مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

اندازه گیری میزان آفلاتوکسین M_1 و اکراتوکسین A در نمونه های شیر پاستوریزه و بررسی تاثیر امواج مایکروویو در کاهش غلظت آن‌ها

اکبر بدلی[۱]، افشین جوادی*[۳و۲]، محمدرضا افشار مقدم[٤]، زهره مشاک[٥]

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد ممقان، دانشگاه آزاد اسلامی، ممقان، ایران.

۲- گروه بهداشت مواد غذایی، واحد علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۳- مرکز تحقیقات ارتقاء سلامت، واحد علوم پزشکی تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

٤- مرکز تحقیقات ایمنی غذا و دارو، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.

٥- گروه بهداشت مواد غذایی،دانشکده دامپزشکی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت:۱۴۰۲/۱۰/۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۵/۲۸

کلمات کلیدی:

استخراج فاز جامد پخشی،

امواج مایکروویو،

میکرواستخراج مایع-مایع پخشی،

کروماتوگرافی‌مایع با کارائی‌بالا،

شیر پاستوریزه

DOI:10.22034/FSCT.22.162.42.

* مسئول مکاتبات:

Javadi@iaut.ac.ir

چکیده

با توجه به گستردگی استفاده از محصولات لبنی مانند شیر پاستوریزه، این محصولات باید عاری از هر گونه آلاینده مانند باقیمانده دارو، آفت کش، مایکوتوکسین و غیره باشند. مایکوتوکسین‌ها (مانند آفلاتوکسین‌ها، اکراتوکسین A و غیره) دسته‌ای از مواد سمّی و آلاینده مواد غذایی، خوراک دام و طیور هستند که به طور طبیعی از انواع خاصی از قارچ‌ها تولید می‌شوند. حضور مایکوتوکسین‌ها در شیر برای سلامتی مصرف کننده بسیار خطرناک است. بنابراین توسعه روش‌های سریع، کارآمد و آسان برای بررسی حضور مایکوتوکسین‌هایی مانند آفلاتوکسین M_1 و اکراتوکسین A در مواد غذایی بسیار حائز اهمیت می‌باشد. در این کار پژوهشی یک روش تجزیه‌ای کارآمد مبتنی بر استخراج فاز جامد پخشی ترکیب شده با میکرواستخراج مایع-مایع پخشی برای استخراج آفلاتوکسین M_1 و اکراتوکسین A از نمونه های شیر پاستوریزه و آنالیز آن‌ها با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مجهز به دتکتور فلورسانس ارائه شده است. تحت شرایط بهینه حدود تشخیص و اندازه گیری به ترتیب در محدوده های ۰/۲۹-۰/۲۳ و ۰/۹۷-۰/۷۷ نانوگرم بر لیتر حاصل شدند. همچنین فاکتور تغلیظ و راندمان استخراج به ترتیب در محدوده های ۲۴۹-۲۳۲ و ٪ ۸۹-۸۳ بدست آمدند. در تعدادی از نمونه ها نیز آفلاتوکسین M_1 (در ۷۰ درصد از نمونه های شیر بررسی شده) و اکراتوکسین A (در ۱۰ درصد از نمونه های شیر بررسی شده) یافت شد. همچنین با توجه به نتایج بدست آمده، تابش مایکروویو می‌تواند میزان آفلاتوکسین M_1 (در محدوده ۲۷/٦ تا ۳۳/۵ درصد) و اکراتوکسین A (در محدوده ۱۷/۳ تا ۲۰/۸ درصد) کاهش دهد.

۱-مقدمه

امروزه، گسترش و بروز انواع مختلف سرطان که تحت تاثیر عوامل مختلفی مانند ایمنی مواد غذایی قرار دارد سلامت جوامع بشری را به طور جدی تهدید می کند. شیر و فرآورده های آن به دلیل دارا بودن مواد مغذی نقش موثری در سبد غذایی مردم سراسر جهان دارند. با توجه به این نکته، شیر و فرآورده های آن باید عاری از هرگونه آلودگی مانند آفت کش، مایکوتوکسین، فلزات سنگین و غیره باشد [۱]. مایکوتوکسین ها بسیار خطرناک بوده و جزو شناخته شده ترین آلاینده ها می باشند. این ترکیبات به طور طبیعی از رشد انواع خاصی از قارچ‌ها حین تولید، نگهداری و انبار نمودن مواد غذایی در شرایط گرم و مرطوب تولید می شوند [۲]. از جمله مایکوتوکسین های شناخته شده می توان به آفلاتوکسین ها و اکراتوکسین A اشاره کرد [۳]. مایکوتوکسین ها می توانند به طور مستقیم (از طریق مصرف مواد غذایی آلوده) و یا غیر مستقیم (از طریق مصرف فرآورده های حیوانات در معرض مایکوتوکسین ها مانند شیر) وارد بدن انسان شوند. این ترکیبات جزو مواد سرطان زا بوده و طی فرایندهای تولید غذا، انجماد و پختن از بین نمی روند. امروزه بیشتر از ۱۷ نوع آفلاتوکسین در طبیعت شناخته شده است که چهار نوع اصلی آن شامل G1، G2، B1 و B2 می‌باشند [٤]. در میان این موارد، آفلاتوکسین B1 و متابولیت هیدروکسیله آن (آفلاتوکسین M1) از سمی ترین افلاتوکسین ها می باشند [٥]. اکراتوکسین A دیگر مایکوتوکسین سمی است که اولین بار از سویه آسپرژیلوس اکراسیوس استخراج و خالص سازی شد. با در نظر گرفتن این نکات، پایش مقدار مایکوتوکسین ها در نمونه های مواد غذایی مانند شیر جهت آگاهی بخشی به متولیان تغذیه و سلامت کشور و عموم مردم بسیار حائز اهمیت است.

مهمترین چالش پیشروی صنایع غذایی و لبنی کاهش یا حذف آلاینده های مواد غذایی می باشد. تا به حال برای رسیدن به این هدف، از فرآیندهای مختلفی مانند تابش دهی با پرتو گاما، اشعه ماورابنفش، اشعه مایکروویو، حرارت، اکسیداسیون و کمپوست استفاده شده است [٦، ٧]. استفاده از این روش ها می تواند از طریق تغییر و تخریب ساختار مولکولی آلاینده ها، سبب مهار انتقال و کاهش قابلیت دسترسی آن ها به بافت هدف و حذف آن ها گردد.

در بسیاری از موارد با توجه به حساسیت بالا از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا[1] به عنوان ابزار تجزیه‌ای برای آنالیز انواع مختلف مایکوتوکسین ها استفاده می شود [۸]. اما متاسفانه آنالیز مستقیم مایکوتوکسین‌ها بدون استفاده از روش‌های آماده سازی به دلیل پیچیدگی ماتریکس نمونه‌ها و مقادیر غلظتی پایین در آن‌ها امکان پذیر نیست [۹]. بنابراین، توسعه و استفاده از روش های آماده سازی آسان و کارا قبل از آنالیز نمونه ها بسیار حائز اهمیت می باشد. تاکنون روش های متنوعی جهت آماده سازی نمونه ها استفاده شده که از این جمله می توان به استخراج مایع-مایع، استخراج فاز جامد، استخراج فاز جامد پخشی[2] و میکرواستخراج مایع-مایع پخشی[3] اشاره کرد.

استخراج فاز جامد پخشی یکی از پرکاربردترین روش های آماده سازی نمونه بوده و در آن ذرات جاذب بطور مستقیم با محلول نمونه در تماس می‌باشند. ذرات جاذب براساس گروه عاملی‌شان می توانند ترکیبات موجود در بافت نمونه را جذب کنند [۱۰]. در مرحله ی بعد ذرات جامدی که آنالیت ها را جذب کرده اند به وسیله ی سانتریفیوژ از محلول آزمایشی جدا شده و به وسیله ی یک حلال مناسب

1- High Performance Liquid Chromatography

2 -Dispersive solid phase extraction

3- Dispersive liquid-liquid microextraction

جهت واجذب آنالیت ها شسته می‌شوند. بنابراین در این روش، انتخاب جاذب مناسب بیش ترین تاثیر را دارد. چارچوب های آلی-فلزی[1]، نسل جدیدی از نانو جاذب ها هستند که با توجه به ظرفیت بالای جذب، تخلخل بسیار بالا، مساحت سطح بالا، پایداری مکانیکی و حرارتی بالا و روش های سنتز ساده بسیار مورد توجه قرار گرفته اند [۱۱].

در این کار پژوهشی از تلفیق روش DSPE و DLLME مبتنی بر استفاده از مایع یونی مغناطیسی برای استخراج آفلاتوکسین M_1 واکراتوکسین A از نمونه های شیر پاستوریزه و سپس آنالیز این ترکیبات به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مجهز به دتکتور فلورسانس[2] استفاده شد. همچنین در این کار پژوهشی برای اولین بار تاثیر استفاده از امواج فرابنفش در کاهش محتوای آنالیت های مورد مطالعه در نمونه های شیر پاستوریزه مورد بررسی قرار گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- نمونه برداری

۳۱ نمونه شیر پاستوریزه گاو در زمستان ۱٤۰۰ که توسط تولید کنندگان محلی در سطح استان آذربایجان شرقی تولید شده بودند از شرکت پگاه تبریز تهیه شدند. این نمونه ها تا زمان آنالیز در ظروفی از جنس پلی اتیلن ترفتالات در داخل یخچال (با دمای ٤ درجه سانتیگراد) نگهداری شدند. یکی از نمونه ها که فاقد آنالیت های مورد مطالعه بود به عنوان بلانک انتخاب شد و در بهینه سازی روش پیشنهادی مورد استفاده قرار گرفت. تمامی آزمایش‌ها در دانشکده شیمی دانشگاه تبریز انجام شد.

۲-۲- مواد شیمیائی

استاندارد آفلاتوکسین M_1، اکراتوکسین A و سه نوع مایع یونی مغناطیسی شامل ۱-هگزیل-۳-متیل ایمیدازولیوم تتراکلروفرات ([C_6MIM] [$FeCl_4$])، ۱-بوتیل-۳-متیل ایمیدازولیوم تتراکلروفرات ([C_4MIM] [$FeCl_4$]) و ۱-بوتیل-۳-متیل ایمیدازولیوم دی برومو دی کلروفرات ([C_4MIM] [$FeCl_2$ Br_2]) از شرکت سیگما (Sigma, USA)، $FeCl_3 \cdot 6H_2O$، ۱و٤-بنزن دی کربوکسیلیک اسید، دی متیل فرمامید، استون، متانول، ایزوپروپانول، تری کلرو استیک اسید، سدیم کلرید، سدیم هیدروکسید از شرکت مرک (Merck, Germany)، استونیتریل و آب با درجه HPLC-grade از شرکت کِمِلَب (ChemLab, Belgium) خریداری شدند.

۲-۳- شرایط آنالیز با دستگاه کروماتوگرافی

بهینه سازی شرایط آنالیز و پارامترهای دخیل در فرآیند جداسازی با دستگاه HPLC، منجر به افزایش قابلیت جداسازی سیستم کروماتوگرافی می شود. شرایط بهینه HPLC مجهز به FLD برای آنالیز آفلاتوکسین M_1 و اکراتوکسین A در جدول یک ذکر گردیده است.

Table 1. Optimal condition of HPLC-FLD

Type of column	Gemini C_{18} , length: 150 mm, ID: 4.6 mm, particle size: 5 µm
Mobile phase	Acetonitrile: water (35:65 v/v), flow rate: 1.1 ml/min
Injector	40 °C, loop: 20 µL
Wavelength of Emission	360 nm for Aflatoxin M_1 and 333 nm for Ochratoxin A
Wavelength of Excitation	430 nm for Aflatoxin M_1 and 470 nm for Ochratoxin A

۲-٤- سنتز MOF

برای سنتز چارچوب آلی-فلزی (MIL-88B(Fe)) [۱۲]، مخلوطی از ۵۵ میلی‌لیتر دی متیل فرمامید و ٤.٤ میلی‌لیتر

1 -Metal Organic Frameworks

2 -Fluorescence Detector

محلول سدیم هیدروکسید (۲ مولار) به یک لیوان شیشه‌ای اضافه و مخلوط مذکور تا زمان دستیابی به یک محلول همگن همزده شد. در ادامه ۱/۸۲ گرم ۱و٤-بنزن دی کربوکسیلیک اسید و ۲/۹۷ گرم $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ به داخل مخلوط مذکور اضافه و مخلوط به مدت ۱۵ دقیقه همزده شد. سپس مخلوط حاصل به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۱۰۰ درجه سانتیگراد اتوکلاو گردید. در ادامه، رسوب به دست آمده با استفاده از کاغذ صافی فیلتر و در دمای اتاق خشک شد. در ادامه پودر جامد به ۲۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه اضافه و به مدت یک روز همزده شد. در نهایت محلول صاف گردیده و MOF به مدت ۱ ساعت در ۱۵ میلی متر جیوه خشک شد. لازم به ذکر است که خواص MOF سنتز شده در کار قبلی گروه ما به طور کامل مورد بحث قرار گرفته است[۱۲].

۲-۵- بهینه‌سازی شرایط استخراج

برای رسیدن به راندمان های استخراج بالا، تاثیر پارامترهای مختلف مانند مقدار تری کلرو استیک اسید (از بین مقادیر ۷۵ تا ۱۵۰ میلی گرم)، مدت زمان ورتکس (از میان مدت زمان های ۱ تا ۵ دقیقه)، مقدار جاذب (از بین مقادیر ۲۵ تا ۱۰۰ میلی گرم)، مدت زمان جذب (از میان زمان های ۱ تا ۵ دقیقه)، اثر نمک زنی (با افزودن محدوده ۰/۰ تا ۱۰ درصد وزنی/ حجمی از نمک سدیم کلرید) ، نوع (از بین چهار حلال استون، متانول، ایزوپروپانول و استونیتریل) و حجم (از بین حجم‌های ۰/۵، ۱/۰، ۱/۵ و ۲/۰ میلی لیتر) حلال شوینده/پخش‌کننده (از بین چهار حلال استون، متانول، ایزوپروپانول و استونیتریل)، مدت زمان واجذب (از میان مدت زمان های ۱ تا ۵ دقیقه) و نوع (از میان سه مایع یونی مغناطیسی $[C_4MIM][FeCl_4]$, $[C_6MIM][FeCl_4]$, $[C_4MIM][FeCl_2Br_2]$) و حجم (از بین حجم‌های ۵۵، ٦۰، ٦۵ و ۷۰ میکرولیتر) حلال استخراج کننده مورد بررسی قرارگرفتند. جهت دستیابی به ماکزیمم کاهش محتوای آفلاتوکسین M_1 و اکراتوکسین A در نمونه ها اثر مدت زمان قرار گرفتن نمونه در معرض امواج مایکروویو (۱۵، ۳۰، ٤۵، ٦۰، ۷۵، ۹۰ و ۱۲۰ ثانیه) و قدرت مایکروویو (از میان توان های ۰، ۹۰، ۱۸۰، ۲۷۰ و ۳٦۰ و ٤۵۰ وات) نیز مورد بررسی قرار گرفت. جهت ارزیابی فاکتورهای موثر در روش ارائه شده از روش "یک پارامتر در یک زمان" استفاده شد. تاثیر این عوامل با مقایسه سطح زیر پیک حاصل از آنالیت‌ها در شرایط مختلف مورد ارزیابی قرار گرفته‌اند.

۲-٦- مشخصات تجزیه‌ای

جهت اعتبارسنجی روش ارائه شده در این کار پژوهشی، پس از رسم منحنی کالیبراسیون برای هر کدام از آنالیت ها، محدوده خطی روش (Linear range)، حد تشخیص (Limit of detection)، حد اندازه‌گیری (Limit of quantitation)، مجذور ضریب همبستگی، تکرارپذیری (RSD%)، راندمان و فاکتور تغلیظ بررسی و محاسبه شدند.

۲-۷- روش استخراج

در این کار پژوهشی یک روش آماده سازی مبتنی بر تلفیق روش‌های DSPE و DLLME برای استخراج آفلاتوکسین M_1 واکراتوکسین A از نمونه های شیر پاستوریزه توسعه داده شد. بدین منظور، ۷ میلی لیتر نمونه شیر پاستوریزه برداشته شده و پس از افزودن ۱۲۵ میلی گرم تری کلرو استیک اسید مخلوط مذکور به مدت ۳ دقیقه ورتکس شد. پس از سانتریفیوژ (با سرعت ۵۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۵ دقیقه) فاز رویی برداشته شده و با ۵۰ میلی گرم از جاذب سنتز شده مخلوط شد. در ادامه مخلوط مذکور به مدت ٤ دقیقه ورتکس شد. پس از سانتریفیوژ (با سرعت ۵۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۵ دقیقه) فاز رویی دور ریخته شده و ۱ میلی لیتر استونیتریل بر روی ذرات جاذب اضافه شد. این مخلوط به مدت ٤ دقیقه ورتکس شده و دوباره پس از سانتریفیوژ (با سرعت ۵۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۵ دقیقه)، فاز آلی حاوی آنالیت های استخراج شده برداشته شده و پس از اختلاط با ۵۵ میکرولیتر از مایع یونی مغناطیسی $[C_6MIM][FeCl_4]$ به داخل ۵ میلی لیتر آب دیونیزه تزریق شد. سپس در حضور آهنربا، مایع یونی مغناطیسی حاوی آنالیت های استخراج شده در داخل لوله

جمع شده و جهت آنالیز کمی به دستگاه HPLC-FLD تزریق شد.

۸-۲- بررسی تاثیر امواج مایکروویو بر محتوی مایکوتوکسین ها

در این راستا، ۷ میلی لیتر از نمونه شیر برداشته شده و با مایکوتوکسین های مورد مطالعه آلوده شدند (۲۰۰ نانوگرم بر لیتر). سپس نمونه به دست آمده تحت امواج مایکروویو قرار گرفت. در ادامه نمونه ها با روش اشاره شده در بالا استخراج شدند.

۳- نتایج

۳-۱- نتایج بهینه‌سازی عوامل موثر در استخراج

۳-۱-۱- مقدار تری کلرو استیک اسید

با توجه به نتایج بدست آمده در نمودار ۱، با افزایش مقدار تری کلرو استیک اسید تا ۱۲۵ میلی گرم، راندمان استخراج آنالیت های مورد مطالعه افزایش یافته و پس از آن ثابت می ماند. در نتیجه ۱۲۵ **میلی گرم** به عنوان **مقدار** بهینه **تری کلرو استیک اسید** انتخاب شد.

۳-۱-۲- مدت زمان ورتکس

مطابق نتایج بدست آمده، با افزایش مدت‌زمان ورتکس تا ۳ دقیقه راندمان استخراج افزایش یافته و بعد از آن ثابت می‌ماند.

۳-۱-۳- مقدار جاذب

نتایج به‌دست آمده در نمودار ۲ نشان می‌دهد که با افزایش مقدار جاذب (MOF) استفاده شده تا ۵۰ میلی گرم راندمان استخراج آنالیت های مورد مطالعه افزایش یافته و پس از آن ثابت می ماند.

٤-۱-۳- مدت زمان جذب

با در نظر گرفتن نتایج بدست آمده، با افزایش مدت زمان ورتکس مخلوط نمونه و ذرات جاذب تا ٤ دقیقه راندمان استخراج افزایش یافته و پس از آن ثابت می ماند.

۵-۱-۳- اثر نمک زنی

نتایج به دست آمده نشان داد که افزایش نمک موجب کاهش کارایی استخراج آنالیت های مورد مطالعه می‌شود و لذا مراحل بعدی بدون افزایش نمک صورت گرفت.

٦-۱-۳- نوع حلال شوینده

نتایج به‌دست آمده در نمودار ۳ نشان می دهد که در بین حلال‌های مورد بررسی استونیتریل دارای بیشترین کارایی در استخراج آنالیت های مورد مطالعه بوده و به عنوان حلال بهینه برای مراحل بعدی انتخاب شد.

۷-۱-۳- حجم استونیتریل

با توجه به نتایج به دست آمده (نمودار ٤) با افزایش حجم استونیتریل تا ۱ میلی لیتر، راندمان های استخراج افزایش یافته و بعد از آن با افزایش بیشتر حجم، کاهش می‌یابند. در نتیجه ۱ میلی‌لیتر استونیتریل به عنوان حجم بهینه برای مطالعات بعدی انتخاب شد.

۸-۱-۳- مدت زمان واجذب

با توجه به نتایج، با افزایش مدت زمان ورتکس مخلوط حلال واجذب کننده و ذرات جاذب تا ٤ دقیقه راندمان استخراج افزایش یافته و پس از آن ثابت می ماند.

۹-۱-۳- نوع حلال استخراج کننده

همان‌طور که در نمودار ۵ مشاهده می‌شود از مایع یونی مغناطیسی $[C_6MIM][FeCl_4]$ کارایی استخراج بالاتری نسبت به سایر حلال‌های مورد استفاده داشته و به عنوان حلال بهینه برای مراحل بعدی انتخاب شد.

۱۰-۱-۳- حجم حلال استخراج کننده

با توجه به نتایج در طول فرآیند DLLME، با افزایش حجم حلال استخراج‌کننده، تغییر چندانی در راندمان استخراج آنالیت های مورد مطالعه مشاهده نمی شود. بنابراین، ۵۵ میکرولیتر به عنوان حجم بهینه انتخاب شد.

۱۱-۱-۳- اثر مدت زمان مایکروویو در کاهش غلظت آنالیت ها

با توجه به نتایج بدست آمده در نمودار ٦ الف، غلظت آنالیت ها در نمونه شیر تا مدت زمان ۹۰ ثانیه کاهش یافته و پس از آن کاهشی در غلظت آنالیت ها مشاهده نمی شود.

۱۲-۱-۳- اثر قدرت مایکروویو در کاهش غلظت آنالیت ها

همان‌طور که در نمودار ٦ ب مشاهده می‌شود، با افزایش قدرت مایکروویو تا ۳٦۰ وات (مدت زمان قرار گرفتن نمونه ها در معرض مایکروویو ۹۰ ثانیه) غلظت آنالیت ها در نمونه شیر کاهش یافته و پس از آن کاهشی در غلظت آنالیت ها مشاهده نمی‌شود.

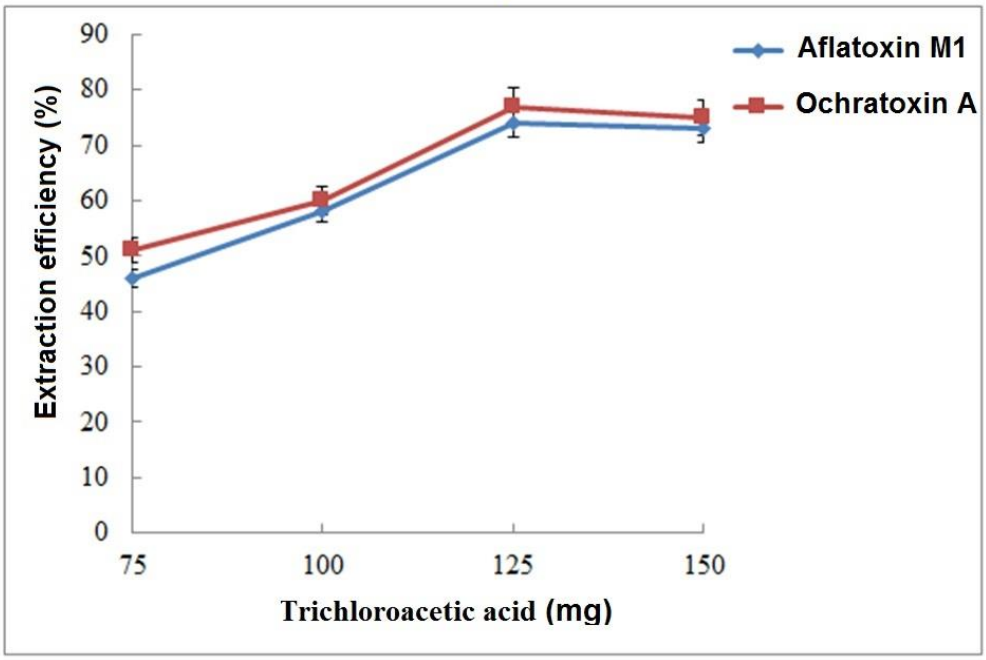

Figure 1. Optimizing the amount of trichloroacetic acid

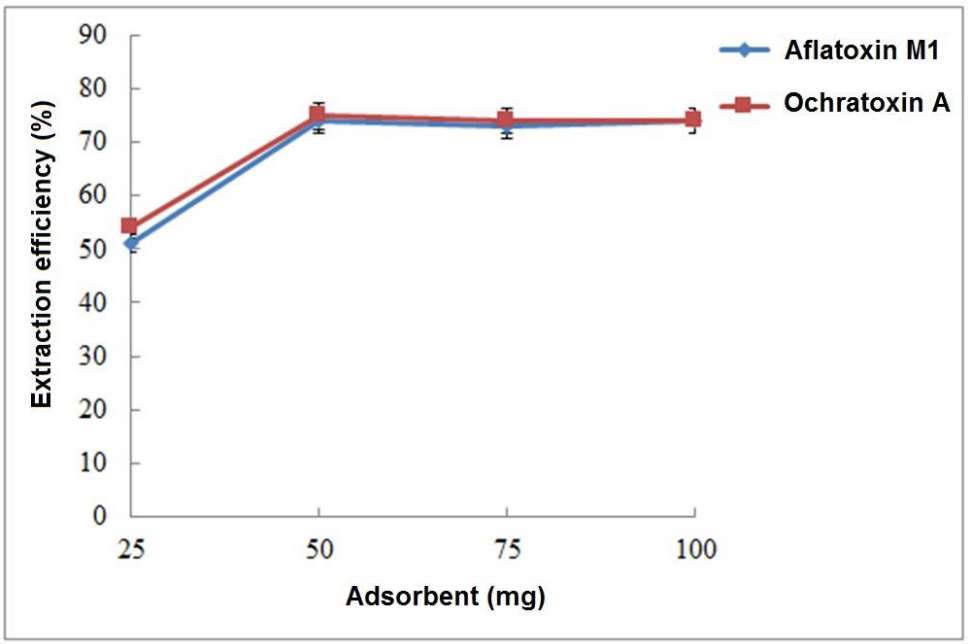

Figure 2. Optimizing the amount of absorbent

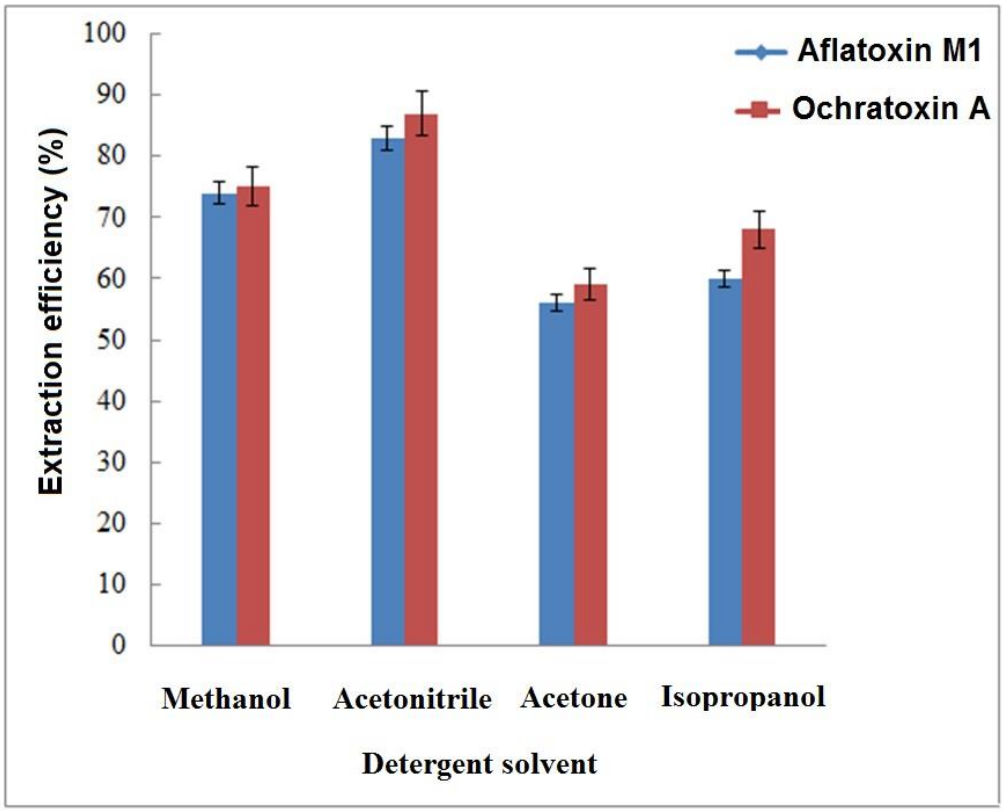

Figure 3. Optimizing the type of detergent solvent

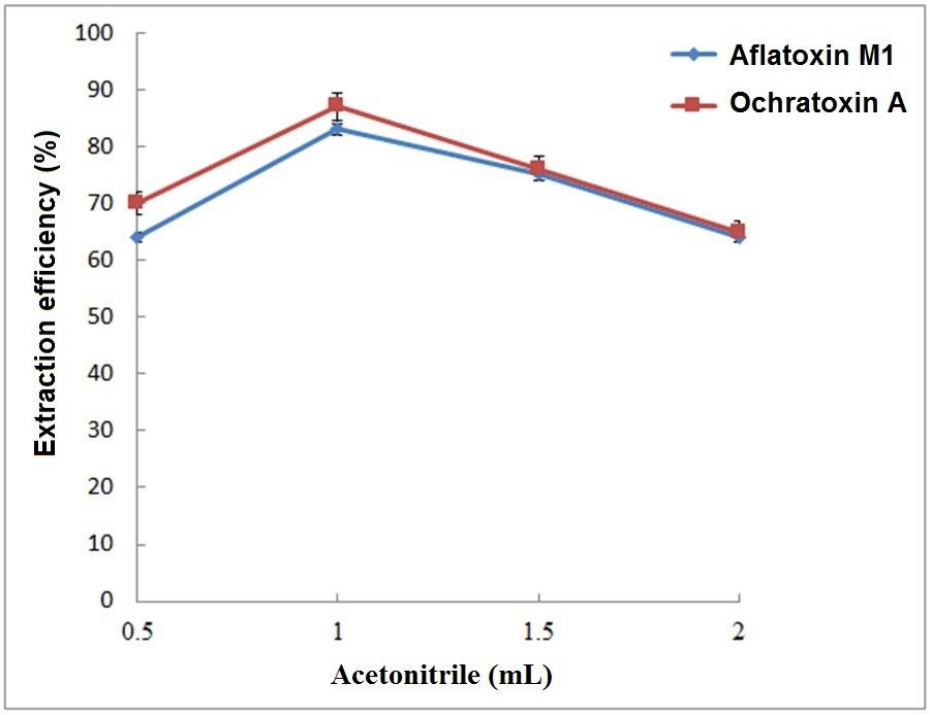

Figure 4. Optimizing the volume of acetonitrile

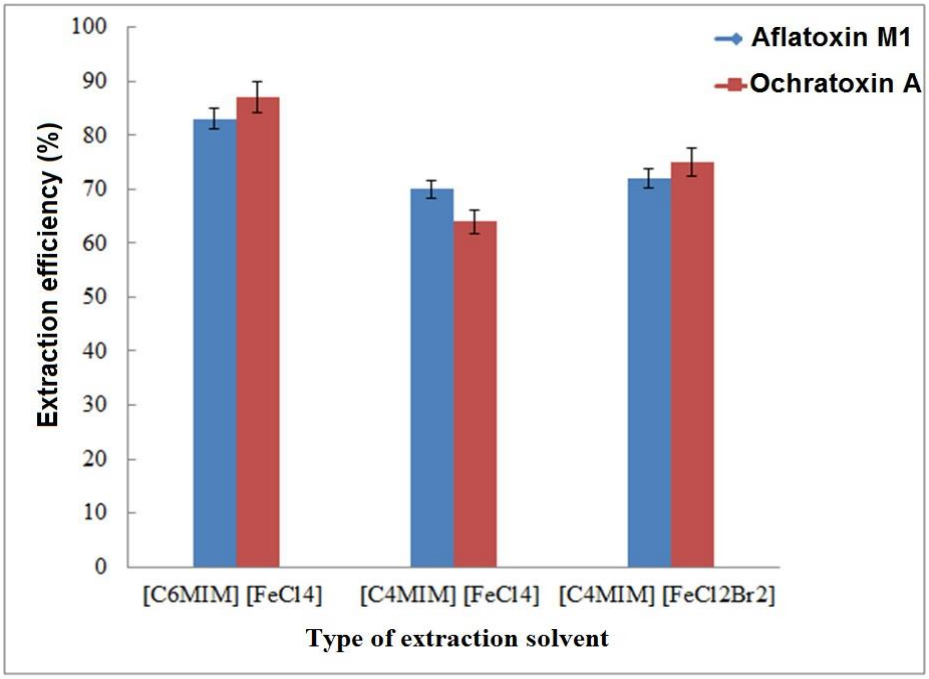

Figure 5. Optimizing the type of extraction solvent

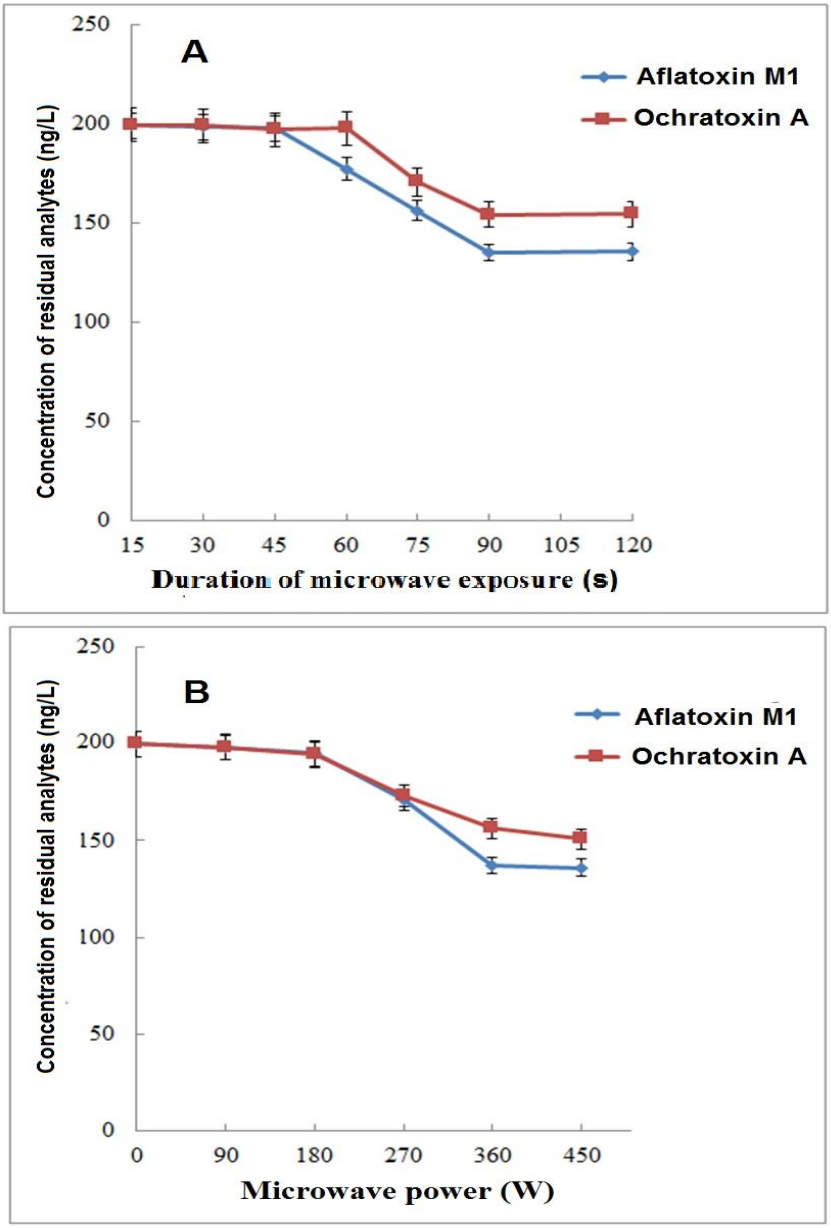

Figure 6. Optimizing microwave exposure time (a) and microwave power (B) in reducing the concentration of studied analytes

۳-۲- نتایج مشخصات تجزیه‌ای

ارقام شایستگی روش ارائه شده تحت شرایط بهینه بدست آمدند. از رسم نمودار کالیبراسیون برای هر یک از آنالیت‌ها، مقادیر مجذور ضریب همبستگی (r^2) و محدوده خطی روش (LR) بدست آمد. جهت ارزیابی تکرارپذیری و دقت روش از انحراف استاندارد نسبی (RSD%) استفاده شد. حد تشخیص (LOD) و حد اندازه‌گیری (LOQ) به ترتیب برابر غلظت‌هایی در نظر گرفته شدند که در آن‌ها نسبت سیگنال به نویز ۳ و ۱۰ می‌باشد. محاسبه فاکتور تغلیظ از مقایسه مساحت زیرپیک آنالیت‌های محلول استاندارد با مساحت پیک آنالیت‌های موجود در نمونه شیر پس از اجرای روش ارائه شده و استخراج صورت‌گرفت. ارقام شایستگی روش ارائه شده در جدول ۱ ارائه شده است.

Table 2. Figure of merits of the presented method

Analyte	Linear range (ng/L)	Limit of Detection (ng/L)	Limit of Quantification (ng/L)	Correlation coefficient	Relative Standard Deviation (%)	Extraction efficiency ± SD (n=3)	Enrichment factor ± SD (n=3)
Aflatoxin M_1	0.97-10^5	0.29	0.97	0.997	3.9	83±3	232±8
Ochratoxin A	0.77-10^5	0.23	0.77	0.998	4.2	89±4	249±11

۳-۳- نتایج آنالیز نمونه‌های حقیقی

با آنالیز نمونه‌های حقیقی کاربرد روش ارائه شده در تعیین کمی مایکوتوکسین های مورد مطالعه مورد ارزیابی قرار می‌گیرد. برای این منظور، نمونه‌های شیر آماده شده در شرایط بهینه مورد استخراج قرار گرفته و با HPLC-FLD آنالیز شدند. با توجه به نتایج بدست آمده در ۲۱ نمونه از ۳۰ نمونه شیر بررسی شده آفلاتوکسین M_1 با غلظت ۲۳ تا ۱۹۶ نانوگرم در لیتر یافت شد. در ۳ نمونه شیر نیز اکراتوکسین A در محدوده غلظتی ۳۰ تا ٤٨ نانوگرم در لیتر یافت شد. در ادامه، نمونه‌های بررسی شده برای ارزیابی تاثیر مایکروویو در کاهش محتوای آنالیت ها در معرض تابش مایکروویو قرار گرفتند (زمان و توان مایکروویو به ترتیب ۹۰ ثانیه و ۳٦۰ وات). با توجه به نتایج بدست آمده، تابش مایکروویو می‌تواند میزان آفلاتوکسین M_1 را در محدوده ۲۷/٦ تا ۳۳/۵ درصد و اکراتوکسین A را در محدوده ۱۷/۳ تا ۲۰/۸ درصد کاهش دهد.

٤-۳- بررسی اثر ماتریکس در نمونه‌های حقیقی

جهت ارزیابی اثر ماتریکس در نمونه‌های شیر بررسی شده، همه نمونه ها و نمونه بلانک با آفلاتوکسین M_1 و اکراتوکسین A به غلظت‌های ۱۰ و ۱۵ نانوگرم در لیتر آلوده شدند. مقادیر بازیابی‌های نسبی به‌دست آمده در جدول ۲ (در محدوده ۸۹ تا ۱۰۳ درصد) نشان می‌دهند که ماتریکس نمونه‌های حقیقی تأثیر چندانی بر عملکرد روش پیشنهادی ندارند.

Table 3. Examination of the matrix effect of pasteurized milk samples

Analyte	Relative recovery ± standard deviation (n = 3) Sample 1	Sample 2	Sample 3	Sample 4	Sample 5
Spiked samples containing each of the analytes at a concentration of 10 ng/L					
Aflatoxin M_1	89±3	87±4	99±2	100±2	91±3
Ochratoxin A	88±2	94±3	101±5	103±5	102±3
Spiked samples containing each of the analytes at a concentration of 50 ng/L					
Aflatoxin M_1	93±2	90±2	101±3	98±4	95±3
Ochratoxin A	93±3	96±4	103±3	100±2	103±4

٤- بحث

در این کار پژوهشی، یک روش آماده سازی نمونه مبتنی بر ترکیب روش های DSPE و DLLME مبتنی بر استفاده از مایع یونی مغناطیسی بهینه سازی شده و برای استخراج آفلاتوکسین M_1 واکراتوکسین A از نمونه های شیر پاستوریزه استفاده شد. آنالیت های استخراج شده با HPLC-FLD آنالیز شدند. همچنین در این کار پژوهشی تاثیر استفاده از امواج فرابنفش در کاهش محتوای آنالیت های مورد مطالعه در نمونه های شیر پاستوریزه مورد بررسی قرار گرفت.

با توجه به ماتریکس پیچیده نمونه شیر، استفاده از عوامل رسوب دهنده و انجام فرایند ترسیب پروتئین در آن قبل از ارائه روش تجزیه ای امری ضروری است. تری کلرواستیک

اسید با توجه به مزیت هایی که دارد به طور گسترده ای به عنوان عامل رسوب دهنده استفاده می گردد [۱۳]. با توجه به این که مقدار کم تری کلرو استیک اسید قادر به رسوب دهی تمام پروتئین ها نیست و مقدار زیاد آن می تواند ماهیت نمونه را تغییر دهد بهینه سازی مقدار آن حائز اهمیت می باشد.

مدت زمان تماس عامل رسوب دهنده (تری کلرواستیک اسید) با نمونه شیر دیگر پارامتر مهمی است که می تواند کارایی روش ارائه شده را تحت تاثیر قرار دهد [۱۳]. در این کار پژوهشی از ورتکس برای افزایش سطح تماس بین عامل رسوب دهنده و نمونه شیر جهت تسریع و بهبود فرآیند ترسیب پروتئین نمونه شیر استفاده شد. فلذا مدت زمان ورتکس در این مرحله نیاز به بهینه سازی دارد.

مقدار جاذب در روش استخراج فاز جامد پخشی از مهم ترین پارامترهای موثر در کارایی روش می‌باشد. این تاثیر در کارایی استخراج، به نسبت فاز جامد جاذب به حجم محلول نمونه مرتبط می‌باشد. در مقادیر کم از جامد نسبت فاز کم بوده و راندمان استخراج پایین می‌باشد ولی با افزایش مقدار جاذب نسبت فازها افزایش یافته و راندمان استخراج افزایش می‌یابد [۱٤]. از این رو مقدار جاذب باید بهینه گردد.

در روش حاضر از ورتکس به منظور افزایش سطح تماس آنالیت های مورد بررسی با جاذب و افزایش میزان جذب آنالیت ها توسط جاذب استفاده شده است [۱۲]. از این رو مدت زمان ورتکس در کارایی روش پیشنهادی موثر بوده و نیاز به بهینه سازی دارد.

عموماً در روش های استخراج، افزایش نمک بر محلول های آبی دو اثر متقابل دارد. اول این که حضور نمک باعث افزایش نیروی یونی فاز آبی شده و باعث کاهش حلالیت آنالیت ها در فاز آبی و افزایش انتقال آن ها به سطح جاذب می شود در نتیجه راندمان استخراج افزایش می یابد. دوم این که افزایش نمک باعث افزایش ویسکوزیته فاز آبی شده و ضریب انتشار آنالیت را در فاز آبی تحت تأثیر قرار می دهد که منجر به کاهش راندمان استخراج می شود. هر کدام از اثرات بر دیگری برتری داشته باشد در این صورت تأثیر آن عامل غالب خواهد بود [۱۵]. لذا یکی از پارامترهای مهم در اکثر روش‌های استخراج که نیاز به بررسی و بهینه‌سازی دارد مقدار نمک می‌باشد.

در این روش حلال پخش کننده در مرحله میکرواستخراج مایع-مایع پخشی به عنوان حلال شوینده آنالیت های مورد بررسی از جاذب در مرحله استخراج فاز جامد پخشی می باشد. از این رو انتخاب نوع حلال پخش کننده از اهمیّت زیادی برخوردار می باشد. حلال پخش کننده در روش پیشنهادی باید قابلیت شویش آنالیت های جذب شده از جاذب را داشته و قابل امتزاج با آب باشد [۱٦]. فلذا انتخاب حلال مناسب بسیار ضروری است.

حجم استونیتریل استفاده شده برای شویش آنالیت‌ها از جاذب پارامتر بسیار مهمی در روش پیشنهادی می‌باشد. با افزایش حجم حلال شوینده/پخش کننده آنالیت‌ها در فاز شوینده رقیق بوده و در مرحله DLLME آنالیت‌ها بیشتر در فاز آبی حل شده و کارایی روش کم می‌شود. از طرف دیگر با کاهش حجم حلال شوینده/پخش کننده کارایی مرحله DLLME کم می‌شود چون حلال استخراج کننده به صورت قطرات کاملاً ریزی پخش نمی‌گردد. تشکیل حالت ابری موجب افزایش سطح تماس حلال استخراج کننده با فاز آبی و تسریع استخراج آنالیت‌ها به درون حلال استخراج کننده می‌شود [۱٦]. به همین دلیل حجم حلال شوینده/پخش کننده بایستی مورد بهینه سازی قرار گیرد.

پس از افزودن حلال شوینده/ پخش کننده بر روی ذرات جاذب حاوی آنالیت های جذب شده، مخلوط حاصل برای مدتی ورتکس می شود تا فرآیند واجذب تسریع شود. بنابراین، مدت زمان ورتکس در این مرحله را زمان واجذب نامیده شده و نیاز به بهینه سازی دارد.

در روش DLLME، انتخاب حلال استخراج کننده‌ی مناسب مهم‌ترین مرحله‌ای است که می‌تواند کارایی روش را به‌طور قابل توجهی تحت تاثیر قرار دهد[۱۷]. برای

بهینه‌سازی این پارامتر، مایعات یونی مغناطیسی به دلیل سمیت کمتر آن‌ها انتخاب شدند.

حجم حلال استخراج‌کننده پارامتر دیگری است که می تواند راندمان استخراج را تحت تاثیر قرار دهد [۱۷]. اگر حجم اولیه حلال بیشتر باشد در این‌صورت حجم فاز جمع شده پس از استخراج نیز بیشتر می‌شود و فاکتور تغلیظ کاهش یافته و سیگنال‌های تجزیه‌ای نیز کاهش خواهند یافت. ازطرفی با کاهش حجم حلال، کارایی استخراج و تکرارپذیری کاهش می‌یابد لذا حجم حلال استخراج‌کننده باید بهینه سازی شود.

مدت زمان قرارگرفتن در معرض امواج مایکروویو و توان مایکروویو نیز پارامترهایی هستند که می توانند غلظت باقیمانده آفلاتوکسین M_1 واکراتوکسین A را در نمونه شیر تحت تاثیر قرار دهند. افزایش مدت زمان و توان امواج مایکروویو می تواند بر تخریب و تغییر شکل ترکیبات هدف موثر باشد و منجر به کاهش غلظت باقیمانده آفلاتوکسین M_1 واکراتوکسین A شود.

تا به امروز روش‌های استخراج مختلفی برای اندازه‌گیری آفلاتوکسین M_1 واکراتوکسین A در نمونه‌های مختلف استفاده شده اند. برای ارزیابی عملکرد و میزان موفقیت روش پیشنهادی، پارامترهای تجزیه ای مربوط به آن اعم از LOD، LR، RSD و LOQ، با پارامترهای تجزیه ای سایر روش‌های به کار رفته برای تعیین آفلاتوکسین M_1 واکراتوکسین A مقایسه شدند. با توجه به داده های جدول ۳، روش پیشنهادی LOD و LOQ پایین تر از سایر روش ها است که بیانگر حساس‌تر بودن روش پیشنهادی می باشد. همچنین روش ارائه شده دارای RSD های پایین تر بوده و تکرار پذیر می باشد. محدوده خطی روش پیشنهادی نیز در مقایسه با سایر روش ها وسیعتر است. این نتایج حاکی از قابلیت بالای روش پیشنهادی در اندازه گیری آفلاتوکسین M_1 واکراتوکسین A می باشد.

Table 4. Comparison of the efficiency of the proposed method with other methods

Sample	Analyte	Relative standard deviation (%)	Limit of Detection (ng/L)	Limit of Quantification (ng/L)	Linear range (ng/L)	Method	Reference
Red wine	Ochratoxin A	≤16.9	130	410	-	a	[18]
Mother milk	Aflatoxin M_1	≤5.9	10	30	100-15000	b	[19]
	Ochratoxin A	≤17.3	10	30	100-15000		
Milk	Aflatoxin M_1	12.3	60	210	210-5000	c	[20]
	Aflatoxin M_1	3.9	0.29	0.97	$0.97\text{-}10^5$	Present work	Present work
	Ochratoxin A	4.2	0.23	0.77	$0.77\text{-}10^5$		

a) Solid phase extraction coupled with liquid chromatography equipped with a sequential mass detector
b) Liquid-liquid extraction coupled with liquid chromatography equipped with a fluorescence detector
c) Liquid phase microextraction with hollow fiber coupled with liquid chromatography equipped with a sequential mass detector

۵- نتیجه‌گیری کلی

در مطالعه حاضر، از ترکیب روش های DSPE و DLLME به عنوان یک روش آماده سازی جدید و کارآمد برای استخراج آفلاتوکسین M_1 و اکراتوکسین A از نمونه های شیر پاستوریزه استفاده شد. روش پیشنهادی سریع و دوستدار محیط زیست بوده و با توجه به نتایج بدست آمده قابلیت بالایی در استخراج آفلاتوکسین M_1 و اکراتوکسین A از نمونه های شیر پاستوریزه (راندمان استخراج بالا، حدود تشخیص و اندازه گیری پایین و تکرار پذیری مناسب) دارد. همچنین علیرغم حضور انواع ترکیبات آلی و معدنی در بافت شیر، ماتریکس نمونه تاثیر محسوسی بر کارایی روش پیشنهادی ندارد.

تعارض منافع

نویسندگان این مقاله هیچگونه تعارض منافعی ندارند.

۶-منابع

[1] Aytenfsu, S., Mamo, G., and Kebede, B., 2016. Review on chemical residues in milk and their public health concern in Ethiopia. *Journal of Nutrition & Food Sciences*. *6*(4), p.524.

[2] Binder, E.M., 2007. Managing the risk of mycotoxins in modern feed production. *Food Science & Technology*. *133*(1-2), pp.149-166.

[3] Chan, D., MacDonald, S.J., Boughtflower, V., and Brereton, P., 2004. Simultaneous determination of aflatoxins and ochratoxin A in food using a fully automated immunoaffinity column clean-up and liquid chromatography–fluorescence detection. *Journal of Chromatography A. 1059*(1-2), pp.13-16.

[4] Herzallah, S.M., 2009. Determination of aflatoxins in eggs, milk, meat and meat products using HPLC fluorescent and UV detectors. *Food Chemistry*. *114*(3), 1141–1146.

[5] Afshar, P., Shokrzadeh, M., Raeisi, S.N., Ghorbani-Hasan, Saraei, A., Nasiraii, L.R., 2020. Aflatoxins biodetoxification strategies based on probiotic bacteria. *Toxicon. 30*, pp.50-58.

[6] Rahmani, A., Mehralipour, J., Shabanlo, A. and Majidi, S., 2015. Efficiency of ciprofloxacin removal by ozonation process with calcium peroxide from aqueous solutions. *Journal of Qazvin University of Medical Sciences*. *19*(2), pp.55-64 (In persian).

[7] Nascimento, U.M. and Azevedo, E.B., 2013. Microwaves and their coupling to advanced oxidation processes: Enhanced performance in pollutants degradation. *Journal of Environmental Science and Health, Part A, 48*(9), pp.1056-1072.

[8] OwusuKyei-Baffour, V., Kongor, J.E., Anyebuno, G., Budu, A.S., Firibu, S.K., and Afoakwa, E.O., 2021. A validated HPLC–FLD method for the determination of mycotoxin levels in sun dried fermented cocoa beans: Effect of cola nut extract and powder. *LWT, 148*, p.111790.

[9] Turner, N.W., Subrahmanyam, S., and Piletsky S.A., 2009. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Analytica Chimica* Acta. *632*(2), pp.168-180.

[10] Jakubus, A., Godlewska, K., Gromelski, M., Jagiello, K., Puzyn, T., Stepnowski, P., and Paszkiewicz, M., 2019. The possibility to use multi–walled carbon nanotubes as a sorbent for dispersive solid phase extraction of selected pharmaceuticals and their metabolites: Effect of extraction condition. *Microchemical Journal*. *146*, pp.1113–1125.

[11] Bazargan, M., Ghaemi, F., Amiri, A., and Mirzaei, M., 2021. Metal–organic framework–based sorbents in analytical sample preparation. *Coordination Chemistry Reviews*. *445*, p.214107.

[12] Pezhhanfar, S., Farajzadeh, M.A., Mohsen Daraei, N., Taghipour BaghaliNobar, N., Hosseini-Yazdi, S.A., and Afshar Mogaddam, M.R., 2022. Introduction of an exclusive, highly linear, and matrix-effectless analytical method based on

dispersive micro solid phase extraction using MIL-88B(Fe) followed by dispersive liquid–liquid microextraction specialized for the analysis of pesticides in celery and tomato juices without dilution. *Microchemical Journal*. *183*, pp.107967.

[13] Mohebbi, A., Nemati, M., Afshar Mogaddam, M.R., Farajzadeh, M.A., and Lotfipour, F., 2022. Dispersive micro–solid–phase extraction of aflatoxins from commercial soy milk samples using a green vitamin–based metal–organic framework as an efficient sorbent followed by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry determination. *Journal of Chromatography A*. 1673, p.463099.

[14] Jamali, M.R., Firouzjah, A., and Rahnama, R., 2013. Solvent-assisted dispersive solid phase extraction. *Talanta 116*, pp.454-459.

[15] Mohebbi, A., and Farajzadeh, M.A., 2020. Chemical synthesis–free and facile preparation of magnetized polyethylene composite and its application as an efficient magnetic sorbent for some pesticides *Journal of Chromatography A*. *1625*, pp.461340.

[16] Wu, Q., Wang, C., Liu, Z., Wu, C., Zeng, X., Wen, J., and Wang, Z., 2009. Dispersive solid-phase extraction followed by dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of some sulfonylurea herbicides in soil by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A. 1216*(29), pp.461340.

[17] Daghi, M.M., Nemati, M., Abbasalizadeh, A., Farajzadeh, M.A., Afshar Mogaddam, M.R., and Mohebbi, A., 2022. Combination of dispersive solid phase extraction using MIL–88A as a sorbent and deep eutectic solvent–based dispersive liquid–liquid microextraction for the extraction of some pesticides from fruit juices before their determination by GC–MS. *Microchemical Journal*. *183*, pp.107984.

[18] Mari˜no-Repizo, L., Kero, F., Vandell, V., Senior, A., Sanz-Ferramola, M. I., Cerutti, S., and Raba, J., 2015. A novel solid phase extraction-ultra high-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry method for the quantification of ochratoxin A in red wines. *Food Chemistry*. *172*, pp.663-668.

[19] Andrade, P.D., Gomesda Silva, J.L., and Caldas, E.D., 2013. Simultaneous analysis of aflatoxins B1, B2, G1, G2, M1 and ochratoxin A in breast milk by high-performance liquid chromatography/fluorescence after liquid–liquid extraction with low temperature purification (LLE–LTP). *Journal of Chromatography A. 1304*, pp.61-68.

[20] Huang, S., Hu, D., Wang, Y., Zhu, F., and Ouyang, G., 2015. Automated hollow fiber liquid-phase microextraction coupled with liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the analysis of aflatoxin M1 in milk. *Journal of Chromatography A. 1416*, pp.137–140.

Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Determination of aflatoxin M1 and ochraoxin A in pasteurized milk and evaluation the effect of microwave irradiations on their reduction

Akbar Badali[1], Afshin Javadi[*2,3], Mohammad Reza Afshar Mogaddam[4], Zohreh Mashak[5]

1- Department of Food Science and Technology, Mamaghan Branch, Islamic Azad University, Mamaghan, Iran.

2- Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary, Tabriz Medical Science, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

3- Health Promotion Research Center, Tabriz Medical Sciences, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

4- Food and Drug Safety Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.

5- Department of Food Hygiene, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran.

ARTICLE INFO

Article History:

Received:2023/12/24

Accepted:2024/8/18

Keywords:

DSPE,
Microwave irradiation,
DLLME,
HPLC,
Pasteurized milk.

DOI: 10.22034/FSCT.22.162.42.

*Corresponding Author E-

Javadi@iaut.ac.ir

ABSTRACT

Due to the extensive use of dairy-products like pasteurized milk, these products should be free of any contaminants such as drug residues, pesticides, mycotoxins, and etc. Mycotoxins (such as aflatoxins, ochratoxin A, and etc.) are a group of toxic and pollutant substances in foodstuffs, animal and poultry feed that are naturally produced from certain types of fungi. The presence of mycotoxins in milk is very dangerous for the health of the consumer. Therefore, the development of fast, efficient and easy methods for investigating the presence of mycotoxins such as aflatoxin M_1 and ochratoxin A in foodstuffs is of great importance. In this research, an efficient analytical method based on the combination of dispersive solid phase extraction and dispersive liquid-liquid microextraction has been proposed for the extraction of aflatoxin M_1 and ochratoxin A from pasteurized milk samples and analyzing them with high-performance liquid chromatography equipped with a fluorescence detector. Under the optimum condition, limits of detections and quantifications within the ranges of 0.23–0.29 and 0.77–0.97 ng L^{-1} were obtained, respectively. Enrichment factors and extraction recoveries has been obtained in the ranges of 232–249 and 83–89%, respectively. Aflatoxin M_1 (in 70% of the examined milk samples) and ochratoxin A (in 10% of the -examined milk samples) were found in a number of samples. Also, according to the obtained results, microwave radiation can reduce the amount of aflatoxin M_1 (in the range of 27.6 to 33.5%) and ochratoxin A (in the range of 17.3 to 20.8%).