفته در آمریکا، آلمان، هلند، بلغارستان، مجارستان، چین، کره و آرژانتین نشان داده است که ۱۰۰٪ – ۶۰ نمونه‌های گندم دارای آلودگی به اندازه ٤٤ µg/g می‌باشند (Chahill *et al*., 1999). آلودگی گندم‌های داخلی نیز در ایران در استان مازندران تا ۱۰/۵ µg/g گزارش شده است (Zamanizadeh & Khorsandi, 1995). بر اساس اطلاعات بدست آمده از طریق پرسشنامه‌های تکمیل شده برای هر کارخانه، مشخص گردید که گندم‌های وارداتی از کشورهایی چون قزاقستان، استرالیا، کانادا، فرانسه، آرژانتین و گندم‌های داخلی بیشتر از استان‌های فارس، مازندران، همدان، کرمانشاه، خوزستان، گرگان، ایلام و تهران تأمین می‌گردد و در سیلوی اختلاط با هم آمیخته می‌شوند. میزان اختلاط بسته به سیاست‌های واردات و استراتژی دولت متفاوت می‌باشد، بطوریکه در سال ۱۳۸۲ نسبت اختلاط در کارخانجات آرد بصورت ۲۰٪ – ۵ گندم وارداتی و ۸۰ تا ۹۵ ٪ گندم داخلی بوده و این در حالیست که در سال ۱۳۸۱ این نسبت بصورت برعکس بوده است. اختلاط گندم‌های داخلی و گندم‌های خارجی که در بعضی موارد همانطور که در بالا ذکر شده است، میزان DON بالایی را دارند، منجر به افزایش میزان DON در آرد خواهد شد و این یکی از دلایل توجیهی میزان بالای بدست آمده DON در آرد می‌باشد. مقایسه میانگین‌های انواع نمونه‌های آرد آلوده به مایکوتوکسین DON نشان داد که اختلاف معنی‌داری بین میانگین آرد کامل با آرد ستاره و سبوس گرفته وجود دارد (جدول ۳). مقدار P، ۰/۰۱۷۱، بدست آمد (P_{value} = ۰/۰۱۷۱).

دلیل این معنی‌دار شدن را می‌توان بر اساس روش‌های مختلف الک‌گیری، سیستم آسیاب (والسی، سنگی) و تا حدود زیادی بر اساس میزان سبوس گرفته شد بررسی کرد، بطوریکه در آرد کامل با توجه به اینکه این نوع آرد بیشتر از لایه خارجی استحصال می‌گردد و سبوس‌گیری انجام نمی‌شود و فقط ممکن است ۲–۱٪ پوست‌گیری گردد، در نتیجه انتظار آلودگی در این نوع آرد بیشتر می‌باشد.

جدول ۳- مقایسه میانگین مقدار DON در انواع مختلف آرد

Table 3- Comparison of the mean level of DON in different kinds of flours

آرد – آرد	اختلاف میانگین Mean difference	معنی‌دار بودن Significance	مقدار P P value
Debranned -Setareh	-7.11	n.s	P>0.05
Debranned- Semolina	-33.83	n.s	P>0.05
Debranned-Nool	-61.38	n.s	P>0.05
Debranned-whole	-90.12	*	P<0.05
Setareh – Semolina	-26.72	n.s	P>0.05
Setareh- Nool	-54.27	n.s	P>0.05
Setareh – Whole	-83.01	*	P<0.05
Semolina – Nool	-27.55	n.s	P>0.05
Semolina – Whole	-56.29	n.s	P>0.05
Nool – Whole	-28.74	n.s	P>0.05

n.s= غیر معنی‌دار

n.s = non-significant

*= اختلاف معنی‌داری بین نمونه‌ها وجود دارد.

* = There was a significant difference between these flours.

نشانی نگارندگان: علیرضا عباداللهی، بخش تحقیقات آفت‌کش‌ها، مؤسسه تحقیقات آفات و بیماری‌های گیاهی، صندوق پستی ۱۴۵۴، تهران ۱۹۳۹۵، ایران؛ محمود قاضی‌خوانساری، گروه فارماکولوژی دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی تهران، ایران.