تحقیقات مهندسی صنایع غذایی/جلد ۲۵ / شماره ۷۷/ پاییز و زمستان /۱۴۰۳/ ص ۳۲ - ۱۵

سایت مجله: https://fooder.areeo.ac.ir

نوع مقاله: پژوهشی

اندازه‌گیری مایکوتوکسین‌ها در غلات با کروماتوگرافی مایع و شناساگر جرمی/ جرمی (LC-MS/MS)

انوشه رحمانی *[۱]، مریم جلیلی[۲] و فرهنگ سلیمانی[۳]

[۱]* استادیار، گروه فراورده‌های غذایی، حلال و کشاورزی، پژوهشکده صنایع غذایی و فراورده‌های کشاورزی، پژوهشگاه استاندارد، کرج، ایران

[۲] استادیار، گروه فراورده‌های غذایی، حلال و کشاورزی، پژوهشکده صنایع غذایی و فراورده‌های کشاورزی، پژوهشگاه استاندارد، کرج، ایران

[۳]مدرس دانشگاه، صنایع غذایی، دانشکده علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران

تاریخ ارسال: ۱۴۰۳/۰۵/۱۲ **تاریخ پذیرش:** ۱۴۰۳/۰۶/۱۳

چکیده

برای تعیین همزمان آفلاتوکسین ها، اکراتوکسین آ، زئارالنون، دئوکسی نیوالنول، سموم T2، HT2 و فومونیسین ها در غلات، یک روش کروماتوگرافی جرمی/ جرمی LC-MS/MS به کار گرفته شد و در آن کارایی دو روش استخراج سموم (یک و دو مرحله‌ای) و چهار روش خالص‌سازی (شامل ستون MycoSep 226، Oasis HLB و ستون ایمیونوافینیتی و بدون خالص‌سازی) برای به دست آوردن حداکثر میزان بازیافت مایکوتوکسین‌ها بررسی گردید. استفاده از حلال استونیتریل: آب: اسیداستیک به نسبت حجمی (۱:۲۰:۷۹) به عنوان حلال استخراج، بدون خالص‌سازی عصارهٔ حاصل از استخراج، بالاترین میزان بازیابی به میزان ٦٤/٣ تا ۱۱۲/۱ درصد را به‌دست داد، در حالی که با استفاده از MycoSep 226 ، Oasis HLB و ستون ایمیونوافینیتی میزان بازیابی به ترتیب ۷ – ۹۹/٦، ۱۰- ۹٤/۹و ٦۱/۳- ۹۷/٦ درصد برای همهٔ مایکوتوکسین‌ها بود. تجزیه و تحلیل نمونه‌های غلات (برنج، گندم، جو و ذرت) با استفاده از شرایط انتخاب شده، میزان بازیابی قابل قبول ۷۵/۱ تا ۱۰٦/۳ درصد را برای همه مایکوتوکسین‌ها در بین همه نمونه‌ها تأیید کرد. کاربرد این روش روی ۳۰ نمونهٔ غلات نمونه برداری شده از بازار نشان داد که روش یاد شده دارای دقت کافی برای استفاده به عنوان روش معمول تجزیه و تحلیل برای سطوح کمی از مایکوتوکسین ها خواهد بود.

واژه‌های کلیدی: مایکوتوکسین، استخراج، خالص سازی، غلات، LC-MS/MS

مقدمه

مایکوتوکسین‌ها متابولیت های طبیعی قارچی هستند که طیف وسیعی از تأثیرات سمی را دارند. از میان صدها مایکوتوکسین، آفلاتوکسین‌ها[۱] (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2)، اکراتوکسین آ[۲] (OTA)، زئارالنون[۳] (ZEA)، دئوکسی‌نیوالنول[۴] (DON)، فومونیزین‌ها[۵] (FB1, FB2) و سموم[۶] T2 و HT2[۷] مهم‌ترین سموم خطرزا برای سلامت انسان و دام هستند.

اخیراً روش‌های تعیین همزمان تعدادی از مایکوتوکسین‌ها در یک استخراج و اندازه‌گیری کاربرد پیدا کرده است. این روش‌ها به‌ویژه زمانی کاربرد دارند که سرعت، دقت و صحت برای برآورد کیفیت حائز اهمیت است. برای

[1] Aflatoxins (B1, B2, G1, G2)
[2] Ochratoxin A (OTA)
[3] Zearalenone (ZEA)
[4] Deoxynivalenol (DON)
[5] Fumonisins (FB1, FB2)
[6] T2- toxin
[7] HT2 toxin

نویسنده مسئول: Email: a.rahmani@standard.ac.ir

http://doi: 10.22092/fooder.2024.366594.1399

© 2023,The Author(s). Published by Agricultural Engineering Research Institute. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/

اندازهگیری مایکوتوکسین در نمونه‌های غذایی بر پایهٔ غلات، روش‌های کروماتوگرافی رایج‌ترین روش‌های مورد استفاده و بسیار حساس و دقیق هستند (Wang *et al.*, 2019). برای تجزیه و تحلیل مایکوتوکسین‌ها، معمولاً از روش‌های کروماتوگرافی از جمله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)، کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)، کروماتوگرافی گازی (GC) و کروماتوگرافی با طیف سنجی جرمی LC-MS/MS استفاده می‌شود (Shi *et al.*, 2018) . کروماتوگرافی با کارایی بالا با آشکارساز UV یا دیود (DAD)، آشکارساز فلورسانس (FLD) یا آشکارساز طیف سنجی جرمی (MS) برای تشخیصAFs، OTA، DON، ZEA، FBs، سیترینین[1] (CIT) و پاتولین[2] (PAT) استفاده شده است. با استفاده از روش‌های کروماتوگرافی مایع برای طیف‌سنجی جرمی، تشخیص همزمان مایکوتوکسین‌های متعدد در غلات مختلف و محصولات غذایی مربوطه ممکن شد (Shi *et al.*, 2018).

مایکوتوکسین‌ها معمولاً از موادغذایی جامد آسیاب شده با تکان دادن یا مخلوط کردن با متانول آبی یا استونیتریل آبی استخراج می‌شوند. با اینکه استفاده از متانول و آب به عنوان حلال مفید برای استخراج همزمان AFs، OTA و ZEA گزارش شده است، استخراج DON یا FBs با این ترکیب گزارش نشده است (Rahmani *et al.*, 2009)، درحالی که مخلوط استونیتریل و آب بازیابی خوبی برای بسیاری از مایکوتوکسین‌ها فراهم می‌کند (Berthiller *et al.*, 2005; Soleimany *et al.*, 2012a).

استفاده از استونیتریل: آب در نسبت‌های حجمی ۸۰:۲۰(Driehuis *et al.*, 2008)، (۸۴: ۱۶) (Ren *et al.*, 2007) و (۸۵: ۱۵) (Tanaka *et al.*, 2006) برای استخراج همزمان آفلاتوکسین‌ها، OTA، ZEA، DON، T2 و HT2 گزارش شده است. برای استخراج فومونیزین ها نسبت حلال آلی کمتر استونیتریل (۷۰ درصد) توصیه می‌شود (Paepens *et al.*, 2005). در نتیجه، برای استخراج همزمان همهٔ مایکوتوکسین‌های فوق‌الذکر مقادیر مناسبی از استونیتریل در روش‌های جدید استفاده شد. علاوه بر این، پژوهش‌ها نشان داه است که مقادیر بالاتر بازیافت سموم با استفاده از حلال استخراج اسیدی به دست می‌آید (Paepens *et al.*, 2005). با در نظر گرفتن توصیهٔ استخراج اسیدی، بسیاری از محققان، از استونیتریل: آب: اسیداستیک (۷۹ : ۲۰: ۱ حجمی) برای استخراج همهٔ مایکوتوکسین‌های هدف تحت بازیابی قابل قبول استفاده کردند (Fernandes *et al.*, 2015; Monbaliu *et al.*, 2010; Sulyok *et al.*, 2010).

خالص‌سازی عصاره‌های استخراج شده مرحله ای است که برای حذف اجزای بافت[3] مادهٔ غذایی استخراج شده همراه با سموم به کار می‌رود و گامی اساسی در اندازه‌گیری مایکوتوکسین‌ها مخصوصا در مقادیر اندک با استفاده از برخی روش‌های کروماتوگرافی، است. با این حال، از آنجایی که میزان قطبیت مایکوتوکسین‌ها متفاوت است باید روش بهینه برای همهٔ گروه‌های مایکوتوکسین‌ها ایجاد شود. خالص سازی با استخراج فاز جامد (SPE) (Qiao *et al.*, 2009) و انواع مختلف MycoSep و Multi-Seps، (Berthiller *et al.*, 2005) و ستون‌های ایمیونوافینیتی (IACs) (Ventura *et al.*, 2006) برای خالص‌سازی همزمان مایکوتوکسین‌ها بررسی شده‌اند. در میان ستون‌های SPE تجاری موجود، ستون های Oasis HLB و MycoSep بیشترین استفاده را دارند (Diana Di Mavungu *et al.*, 2009). ستون‌های MycoSep که به صورت تجاری در دسترس هستند، از جاذب‌هایی تشکیل شده است که تقریباً تمام مواد مزاحم را در خود حفظ می‌کنند، در حالی که آنالیت (سموم) هیچ تمایلی به واکنش با این ماده نشان نمی‌دهد. ستون‌های MycoSep چند منظوره‌اند، حاوی زغال چوب، سلیت و

[1] Citrinin
[2] Patulin
[3] Matrix

آلومینا هستند و معمولاً برای تجزیه و تحلیل همزمان سموم تریکوتسن[1] استفاده می شوند(Berthiller *et al.*, 2005).

ستون‌های ایمونوافینیتی(IAC) حاوی آنتی‌بادی‌هایی هستند که به یک ماده پشتیبانی بی‌اثر متصل هستند و برای اتصال اختصاصی سموم در حین عبور ناخالصی‌های نمونه استفاده می‌شوند. این ستون‌ها تجزیه و تحلیل مایکوتوکسین را ساده کرده‌اند و از آنجایی که بسیار انتخابی هستند، محلول های نهایی بسیار خالص به دست می آیند. علاوه بر این، این ستون‌ها نسبت به روش های سنتی حلال بسیار کمتری مصرف می‌کنند و می‌توانند خودکار شوند. چندین ستون ایمیونوافینیتی تجاری برای آفلاتوکسین‌ها، فومونیزین‌ها، OTA، DON، تریکوتسن های نوع A (T2-toxin) و ZEA موجود است (Lattanzio *et al.*, 2009). عیب اصلی استفاده از ستون های ایمیونوافینیتی IAC نیاز به خالص‌سازی همزمان تریکوتسن های منفرد (DON) یا گروهی از تریکوتسن‌های مرتبط (سموم T2 و HT2) است. ستون‌های ایمیونوافینیتی چند سمی حاوی آنتی بادی برای همهٔ این مایکوتوکسین‌ها برای تعیین همزمان سموم فوزاریوم (DON، T2-toxin، HT2-Toxin، FB1، FB2 و ZEA) و آفلاتوکسین‌ها (AFs) و OTA در ذرت استفاده شده است (Lattanzio *et al.*, 2007). به‌رغم استفادهٔ گسترده از ستون‌های ایمونوفینیتی به هنگام استخراج مایکوتوکسین‌ها از نمونه‌ها، استفاده از کارتریج‌های SPE مانند Oasis HLB دارای چندین مزیت از جمله کم‌هزینه بودن و استفاده رایج در آزمایشگاه‌ها است(*Stecher et al.*, 2007) .

در روند اخیر در آماده‌سازی نمونه برای آنالیز LC-MS/MS ، تزریق مستقیم عصارهٔ استخراج شده از نمونه به صورت رقیق شده و بدون خالص‌سازی بیشتر گزارش شده است، به ویژه زمانی که طیف وسیعی از سموم باید تجزیه و تحلیل شوند (Sulyok *et al.*, 2010). گزینش پذیری بالای ابزارهای LC-MS/MS باعث کاهش یا حتی حذف خالص سازی نمونه می‌شود و در نتیجه توان نمونه را افزایش می‌دهد. با این حال، بدون در نظر گرفتن مرحلهٔ تمیز کردن، تجزیه و تحلیل سریع‌تری را ارائه می‌کند، سطوح تشخیص پایین‌تر در عصاره‌های تصفیه‌شده بیشتر قابل دستیابی است.

نتایج آزمون مهارت LC-MS/MS برای شناسایی نقاط قوت و ضعف احتمالی روش‌های مختلف در اندازه گیری ۱۱ مایکوتوکسین (آفلاتوکسین B1، B2، G1 و G2، فومونیزین B1 و B2، اکراتوکسین آ، زئارالنون، دئوکسی نیوالنول، سم T2 و HT2 در ذرت با شرکت ۴۱ آزمایشگاه نشان داد که اکثر آزمایشگاه‌ها (۵۶ درصد آزمایشگاه‌ها) از مخلوط استونیتریل: آب برای استخراج استفاده کردند. حدود ۱۷ درصد آزمایشگاه‌های از مخلوط متانول:آب و ۱۵ درصد از دو استخراج متوالی با محلول بافر فسفات(PBS) و متانول (۱۵درصد) استفاده کردند. تعداد کمی از آزمایشگاه ها (حدود ۷درصد) از مخلوط استونیتریل: آب: متانول و حدود ۵ درصد آزمایشگاه‌ها از آب: اتیل استات یا PBS به تنهایی استفاده کردند. هرچند اکثر آزمایشگاه‌ها از مرحلهٔ خالص سازی قبل از کروماتوگرافی استفاده کردند ولی ۳۷ درصد آنها عصاره‌های استخراج شده را مستقیما به سیستم کروماتوگرافی تزریق کردند. به طور کلی، مخلوط‌های استخراج آب با استونیتریل، متانول یا هر دو نتایج خوبی برای استخراج کمی مایکوتوکسین‌ها از ذرت ارائه کردند. هرچند آزمایشگاه‌هایی که از خالص‌سازی عصاره استخراج شده استفاده کردند، نتایج قابل قبولی را برای اکثر مایکوتوکسین‌ها گزارش دادند، ولی نتایج بسیارخوبی نیز توسط آزمایشگاه‌هایی به‌دست آمد که مستقیما عصاره‌های استخراج را آنالیز کردند. یافته‌های این پژوهش بازیابی بالاتر از حدقابل قبول و تنوع بالای نتایج فومونیزین توسط اکثر آزمایشگاه‌ها را نشان داد که قابل توجیه نبود (De Girolamo *et al.*, 2013).

[1] Tricotesens

مطالعهٔ حاضر رویکردی سیستماتیک را برای انتخاب یک حلال استخراج و روش خالص سازی به‌منظور استخراج و خالص‌سازی همزمان AFs، OTA، ZEA، DON، فومونیزین‌ها، T2 و HT2 توکسین توصیف می‌کند. مقایسهٔ چندگانه روش‌های آماده‌سازی نمونه برای استخراج و خالص‌سازی مؤثر مایکوتوکسین‌های ردیابی از نمونه‌های غلات خوشه‌ای، قبل از تجزیه و تحلیل، با استفاده از LC-MS/MS انجام شد. بهترین روش آماده‌سازی نمونه، بالاترین میزان بازیابی همهٔ مایکوتوکسین‌های هدف را ارائه می‌دهد. روش بهینه برای تعیین همزمان مایکوتوکسین‌ها در دیگر غلات نیز به کار گرفته شد.

خلاصهٔ مروری بر پژوهش‌های پیشین در خصوص اندازه گیری مایکوتوکسین ها با روش LC-MS/MS در جدول ۱ آمده است.

مواد و روش‌ها

مواد و شناساگرها

استانداردهای مایکوتوکسین‌های (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, OTA, ZEA, DON)، فومونیزین‌ها (FB1,FB2) و سموم T2 و HT2 از شرکت سیگما (Sigma) آلمان خریداری شدند. متانول و استونیتریل درجهٔ کروماتوگرافی مایع (LC) و اسیداستیک از شرکت مرک (Merck) آلمان تهیه شد. محلول بافر فسفات (PBS) با حل کردن قرص PBS از شرکت (Sigma-Aldrich, USA) در آب مقطر تهیه شد.

ستون های چند منظوره MycoSepTM 226 از برند Rumer Lab تهیه شد. کارتریج های OASISTM HLB شش میلی‌لیتر، (۲۰۰ میلی‌گرم) از شرکت واترز Waters (میلفورد، آمریکا) به دست آمد. ستون‌های ایمونوافینیتی AOFZDT2TM (IAC) از شرکت وایکم (VICAM،آمریکا) تهیه شد.

محلول استاندارد و آماده سازی نمونه آلوده

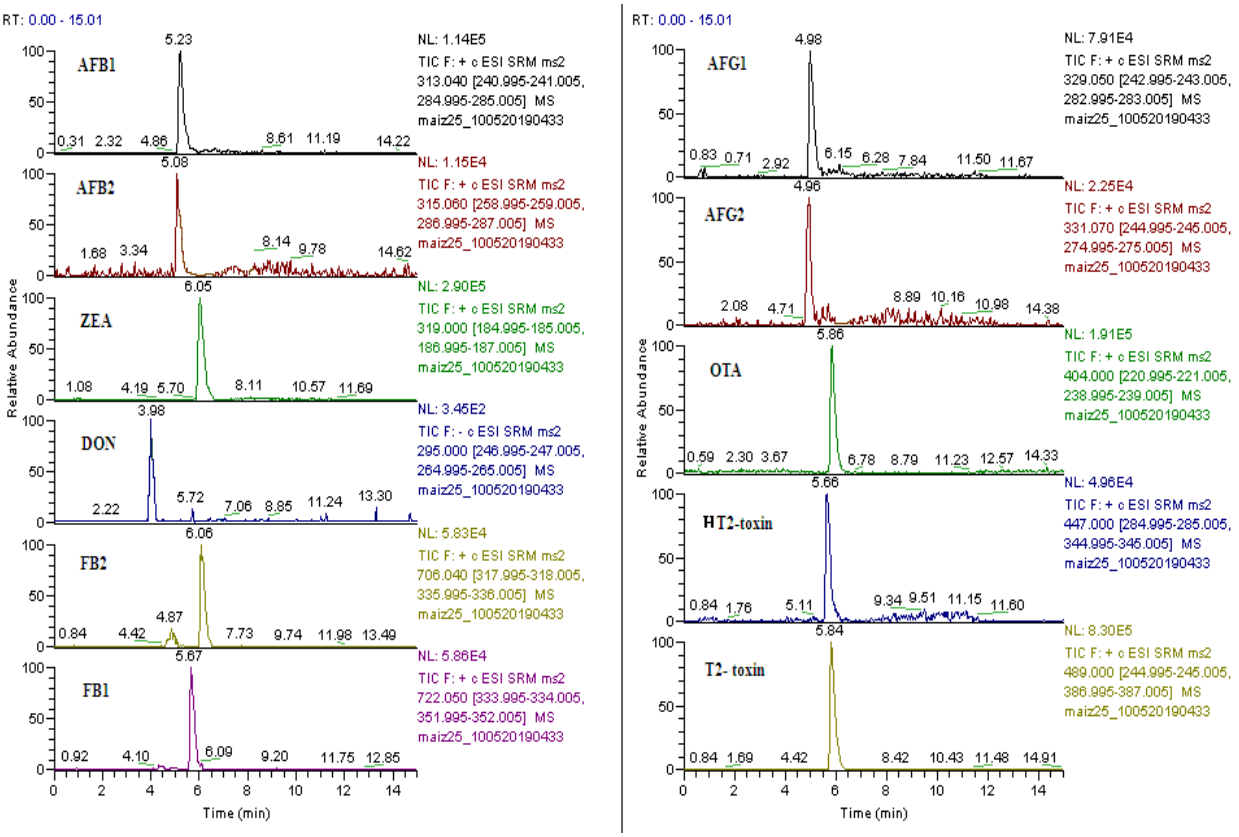
برای تهیهٔ محلول استاندارد مخلوط مایکوتوکسین‌ها، ابتدا حجم ۵۰ میکرولیتر OTA با غلظت ۵۰،۰۰۰ نانوگرم در میلی لیتر) در متانول حل شد تا محلول ذخیره ۲،۵۰۰ نانوگرم بر میلی لیتر تولید شود. یک میلی لیتر از این محلول ذخیرهٔ منفرد OTA با ۱ میلی لیتر محلول مخلوط آفلاتوکسین (محلول استاندارد مخلوط AFB1, AFG1 با غلظت ۱۰۰۰ نانوگرم در میلی لیتر و AFB2 و AFG2 با ۳۰۰ نانوگرم در میلی لیتر)، ۵۰۰ میکرولیتر ZEA (۵۰،۰۰۰ نانوگرم در میلی لیتر) مخلوط شد. ۲۵۰ میکرولیتر محلول استاندارد (۲۰۰،۰۰۰ نانوگرم در میلی لیتر) سم DON ، ۵۰۰ میکرولیتر محلول استاندارد FB1 (۵۰،۰۰۰ نانوگرم در میلی لیتر)، ۵۰۰ میکرولیتر FB2 از محلول استاندارد (با غلظت ۵۰،۰۰۰ نانوگرم در میلی لیتر)، ۵۰۰ میکرولیتر از محلول استاندارد سم T2 (۱۰۰،۰۰۰ نانوگرم در میلی لیتر) و ۵۰۰ میکرولیتر از محلول استاندارد سم HT2 (۱۰۰،۰۰۰ نانوگرم در میلی لیتر) در یک فلاسک حجمی ۱۰ میلی لیتری مخلوط شد و با متانول به حجم رسید تا محلول ذخیره ای از سموم با غلظت‌های ۱۰۰، ۳۰، ۱۰۰، ۳۰، ۲۵۰، ۲۵۰۰، ۲۵۰۰، ۲۵۰۰، ۵۰۰۰، ۵۰۰۰ و ۵۰۰۰ نانوگرم در میلی لیتر به ترتیب برای AFB1، AFB2، AFG1، AFG2، OTA، ZEA، FB1، FB2، T2-toxin، HT2-toxin و DON به دست آید. از این محلول برای تهیهٔ محلول استاندارد کاری استفاده شد. تمام محلول‌های استاندارد کاری در ویال‌های کهربایی در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

تجهیز و شرایط LC-MS/MS

برای تجزیه و تحلیل LC از سیستم‌های کروماتوگرافی مایع با شناساگر جرمی کوانتومی (Thermo Scientific، امریکا) متشکل از یک پمپ دوتایی ، یک گاززدا، یک آون ستونی و یک نمونه‌بردار خودکار استفاده شد. برای آزمون از یک ستون کوتاه C18 به اندازهٔ ۵۰× ۲/۱ میلی‌متر، اندازه

ذرات ۱/۹ میکرومتر (Thermo Scientific، امریکا) بهره گرفته شد.

دمای ستون در ۳۰ درجه سلسیوس نگه داشته شد. ولتاژ ۳ کیلو ولت بود و از نیتروژن به عنوان گاز پاشش استفاده شد. دمای منبع و دمای جداسازی به ترتیب ۱۲۰ و ۴۰۰ درجه سلسیوس تنظیم شد. مایکوتوکسین‌ها در کانال های اسکن[1] (SRM) بررسی شدند. اندازه‌گیری با کالیبراسیون استاندارد همسان با ماتریس ماده‌غذایی اجرا شد. از حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر و یونیزاسیون الکترواسپری [2] (ESI) در حالت یون مثبت و منفی استفاده شد. مایکوتوکسین با استفاده از برنامهٔ گرادیان فاز متحرک شامل متانول و محلول آبی اسید استیک (۰/۱ درصد) جداسازی شد. (صفر تا ۲ دقیقه) با متانول ۵ درصد شروع شد و طی دقیقه ۲ تا ۵ با گرادیان به متانول ۹۰ درصد تغییر کرد، و با همان شرایط (۵-۱۰ دقیقه) ادامه یافت و دوباره (دقیقه ۱۰ تا ۱۳) به متانول ۵ درصد گرادیان بازگشت و (۱۳ تا ۱۵ دقیقه) برای تعادل مجدد ستون ادامه یافت. شکل ۱ تصویر پیک های مایکوتوکسین را همان‌طور نشان می‌دهد که در کروماتوگرام ظاهر می‌شوند.



AFB1, aflatoxin B1 (2,5 ng/g); AFB2, aflatoxin B2 (0.75 ng/g); AFG1, aflatoxin G1 (2.5 ng/g); AFG2, aflatoxin G2 (0.75 ng/g); OTA, ochratoxin A (6.25 ng/g); ZEA, zearalenone (62.5 ng/g), deoxynivalenol (DON) (125 ng/g), FB1 fomunisinB1(62.5 ng/g), FB2, fomonisinB2(62.5 ng/g), T2 toxin (125 ng/g), Ht2 toxin (125mg/g)

شکل ۱. کروماتوگرام مایکوتوکسین ها پس از استخراج از نمونهٔ برنج آلوده شده، بدون استفاده از روش خالص سازی

Figure 1. Chromatogram of mycotoxins after extraction from infected rice sample, without using purification

[1] Selected reaction monitoring (*SRM*)

[2] Electrospray ionization (*ESI*)

جدول ۱- خلاصهٔ مروری بر پژوهش‌های پیشین در خصوص اندازه گیری مایکوتوکسین ها با روش LC-MS/MS

Table 1- An overview of previous researches regarding the measurement of mycotoxins by LC-MS/MS method

روش استخراج	خالص سازی	سموم	روش اندازه گیری	نتایج	مراجع
استونیتریل: آب: اسید استیک (۷۹: ۲۰: ۱ حجمی)	بدون خالص سازی	اندازه گیری ۱۲ سم شامل AFs، OTA، ZEA، FBs، DON و T2 و HT2 در غلات	LC-MS/MS	بازیافت ۷۶/۸ تا ۱۰۸/۴ درصد و حد تشخیص ۰/۰۱ تا ۲۰ میکروگرم در کیلوگرم	(Soleimany et al., 2012a)
استخراج با استونیتریل:آب:اسید فرمیک (۷۹ : ۲۰: ۱ حجمی)	بدون خالص سازی–	اندازه گیری ۲۳ مایکوتوکسین شامل AFs, OTA, ZEA, DON, T2, HT2, FBs, در خوراک دام	LC-MS/MS	حد تشخیص۰/۷ تا ۶۰/۶ میکروگرم در کیلوگرم	(Monbaliu et al., 2010)
استخراج سموم با استونیتریل:آب (۲۰:۸۰ حجمی)	فیلتر ۰/۴۵ میکرو متر نیتروسلولز	اندازه گیری۲۰ مایکوتوکسین شامل AFs، OTA، ZEA، DON و T2 و HT2 در خوراک دام	LC-MS/MS	بازیافت سموم ۷۳– ۱۱۱ درصد و حد تشخیص ۸ تا ۲۵۰ میکروگرم در کیلوگرم	(Driehuis et al., 2008)
استخراج سموم با استونیتریل:آب (۸۴ : ۱۶حجمی)	Mycosep 226	اندازه گیری ۱۷ مایکوتوکسین شامل AFs، OTA، ZEA، DON، T2 و HT2	UPLC-MS/MS	بازیافت سموم ۷۰/۶– ۱۱۹ درصد و حد تشخیص ۰/۰۱ تا ۰/۷ میکروگرم در کیلوگرم	(Ren et al., 2007)
استخراج سموم با استونیتریل: آب در نسبت های حجمی(۸۵: ۱۵)	Mycosep #226	اندازه گیری تریکوتسن ها و AFs، OTA، ZEA، DON، T2 و HT2	LC-MS	حد تشخیص ۰/۱ تا ۶/۱ میکروگرم در کیلوگرم	(Tanaka et al., 2006)
استخراج فومونیزین ها با متانول : آب (۷۰: ۳۰ حجمی) اسیدی شده تا pH ۴ با اسید کلریدریک	ستون IAC	اندازهگیری فومونیسین ها FBs در کورن فلکس	LC-MS/MS	بازیافت ۷۱– ۹۴ درصد، حد تشخیص ۷/۵ تا ۲۰ میکروگرم در کیلوگرم	(Paepens et al., 2005)
استخراج با متانول و آب	SPE	اندازه گیری AFs و OTA در ماء الشعیر	UPLC-MS/MS	حد تشخیص ۱ پیکوگرم	(Ventura et al., 2006)
استخراج با استونیتریل:اسید فرمیک (۹۵ : ۵ حجمی) و هگزان برای استخراج ترکیبات غیر قطبی	Oasis HLB و MycoSep	اندازه گیری ۲۳ مایکوتوکسین شامل AFs، OTA، ZEA، DON، FBs, T2 و HT2	UPLC-MS/MS	بازیافت بیش از ۶۰ درصد و حد تشخیص ۰/۳ تا ۳۰ میکروگرم در کیلوگرم	(Diana Di Mavungu et al., 2009)
استخراج دو مرحله ای با PBS و متانول	IAC, Oasis HLB	اندازه گیری سموم AFs، FBs, ZEA, DON, وOTA T2, HT2 در ذرت	LC-MS/MS	بازیافت بیشتر از ۷۹ درصد و حد تشخیص ۰/۳ تا ۴/۲ میکروگرم در کیلوگرم	(Lattanzio et al., 2007) (Lattanzio et al., 2009)
استخراج با استونیتریل : آب		اندازه گیری ۱۹ سم شامل AFs، OTA، ZEA، DON، FBs ، سم T2 و HT2 در مواد غذایی			(Sulyok et al., 2010)
استخراج با استونیتریل : آب	بدون خالص سازی	اندازه گیری ۳۳ سم شامل AFs، OTA، ZEA، DON، FBs، سم T2 و HT2 در مواد غذایی	LC-MS/MS	کمترین حد اندازه گیری ۱ تا ۵۰ میکروگرم در کیلوگرم	(Spanjer,et al., 2008)
استخراج یک مرحله ای استونیتریل: آب و متانول:آب و استخراج دو مرحله ای PBS و متانول (۱۵ درصد)، مخلوط استونیتریل: آب: متانول آب: اتیل استات یا PBS	خالص سازی با ستون و بدون خالص سازی	اندازه گیری ۱۱ مایکوتوکسین شامل AFs، OTA، ZEA، DON، FBs، سم T2 و HT2 در ذرت	LC-MS/MS		(De Girolamo et al., 2013)

آماده سازی نمونه

برای تهیه نمونه آلوده، ذرت بدون آلودگی با مقدار مناسب مخلوط مایکوتوکسین آلوده شد. غلظت به‌دست‌آمده مایکوتوکسین‌ها در نمونه ذرت آلوده شده به ترتیب ۲/۵ میکروگرم در کیلوگرم برای AFB1 و AFG1، ۰/۷۵ میکروگرم در کیلوگرم برای AFB2 و AFG2، ۶/۲۵ میکروگرم در کیلوگرم برای OTA، ۶۲/۵ میکروگرم در کیلوگرم برای ZEA، FB1 و FB2 و ۱۲۵ میکروگرم در کیلوگرم برای DON، و سموم T2 و HT2 بود.

انتخاب روش استخراج

در این پژوهش، از دو روش استخراج استفاده شده است.

استخراج یک مرحله ای: نمونه های آسیاب شده (۱۰ گرم) ابتدا با ۴۰ میلی لیتر حلال استخراج آلی (استونیتریل: آب: اسید استیک ۷۹:۲۰:۱)، مخلوط شد و با تکان دادن به مدت ۶۰ دقیقه روی یک تکان دهنده (مدل ۷۱۱ ,VDRl، ایتالیا) سموم استخراج شد. مایع رویی در ۳۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد (سانتریفیوژ Allegra X-22R، آمریکا) (Sulyok *et al.*, 2007).

برای استخراج دو مرحله ای: مایکوتوکسین‌ها، ۱۰ گرم نمونهٔ آسیاب شده با ۵۰ میلی لیتر PBS به مدت ۶۰ دقیقه روی یک تکان دهنده به‌کار گرفته شد، در ۳۰۰۰ دور در دقیقه (به مدت ۱۰ دقیقه)، سانتریفیوژ شد و ۳۵ میلی لیتر از عصاره استخراج شده جمع‌آوری و با فیلتر میکروفیبر شیشه ای فیلتر گردید (عصارهٔ A). سپس، ۳۵ میلی‌لیتر متانول به مادهٔ جامد باقی مانده، حاوی ۱۵ میلی‌لیتر PBS اضافه شد و نمونه دوباره با تکان دادن به مدت ۶۰ دقیقه استخراج شد (به این ترتیب حلال استخراج حدود ۷۰ درصد متانول آبی بود). پس از سانتریفیوژ شدن (۳۰۰۰ دور در دقیقه، ۱۰ دقیقه)، عصاره به دست آمد (عصاره). سپس مخلوط مقدار مساوی از عصارهٔ A و B (۵ میلی‌لیتر از هر کدام) برای اندازه‌گیری به کار رفت (Lattanzio *et al.*, 2007).

انتخاب روش خالص سازی

عصاره ها با روش های مختلف خالص سازی شامل کارتریج SPE با استفاده از MycoSep 226 و کارتریج Oasis HLB و IAC چند منظوره AOFZDT2TM خالص سازی شدند. عصارهٔ استخراج شدهٔ بدون اِعمال خالص سازی با سه روش خالص سازی فوق الذکرمقایسه شد. عملکرد هر روش خالص‌سازی در ترکیب با روش استخراج با تجزیه و تحلیل میزان بازیابی مایکوتوکسین‌ها در سه تکرار تعیین شد.

برای روش خالص سازی MycoSep، ده میلی لیتر عصاره (استخراج یک مرحله‌ای) یا مخلوط ۵ میلی لیتر عصارهٔ A و ۵ میلی لیتر عصارهٔ B (استخراج دو مرحله‌ای) در ستون MycoSep اِعمال شد. مقدار ۴ میلی‌لیتر از عصارهٔ خاص سازی شده به لولهٔ آزمایش منتقل و با گاز نیتروژن خشک شد. باقیمانده با ۱ میلی‌لیتر محلول حجمی متانول و آب اسیدی شده با ۰/۱ درصد اسید استیک (۱: ۱) حل شد. محلول‌ها پس از عبوراز فیلتر ۰/۲۲ میکرومتری به LC-MS/MSتزریق شدند(Berthiller *et al.*, 2005).

برای خالص‌سازی با Oasis HLB و ستون ایمیونوافینیتی IAC از عصارهٔ رقیق شده استفاده شد. این عصاره در برخی پژوهش ها استفاده شده بود (Ren *et al.*, 2007; Sáez *et al.*, 2004). با اندکی تغییرات، حجم ۱۰ میلی لیتر از عصارهٔ حاصل از استخراج (استخراج یک مرحله ای) با ۹۰ میلی لیتر آب مقطر رقیق شد و سپس ۵۰ میلی لیتر محلول رقیق شده از طریق کارتریج Oasis HLB با سرعت جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه از کارتریج عبور داده شد. کارتریج Oasis HLB پیش از آن با ۶ میلی لیتر متانول فعال و با ۲ میلی لیتر آب مقطر متعادل شده بود. برای خالص‌سازی عصاره های حاصل از استخراج دو مرحله‌ای، ابتدا ۱۰ میلی‌لیتر عصارهٔ B حاوی

متانول/ PBS با ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر رقیق شد. پنج میلی لیتر عصارهٔ A (معادل ۱ گرم نمونه) و ۵۰ میلی لیتر عصارهٔ رقیق شدهٔ B از ستون Oasis HLB عبور داده شد. مایکوتوکسین‌ها با ۶ میلی‌لیتر متانول شسته و با گاز نیتروژن در دمای ۵۰ درجه سلسیوس خشک شدند. باقیمانده با ۱ میلی لیتر مخلوط حجمی متانول و محلول آبی ۰/۱ درصد اسید استیک (۱: ۱) حل شد. محلول ها از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتری عبور داده و به LC-MS/MS تزریق شدند. عصاره با استفاده از ستون ایمنی AOFZDT2TM و ۵۰ میلی‌لیتر عصارهٔ استخراج یک مرحله‌ای (۱۰ میلی لیتر عصاره رقیق شده با ۹۰ میلی لیتر آب مقطر) مشابه روش توصیف شده برای کارتریج Oasis HLB خالص‌سازی شد. برای خالص‌سازی عصارهٔ حاصل از استخراج دو مرحله‌ای، ابتدا ۵۰ میلی‌لیتر عصارهٔ رقیق‌شدهٔ B (۱۰ میلی‌لیتر عصارهٔ B رقیق شده با ۹۰ میلی‌لیتر آب مقطر) با سرعت ۱ تا ۲ قطره در ثانیه از ستون ایمیونوافینیتی AOFZDT2TM عبور داده شد. ستون با ۲۰ میلی لیتر PBS شسته شد تا بقایای متانول کاملاً حذف شود. پس از عبور ۵ میلی‌لیتر از عصارهٔ A، ستون با ۱۰ میلی لیتر آب مقطر شسته شد تا باقیمانده PBS و ترکیبات مزاحم ماتریکس مادهٔغذایی حذف شوند. سموم نگه‌داشته شده در ستون ایمیونوافینیتی با ۳ میلی لیتر متانول در دو مرحلهٔ ۱/۵ میلی‌لیتری با سرعت ۱ قطره در ثانیه و فاصلهٔ ۵ دقیقه بین دو مرحله واجذب شد. شستشوی کامل تمام سموم با مرحلهٔ شستشوی دوم و پس از عبور هوا از ستون به دست آمد(Lattanzio *et al.*, 2007) . مخلوط به‌دست آمده مایکوتوکسین‌ها تحت گاز نیتروژن خشک شد و برای آزمون LC-MS/MS در ۱ میلی‌لیتر فاز متحرک حل شد.

برای آنالیز مایکوتوکسین‌ها، بدون خالص‌سازی، ۰/۵ میلی‌لیتر عصارهٔ نهایی استخراج یک مرحله‌ای با همان مقدار استونیتریل: آب: اسید استیک (۱:۲۰:۷۹) رقیق و به LC-MS/MS تزریق شد (Spanjer *et al.*, 2008; Sulyok *et al.*, 2007, 2010). در مورد عصاره‌های دو مرحله‌ای، با مخلوط کردن ۵ میلی لیتر عصارهٔ A با همان مقدار عصارهٔ B (برابر ۱ گرم نمونه) و عبور از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر، نمونه برای تزریق مستقیم به LC-MS/MS، آماده شد.

اعتبار سنجی

اعتبارسنجی روش با توجه به توصیه‌های عملکرد روش‌های تحلیلی و تفسیر نتایج (Vasquez-Martinez *et al.*, 2011) و اعتبار سنجی روش‌های تحلیلی برای تعیین مایکوتوکسین‌ها در مواد غذایی اجرا گردید (Gilbert & Anklam, 2002) و نتایج با سطوح قابل قبول تعیین‌شده توسط مقررات اروپایی برای روش‌ها مقایسه شد. تجزیه و تحلیل برای کنترل سطوح مایکوتوکسین در مواد غذایی(Cheli *et al.*, 2014; Köppen *et al.*, 2013) و تجزیه و تحلیل رگرسیون خطی برای مخلوط AFs، OTA، ZEA، OTA، DON، FB1، FB2، T2-Toxin و HT2-Toxin اجرا شد. منحنی‌های کالیبراسیون پنج نقطه‌ای برای مایکوتوکسین‌ها در محدودهٔ غلظت‌های مذکور در جدول ۴ رسم شد. از رگرسیون خطی برای رسم نسبت مساحت پیک هر مایکوتوکسین در برابر غلظت آن استفاده شد. ارزیابی هر نقطه سه بار تکرار شد. کمترین حد تشخیص [1] (LOD) و کمترین حد اندازه‌گیری [2](LOQ) با رقت‌های سریالی با کمترین غلظت تعیین و بر اساس نسبت سیگنال/نویز ۳ (۳= S/N) و ۱۰ (۱۰= S/N) برآورد شد. برای بررسی میزان

[1] Limit of Detection (LOD)
[2] Limit of Quantification (LOQ)

بازیافت و اثر ماتریس، پنج استاندارد پس از استخراج به ماتریس ذرت اضافه و هر یک سه بار تزریق شد.

نتایج و بحث

مقایسهٔ روش های استخراج و خالص سازی

در این مطالعه، ۱۰ گرم نمونه استخراج شد. اما در مقالات مروری دیده شده مقادیر کمتری استخراج شده است (۰/۵ گرم نمونه (Sulyok *et al.*, 2007, 2010) و ۵ گرم نمونه(Monbaliu *et al.*, 2010) تمونهٔ استخراج شده همراه با ۴ روش خالص سازی بررسی شد. بازیابی به‌دست‌آمده از مایکوتوکسین‌ها و اهمیت تفاوت بین بازیابی‌های به‌دست‌آمده با استفاده از روش‌های مختلف استخراج و خالص سازی در جدول ۲ نشان داده شده است.

پیش از این گفته شد بهترین روش‌ها برای استخراج همزمان AFs، OTA، ZEA، DON، فومونیزین‌ها، سموم T2 و HT2 استخراج یک مرحله‌ای با استونیتریل: آب: اسید استیک (۱:۲۰:۷۹) است (Sulyok *et al.*, 2007) و روش های استخراج دو مرحله‌ای با استفاده از PBS و متانول(Lattanzio *et al.*, 2007). در میان تمام روش‌های خالص‌سازی Oasis HLB و Mycosep 226 کمترین بازیابی را ارائه داده‌اند و میزان بازیابی Oasis HLB در محدودهٔ ۱۱/۸ و ۸۹ درصد برای تقریباً همهٔ مایکوتوکسین‌ها به جز AFG2، AFG1 و DON است. میزان بازیابی ب برای مایکوتوکسین‌ها با استفاده از ستون Oasis HLB در محدوده۱۱/۸ درصد برای HT2 Toxin و ۷۷/۴ درصد برای AFG1 است که مشابه میزان بازیابی برای AFs گزارش شده در برخی پژوهش‌های پیشین است(Garon *et al.*, 2006; Richard *et al.*, 2007).

همچنین MycoSep 226 بازیابی بین ۱۱/۵ تا ۸۸/۲ درصد را ارائه می‌دهد که برای هیچ یک از مایکوتوکسین‌ها به جز AFB2 قابل قبول نیست. این نتایج نمی تواند نتایج بازیافت خوب گزارش شده در پیشینه تحقیق با MycoSep 226 را تایید کند که ۹۳ درصد بازیافت برای DON، ۵۰ تا ۷۰ درصد برای T2 و HT2 توکسین و ۳۰ تا ۸۰ درصد برای ZEA با استفاده از MycoSep 226 را گزارش کردند (Berthiller *et al.*, 2005; Biselli & Hummert, 2005). تفاوت بازیابی‌ها در این تحقیق. و ادبیات را می توان با بسیاری از متغیرهای موثر بر استخراج مایکوتوکسین توضیح داد. یکی از مهم‌ترین تفاوت‌ها در این تحقیق تغییر در حلال استخراج است که به دلیل وجود فومونیزین‌ها در این تحقیق، نسبت به بسیاری مقالات، اعمال شد.

در بین تمام روش‌های خالص سازی، روش‌های IAC و روش‌های بدون خالص سازی، به ترتیب با درصد بازیافت ۶۱/۳ تا ۹۷/۶ درصد و ۶۴/۳ تا ۱۱۲/۱درصد، بالاترین میزان بازیابی را برای همه مایکوتوکسین‌ها ارائه کردند. با توجه به بالابودن قیمت و زمان آماده‌سازی نمونه با استفاده از IAC، روش بدون خالص سازی به عنوان روش بهینه برای آماده سازی نمونه‌ها انتخاب شد. تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) بازیابی مایکوتوکسین‌ها با استفاده از روش‌های مختلف استخراج و خالص‌سازی در جدول ۳ نشان داده شده است. تحلیل واریانس مدل خطی عمومی (GLM) نشان داد که بر اساس بازیابی‌های به‌دست‌آمده بین روش‌های مختلف استخراج و خالص سازی و سموم تفاوت معنی‌داری وجود دارد (p-value <۰.۰۵). مقدار بالای مربعات R نشان داد که بیش از ۹۵ درصد تغییر بازیابی را می توان با این متغیرهای استخراج و خالص‌سازی و تعامل آنها پیش بینی کرد.

با توجه به اهمیت عملکرد روش برای سطوح مختلف آلودگی مایکوتوکسین، در مورد اثر غلظت مایکوتوکسین‌ها بررسی‌های بیشتری شده است. استفاده از روش استخراج یک مرحله‌ای و روش "بدون خالص‌سازی" در غلظت‌های مختلف روی مایکوتوکسین‌ها در نمونهٔ غنی شده، بازیابی در محدودهٔ ۶۴/۳ تا ۱۱۲/۱ درصد به دست آمد که با نتایج گزارش شدهٔ دیگر محققان برای همه مایکوتوکسین‌ها به جز فومونیزین‌ها همخوانی دارد و الزامات اتحادیه اروپا را برای

روش سنجش مایکوتوکسین‌ها فراهم می‌کند (European Commission, 2006; Spanjer *et al.*, 2008). در روش ارائه شده توسط اسپانجر و همکاران (Spanjer *et al.*, 2008). تعداد زیادی از مایکوتوکسین‌ها از جمله آفلاتوکسین‌ها، اکراتوکسین آ، زئارالنون، دئوکسی نیوالنول ، سم T2، سم HT2 و برخی مشتقات این سموم در مدت ۳۰ دقیقه تفکیک

جدول ۲ - نتایج بازیابی مایکوتوکسین ها با استفاده از دو روش استخراج مختلف و روش های خالص سازی مختلف

Table 2 - Mycotoxin recovery results using two different extraction and different purification methods

مایکوتوکسین ها	غلظت (میکروگرم در کیلوگرم)	روش استخراج	روش خالص سازی			
			ایمینوافینیتی	Mycosep 226	بدون خالص سازی	Oasis HLB
آفلاتوکسین B1	۵	یک مرحله ای	۸۳/۵ ± ۴/۵ aA	۴۲ ± ۶/۵ aB	۸۵/۱ ± ۷/۶aA	۲۶/۱ ± ۱۰/۵ aB
		دو مرحله ای	۸۰/۲ ± ۵/۵ aA	۳۴ ± ۴/۵ bB	۹۷/۲ ± ۹/۵ aC	۱۸/۵ ± ۸/۵ aD
آفلاتوکسین B2	۱.۵	یک مرحله ای	۸۴/۵ ± ۴.۳ aA	۸۸/۱ ± ۱۱/۵ cA	۹۶/۹ ± ۱۱/۸ aA	۶۸/۵ ± ۶/۴ bB
		دو مرحله ای	۷۱/۵ ± ۱۰/۲ aA	۷۲/۵ ± ۶/۱ cA	۸۹/۹ ± ۴/۵ aB	۷۹/۲ ± ۱۴/۴ AB
آفلاتوکسین G1	۵	یک مرحله ای	۸۰/۵ ± ۴/۵ aA	۴۴/۵ ± ۲۳/۱ abcB	۷۶/۲ ± ۱۱/۹ aA	۷۶/۱ ± ۴/۵bA
		دو مرحله ای	۷۵/۹ ± ۳/۵ aA	۳۲/۴ ± ۴/۲ bB	۹۱/۵ ± ۶/۳ aC	۸۹/۱ ± ۵/۸bC
آفلاتوکسین G2	۱.۵	یک مرحله ای	۹۱/۴ ± ۶/۲ aA	۳۱/۸ ± ۴/۱ bB	۸۴/۱ ± ۱۳/۱ aA	۱۹/۲ ± ۴/۹ aC
		دو مرحله ای	۸۲/۹ ± ۳/۸ aA	۱۱/۸ ± ۴/۱ dB	۸۵/۸ ± ۵/۶ aC	۱۸/۱ ± ۴/۲ aC
اکراتوکسین آ	۱۲.۵	یک مرحله ای	۸۶/۳ ± ۳/۸aA	۴۷/۱ ± ۲۶/۱ cB	۹۰/۱ ± ۴/۷ aA	۲۵/۱ ± ۴/۹ aC
		دو مرحله ای	۸۰/۲ ± ۳/۵ aA	۵۲/۳ ± ۴/۱ cB	۸۷/۱ ± ۸/۳ aA	۲۶/۵ ± ۷/۱ aC
زئارالنون	۱۲۵	یک مرحله ای	۷۷/۲ ± ۶/۸ aA	۶۲/۳ ± ۶/۸ cB	۸۲/۷ ± ۴/۵ aC	۳۱/۳ ± ۷/۱ aD
		دو مرحله ای	۶۹/۳ ± ۴/۱ aA	۵۴/۵ ± ۷/۶ cB	۷۷/۷ ± ۸/۳ aA	۳۷/۳ ± ۴/۶ aC
داکسی نیوالنون	۲۵۰	یک مرحله ای	۷۴/۷ ± ۵/۶ aA	۵۰/۱ ± ۴/۶ cB	۸۲/۱ ± ۵/۷ aC	۵۲/۹ ± ۷/۹ bB
		دو مرحله ای	۷۵/۳ ± ۴/۹ aA	۴۹/۵ ± ۴/۸ cB	۸۵/۱ ± ۶/۱ aC	۶۵/۳ ± ۴/۸ bD
فومونیسین B1	۱۲۵	یک مرحله ای	۹۰/۱ ± ۳/۷aA	۳۷/۱ ± ۴/۸cbB	۸۹/۵ ± ۳/۸aA	۳۴/۷ ± ۷/۲aB
		دو مرحله ای	۷۸/۷ ± ۴/۱aA	۳۷/۱ ±۴/۶cB	۸۸/۹ ±۸/۳ aA	۳۳/۷ ±۹/۶ aB
فومونیسین B2	۱۲۵	یک مرحله ای	۷۸/۹ ± ۵/۶aA	۳۸/۱ ± ۴/۷cB	۸۰/۱ ± ۵/۶aA	۳۹/۵ ± ۳/۹aC
		دو مرحله ای	۷۰/۵ ± ۳/۸aA	۳۳/۹ ± ۱.۴cbB	۸۲/۹ ± ۶/۱aC	۱۷/۶ ± ۶/۸aD
سم T2	۲۵۰	یک مرحله ای	۸۰/۱ ± ۲/۹aA	۳۸/۲ ± ۴/۱cB	۸۵/۶ ± ۵/۱aA	۲۷/۱ ± ۵/۱aC
		دو مرحله ای	۸۶/۹ ± ۳/۷aA	۴۱/۸ ± ۳/۹cB	۹۴/۶ ± ۴/۸aC	۳۰/۱ ± ۴/۳aD
سم HT2	۲۵۰	یک مرحله ای	۷۹/۱ ± ۳/۱aA	۶۴/۳ ± ۶/۴cB	۸۵/۹ ± ۳/۵aC	۱۴/۹ ± ۳/۸aD
		دو مرحله ای	۹۰/۳ ± ۴/۲aA	۴۶/۳ ± ۴/۸cB	۱۰۷/۳ ± ۴/۸aC	۱۴/۵ ± ۳/۱aD

انحراف معیار از سه تکرار تعیین بازیابی

حروف کوچک (abc) تفاوت قابل توجهی در بازیابی بین خالص سازی برای هر مایکوتوکسین را نشان می دهند (تفاوت بین ستون ها)

حروف بزرگ (ABC) تفاوت قابل توجهی را در بازیابی بین حلال ها برای هر مایکوتوکسین نشان می دهند (تفاوت بین ردیف ها)

جدول ۳ .تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) بازیابی مایکوتوکسین ها با استفاده از روش های مختلف استخراج و خالص سازی

Table 3. Analysis of variance (ANOVA) of recovery of mycotoxins using different extraction and purification methods

منبع	درجهٔ آزادی	F-value	P-value
سم	۱۰	۲۸/۵۸	۰/۰۰۰
روش استخراج	۱	۲/۲۴	۰/۱۳۶
روش خالص سازی	۳	۷۷۸/۱۷	۰/۰۰۰
سم×روش استخراج	۱۰	۲/۶۶	۰.۰۰۵
سم× روش خالص سازی	۳۰	۲۲/۲۶	۰/۰۰۰
روش استخراج× خالص سازی	۳	۸/۷۸	۰/۰۰۰
سم×روش استخراج× خالص سازی	۳۰	۲/۱۸	۰/۰۰۱
R-sq= ۹۵/۱			

و اندازه‌گیری شدند. این روش با روش رسمی اتحادیه اروپا برای تعیین آفلاتوکسین در مواد غذایی مقایسه شد و به عنوان روش مولتی مایکوتوکسین با تشخیص بیش از یک مایکوتوکسین در ذرت، گندم سیاه، انجیر و آجیل به اثبات رسید.

بازیابی فومونیزین‌ها در روش ارائه شده بیشتر از موارد گزارش شده توسط اسپانجر و همکاران (Spanjer *et al.*, 2008). است. این را می توان به دلیل افزایش مقدار آب حلال استخراج و افزودن اسید استیک به عصاره توضیح داد که راحت‌ترین راه برای بهبود راندمان استخراج و در نتیجه بازیابی فومونیزین‌ها است و روش چندگانه را برای دیگر مایکوتوکسین‌ها بدون تغییر باقی می‌گذارد.

این یافته‌ها با نتایج استخراج مایکوتوکسین‌ها از ذرت، گندم، جو دوسر، دانه‌های ذرت و نان، استخراج با استونیتریل آباسیداستیک (۷۹ : ۲۰ :۱)، و یک مرحله چربی‌زدایی با هگزان، فیلتراسیون، تبخیر حلال از عصاره و حل کردن باقیمانده در فاز متحرک برای اندازه گیری میزان سموم با LC-MS/MS مشابه است. در این پژوهش فاز متحرک که از مخلوطی از متانول و آب با ۱۰ میلی مولار استات آمونیوم تشکیل شده بود، با اسید استیک در pH برابر ۳ تنظیم شد. نتایج ویژگی های عملکرد روش توسعه یافته با معیارهای ذکر شده در مقررات کمیسیون (EC)شمارهٔ ۲۰۰۶/۴۰۱ مطابقت خوبی دارد (De Boevre *et al.*, 2012).

اعتبارسنجی روش

خطی بودن رابطه بین سطح پیک و غلظت با تجزیه و تحلیل منحنی‌های کالیبراسیون پنج نقطه‌ای مایکوتوکسین‌ها در غلظت‌های مختلف تعیین شد (جدول ۴). برای همه مایکوتوکسین‌ها، ضرایب همبستگی منحنی کالیبراسیون بیشتر از ۰/۹۲۵ بود. کمترین حد تشخیص و کمترین حد اندازه‌گیری (LOD و LOQ) برای این روش روی نمونه‌های حاوی غلظت بسیار پایین مایکوتوکسین و نمونهٔ ذرت اجرا شد. کمترین حد تشخیص به دست آمده برای مایکوتوکسین ها ۰/۰۵ تا ۵ و ۰/۰۸ تا ۸ میکروگرم در کیلوگرم به ترتیب برای محلول استاندارد مایکوتوکسین ها و برای عصاره استخراج شده از ذرت بود. کمترین حد اندازه گیری ۰/۱۵ تا ۱۵ و ۰/۲۵تا ۲۵ میکروگرم در کیلوگرم برای محلول استاندارد مایکوتوکسین ها و ذرت بود . این حدود

بسیار کمتر از حدود نظارتی تعیین شده توسط اتحادیه اروپایی برای مایکوتوکسین‌هاست که قابلیت روش را برای به کار رفتن در اندازه‌گیری مایکوتوکسین‌ها نشان می‌دهد (European Commission, 2006). مقادیر به دست امده، در مقایسه با مقادیری که از دیگر پژوهش‌ها به‌دست آمده است، با توجه به عدم استفاده از خالص‌سازی از پژوهش‌هایی که تخلیص با IAC یا MycoSep صورت گرفته است (Lattanzio *et al.*, 2009; Diana Di Mavungu *et al.*, 2009)، بالاتر است.

در بررسی دیگری برای نظارت بر وقوع این مایکوتوکسین‌ها در محصولاتی برای تغذیهٔ حیوانات در سوئد، عصاره های استخراج مایکوتوکسین‌ها به دو قسمت تقسیم شدند که یک بخش رقیق و بدون خالص سازی و بخش دیگر با استفاده از MultiSep226 خالص سازی و سپس برای جداسازی، شناسایی و اندازه گیری مایکوتوکسین‌ها با LC-ESI-MS/MS در حالت SRM بررسی گردید. بازیابی برای همهٔ مایکوتوکسین‌ها بالاتر از ۸۶ درصد و حد تشخیص ۰/۱ تا µg/kg ۷۲ و حد اندازه گیری از ۲/۵ تا µg/kg ۱۱۵ بود (Tevell Åberg *et al.*, 2013).

جدول ۴. خطی بودن و حساسیت روش LC-MS/MS برای تعیین همزمان مایکوتوکسین ها

Table 4. Linearity and sensitivity of LC-MS/MS method for simultaneous determination of mycotoxins

مایکوتوکسین ها	حد تشخیص LOD در محلول استاندارد (ug/L)	حداندازه گیری LOQ در محلول استاندارد (ug/L)	حد تشخیص LOD در ذرت (ug/kg)	حداندازه گیری LOQ در ذرت (ug/kg)	محدوده خطی(ug/L)	R2
آفلاتوکسین B1	۰/۰۵	۰/۱۵	۰/۰۸	۰/۲۵	۰/۰۵–۱۰۰	۰/۹۹۹
آفلاتوکسین B2	۰/۱۵	۰/۵	۰/۲۵	۰/۷۵	۰/۱۵–۳۰	۰/۹۹۸
آفلاتوکسین G1	۰/۰۵	۰/۱۵	۰/۱	۰/۳	۰/۰۵–۱۰۰	۰/۹۹۷
آفلاتوکسین G2	۰/۲	۰/۶	۰/۳	۱	۰/۲–۳۰	۰/۹۹۵
اکراتوکسین آ	۰/۰۵	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۴۵	۰/۱ –۲۵۰	۰/۹۹۷
زئارالنون	۰/۱	۰/۳	۰/۵	۱/۵	۱–۲۵۰۰	۰/۹۹۵
داکسی نیوالنون	۵	۱۵	۷	۲۰	۵–۵۰۰۰	۰/۹۲۵
فومونیسین B1	۵	۱۵	۸	۲۵	۵–۲۵۰۰	۰/۹۹۳
فومونیسین B2	۵	۱۵	۸	۲۵	۵–۲۵۰۰	۰/۹۹۴
سم T2	۲/۵	۷/۵	۵	۱۵	۲/۵–۵۰۰۰	۰/۹۸۶
سم HT2	۲/۵	۷/۵	۵	۱۵	۲/۵–۵۰۰۰	۰/۹۸۵

سلیمانی و همکاران (Soleimany *et al.*, 2012a) برای اندازه‌گیری مایکوتوکسین‌ها در غلات از استخراج یک مرحله‌ای حلال استونیتریل: آب: اسیداستیک (۱:۲۰:۷۹) بدون خالص‌سازی استفاده نمودند. تعیین همزمان مایکوتوکسین‌ها با کروماتوگرافی مایع فاز معکوس طیف سنجی جرمی (UPLC-MS/MS) با استفاده از رابط الکترو اسپری یونیزاسیون (ESI) در هر دو حالت یون مثبت و منفی انجام شد. میانگین بازیابی مایکوتوکسین‌ها از غلات ۸۳/۵ تا ۱۰۷/۳درصد بود، در حالی که حد تشخیص (LOD) و حد اندازه گیری (LOQ) به ترتیب از ۰/۰۱ تا ۲۵ میکروگرم در کیلوگرم و ۰/۰۲تا۴۰ میکروگرم در کیلوگرم بود. روش توسعه یافته برای تعیین مایکوتوکسین‌ها در ۱۰۰ نمونه

غلات جمع آوری شده از بازارهای مالزی استفاده شده است. نتایج بررسی‌ها نشان داد که این روش برای تعیین مایکوتوکسین‌ها در غلات مناسب است و می‌تواند برای آنالیز معمول اجرا شود(Soleimany *et al*., 2012b).

تجزیه و تحلیل نمونه های غلات (برنج، گندم، جو و ذرت) در جدول ۵ نشان داده شده است. میزان بازیابی سموم با محاسبه درصد مقدار اندازه گیری شده هر مایکوتوکسین به سطح آلوده شده آن به دست آمد. میزان بازیافت ۷۵/۱ تا ۱۰۶/۳ درصد بود که برای روش‌های مایکوتوکسین در محدوده میزان بازیافت قابل قبول (۷۰ تا۱۱۰ درصد) قرارداشت.

کاربرد روش برای سنجش آلودگی نمونه های واقعی

روش LC-MS/MS در اندازه گیری کمی آفلاتوکسین‌ها، اکراتوکسین‌آ، زئارالنون، داکسی نیوالنول، فومونیزین‌ها، سموم T2 و HT2، در ۳۰ نمونه غلات به کار برده شد. تمام نمونه‌های غلات جمع‌آوری‌شده با استفاده از روش جدید LC-MS/MS بررسی شدند و نتایج در جدول ۶ آورده شده است.

جدول۵- بازیافت مایکوتوکسین ها با روش استخراج یک مرحله ای و بدون خالص سازی

Table 5- Recovery of mycotoxins with one-step extraction method without purification

مایکوتوکسین ها	سطح آلوده شده (ng/g)	بازیافت (٪)			
		ذرت	برنج	گندم	جو
آفلاتوکسین B1	۵	۱۰۶/۳	۱۰۵/۶	۱۰۴/۱	۱۰۲/۱
آفلاتوکسین B2	۱/۵	۹۱/۱	۹۱	۸۸/۲	۸۶/۲
آفلاتوکسین G1	۵	۸۳/۵	۸۶	۷۵/۱	۸۴/۶
آفلاتوکسین G2	۱/۵	۸۶/۵	۸۶/۵	۸۶/۲	۸۱/۳
اکراتوکسین آ	۱۲/۵	۸۶/۹	۸۸/۴	۸۸/۱	۸۷/۱
زئارالنون	۱۲۵	۸۸/۵	۹۰/۱	۸۹/۱	۸۸/۹
داکسی نیوالنون	۲۵۰	۹۰/۱	۸۹/۲	۸۶/۵	۸۵/۱
فومونیسین B1	۱۲۵	۹۰/۲	۹۱/۲	۸۸/۹	۸۹/۱
فومونیسین B2	۱۲۵	۸۷/۴	۸۹/۲	۸۷/۲	۸۳/۱
سم T2	۲۵۰	۹۵/۹	۹۸/۵	۹۳/۱	۹۱/۹
سم HT2	۲۵۰	۹۷/۱	۹۷/۲	۹۷	۹۲/۳

از این میان ۳۰ نمونه بررسی شده، ۹ نمونه از ۱۲ نمونه برنج (۷۵ درصد)، ۴ نمونه از ۵ نمونه گندم (۸۰ درصد)، ۳ نمونه از ۵ نمونه جو (۶۰ درصد) و ۶ نمونه از ۸ نمونه ذرت (۷۵ درصد)، و در مجموع ۲۵ نمونه از ۳۰ نمونه کل (۸۳/۳درصد) به حداقل یک مایکوتوکسین آلوده بودند. ولی میزان آلودگی در هیچ یک از نمونه ها از سطوح مجاز آلودگی فراتر نبود.

جدول ٦- آلودگی مایکوتوکسین ها در نمونه های غلات

Table 6- Contamination of mycotoxins in cereal samples

مایکوتوکسین ها	برنج	گندم	جو	ذرت	
تعداد نمونه (N)	۱۲	۵	۵	۸	۳۰
آفلاتوکسین ها AFs	۶ (۰/۲۵- ۴/۶۵)	۴ (۰/۳- ۳/۵)	۲ (۰/۲۵-۲/۹۵)	۶ (۰/۲۵- ۶/۵)	۱۸ (۰/۲۵-۶/۵)
اکراتوکسین آ	۷ (۰/۶- ۴/۴۵)	۲ (۱/۵-۱۰/۴۵)	۲ (۰/۹-۱۵/۵)	۴ (۱/۵-۲۰/۵.)	۱۵ (۰/۴۵- ۲۰/۵)
زئارالنون	۴ (۴/۵- ۱۲/۵)	۲ (۲/۵- ۲۰.۸۵)	۲ (۱/۵- ۲۰/۵)	۴ (۲/۵- ۵۴/۳۵)	۱۲ (۱/۵-۵۴/۳۵)
داکسی نیوالنون	۳ (۲۰ – ۸۵/۵)	۲ (۲۵- ۱۱۰/۵)	۲ (۲۰- ۸۰/۵)	۴ (۳۵- ۱۵۰)	۱۱ (۲۰-۱۵۰)
فومونیسین B1	۲ (۴۰- ۶۵)	۱ (۷۵)	۲ (۳۵- ۱۰۵)	۳ (۵۰- ۲۲۵)	۸ (۳۵- ۲۲۵)
فومونیسین B2	ND	۲ (۲۵- ۸۵)	۲ (۳۰- ۹۵)	۳ (۴۵- ۱۷۵)	۷ (۲۵- ۱۷۵)
سم T2	۲ (۱۵- ۹۵)	۱ (۴۵)	۱ (۴۵)	۴ (۳۰- ۱۰۵)	۸ (۱۵-۱۰۵)
سم HT2	۱ (۲۰)	ND	ND	۳ (۳۰- ۹۵)	۴ (۳۰- ۹۵)
وقوع (٪)	۹ (٪۷۵)	۴ (٪ ۸۰)	۳ (٪ ۶۰)	۶ (٪ ۷۵)	۲۵ (٪ ۸۳.۳)

n (max - min) (ng/g)

ND : معمولا مقادیر تشخیص داده نشده را ND می گویند و کمتر از LOQ را به‌صورت LOQ> گزارش می دهند.

نتیجه‌گیری

آماده‌سازی کارآمد نمونه از طریق انتخاب روش‌های استخراج و خالص‌سازی، برای تعیین همزمان ۱۱ مایکوتوکسین از غلات، توسط LC-MS/MS توسعه یافت. در این مطالعه، استونیتریل: آب: اسید استیک (۷۹:۲۰:۱ درصد حجمی) میزان بازیابی بالاتری را برای همه مایکوتوکسین‌ها در مقایسه با استخراج دو مرحله‌ای ارائه داد. علاوه بر این، روش خالص‌سازی با استفاده از میکروفیلتر فیبر شیشه (بدون خالص‌سازی) بالاترین میزان بازیابی (۶۴/۳ تا ۱۱۲/۱ درصد) را در مقایسه با سه روش تمیزکردن دیگر، IAC، Oasis HLB و MycoSep 226 به‌دست داد. مطالعه اعتبارسنجی نشان داد که این روش برای تعیین همزمان مایکوتوکسین‌های هدف در غلات به میزان کافی از خطی بودن، حساسیت، دقت و صحت برخوردار است. بنابراین، می‌توان نتیجه گرفت که این روش برای تعیین مایکوتوکسین به صورت آزمون روتین مناسب است. علاوه بر این، رویکرد تجربی مورد استفاده در این مطالعه می‌تواند به عنوان مرجعی برای دیگر روش‌های آماده‌سازی نمونه استفاده شود.

تعارض منافع

نویسندگان در زمینه انتشار مقاله ارائه شده به طور کامل از سوء اخلاق نشر، از جمله سرقت ادبی، سوء رفتار جعل داده‌ها و یا ارسال و انتشار دوگانه، پرهیز نموده‌اند و منافعی تجاری در این راستا ندارند.

منابع

Berthiller, F., Schuhmacher, R., Buttinger, G., and Krska, R. 2005. Rapid simultaneous determination of major type A- and B-trichothecenes as well as zearalenone in maize by high performance liquid chromatography–tandem mass spectrometry. J. Chromatography A, 1062(2), 209-216. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.11.011

Biselli, S., and Hummert, C. 2005. Development of a multicomponent method for Fusarium toxins using LC-MS/MS and its application during a survey for the content of T-2 toxin and deoxynivalenol in various feed and food samples. Food additives and contaminants, 22(8), 752-760.

Cheli, F., Battaglia, D., Gallo, R., and Dell'Orto, V. 2014. EU legislation on cereal safety: An update with a focus on mycotoxins. Food Control, 37, 315-325.

European Commission. 2006. Commission Regulation (EC) No 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs. Off J Eur Union L, 70, 12-34.

De Boevre, M., Di Mavungu, J. D., Maene, P., Audenaert, K., Deforce, D., Haesaert, G., Eeckhout, M., Callebaut, A., Berthiller, F., Van Peteghem, C., and De Saeger, S. 2012. Development and validation of an LC-MS/MS method for the simultaneous determination of deoxynivalenol, zearalenone, T-2-toxin and some masked metabolites in different cereals and cereal-derived food. Food Additives & Contaminants: Part A, 29(5), 819-835. https://doi.org/10.1080/19440049.2012.656707

De Girolamo, A., Solfrizzo, M., Lattanzio, V. M. T., Stroka, J., Alldrick, A., van Egmond, H. P., and Visconti, A. 2013. Critical evaluation of LC-MS-based methods for simultaneous determination of deoxynivalenol, ochratoxin A, zearalenone, aflatoxins, fumonisins and T-2/HT-2 toxins in maize. World Mycotoxin Journal, 6(3), 317-334. https://doi.org/https://doi.org/10.3920/WMJ2012.1538

Diana Di Mavungu, J., Monbaliu, S., Scippo, M.-L., Maghuin-Rogister, G., Schneider, Y.-J., Larondelle, Y., Callebaut, A., Robbens, J., Van Peteghem, C., and De Saeger, S. 2009. LC-MS/MS multi-analyte method for mycotoxin determination in food supplements. Food additives and contaminants, 26(6), 885-895.

Driehuis, F., Spanjer, M. C., Scholten, J. M., and te Giffel, M. C. 2008. Occurrence of Mycotoxins in Feedstuffs of Dairy Cows and Estimation of Total Dietary Intakes. Journal of Dairy Science, 91(11), 4261-4271. https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2008-1093

Fernandes, P. J., Barros, N., Santo, J. L., and Câmara, J. S. 2015. High-throughput analytical strategy based on modified QuEChERS extraction and dispersive solid-phase extraction clean-up followed by liquid chromatography-triple-quadrupole tandem mass spectrometry for quantification of multiclass mycotoxins in cereals. Food Analytical Methods, 8, 841 ۸۵۶–

Garon, D., Richard, E., Sage, L., Bouchart, V., Pottier, D., and Lebailly, P. 2006. Mycoflora and multimycotoxin detection in corn silage: experimental study. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54(9), 3479-3484.

Gilbert, J., and Anklam, E. 2002. Validation of analytical methods for determining mycotoxins in foodstuffs. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 21(6-7), 468-486.

Köppen, R., Bremser, W., Rasenko, T., and Koch, M. 2013. Development and certification of a reference material for Fusarium mycotoxins in wheat flour. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 405, 4755-4763.

Lattanzio, V. M., Pascale, M., and Visconti, A. 2009. Current analytical methods for trichothecene mycotoxins in cereals. TrAC Trends in Analytical Chemistry, 28(6)768-758 .

Lattanzio, V. M. T., Solfrizzo, M., Powers, S., and Visconti, A. 2007. Simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A and Fusarium toxins in maize by liquid chromatography/tandem mass spectrometry after multitoxin immunoaffinity cleanup. Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry, 21(20), 3253-3261.

Monbaliu, S., Van Poucke, C., Detavernier, C. l., Dumoulin, F., Van De Velde, M., Schoeters, E., Van Dyck, S., Averkieva, O., Van Peteghem, C., and De Saeger, S. 2010. Occurrence of Mycotoxins in Feed as Analyzed by a Multi-Mycotoxin LC-MS/MS Method. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 58(1), 66-71. https://doi.org/10.1021/jf903859z

Paepens, C., De Saeger, S., Van Poucke, C., Dumoulin, F., Van Calenbergh, S., and Van Peteghem, C. 2005. Development of a liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for the quantification of

fumonisin B1, B2 and B3 in cornflakes. Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry, 19(14), 2021-2029.

Qiao, J., Qi, L., Ma, H., Liu, H., Yang, J., Chen, Y., and Yang, G. 2009. A block copolymer covalent coating acting as surfactants in separation of 2-[hydroxy (4-nitrophenyl) methyl]-cyclopent-2-enone and 4-nitrobenzaldehyde by capillary electrophoresis. Talanta, 80(2), 770-776.

Rahmani, A., Jinap, S., and Soleimany, F. 2009. Qualitative and quantitative analysis of mycotoxins. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety, 8(3), 202-251.

Ren, Y., Zhang, Y., Shao, S., Cai, Z., Feng, L., Pan, H., and Wang, Z. 2007. Simultaneous determination of multi-component mycotoxin contaminants in foods and feeds by ultra-performance liquid chromatography tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography A, 1143(1), 48-64. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chroma.2006.12.064

Richard, E., Heutte, N., Sage, L., Pottier, D., Bouchart, V., Lebailly, P., and Garon, D. 2007. Toxigenic fungi and mycotoxins in mature corn silage. Food and Chemical Toxicology, 45(12), 2420-2425.

Sáez, J. M., Medina, Á., Gimeno-Adelantado, J. V., Mateo, R., and Jiménez, M. 2004. Comparison of different sample treatments for the analysis of ochratoxin A in must, wine and beer by liquid chromatography. Journal of Chromatography A, 1029(1-2), 125-133.

Shi, H., Li, S., Bai, Y., Prates, L. L., Lei, Y., and Yu, P. 2018. Mycotoxin contamination of food and feed in China: Occurrence, detection techniques, toxicological effects and advances in mitigation technologies. Food Control, 91, 202-215.

Soleimany, F., Jinap, S., and Abas, F. 2012a. Determination of mycotoxins in cereals by liquid chromatography tandem mass spectrometry. Food Chemistry, 130(4), 1055-1060. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.131

Soleimany, F., Jinap, S., Faridah, A., and Khatib, A. 2012b. A UPLC–MS/MS for simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, DON, fumonisins, T-2 toxin and HT-2 toxin, in cereals. Food Control, 25(2), 647-653. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2011.11.012

Spanjer, M. C., Rensen, P. M., and Scholten, J. M. 2008. LC–MS/MS multi-method for mycotoxins after single extraction, with validation data for peanut, pistachio, wheat, maize, cornflakes, raisins and figs. Food Additives & Contaminants: Part A, 25(4), 472-489. https://doi.org/10.1080/02652030701552964

Stecher, G., Jarukamjorn, K., Zaborski, P., Bakry ,R., Huck, C. W., and Bonn, G. K. 2007. Evaluation of extraction methods for the simultaneous analysis of simple and macrocyclic trichothecenes. Talanta, 73(2), 251-257.

Sulyok, M., Krska, R., and Schuhmacher, R. 2007. Application of a liquid chromatography–tandem mass spectrometric method to multi-mycotoxin determination in raw cereals and evaluation of matrix effects. Food additives and contaminants, 24(10), 1184-1195.

Sulyok, M., Krska, R., and Schuhmacher, R. 2010. Application of an LC–MS/MS based multi-mycotoxin method for the semi-quantitative determination of mycotoxins occurring in different types of food infected by moulds. Food Chemistry, 119(1), 408-416.

Tanaka, H., Takino, M., Sugita-Konishi, Y., and Tanaka, T. 2006. Development of a liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometric method for the simultaneous determination of trichothecenes, zearalenone and aflatoxins in foodstuffs. Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry, 20(9), 1422-1428.

Tevell Åberg, A., Solyakov, A., and Bondesson, U. 2013. Development and in-house validation of an LC-MS/MS method for the quantification of the mycotoxins deoxynivalenol, zearalenone, T-2 and HT-2 toxin, ochratoxin A and fumonisin B1 and B2 in vegetable animal feed. Food Additives & Contaminants: Part A, 30(3), 541-549. https://doi.org/10.1080/19440049.2012.760208

Vasquez-Martinez, Y., VILLEGAS R, L., Villa, A., and Massiff, G. 2011. Validation of a liquid chromatography-fluorescence spectrometric method for the quantification of four quinolones in pig and chicken muscle following the European Union guideline EC/657/2002. Journal of the Chilean Chemical Society, 56(1), 554-558.

Ventura, M., Guillén, D., Anaya, I., Broto-Puig, F., Lliberia, J. L., Agut, M., and Comellas, L. 2006. Ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the simultaneous analysis of aflatoxins B1, G1, B2, G2 and ochratoxin A in beer. Rapid Communications in Mass Spectrometry: An International Journal Devoted to the Rapid Dissemination of Up-to-the-Minute Research in Mass Spectrometry, 20(21), 3199-3204.

Wang, H.-Y., Yang, Y.-L., Wang, Y., Zhang, S.-F., and Li, L. 2019. Development of disk-shaped monolithic microplates for detecting multiple mycotoxins. Analytical Methods, 11(48), 6084-6091.

Food Engineering Research/Vol.25/No.77/Autumn & Winter 2024/P: 15-32

Journal Home page: https://fooder.areeo.ac.ir/

Original Research

Multi-Mycotoxin Determination in Cereals Using LC-MS/MS Method

Anosheh Rahmani*, Maryam Jalili, Farhang Soleimany

***Corresponding Author:** Assistant Professor, Department of Food, Halal and Agricultural Products, Food Technology and Agricultural Products Research Center, Standard Research Institute (SRI), Karaj, Iran
Email: a.rahmani@standard.ac.ir
Received:2 August 2024 **Accepted:** 3 September 2024
http://doi: 10.22092/fooder.2024.366594.1399

Abstract

A chromatography mass/mass method (LC-MS/MS) was used for the simultaneous determination of aflatoxins, ochratoxin A, zearalenone, deoxynivalenol, toxins T2, HT2 and fumonisins in cereals, and the efficiency of two methods of extracting toxins (one and two steps) and four purification methods (including MycoSep 226, Oasis HLB, immunoaffinity column (IAC) and No clean-up method) were investigated to obtain the maximum amount of recovery of myconoxins. The use of acetonitrile solvent: water: acetic acid in a volume ratio (79:20:1) as the extraction solvent, without purification, achieved the highest recovery rate of 64.3 to 112.1%. However, using MycoSep 226, Oasis HLB and IAC, the recovery rate was 7- 99.6, 10-94.9 and 61.3- 97.6% for all mycotoxins, respectively. Analysis of cereal samples (rice, wheat, barley, and corn) using the selected sample preparation method confirmed acceptable recovery rates of 75.1–106.3% for all mycotoxins among all samples. The application of the method on 30 grain samples taken from market showed that the method has sufficient accuracy to be used as a routine analysis method for small levels of mycotoxins.

Keywords: Mycotoxin, Extraction, Purification; Cereals; LC-MS/MS

© 2023,The Author(s). Published by Agricultural Engineering Research Institute. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/