

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

مهديس مسيبي<sup>۱</sup>، حبيب ا... ميرزايي<sup>۲</sup>

دریافت: ۹۱/۱۰/۲۵

پذیرش: ۹۲/۰۱/۲۰

### چکیده

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

**روش بررسی:** در این مطالعه تعداد ۸۰ نمونه برنج وارداتی از کشورهای هندوستان و پاکستان در مرز اینچه برون واقع در استان گلستان در فاصله زمانی دی ماه ۹۰ تا مرداد ماه ۹۱ نمونه‌برداری و از نظر میزان میکوتوکسین‌ها (آفلاتوکسین‌های  $B_1$ ،  $B_2$ ،  $G_1$ ،  $G_2$  و مجموع آفلاتوکسین‌ها، اکراتوکسین  $A$ ، زرالنون و داکسی نیوالنول) و فلزات سنگین (سرب، آرسنیک و کادمیوم) مورد آزمون قرار گرفتند. تمامی نمونه‌ها از نظر میزان میکوتوکسین‌ها توسط دستگاه  $HPLC$  و خالص‌سازی با ستون ایمونوآفینیتهی (خالص‌سازی داکسی نیوالنول با ستون فاز جامد انجام شد) آزمون شدند. برای اندازه‌گیری آرسنیک از دستگاه بیناب سنجی جذب اتمی بر مبنای تولید هیدرید و برای تعیین مقدار سرب و کادمیوم از روش طیف سنجی نوری جذب اتمی با کوره گرافیتی بر طبق استاندارد  $AOAC.986.15$  استفاده شد.

**یافته‌ها:** نتایج این مطالعه نشان داد که میانگین میزان آفلاتوکسین  $B_1$ ،  $B_2$ ، اکراتوکسین  $A$  و آفلاتوکسین توتال به ترتیب  $0/033$ ،  $0/036$ ،  $0/093$  و  $0/096$   $ng/g$  بود. آفلاتوکسین‌های  $G_1$ ،  $G_2$  و داکسی نیوالنول در هیچ یک از نمونه‌ها مشاهده نشد. میانگین غلظت سرب، آرسنیک و کادمیوم در نمونه‌ها نیز به ترتیب  $0/067$ ،  $0/007$ ، و  $0/024$   $mg/kg$  بود.

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

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

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

mahdis\_mosayebi@yahoo.com

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

## مقدمه

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

ارزش تغذیه‌ای برنج (به عنوان یک منبع انرژی: ۲۳۴۵ Kcal/Kg) و قدرت بالای جذب رطوبت در برنج، آن را به یک سوسترای ایده‌آل برای ایجاد و رشد گونه‌های قارچی به ویژه قارچ‌های مولد سم که می‌توانند مایکوتوکسین‌هایی مانند آفلاتوکسین‌ها را تولید نمایند، تبدیل نموده است. فاکتورهایی مانند محتوای رطوبت، فعالیت آبی، دما، مدت انبارداری، شرایط اکولوژیکی، میزان اولیه آلودگی، توانایی تولید سم گونه‌های قارچی و ماهیت ماده بر تولید مایکوتوکسین‌ها تاثیر می‌گذارد. به علاوه در طی مدت انبارداری، قارچ‌ها سبب تغییرات ارگانولپتیک و رنگ در دانه می‌شوند (۱). مطالعات زیادی نشان داده است که آلودگی محصولات کشاورزی به مایکوتوکسین‌ها، چالشی برای سلامت افراد به ویژه در کشورهای در حال توسعه است. آلودگی برنج به مایکوتوکسین‌ها از گندم و ذرت کمتر است. برنج قبل از برداشت می‌تواند با قارچ‌های مزرعه مانند گونه‌های فوزاریوم و در طی حمل و نقل و مدت انبارداری با قارچ‌های انباری از قبیل گونه‌های آسپرژیلوس و پنی‌سیلیوم آلوده شود. سه جنس مذکور، نه تنها به خاطر توانایی آنها در تولید مایکوتوکسین‌های بسیار مختلف از قبیل آفلاتوکسین  $B_1$  (AFB<sub>1</sub>)، فومانایزین  $B_1$  (FB<sub>1</sub>)، اکراتوکسین A (OTA)،

تریکودسن‌ها و زرالنون (ZEN)، بلکه به دلیل اینکه در همه جا حضور دارند، از مهم‌ترین قارچ‌ها در غلات و غذاها در نظر گرفته می‌شوند. آنها برای مهره‌داران نظیر انسان و دام در غلظت‌های کم سمی هستند. Vainio و همکاران (۱) در سال ۱۹۹۳ AFB<sub>1</sub>، FB<sub>1</sub> و OTA، به عنوان «احتمالاً جهش‌زا» برای انسان طبقه‌بندی نمودند. مطالعات اپیدمیولوژیکی بعدی، AFB<sub>1</sub> و FB<sub>1</sub> و OTA را به ترتیب از عوامل بیماری‌های کارسینوم سلول کبدی، سرطان مری، نفروپاتی بومی بالکان در انسان نشان داد. آلودگی غلات به تریکودسن‌ها، به ویژه دی اکسی نیوالنول (DON) و نیوالنول (NIV) نیز مورد توجه جهانی است. بنابراین، اطلاعات درباره مایکو فلورای قارچی در برنج، پیش نیاز ایجاد برنامه‌های کنترل مایکوتوکسین‌ها است. همه مایکوتوکسین‌ها، فرآورده‌های طبیعی با وزن مولکولی پایین (یعنی مولکول‌های کوچک) هستند که به عنوان متابولیت‌های ثانویه توسط قارچ‌های رشته‌ای تولید می‌شوند. در حالی که همه مایکوتوکسین‌ها منشا قارچی دارند، ولی همه ترکیبات سمی تولید شده توسط قارچ‌ها، از گروه مایکوتوکسین‌ها نیستند (۳). از اثرات سمی مایکوتوکسین‌ها بر روی سلامت انسان و حیوان تحت عنوان «مایکوتوکسینوسیس» یاد می‌شود که شدت آن به میزان سمیت مایکوتوکسین، میزان قرار گرفتن در معرض سم، سن و وضعیت تغذیه‌ای فرد و اثرات احتمالی تشدیدکنندگی مواد شیمیایی دیگر با سمی که فرد در معرض آن قرار می‌گیرد، بستگی دارد (۴). مایکوتوکسین‌ها (به جز FB) عموماً لیپوفیلیک هستند و بنابراین تمایل به ذخیره و تجمع در قسمت‌های چرب بدن را دارند (۵). آفلاتوکسین‌ها، گروهی از متابولیت‌های ثانویه پلی کتید (یک گروه بزرگ و مهم ترکیبات طبیعی) جهش‌زا و سمی هستند که توسط گونه‌هایی از آسپرژیلوس فلاووس، آسپرژیلوس پارازیتیکوس، آسپرژیلوس نومیوس و آسپرژیلوس پزودوتااماری تولید می‌شوند (۶) آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان (IRAC) آفلاتوکسین  $B_1$  را در گروه یک جهش‌زاهای انسانی طبقه‌بندی می‌کند که عضو هدف آنها جهت سمیت و جهش‌زایی، کبد است (۷). در بین ۱۸ نوع آفلاتوکسین‌های متفاوت شناسایی شده، اعضای اصلی این گروه، شامل آفلاتوکسین‌های  $B_1$ ،  $B_2$ ،  $G_1$ ،  $G_2$ ،  $M_1$

و در بین جمعیت سیاه پوست چارلستون، کارولینای جنوبی در آمریکا شده است. چون فومانایزین  $B_1$  جذب فولات را در سطوح سلولی کاهش می‌دهد، مصرف فومانایزین باعث نقص لوله‌های عصبی در نوزادان انسان می‌شود (۴). تریکودسن‌ها (TCT)، یک گروه وسیع متشکل از ۱۰۰ متابولیت قارچی با ساختمان اصلی یکسان را تشکیل می‌دهند. در سطح سلولی، اثر اصلی سمی مایکوتوکسین‌های TCT، به صورت بازدارندگی مقدماتی از سنتز پروتئین‌ها ظاهر می‌شود. تریکودسن‌ها، بر سلول‌های تقسیم‌شونده فعال مانند سلول‌هایی که در دستگاه گوارش، پوست و لنفوئیدها و سلول‌های اریتروئید قرار دارند، تاثیر می‌گذارد. فعالیت سمی TCT، باعث نکروزه گسترده در موکوس دهانی و پوست در تماس با این سم، اثر حاد روی دستگاه گوارش، کاهش مغز استخوان و فعالیت ایمنی می‌گردد. مایکوتوکسین‌های تریکودسن، به طور گسترده در غلات و غذاهای دیگر وجود دارند. تولید سم در رطوبت بالا و دمای  $24-6^{\circ}\text{C}$  از همه بیشتر است. شیوع طبیعی TCT در آسیا، آفریقا، آمریکای جنوبی، اروپا و آمریکای شمالی گزارش شده است. تریکودسن‌ها در ذرت، گندم، جو، یولاف، برنج، چاودار، سبزیجات و دیگر محصولات کشاورزی آشکار شدند. مثال‌هایی از تریکودسن‌های نوع A شامل (T-2) diacetoxyscirpenol، HT-2 toxin (HT-2)، T-2 toxin dextrinvalenol، Fusarenone-X (FUX) (DAS) است. (DON) و nivalenol (NIV) مثال‌هایی از متداول‌ترین تریکودسن‌های نوع B هستند (۳). آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان در سال ۱۹۹۳، اکراتوکسین A و فومانایزین‌ها را در گروه احتمالا جهش‌زا (گروه 2B) و تریکودسن‌ها و زیرالنون در گروه ۳ که برای انسان جهش‌زا نیستند، طبقه‌بندی نموده است (۷).

از سوی دیگر کنترل بیشینه رواداری فلزات سنگین در برنج یکی از مواردی است که برای حفظ سلامت مصرف‌کنندگان و نیل به ایمنی غذایی باید مورد توجه قرار گیرد. با توجه به عوارض جبران‌ناپذیر حاد و مزمن فلزات سنگین در بدن انسان که از تاثیر بر سیستم عصبی تا سرطان‌زایی طبقه‌بندی می‌شوند موجب شده تا حساسیت و اهمیت این موضوع را دو چندان

و  $M_2$ ، فراوانی و شدت سمیت آفلاتوکسین  $B_1$  در بین انواع آفلاتوکسین‌ها از همه بیشتر است و بعد از آن به ترتیب  $G_1$ ،  $B_2$  و  $G_2$  قرار دارند. آفلاتوکسین  $B_1$ ، قوی‌ترین ماده شناخته شده جهت هیپاتوکارسینوژنیک بوده و اخیراً ثابت شده است که تراژونیک، موتازونیک و ژنوتوکسیک نیز هست. در دام‌های شیری از تغییر شکل آفلاتوکسین‌های  $B_1$  و  $B_2$  به متابولیت‌های هیدروکسیله، آفلاتوکسین  $M_1$  و  $M_2$  حاصل می‌شود که در شیر و فرآورده‌های لبنی وجود دارند (۶). آفلاتوکسین‌ها مانند دیگر ترکیبات هتروسیکلی، نور فلوتورسانس تولید می‌کنند و توسط خاصیت فلوتورسانس آنها تشخیص داده می‌شوند.  $AFB_1$  و  $AFB_2$  نور فلوتورسانس آبی تولید می‌کنند و  $AFG_1$  و  $AFG_2$  در زیر نور اولترا و یوله، نور زرد-سبز تولید می‌نمایند (۵). اکراتوکسین A (OTA)، نیز یک متابولیت ثانویه است که توسط چند گونه از اسپریلیوس و پنی‌سیلیوم تولید می‌شود. این سم، که یک ترکیب نفروتوکسیک و نفروکارسینوژنیک هست، اساساً در غلات و همچنین در ترکیبات دیگر مانند قهوه، میوه‌جات خشک و آب انگور یافت شده است. در انسان تومورها را توسعه می‌دهد و عامل تومورهای اپی‌تلیال در دستگاه ادراری فوقانی در ناحیه بالکان بود (۳). زیرالنون (ZEN)، یک ترکیب غیر استروئیدی است که همراه با دی‌اکسی والنول وجود دارد (۸). زیرالنون به واسطه اثر استروژنیک آن روی حیوانات شناخته شده است. زیرالنون به رسپتورهای استروژنی موثر بر رونویسی وابسته به استروژن در هسته تاثیر می‌گذارد، متصل می‌شود. رسپتورهای باند شده توسط ZEN، از متصل شدن هورمون‌های استروژنیک به آن در بافت‌های مربوط به پستاندارانی مانند موش جلوگیری می‌کند. مطالعات اخیر در سال ۲۰۰۱ توانمندی ZEN برای تحریک رشد سلول‌های سرطانی پستان که شامل رسپتورهای گیرنده استروژن بودند، را نشان داده است (۵). فومانایزین‌ها ( $B_1$  و  $B_2$ )، توسعه‌دهنده تومورها و متابولیت‌های قارچ فوزاریوم هستند که زنجیره بلند هیدروکربنی دارند که در سمیت آنها نقش ایفاء می‌کند. فومانایزین  $B_1$  از همه سمی‌تر است و در موش‌ها تومورها را افزایش دادند. مصرف فومانایزین‌ها مصادف با وقوع سرطان حلقی در قسمت‌های مختلف آفریقا، آمریکای مرکزی و آسیا

نمونه در فاصله زمانی دی ۹۰ - مرداد ۹۱ جمع‌آوری گردید. نمونه‌برداری طبق استاندارد ملی ایران شماره ۲۵۸۱ «روش نمونه‌برداری از محصولات کشاورزی جهت آزمون آفلاتوکسین» انجام شد (۱۳). قابل ذکر است که محموله‌های وارداتی برنج در بسته‌بندی‌های کیسه ۴۰ Kg بودند. نمونه‌های گرفته شده از هر بهر با هم مخلوط شده و در انتها یک نمونه پنج کیلوگرمی جهت آزمون میکوتوکسین‌ها و فلزات سنگین به آزمایشگاه ارسال گردید.

## ۲- آزمون میکوتوکسین‌ها:

۲-۱ آماده‌سازی نمونه: جهت کاهش خطای حاصل از نمونه‌برداری، نمونه‌های برنج توسط آسیاب، به خوبی آسیاب و یکنواخت شدند، به طوری که ذرات آنها از الک با قطر چشمه ۲ mm عبور نماید. سپس در کیسه پلاستیکی یا پارچه‌ای تمیز نگهداری شدند. ۵۰g از نمونه آسیاب شده جهت آزمون میکوتوکسین‌ها طبق استاندارد ملی ایران به شماره ۶۸۷۲ «خوراک انسان - دام، اندازه‌گیری آفلاتوکسین‌های گروه B و G به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و خالص‌سازی با ستون ایمونو افینیتی» (۱۴) و ۹۲۳۸ «غلات و فرآورده‌های آن - اندازه‌گیری اکراتوکسین A به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و خالص‌سازی با ستون ایمونو افینیتی - روش آزمون» (۱۵) و ۹۲۳۹ «غلات و فرآورده‌های آن - اندازه‌گیری زیرالنون به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و خالص‌سازی با ستون ایمونو افینیتی - روش آزمون» (۱۶) و ۱۰۲۱۵ «غلات و فرآورده‌های آن - اندازه‌گیری نیووالنول به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و خالص‌سازی ستون فازجامد-روش آزمون» مورد آزمون قرار گرفت (۱۷).

۲-۲ اساس روش: استخراج سم از نمونه‌ها توسط حلال استخراج انجام شد. عصاره بدست آمده پس از صاف شدن توسط کاغذ صافی، با حجم مشخصی از آب مقطر تا رسیدن به یک غلظت معین رقیق شد و پس از صاف شدن با کاغذ صافی با رشته‌های شیشه (Glass Microfiber Filter)، از ستون ایمونو افینیتی که دارای آنتی بادی‌های اختصاصی است، با سرعت یک قطره در ثانیه عبور داده شد. با عبور عصاره رقیق شده از ستون، آنتی‌ژن موجود در عصاره به آنتی بادی‌های

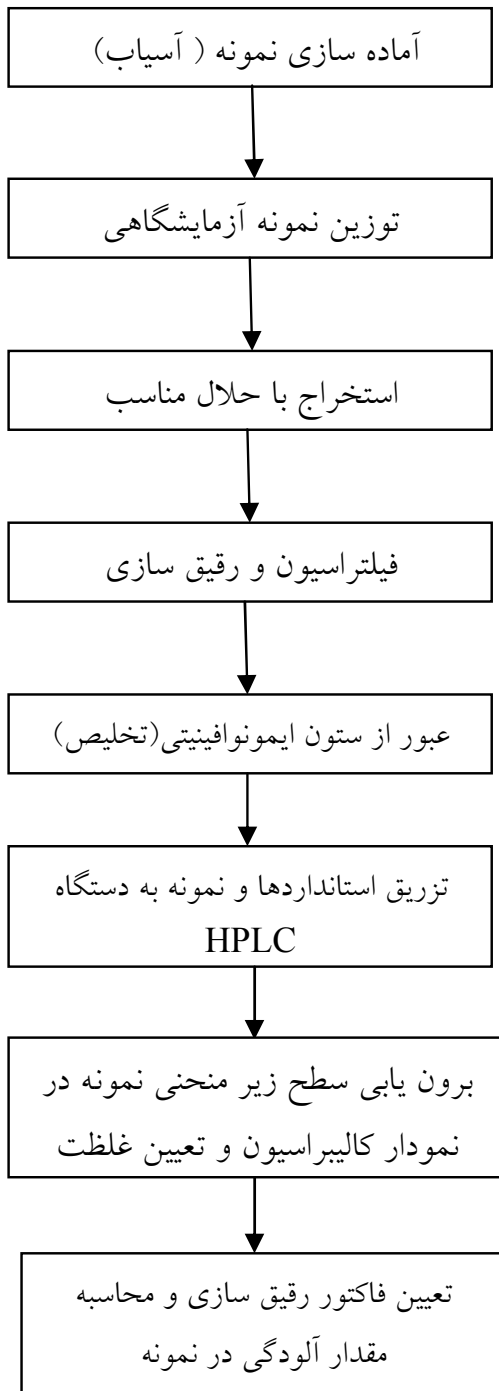
نماید. تقریباً تمام فلزات سنگین در بدن اثرات زیان بار به جا می‌گذارند. بعضی از این عناصر مانند سرب، کادمیوم، نیکل و جیوه حتی در مقادیر ناچیز نیز برای سلامتی انسان سمی و خطرناکند و باعث مشکلات بهداشتی مختلفی مانند تخریب کلیه، مشکلات ریوی، صدمات استخوانی و سرطان و غیره می‌شوند (۹ و ۱۰). آلودگی محصولات کشاورزی به فلزات سنگین، علاوه بر منشا طبیعی، به طور عمده در نتیجه فعالیت‌های انسان (آنتروپوژنیک) از قبیل کشاورزی، استخراج معدن، ساخت و ساز، کودهای شیمیایی، آبیاری با فاضلاب، کاربرد لجن فاضلاب در زمین‌های کشاورزی، کودهای دامی، کاربرد سموم دفع آفات نباتی، فرایندهای صنعتی و از طریق آب، هوا و خاک آلوده است (۱۱ و ۱۲). در تحقیقی که توسط Yap و همکاران (۱۱) در سال ۲۰۰۹ در مالزی انجام شد، متوسط غلظت فلزات سنگین در قسمت‌های مختلف گیاه برنج نشان داد که همه فلزات سنگین مورد مطالعه (شامل کادمیوم، کروم، مس، آهن، منگنز، سرب و روی) در گیاه وجود دارند به جز سرب که فقط در ریشه گیاه آشکار شد. بیشتر فلزات مورد مطالعه در ریشه ذخیره شدند به جز منگنز که بیشترین غلظت را در برگ‌ها داشت. در حالی که کادمیوم به طور یکنواخت در سرتاسر گیاه توزیع شد. به علاوه مس در بالاترین غلظت در ریشه گیاه برنج انباشته شد.

با توجه به مصرف روز افزون برنج‌های وارداتی هندی و پاکستانی در ایران، این تحقیق، با هدف شناسایی آلودگی برنج به میکوتوکسین‌ها شامل آفلاتوکسین G<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>1</sub> و مجموع آفلاتوکسین‌ها و فلزات سنگین شامل سرب، کادمیوم و آرسنیک در برنج‌های وارداتی به استان گلستان به عنوان یکی از گروه‌های غذایی مهم در سبد غذایی خانوار و اهمیت تامین امنیت غذایی انجام شد.

## مواد و روش‌ها

### ۱- نمونه‌برداری:

واردات برنج از مرز اینچه برون در استان گلستان و در بازه زمانی مورد مطالعه، از کشورهای پاکستان و هندوستان انجام گرفت. نمونه‌ها در مبدا ورود محموله به کشور، به تعداد ۸۰



نمودار ۱: مراحل انجام آزمون اندازه گیری میکوتوکسین ها به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و خالص سازی با ستون ایمونو آفینیتی

اختصاصی درون ستون متصل شد. آنتی ژن متصل شده به آنتی بادی در درون ستون توسط عبور متانول از داخل ستون، شسته و در درون ویال جمع آوری و با آب رقیق شد. تزریق، جداسازی، تشخیص و تعیین مقدار با روش فاز معکوس کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا به ترتیب با استفاده از ستون فاز معکوس، مشتق ساز و دکتور فلئورسانس، مقایسه سطح زیر منحنی استاندارد با نمونه مجهول و ضریب رقت میزان آلودگی برحسب نانوگرم بر گرم محاسبه شد. جهت تهیه منحنی های استاندارد کالیبراسیون، قبل از تزریق نمونه ابتدا غلظت های معین از محلول های استاندارد میکوتوکسین مورد اندازه گیری به دستگاه HPLC (از کمپانی واترز، آمریکا، مدل آلیانس ۲۶۹۵) تزریق شد.

### ۳- آزمون فلزات سنگین:

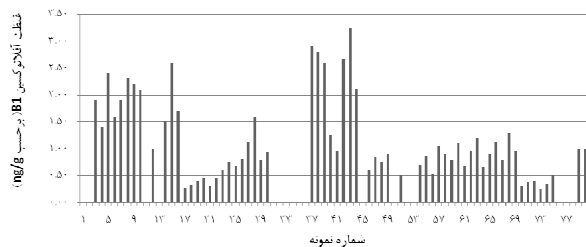
ظروف شیشه ای، قبل از استفاده با محلول اسید نیتریک (۱:۱) و سپس با آب مقطر شستشو شد. ظروف مورد استفاده برای انجام عمل هضم نیز ابتدا با واکنشگرهایی که در فرآیند هضم استفاده می شدند، شستشو و سپس کاملاً با آب مقطر آبکشی گردید. جهت اندازه گیری آرسنیک از روش بیناب سنجی جذب اتمی بر مبنای تولید هیدرید و برای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

اساس کار در روش اول متلاشی شدن مواد آلی در اثر هضم با اسید نیتریک در یک سیستم بسته است، بدین ترتیب که یون آرسنیک پنج ظرفیتی در مجاورت یدید پتاسیم به یون آرسنیک سه ظرفیتی کاهش می یابد. هیدرید آرسنیک توسط سدیم بورو هیدرید و پیش از اتمی شدن در سلول کوارتز گرم شده با شعله تولید می شود. اندازه گیری به روش بیناب سنجی جذب اتمی مجهز به لامپ دوتریوم در طول موج ۱۹۳/۷nm انجام می گیرد. در روش دوم، ابتدا آزمون خشک شده و سپس با افزایش تدریجی دما، در محدوده دمایی  $50 \pm 500^{\circ}\text{C}$  خاکستر می شود. در این مرحله محلول اسید کلریدریک  $6\text{M}$  (۱+۱) اضافه شده و تا حد خشک شدن تبخیر می گردد. باقیمانده در محلول اسید نیتریک ۱/۸M حل شده، و در ادامه تعیین مقدار عناصر به روش بیناب سنجی جذب اتمی، با استفاده از کوره

گرافیتی در طول موج مربوط به هر عنصر انجام می‌شود.

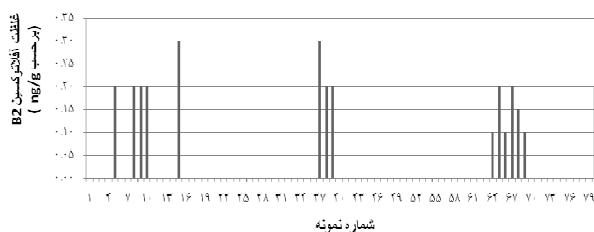
#### یافته‌ها

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

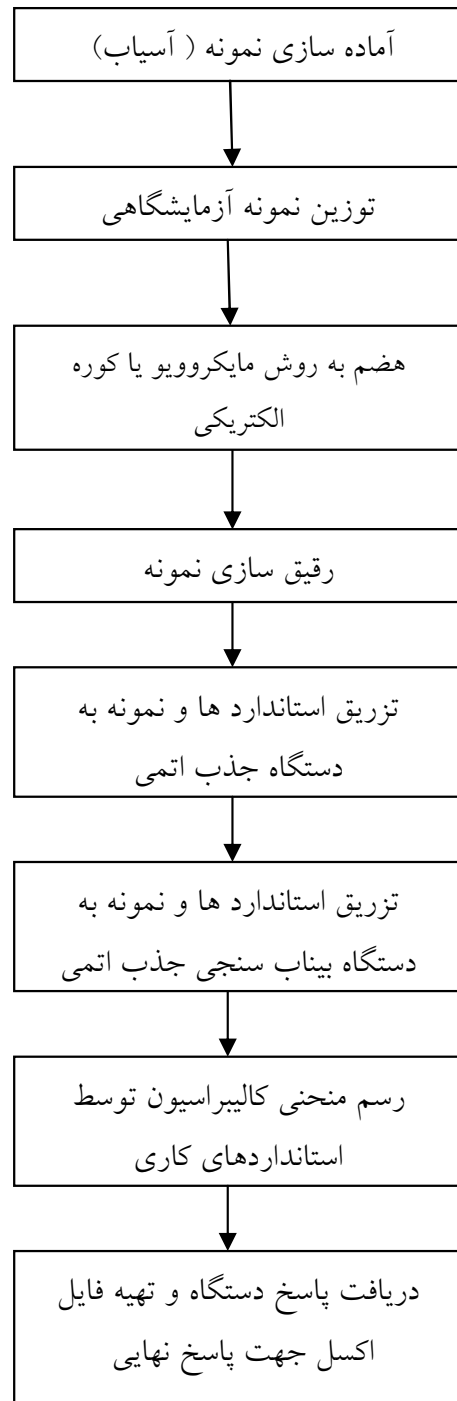


شکل ۱- میزان آفلاتوکسین B1 در نمونه‌های برنج مورد آزمون از دی ۹۰-مرداد ۹۱

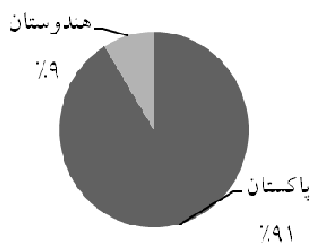
در ۶۵ نمونه مورد آزمون (۸۱/۲۵٪)، AFB2 کمتر از حد تعیین مقدار بود. کمترین مقدار AFB2، ۰/۱ در برنج با شماره‌های ۶۴، ۶۶ و ۶۹ و بیشترین مقدار آن ۰/۳ در برنج با شماره‌های ۱۵ و ۳۷ و میانگین آن در کل نمونه‌ها، ۰/۰۳۶ ng/g بود. آفلاتوکسین‌های G1، G2، زیرانون و داکی نیوالنول در هیچ یک از نمونه‌های مورد آزمون مشاهده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



شکل ۲- میزان آفلاتوکسین B2 در نمونه‌های برنج مورد آزمون از دی ۹۰-مرداد ۹۱

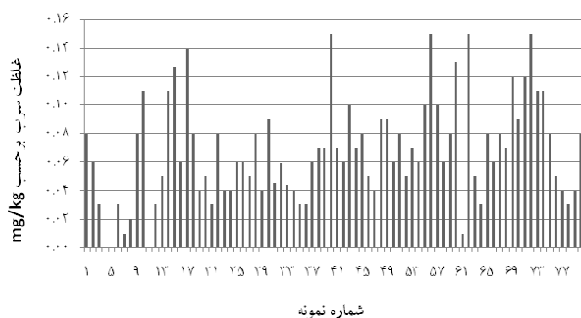


نمودار ۲: مراحل انجام آزمون اندازه‌گیری فلزات سنگین به روش بیناب‌سنجی جذب اتمی با روش هضم کوره الکتریکی

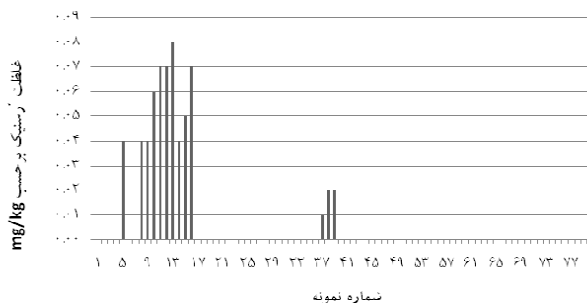


شکل ۵- تفکیک نمونه‌های برنج وارداتی بر اساس مبدأ ورود به کشور در بازه زمانی دی ۹۰-مرداد ۹۱

میزان فلزات سنگین سرب، آرسنیک و کادمیوم در ۸۰ نمونه برنج مورد آنالیز به ترتیب بیشترین مقدار آن ۰/۰۸، ۰/۱۵ و ۰/۰۶ و کمترین مقدار آن برای هر سه ۰/۰۱ و میانگین کل در نمونه‌ها ۰/۰۰۷/۰۰۶۷ mg/kg و ۰/۰۲۴ بود. بر طبق نتایج این بررسی و استاندارد ملی موجود برای بیشینه رواداری فلزات سنگین سرب، آرسنیک و کادمیوم در برنج (۱۹) که به ترتیب برابر ۰/۱۵ mg/kg، ۰/۱۵ و ۰/۰۶ تعیین شده است، کلیه نمونه‌ها در حد مجاز استاندارد بودند (شکل‌های ۸ و ۷).

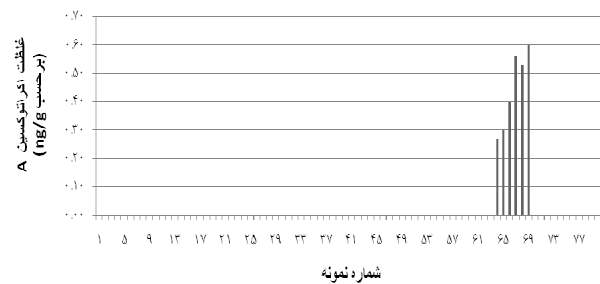


شکل ۶ - میزان سرب در نمونه‌های برنج مورد آزمون از دی ۹۰-مرداد ۹۱



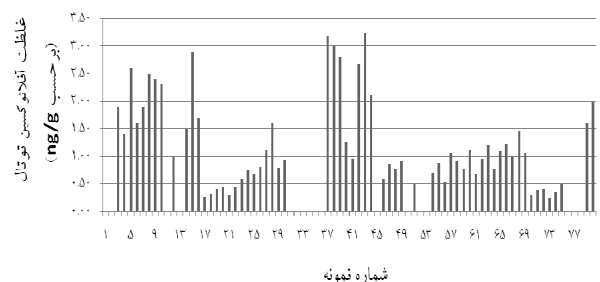
شکل ۷ - میزان آرسنیک در نمونه‌های برنج مورد آزمون از دی ۹۰-مرداد ۹۱

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



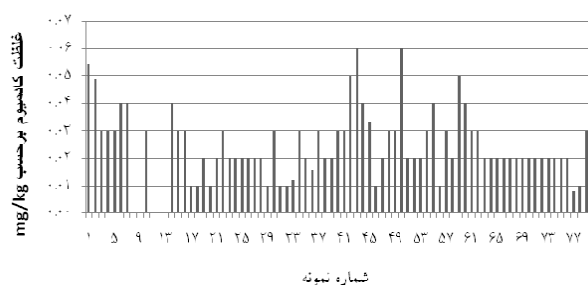
شکل ۳ - میزان اکراتوکسین A در نمونه‌های برنج مورد آزمون از دی ۹۰-مرداد ۹۱

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



شکل ۴ - غلظت مجموع آفلاتوکسین‌ها در نمونه‌های برنج مورد آزمون از دی ۹۰-مرداد ۹۱

از ۸۰ نمونه مورد آزمون، ۷ نمونه برنج از محموله‌های وارداتی از کشور هندوستان و ۷۳ نمونه برنج از محموله‌های وارداتی از کشور پاکستان نمونه‌برداری گردیده بود. بنابراین ۹۰٪ واردات برنج از مبادی ورودی استان گلستان، از کشور پاکستان انجام شده است (شکل ۵).



شکل ۸ - میزان کادمیوم در نمونه‌های برنج مورد آزمون از دی ۹۰ - مرداد ۹۱

## بحث

یافته‌های این مطالعه نشان داد میزان آلودگی برنج به میکوتوکسین‌ها و فلزات سنگین وارد شده از کشورهای پاکستان و هندوستان به استان گلستان جهت مصارف خوراکی بر طبق استاندارد ملی ایران در حد قابل قبول قرار داشتند. بررسی Hadian و همکاران (۲۰) در سال ۱۳۸۶ بر روی میزان شیوع اکراتوکسین A در برنج‌های داخلی و وارداتی فروشگاه‌های زنجیره‌ای شهر تهران، نشان داد که میزان آلودگی به اکراتوکسین A در ۹۷٪ نمونه‌ها، کمتر از حد مجاز تعیین شده در استاندارد ملی ایران بود. سطوح آلودگی به اکراتوکسین A در نمونه‌های برنج وارداتی از برنج‌های داخلی کمتر بود. دامنه تغییرات آلودگی به اکراتوکسین A در انواع برنج وارداتی ۰/۱۵ تا ۰/۱۵۷ و در انواع برنج داخلی ۰/۱۵-۴۶/۷۶  $\mu\text{g}/\text{kg}$  بود.

در تحقیقی که توسط Faraji و همکاران (۲۱) در سال ۱۳۸۹ بر روی آفلاتوکسین‌های برنج مصرفی مشهد در دو فصل تابستان و زمستان و مقایسه آن با برنج‌های وارداتی انجام شد، نشان داد که میزان آفلاتوکسین توتال در ۸/۳٪ از نمونه‌ها بالاتر از حد مجاز استاندارد ملی ایران بود. همچنین برنج‌های ایرانی از نظر میزان آفلاتوکسین در سطح مطلوب‌تری قرار داشتند و میانگین میزان آفلاتوکسین در نمونه‌ها در فصل تابستان بیش از فصل زمستان است که علت آن اثر کاهش دما و رطوبت در فصل زمستان است که مانع از رشد و فعالیت قارچ‌ها می‌شود. میزان آفلاتوکسین‌های G1 و G2 نیز نزدیک به صفر و قابل اغماض بود که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد. مطالعه Park و همکاران (۱) در سال ۲۰۰۵ در کره جنوبی

نشانگر این است که *Aspergillus* و *Penicillium citrinum* candidus گونه‌های غالب در نمونه‌های برنج بودند. اکراتوکسین A، شایع‌ترین میکوتوکسین شناسایی شده، در برخی از نمونه‌ها بالاتر از حد مجاز اتحادیه اروپا (۵ ng/g) بود. در تحقیق دیگری که Salem و همکاران (۲۲) در سال ۲۰۰۸ تا ۲۰۰۹ روی وجود میکوتوکسین‌ها در غذاهایی که بیشترین میزان مصرف را در اردن داشتند انجام شد، وجود اکراتوکسین A در برنج (۳/۴٪) بعد از گندم (۲۹٪) و جو (۵/۱۲٪) و کمتر از بیشینه حد قابل تحمل اکراتوکسین A (۵  $\mu\text{g}/\text{kg}$ ) که توسط کمیسیون اتحادیه اروپا برای دانه‌های خام غلات وضع شده است، قرار داشت. آفلاتوکسین توتال نیز در ۳٪ نمونه‌های آنالیز شده با میانگین ۹/۶۲  $\mu\text{g}/\text{kg}$  در بادام زمینی و برنج مشاهده شد. داکسی نیوالنول و فومونایزین‌ها به ترتیب در ۴٪ و ۲٪ از نمونه‌ها اندازه‌گیری شد، ولی مقدار آنها در حد مجاز کمیسیون اتحادیه اروپا بود.

بررسی Nguyen و همکاران (۲۳) که در سال ۲۰۰۷ در پنج ایالت ویتنام انجام شد، مشخص نمود که AFB1 در ۵۱٪ نمونه‌ها مشاهده شد و مقدار آن در همه ایالت‌ها در فصول بارانی، بیشتر از فصول خشک بود و تا هفت برابر هم می‌رسید. همه نمونه‌ها در حد مجاز مقررات WHO (۳۰ ng/g) بودند، ولی مقایسه نتایج با مقررات کمیسیون اتحادیه اروپا برای AFB1 (۲ ng/g) ۱۰ نمونه بالاتر از حد مجاز بودند. اکراتوکسین A نیز در فصول خشک در دو ایالت Binh Dinh و Phu Yen، به ترتیب بیشینه ۱/۶۳ و ۱/۸۷ ng/g و در فصول بارانی ۰/۳۵ و ۰/۲۹ ng/g بود. در میان نمونه‌های برنجی که هم‌زمان توسط AFB1 و OTA آلوده شده بودند، به ترتیب ۶۹/۲۳٪ و ۶۱/۵۴٪ آنها توسط سیتیرینین نیز آلودگی داشتند که به اثر تشدیدکنندگی و هم افزایی این میکوتوکسین‌ها بر همدیگر اشاره دارد.

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

میانگین وزن بدن فرد بالغ (60 kg) تعیین شده، نتایج کلی نشان‌دهنده میزان آلودگی به فلزات سنگین کمتر از حد مجاز استاندارد بود و خطری برای مصرف از نظر بهداشتی و ایمنی ندارند. از طرفی بررسی انجام شده توسط کمیته اروپایی تهیه مواد غذایی نشان می‌دهد که متوسط مقدار مایکوتوکسین مصرف شده توسط افراد (به خصوص براساس مقدار سم به کیلوگرم وزن بدن) کم است، لیکن نمی‌توان حداکثر مقدار سم خورده شده یا مجموع سموم خورده شده و میزان آن را محاسبه کرد.

به هر حال تعیین یک ارتباط علت و معلولی بین مایکوتوکسین‌ها با بیماری‌های انسان به دلیل بسیاری از مشکلات در مطالعات اپیدمیولوژی انسانی کار بسیار دشواری است. یک صد کشور در دنیا از جمله ایران مرز بیشینه مجاز جهت مایکوتوکسین‌ها در انواع مواد غذایی وضع کردند. جهت به حداقل رساندن آلودگی برنج به انواع مایکوتوکسین‌ها، رعایت یک چرخه کنترل بهداشتی از مزرعه تا میز مصرف‌کننده ضروری است. به خصوص در برنج‌های وارداتی، رعایت شرایط خوب جابه‌جایی و حمل و نقل و رعایت شرایط خوب انبارداری (GSP) نظیر کنترل درجه حرارت انبارهای نگهداری آن در زیر 20 °C و کنترل رطوبت در کاهش میزان آلودگی قارچی در برنج از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. (28)

### نتیجه‌گیری

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

### تشکر و قدردانی

از مساعدت‌های اداره کل استاندارد استان گلستان در انجام این پژوهش، صمیمانه قدردانی و سپاسگزاری می‌گردد.

بررسی Malakootian و همکاران (24) در سال 1390 بر روی فلزات سنگین در برنج‌های هندی وارداتی به ایران، نشان‌گر آن است که کادمیوم در کلیه نمونه‌های برنج کمتر از حد قابل تشخیص بود. میانگین میزان سرب 0/364 mg/kg، کروم 0/653 mg/kg و نیکل 0/019 mg/kg بود.

مطالعه دیگری که توسط Hedayatifar و همکاران (25) در سال 89 روی میزان سرب و کادمیوم برنج‌های طارم و دمسیاه کشت شده در استان لرستان انجام شد، میزان کادمیوم و سرب به ترتیب 0/037±0/06 mg/kg و 0/077±0/08 mg/kg بود. کشورهای جنوب و جنوب شرقی آسیا از جمله شبه جزیره مالزی، ویتنام، هند، تایلند، فیلیپین، اندونزی، بنگلادش و پاکستان توجه زیادی به آلودگی خاک و محصولات کشاورزی توسط فلزات سنگین با توجه به اثرات بالقوه بر سلامت انسان و پایداری درازمدت تولید مواد غذایی در مناطق آلوده داشته‌اند. Jo و همکاران (26) در سال 2004 گزارش کردند که در کره، متوسط غلظت کادمیوم، مس، سرب و روی در لایه سطحی (0-15cm) خاک شالیزارهای برنج به ترتیب 0/11 mg/kg (دامنه تغییرات: 0-1/01)، 4/47 mg/kg (دامنه تغییرات: 0-41/6)، 4/84 mg/kg (دامنه تغییرات: 0-66/4)، 4/47 mg/kg (دامنه تغییرات: 0-96/7) بود. Herawati و همکاران (27) در سال 2006 در ژاپن تخمین زدند سطح متوسط کادمیوم، مس و روی در برنج به ترتیب 75/9، 3/71، 22/9 mg/kg و سطوح متوسط کادمیوم، مس و روی در شالیزارهای برنج به ترتیب 19/446.5 mg/kg و 96/4 بود. چین با مشکلات آلودگی خاک به ویژه آلودگی به فلزات سنگین مواجه است. در سال 2001 برآورد شد که نزدیک به بیست میلیون هکتار خاک زراعی (تقریباً یک پنجم از کل مناطق از زمین‌های کشاورزی) در چین آلوده به فلزات سنگین بود که منجر به کاهش تولید ده میلیون تن مواد غذایی به طور سالانه می‌شود (12).

با توجه به مصرف برنج در سبد غذایی خانوارهای ایرانی به میزان 110g در روز، میزان دریافت قابل تحمل روزانه موقتی فلزات سنگین (PTDI) و میزان دریافت قابل تحمل هفتگی موقتی (PTWI) آنها که توسط کمیته مشترک متخصصان سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد و سازمان بهداشت جهانی در خصوص افزودنی‌های خوراکی (JECFA) برای

## منابع

1. Park JW, Choi S-Y, Hwang H-J, Kim Y-B. Fungal mycoflora and mycotoxins in Korean polished rice destined for humans. *International Journal of Food Microbiology*. 2005;103(3):303-14.
2. Noori K. A study on market distortions and its effects on rice supply, demand and import in Iran. *Journal of Pajouhesh and sazandegi*. 2007;73:17-25(in Persian).
3. Zain ME. Impact of mycotoxins on humans and animals. *Journal of Saudi Chemical Society*. 2011;15(2):129-44.
4. Peraica M, Radić B, Lucić A, Palvović M. Toxic effects of mycotoxins in humans. *Bulletin of the World Health Organization*. 1999;77(9):754-66.
5. Hussein SH, Brasel JM. Toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals-review. *Journal of Toxicology*. 2001;167:131-34.
6. Hussain A, Ali J, Shafqatullah. Studies on contamination level of aflatoxins in Pakistani rice. *Journal of Chemistry Society of Pakistan*. 2011;33:481-84.
7. IARC (International Agency for Research on Cancer), IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans. volume 56. Lyon, France: IARC; 1993.
8. Richard JL. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses-an overview. *International Journal of Food Microbiology*. 2007;119(1-2):3-10.
9. Lin HT, Wong S-S, Li G-Ch. Heavy metal content of rice and shellfish in Taiwan. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2004;12(2):167-74.
10. Zazouli MA, Bandpei AM, Maleki A, Saberian M, Izanloo H. Determination of cadmium and lead contents in black tea and tea liquor from Iran. *Asia Journal of Chemistry*. 2010;22(2):1387-93.
11. Yap DW, Adezrian J, Khairiah J, Ismail BS, Ahmad-Mahir R. The uptake of heavy metals by paddy plants (*Oryza sativa*) in Kota Marudu, Sabah, Malaysia. *American-Eurasian Journal of Agriculture and Environment Science*. 2009;6(1):16-19.
12. Luo Y, Wu I, Liu L, Han C, Li Z. Heavy metal contamination and remediation in Asian agricultural land, key laboratory of soil environment and pollution remediation. China: Chinese Academy of Sciences; 2009.
13. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Analysis sampling of agricultural crops for aflatoxin. ISIRI No. 2581. 2nd ed. Karaj: ISIRI; 1985 (in Persian).
14. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Food and feed stuffs: Determination of aflatoxins B&G by HPLC method using immunoaffinity column clean up-Test method. ISIRI No. 6872. Karaj: ISIRI; 2012 (in Persian).
15. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Foodstuffs- Cereal and cereals Products: Determination of ochratoxin A by HPLC method and immunoaffinity column clean up-Test method. ISIRI No. 9238. Karaj: ISIRI; 2012 (in Persian).
16. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Foodstuffs- Cereal and cereals products: Determination of zearalenon by HPLC method and immunoaffinity column clean up-Test method. ISIRI No. 9239. Karaj: ISIRI; 2012 (in Persian).
17. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Cereal and cereal products: Determination of deoxynivalenole by HPLC method and DONSPE column clean up-Test method. ISIRI No. 10215. Karaj: ISIRI; 2012 (in Persian).
18. Metals and Other Elements at Trace Levels in Foods .AOAC Official Method 986.15.2005.
19. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Food & Feed-Maximum limit of heavy metals. ISIRI No. 12968. Karaj: ISIRI; 2011 (in Persian).
20. Hadian Z, Yazdanpanah H, Azizi MH, Seyedahmadian F, Koshki MR, Hosseini SM, et al. Occurrence of ochratoxin A in rice sold in chain stores in Tehran, 2007. *Iranian Journal of Nutrition Sciences and Food Technology*. 2009;2:53-59 (in Persian).
21. Faraji H, Tabatabai Yazdi F, Kafilzadeh F, Nasiri Mohallati M. Investigation of total aflatoxins in consumed rice at Mashhad city in the summer and winter. *Journal of Food Science and Technology*. 2010;2:11-16 (in Persian).
22. Salem NM, Rafat A. Mycotoxins in food from Jordan: preliminary survey. *Food Control*. 2010;21(8):1099-103.
23. Nguyen MT, Tozlovanu M, Tran TL, Pfohl-Leskowicz A. Occurrence of aflatoxin B1, citrinin and ochratoxin A in rice in five provinces of the central region of Vietnam. *Food Chemistry*. 2007;105(1):42-47.

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

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

Mahdis Mosayebi<sup>1\*</sup>, Habiballah Mirzaee<sup>2</sup>

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

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

Received: 14 January 2013 ; Accepted: 9 April 2013

### **ABSTRACT**

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

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

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

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

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

---

\*Corresponding Author: [mahdis\\_mosayebi@yahoo.com](mailto:mahdis_mosayebi@yahoo.com)

Tel: +98 171 2345623-25, Fax: +98 -----