

تحري الأفلاتوكسينات في أصناف القمح السوري - تحديد الشروط المثلى في تعيين الأفلاتوكسينات الأربعة (B_1 , B_2 , G_1 , G_2) باستخدام الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC)

شريف صادق *

نسرين البيطار **

رواد زهرة ***

(تاريخ الإبداع 9/ 13/ 2021 . قبل للنشر في 16/ 11/ 2021)

□ ملخص □

تناول البحث دراسة عدد من شروط التحليل بهدف التعيين المتزامن للأفلاتوكسينات (B_1 , B_2 , G_1 , G_2) بطريقة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء باستعمال الاشتقاق بالخلية الكيميائية الضوئية ومكشاف الفلورة، وذلك للوصول إلى طريقة انتقائية يمكن اعتمادها في تحليل الأفلاتوكسينات الأربعة وفق تقانة HPLC-FLD. تم تحقيق ذلك باستخدام عمود فصل كروماتوغرافي نوعي من نوع C_{18} وطور متحرك من الماء : الميثانول : الأسيتونتريل بنسب حجمية (15:30:60 V:V:V) على الترتيب، وعند أطوال موجية للمكشاف (طول موجة الإثارة 365nm، طول موجة الإصدار 440nm) ومعدل سرعة تدفق (1 ml/min)، عند درجة حرارة للعمود 40°C حيث تم فصل الأفلاتوكسينات الأربعة بانتقائية وحساسية جيدة وزمن استبقاء مناسب لم يتجاوز 10 دقيقة، حيث كانت الأزمنة وبالترتيب لكل من الأفلاتوكسينات الأربعة G_1 , G_2 , B_1 , B_2 هي 5.977، 6.896، 7.824، 9.054 دقيقة. وبالتالي فإن طريقة HPLC-FLD بوجود خلية الاشتقاق وباستخدام الشروط التي خلصت إليها هذه الدراسة يمكن أن تعتمد وبشكل موثوق في التحاليل النوعية للأفلاتوكسينات الأربعة للتحري عن وجودها في حبوب القمح.

* أستاذ، قسم الهندسة الغذائية، كلية الهندسة الكيميائية والبترولية، جامعة البعث.

** مدرس، قسم الهندسة الغذائية، كلية الهندسة الكيميائية والبترولية، جامعة البعث.

*** طالب دكتوراه، قسم الهندسة الغذائية، كلية الهندسة الكيميائية والبترولية، جامعة البعث.

Investigating Aflatoxins in Syrian Wheat Varieties - Determining the Optimal Conditions for Determining the Four Aflatoxins (B1, B2, G1, G2) Using High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

S. Sadeek^{*}
N. AlBitar^{**}
R. Zahrah^{***}

(Received 13 / 9 / 2021 . Accepted 16 / 11/ 2021)

□ ABSTRACT □

the research has studied number of analysis conditions with the aim of simultaneous identification of aflatoxins (B1, B2, G1, G2) in a manner High-performance liquid chromatography using photochemical cell derivatization and fluorescence detector, in order to reach a selective method that can be adopted in the analysis of the four aflatoxins according to HPLC-FLD technology.

This was achieved by using a C18-type chromatographic column and a water: methanol: acetonitrile mobile phase in volume ratios (15:30:60 V:V:V) respectively, and at detector wavelengths (excitation wavelength 365nm, emission wavelength 440nm).) and a flow rate of (1 ml/min), at a column temperature of 40°C, where the four aflatoxins were separated with selectivity, good sensitivity, and an appropriate retention time that did not exceed 10 minutes, where the times and in order for each of the four aflatoxins G1, G2, B1, B2 were 5.977 minutes, 6.896 minutes, 7.824 minutes, 9.054 minutes.

Therefore, the HPLC-FLD method in the presence of the derivatization cell and using the conditions concluded in this study can be reliably adopted in the qualitative analyzes of the four aflatoxins to investigate their presence in wheat grains.

Keywords: AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, determination, HPLC, RP-HPLC, Photochemical Derivatization, fluorescence detecto

* Professor, Department of Food Engineering, Faculty e of Chemical and Petroleum Engineering, Al-Baath University.

**Teacher, Department of Food Engineering, Faculty of Chemical and Petroleum Engineering, Al-Baath University

***Ph. D. Student, Department of Food Engineering, Faculty of Chemical and Petroleum Engineering, Al-Baath University.

1- المقدمة:

إن السموم الفطرية هي مستقلبات سامة ذات وزن جزيئي منخفض تنتجها أنواع معينة من أجناس العفن مثل الرشاشيات والبنسليوم والفوزاريوم أثناء نموها على الطعام والأعلاف [1] [2].

كما وتنتقل هذه السموم إلى المنتجات الغذائية حيث تلوث 25% من الحبوب المستهلكة في العالم [3]، في مراحل مختلفة من الإنتاج والمعالجة خاصة في ظروف الرطوبة ودرجة الحرارة الملائمة [4]، وقد ثبت أن السموم الفطرية وبخاصة الأفلاتوكسينات تسبب آثاراً صحية ضارة على البشر تعددت بين تليف الكبد أو حتى تلف الكبد الحاد، بالإضافة إلى تحريض الأورام السرطانية والتأثيرات المسخية وكبت المناعة [5] [6].

تعتبر الأفلاتوكسينات من أشهر السموم الفطرية والتي تناولتها الكثير من الأبحاث حول العالم نظراً لخطورتها على الإنسان والحيوان على حد سواء، وهي عبارة عن منتجات أيض ثنائية سامة تنتجها الفطريات والأعفان من نوع (*Aspergillus flavus*) و (*Aspergillus parasiticus*) التي تنمو على مجموعة متنوعة من المنتجات الزراعية والحبوب كالذرة والقمح والفاصوليا السوداني والسمسم وغيرها [7] [8]، ومن بين 18 نوعاً مختلفاً من الأفلاتوكسينات المعروفة عالمياً فإن الأنواع الرئيسية هي وبحسب ترتيب السمية $AFB1 < AFG1 < AFB1 < AFG1$ [9] [10].

حيث يعد الأفلاتوكسين (*AFB1*) أخطر الأفلاتوكسينات ومن أهم مسببات سرطان الكبد المعروفة في الثدييات [11] [12]، وتصنفه الوكالة الدولية لأبحاث السرطان (*IARC*) كمسرطن من المجموعة الأولى [13].

وعلى الرغم من تعدد الطرق النوعية في كشف وفصل الأفلاتوكسينات، إلا تقنية الكروماتوغرافيا السائلة العالية الأداء (*hplc*) والتي تعتمد مبدأ التفريق اللوني بوجود كاشف الفلورة (*fluorescence detector*) تبقى من أفضل الطرق المستخدمة في الكشف وفصل الأفلاتوكسينات نظراً لحساسيتها العالية ودقتها وسهولة استخدامها [14].

فقد اعتمد Jose وآخرون عام 2016 في الشروط التالية عمود نوع C_{18} وطور متحرك من الماء : الميثانول : الأسيتونتريل بنسب حجمية (15:20:65 V:V:V) على الترتيب، وعند الاطوال الموجية 360-440 في تحري الأفلاتوكسينات في الفول السوداني [15].

في حين اعتمد Felipe وشركاه عام 2014 شروط مختلفة وفق التالي: عمود نوع C_{18} وطور متحرك من الماء : الميثانول : الأسيتونتريل بنسب حجمية (20:10:70 V:V:V) على الترتيب، وعند الاطوال الموجية 365-450 بعد دراسة عدد من الشروط التحليلية للوصول الى شروط مثالية تناسب بحثهم [16].

كذلك استخدم كل من Ahmed and Key and Coralia عام 2018 عمود نوع C_{18} وطور متحرك من الماء : الميثانول : الأسيتونتريل بنسب حجمية (10:25:65 V:V:V) على الترتيب، وعند الاطوال الموجية 360-450 في تحري الأفلاتوكسينات في عينات الارز. [17].

وقد استخدم عدد من الباحثين المصريين عام 2015 في بحثهم عن السموم الفطرية في اللحوم عمود نوع C_{18} وطور متحرك من الماء : الميثانول : الأسيتونتريل بنسب حجمية (20:20:60 V:V:V) على الترتيب، وعند الاطوال الموجية 360-440 [18].

ونظراً للأهمية الاستراتيجية لمحصول القمح في سوريا والدور الرئيسي لمنتجاته للإنسان والحيوان على حد سواء، كان من الضروري البحث عن اسباب التلوث الناجم عن الاصابات الفطرية والتحري عن وجود السموم الناتجة عنها وبشكل خاص الافلاتوكسينات لما لها من أثر صحي بالغ الأهمية.

2- هدف البحث:

يهدف البحث إلى دراسة عدد من شروط التحليل المستخدمة وفق تقنية الكروماتوغرافيا عالية الاداء (HPLC) مع اشتقاق بالخلية الكيميائية الضوئية ومكشاف الفلورة، وذلك للوصول إلى طريقة انتقائية سريعة التطبيق ووجير مكلفة وتتمتع بالدقة والحساسية العالية، ويمكن اعتمادها في الفصل المتزامن للأفلاتوكسينات الاربعة وفق تقانة HPLC-FLD بما يضمن الفائدة للدراسات اللاحقة التي تعتمد تقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الاداء في تحري وفصل الأفلاتوكسينات ويساهم عملياً باستخدام طريقة مجرية وذات موثوقية، وتعتمد هذه الدراسة على أهمية القمح ومنتجاته في حياتنا اليومية كون الجرعة اليومية لاستهلاك القمح ومنتجاته عالية مما ينطوي على خطورة كبيرة في حال وقوع اصابة فطرية وبالتالي تلوث بالأفلاتوكسينات.

3- مواد وطرائق البحث (Materials and methods):**3-1- المواد والمحاليل المستعملة (Materials and Solvents):**

- تتمتع المركبات والمحاليل المستخدمة جميعها بدرجة عالية من النقاوة (HPLC-grade):
- 1) مزيج عياري للأفلاتوكسينات بنقاوة عالية $\leq 99.0\%$ ، إنتاج شركة (SUPELCO).
 - 2) ميثانول (Methanol, CH₃OH) $\leq 99.9\%$ ، إنتاج شركة (Lichrosolv-Germany).
 - 3) أسيتونتريل (Acetonitrile, CH₃CN) $\leq 99.9\%$ ، إنتاج شركة (Lichrosolv-Germany).
 - 4) ماء ثنائي التقطير منزوع الشوارد (de-ionized)، بالإضافة إلى دوارق ومصاصات زجاجية عيارية بحجوم مختلفة.

3-2- الأجهزة والأدوات المستعملة (Apparatus and Tools):

- 1) جهاز الكروماتوغرافيا السائلة عالية الاداء (HPLC (SHIMADZU).
- 2) حمام مائي يعمل بالأموح فوق الصوتية (Ultrasonic bath) ماركة Grant.
- 3) خلية الاشتقاق الكيميائية الضوئية Photochemical Derivatization ماركة LCtech.

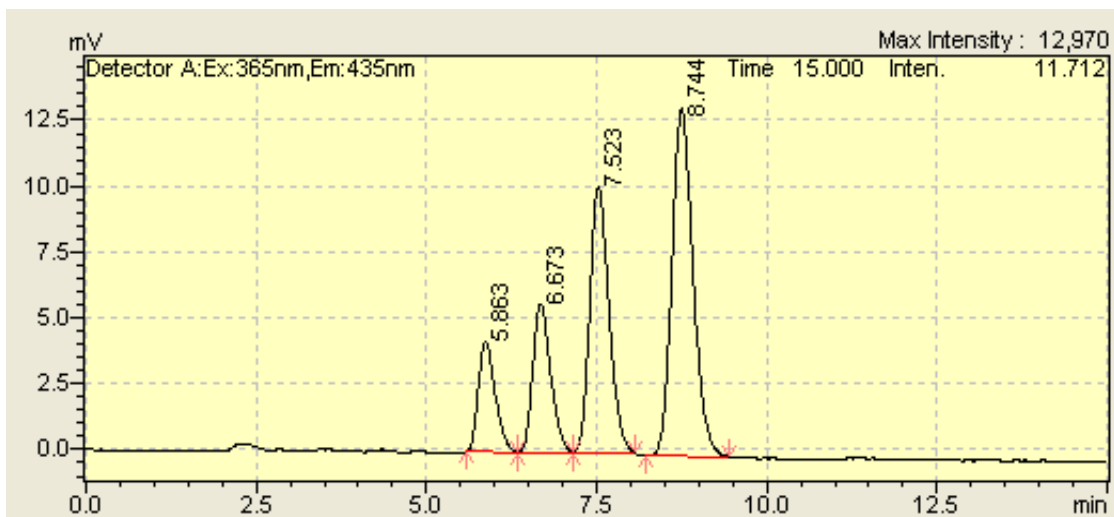
4- النتائج والمناقشة (Results and Discussion):**4-1- النسبة المثلى لمذيبات الطور المتحرك****(The Optimal Ratio for Mobile Phase Solvents):**

تم في هذه الدراسة الاعتماد على طور متحرك مكوّن من الماء والميثانول والأسيتونتريل بنسب مختلفة حيث لوحظ تباين واضح في متوسط زمن الاحتفاظ ومتوسط مساحة القمم الكروماتوغرافية لمركبات الأفلاتوكسينات ، إذ تؤثر نسب المذيبات على الفصل الجيد وزمن الاحتفاظ ومساحة القمة العائدة لكل من مركبات الأفلاتوكسينات، فقد كان الفصل غير جيد عند استخدام نسب مزج الماء:الميثانول:الأسيتونتريل (V:V:V) (30:15:55) على الترتيب [19]، بينما ظهرت قمم واضحة الى حد ما وفصل جيد نسبياً عند استخدام نسب مزج (الماء: الميثانول: الأسيتونتريل) (V:V:V) (10:40:50) على الترتيب [20]، ولكن وعند استخدام طور متحرك وفق النسب الآتية (الماء : الميثانول : الأسيتونتريل) (V:V:V) (15:30:60) على الترتيب [21]، كان متوسط أزمنا الاحتفاظ جيدة ومتوسط مساحات قمم أفضل بالمقارنة مع النسب السابقة كما هو موضح في الجدول رقم (1) والشكل رقم (1).

الجدول رقم (1): تأثير نسب مكونات الطور المتحرك في متوسط مساحات قيم مركبات الأفلاتوكسينات (G₂, G₁, B₂, B₁) على الترتيب ومتوسط زمن احتفاظها.

| الطور المتحرك (Mobile phase) (V:V:V) % | Wa.: Me-OH: ACN (50 :15 :30 V:V:V) | | Wa.: Me-OH: ACN (50 :40 :10 V:V:V) | | Wa.: Me-OH: CAN (60 :30 :15 V:V:V) | |
|---|---------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|---------------------------------------|-----------------------------------|
| | متوسط مساحة القمة Area ± RSD %* | متوسط زمن الاحتفاظ Rt ± RSD %* | متوسط مساحة القمة Area ± RSD %* | متوسط زمن الاحتفاظ Rt ± RSD %* | متوسط مساحة القمة Area ± RSD %* | متوسط زمن الاحتفاظ Rt ± RSD %* |
| الأفلاتوكسينات Aflatoxins | | | | | | |
| AFG ₂ (1.60 µg/l) | 143500±1.18 | 4.892 ±1.31 | 95812±0.98 | 5.108 ±1.21 | 146310 ±0.89 | 5.862 ±1.12 |
| AFG ₂ (3.20 µg/l) | 284900±1.41 | 4.901 ±0.89 | 181051±1.08 | 5.103 ±0.95 | 291101 ±0.94 | 5.870 ±0.99 |
| AFG ₁ (5.30 µg/l) | 111534 ±1.41 | 5.409 ±0.91 | 164187 ±0.85 | 5.631 ±1.22 | 207192 ±1.14 | 6.674 ±1.13 |
| AFG ₁ (10.60 µg/l) | 221.984 ±1.50 | 5.410 ±0.94 | 328088 ±1.08 | 5.621 ±0.87 | 414098 ±0.56 | 6.676 ±1.01 |
| AFB ₂ (1.65 µg/l) | 262460 ±0.46 | 5.910 ±0.44 | 311454 ±0.38 | 6.370 ±0.86 | 397363 ±1.11 | 7.524±0.95 |
| AFB ₂ (3.30 µg/l) | 523170 ±0.64 | 5.920 ±0.50 | 622090 ±0.95 | 60374 ±1.05 | 787150 ±0.93 | 7.498±1.02 |
| AFB ₁ (5.35 µg/l) | 395528±1.21 | 6.477±0.89 | 503116±1.45 | 7.172±1.22 | 571191±1.08 | 8.750±0.88 |
| AFB ₁ (10.70 µg/l) | 790985±1.08 | 6.478±1.05 | 1007120±1.11 | 7.175±1.19 | 1147716±2.05 | 8.748±0.92 |
| T:40°C, Column (C ₁₈), λ _{ex} = 365nm, λ _{em} = 440nm, Flow Rate: 1ml/min, Water: Methanol: Acetonitrile 60:30:15 | | | | | | |

*n=3 تكرارية حقن المحلول العياري العائد لمركبات الأفلاتوكسينات (G₂, G₁, B₂, B₁).



الشكل (1): كروماتوغرام يبين فصل مركبات الأفلاتوكسينات (B_1 , B_2 , G_1 , G_2) عند نسب الطور المتحرك $H_2O:CH_3OH:CH_3CN$ (60:30:15 V:V:V)

4-2- سرعة التدفق المثلى للطور المتحرك

(The Optimal Flow Rate for Mobile Phase)

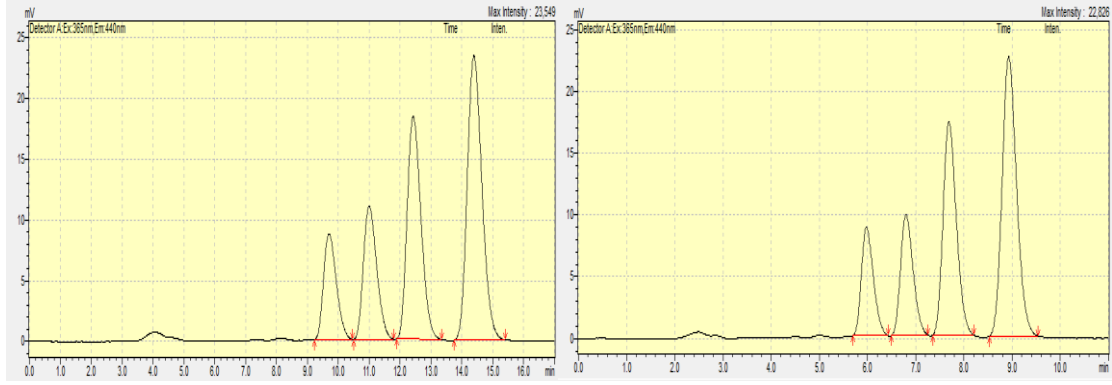
بتجريب سرعات تدفق مختلفة للطور المتحرك (0.6-1.0-1.2 ml/min) تم في هذه المرحلة حقن محلولين عياريين لمزيج الأفلاتوكسينات وفق التراكيز المبينة في الجدول (2)، أظهرت النتائج أنه عند سرعة تدفق (1.0 ml/min) كان متوسط مساحات القمم أفضل بالإضافة إلى الفصل الجيد للقمم الأربعة العائدة لمركبات الأفلاتوكسينات لذلك اختير التدفق (1 ml/min) المقابل للمساحة الأكبر للقمم الكروماتوغرافية، حيث أثرت زيادة تدفق الطور المتحرك في عمود الفصل سلباً على مساحات القمم عند تدفق (1.2 ml/min). وعند تدفق (0.6 ml/min) كان الفصل جيداً ولكن أزمناً الاحتفاظ كانت طويلة، كذلك كان الفصل جيداً عند التدفق (0.8 ml/min) مع تأخر زمني بسيط في أزمناً الاستبقاء لكل من الأفلاتوكسينات، لذلك من الممكن استخدام سرعة التدفق (0.8 ml/min) ولكن بعد استهلاك عمود الفصل الكروماتوغرافي لفترة من الزمن لتحسين الفصل بين القمم. لُوحظ من خلال مساحات الكروماتوغرامات الموضحة في الشكل (2)، الانزياح الواضح للقمم الكروماتوغرافية لمركبات الأفلاتوكسينات نتيجة التأثير بتغيرات الضغط الناجم عن تغير التدفق وهذا يعني ازدياد زمن الاحتفاظ بنقصان التدفق المطبق (0.6 ml/min). كما لُوحظ تناقص المساحة الكروماتوغرافية وزمن الاحتفاظ بازدياد تدفق الطور المتحرك المطبق خلال العمود (1 ml/min).

جدول (2): تأثير سرعة تدفق الطور المتحرك في متوسط مساحات قمم مركبات الأفلاتوكسينات (G₂, G₁, B₂, B₁) على الترتيب ومتوسط زمن احتفاظها.

| سرعة التدفق | 0.6 (ml/min) | | 0.8 (ml/min) | | 1.0 (ml/min) | | 1.2 (ml/min) | |
|----------------------------------|--|---|--|---|--|---|--|---|
| | متوسط مساحة القمة Area ± RSD % [*] | متوسط زمن الاحتفاظ (min.) Rt ± RSD % [*] | متوسط مساحة القمة Area ± RSD % [*] | متوسط زمن الاحتفاظ (min.) Rt ± RSD % [*] | متوسط مساحة القمة Area ± RSD % [*] | متوسط زمن الاحتفاظ (min.) Rt ± RSD % [*] | متوسط مساحة القمة Area ± RSD % [*] | متوسط زمن الاحتفاظ (min.) Rt ± RSD % [*] |
| الأفلاتوكسينات Aflatoxins | | | | | | | | |
| AFG ₂ (0.80 µg/l) | 210802±1.21 | 10.645±0.84 | 160128±1.46 | 8.126±1.65 | 131147±1.29 | 5.593±0.87 | 111335±2.04 | 5.093±0.87 |
| AFG ₂ (1.60 µg/l) | 421607±0.78 | 10.649±0.92 | 320240±1.22 | 8.124±0.79 | 262290±1.08 | 5.590±0.99 | 222670±1.57 | 5.090±0.99 |
| AFG ₁ (2.65 µg/l) | 325490±1.25 | 12.319±1.55 | 231339±1.61 | 9.407±0.66 | 179166±0.79 | 6.492±0.59 | 141145±1.71 | 6.092±0.59 |
| AFG ₁ (5.30 µg/l) | 651050±1.21 | 12.318±1.09 | 462780±1.31 | 9.404±1.372 | 359250±1.25 | 6.490±0.88 | 282199±1.50 | 6.090±0.88 |
| AFB ₂ (0.825 µg/l) | 559290±1.05 | 14.015±0.39 | 413490±1.24 | 10.720±0.86 | 339799±0.79 | 7.415±1.29 | 277344±1.52 | 7.015±1.29 |
| AFB ₂ (1.65 µg/l) | 1118580±1.51 | 14.015±0.84 | 826983±1.19 | 10.719±0.82 | 679715±1.08 | 7.414±1.31 | 554678±1.42 | 7.024±1.31 |
| AFB ₁ (2.675 µg/l) | 795531±2.10 | 16.585±1.32 | 608120±1.54 | 12.697±1.02 | 502752±1.28 | 8.787±0.88 | 375485±1.10 | 8.287±0.88 |
| AFB ₁ (5.35 µg/l) | 1584451±1.94 | 16.579±1.24 | 1216128±0.96 | 12.695±1.04 | 1004802±1.12 | 8.790±0.94 | 750781±1.09 | 8.310±0.94 |

T:40°C, Column (C₁₈), λ_{ex} = 365nm, λ_{em} = 440nm, Flow Rate: 1ml/min, Water: Methanol: Acetonitrile 60:30:15

*n=3: تكرارية حقن المحلول العياري لمركبات الأفلاتوكسينات (G₂, G₁, B₂, B₁).



(b)

(a)

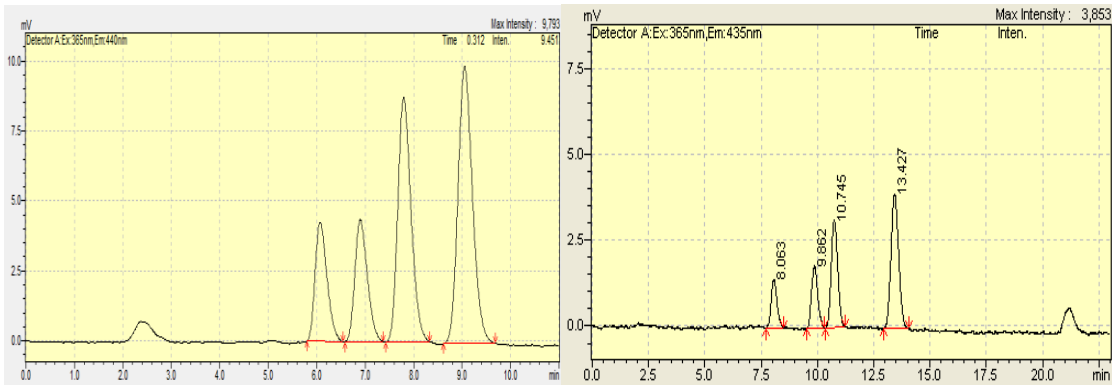
الشكل (2): كروماتوغرام فصل الأفلاتوكسينات (B_1 , B_2 , G_1 , G_2)

(a): عند التدفق 1 ml/min ، (b) عند التدفق 0.6 ml/min

3-4- درجة الحرارة المثلى لفرن عمود الفصل الكروماتوغرافي:

(Optimal Temperature for Chromatographic Separation Column Oven)

عند دراسة تأثير درجة حرارة فرن العمود في كل من متوسط أزمدة الاحتفاظ ومساحات قمم مركبات الأفلاتوكسينات، تم تغيير درجة حرارة فرن العمود الكروماتوغرافي C_{18} بدءاً من درجة حرارة الغرفة ($25^\circ C$) إلى الدرجة ($40^\circ C$) مروراً بالدرجة ($30^\circ C$)، وقد تبين أنه عند الدرجة ($40^\circ C$) كانت مساحات القمم العائدة لمركبات الأفلاتوكسينات أفضل مقارنة بمساحاتها عند درجات الحرارة (30 , 25) $^\circ C$ كما أن الفصل كان جيداً مع عدم وجود تداخل بالقمم وكذلك كان زمن الاحتفاظ أقل منه عند درجتي الحرارة (30 , 25) $^\circ C$ كما في الجدول رقم (3) والشكل رقم (3):

b: $25^\circ C$ a: $40^\circ C$ الشكل (3): تأثير درجة حرارة فرن العمود في متوسط مساحات قمم مركبات الأفلاتوكسينات (B_1 , B_2 , G_1 , G_2) ومتوسط أزمدة الاحتفاظ.

جدول رقم (٣): تأثير درجة حرارة فرن العمود في مساحات قيم مركبات الأفلاتوكسينات (B1,B2,G1,G2) على الترتيب وعلى زمن احتفاظها.

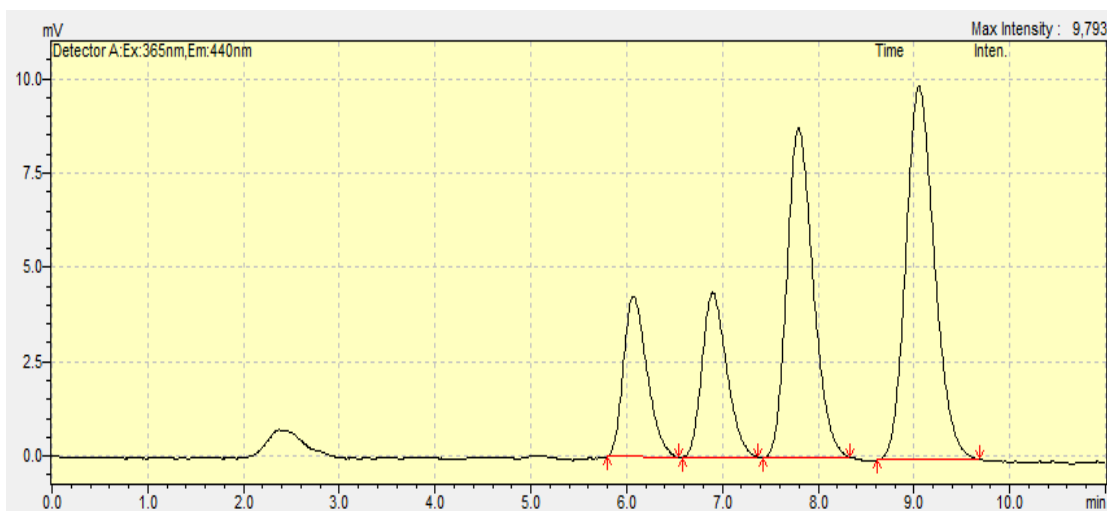
| درجة حرارة فرن العمود T (°C) | 25 °C | | 30 °C | | 40 °C | |
|---|---|--|---|--|---|--|
| | متوسط مساحة القيمة $\overline{\text{Area}} \pm \text{RSD} \%^*$ | متوسط زمن الاحتفاظ (min.) $\overline{\text{Rt}} \pm \text{RSD} \%^*$ | متوسط مساحة القيمة $\overline{\text{Area}} \pm \text{RSD} \%^*$ | متوسط زمن الاحتفاظ (min.) $\overline{\text{Rt}} \pm \text{RSD} \%^*$ | متوسط مساحة القيمة $\overline{\text{Area}} \pm \text{RSD} \%^*$ | متوسط زمن الاحتفاظ (min.) $\overline{\text{Rt}} \pm \text{RSD} \%^*$ |
| الأفلاتوكسينات Aflatoxin | | | | | | |
| AFG ₂ (0.80 µg/l) | 135364±1.08 | 8.162±0.89 | 133250±1.52 | 7.572±1.18 | 132240±1.17 | 5.593±0.87 |
| AFG ₂ (1.60 µg/l) | 2704725±1.36 | 8.164±0.96 | 266550±1.09 | 7.575±2.01 | 264478±1.22 | 5.590±0.99 |
| AFG ₁ (2.65 µg/l) | 184711±1.68 | 9.797±1.08 | 18219±1.59 | 9.005±1.20 | 181430±0.28 | 6.492±0.59 |
| AFG ₁ (5.30 µg/l) | 368428±1.29 | 9.796±0.55 | 364829±0.49 | 9.004±1.30 | 362750±0.81 | 6.490±0.88 |
| AFB ₂ (0.825 µg/l) | 341518±2.11 | 11.269±1.04 | 331977±1.28 | 10.348±0.46 | 338196±0.72 | 7.415±1.29 |
| AFB ₂ (1.65 µg/l) | 682990±1.29 | 11.270±1.15 | 663085±0.87 | 10.347±1.20 | 676380±1.26 | 7.414±1.31 |
| AFB ₁ (2.675 µg/l) | 490781±0.77 | 13.825±1.51 | 476011±1.52 | 12.567±1.49 | 483085±0.51 | 8.787±0.88 |
| AFB ₁ (5.35 µg/l) | 981382±0.86 | 13.823±1.54 | 952028±1.43 | 12.570±1.57 | 966158±1.26 | 8.790±0.94 |
| Flow Rate: 1ml/min, Column (C ₁₈), λ _{ex} =365nm, λ _{em} =435nm, Mobile Phase: (Water: Methanol: Acetonitrile– 60:30:15 V: V:V) | | | | | | |

*n=3: تكرارية حقن المحلول المعياري للمركبات الأفلاتوكسينات (B₁, B₂, G₁, G₂).

4-4- الأطوال الموجية لمكشاف الفلورة FLD: طول موجة الإثارة وطول موجة الإصدار المثلى: Optimal

Excitation and Emission Wavelengths

طُبقت من أجل تحديد الأطوال الموجية لمكشاف الفلورة من ناحية سرعة تدفق الطور المتحرك في عمود الفصل الكروماتوغرافي C₁₈ (1 ml/min) ودرجة حرارة فرن العمود (40°C) ونسب مزج مذيبات الطور المتحرك H₂O:CH₃OH:CH₃CN (60:30:15 V:V:V) على الترتيب. وقد لوحظ اختلاف في استجابة المكشاف لمركبات الأفلاتوكسينات عند الأطوال الموجية المختارة والمبينة في الجدول رقم (4)، حيث اختلفت مساحات قمم مركبات الأفلاتوكسين باختلاف الأطوال الموجية لمكشاف الفلورة وتبين أن أفضل مساحات للقمم كانت عند الأطوال الموجية $\lambda_{ex}= 365 \text{ nm}$, $\lambda_{em}=440 \text{ nm}$ للتعيين المتزامن للأفلاتوكسينات وذلك من حيث المساحات وخاصة بالنسبة للأفلاتوكسين B1 وكذلك من حيث جودة الفصل، بالإضافة إلى الزمن الأمثل كما هو واضح في الجدول (4) والشكل رقم (4).



الشكل (4): كروماتوغرام مركبات الأفلاتوكسينات (B₁, B₂, G₁, G₂) المفصولة عند الأطوال الموجية $\lambda_{ex}= 365 \text{ nm}$, $\lambda_{em}= 440 \text{ nm}$

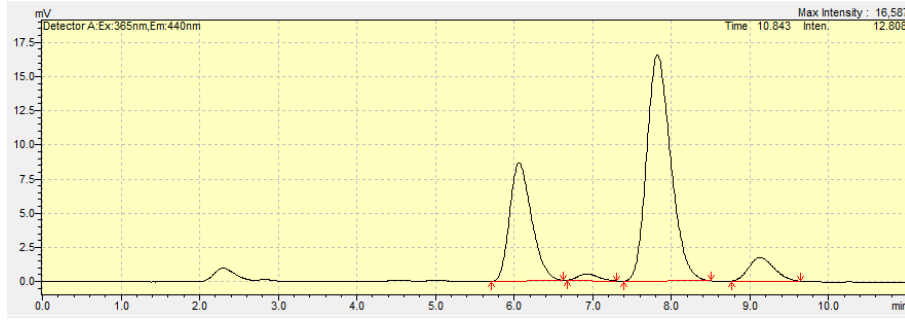
جدول رقم (4): تأثير الأطوال الموجية المختارة على متوسط مساحة كل من مركبات الأفلاتوكسينات (B₁, B₂, G₁, G₂).

| طول موجة الإثارة وطول موجة الإصدار $\lambda_{ex}, \lambda_{em}$ (nm) | (360 – 425) nm | (365 – 440) nm | (365 – 400) nm | (365 – 435) nm | (365 – 450) nm |
|--|--|--|--|--|--|
| الأفلاتوكسينات Aflatoxins | متوسط مساحة القمة Area \pm RSD %* | متوسط مساحة القمة Area \pm RSD %* | متوسط مساحة القمة Area \pm RSD %* | متوسط مساحة القمة Area \pm RSD %* | متوسط مساحة القمة Area \pm RSD %* |
| AFG ₂ (0.80 μ g/l) | 84004 \pm 1.15 | 151937 \pm 0.99 | 5772 \pm 2.55 | 136144 \pm 2.04 | 183813 \pm 1.29 |
| AFG ₂ (1.60 μ g/l) | 166890 \pm 2.50 | 302090 \pm 1.08 | 11487 \pm 1.22 | 271085 \pm 1.54 | 365550 \pm 1.30 |
| AFG ₁ (2.65 μ g/l) | 115833 \pm 1.01 | 190026 \pm 1.44 | 14134 \pm 1.28 | 153074 \pm 1.90 | 257720 \pm 2.04 |
| AFG ₁ (5.30 μ g/l) | 130145 \pm 2.11 | 381897 \pm 1.38 | 28003 \pm 0.88 | 306011 \pm 1.27 | 504195 \pm 1.88 |
| AFB ₂ (0.825 μ g/l) | 333147 \pm 1.59 | 366425 \pm 2.08 | 110904 \pm 1.81 | 386662 \pm 1.06 | 308410 \pm 1.79 |
| AFB ₂ (1.65 μ g/l) | 359959 \pm 2.21 | 733001 \pm 1.69 | 220825 \pm 2.02 | 771591 \pm 0.79 | 6158001.81 |
| AFB ₁ (2.675 μ g/l) | 478546 \pm 0.89 | 552875 \pm 0.88 | 169916 \pm 1.74 | 552393 \pm 1.15 | 473922 \pm 1.44 |
| AFB ₁ (5.35 μ g/l) | 940076 \pm 1.31 | 1106859 \pm 1.07 | 340011 \pm 1.60 | 1104920 \pm 1.11 | 946150 \pm 2.0 |

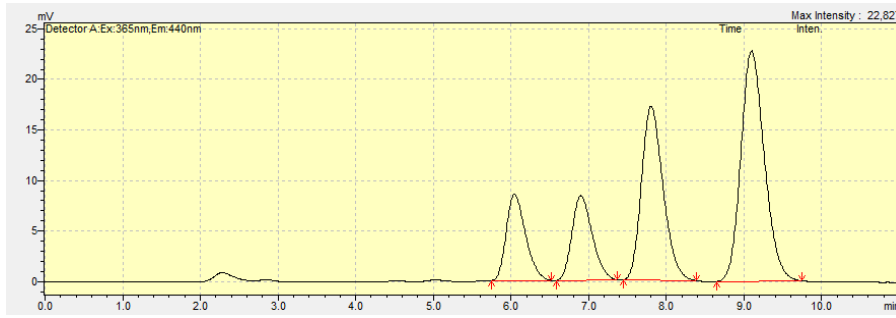
* تكرارية حقن المحلول المعياري للعائد لمركبات الأفلاتوكسينات (B₁, B₂, G₁, G₂). n=3*

4-5- طريقة الاشتقاق (Derivation method):

تمّ استخدام الاشتقاق بالخلية الكيميائية الضوئية حيث توضع بين عمود الفصل الكروماتوغرافي ومكشاف FLD، ومن ثمّ حقن مزيج عياري بتركيز (6.95 µg/l) مع الاشتقاق وبدون اشتقاق، نلاحظ ظهور قمم مركبي B1 و G1 ولكن بشكل ضئيل، وذلك نظراً لضعف الفلورة في كل منهما فكان لا بد من استخدام تقنية الاشتقاق لملائمتها لكاشف الفلورة بحسب ما هو واضح بالشكل رقم (5).



a: بدون خلية الاشتقاق الكيميائية الضوئية



b: مع خلية الاشتقاق الكيميائية الضوئية

الشكل رقم (5): كروماتوغرامات فصل الأفلاتوكسينات (B₁, B₂, G₁, G₂) باستخدام أو عدم استعمال خلية الاشتقاق الكيميائية الضوئية.

4-6- تكرارية فصل والتعيين المتزامن للأفلاتوكسينات (B₁, B₂, G₁, G₂) باستخدام عمود الفصل

الكروماتوغرافي C18 وفق تقانة HPLC-FLD:

تمّ حقن محلول عياري لمزيج الأفلاتوكسينات بتركيز (6.95 µg/l) بتطبيق الشروط المثلى التي تمّ التوصل إليها وفق وبتكرارية قدرها عشر مكررات، حيث يوضح الجدول (5) تكرارية فصل مركبات الأفلاتوكسين (B₁, B₂, G₁, G₂) وفق الشروط التحليلية المثلى التي تمّ التوصل إليها، إذ سجل متوسط زمن الاحتفاظ لمركبات الأفلاتوكسينات (B₁ Rt(B₁)=9.054 min, B₂ Rt(B₂)=7.824 min, G₁ Rt(G₁)=6.861 min, G₂ Rt(G₂)=5.977 min) بإنحراف معياري نسبي مؤني % (0.673, 1.010, 0.812, 0.994) على التوالي، في حين سجل متوسط مساحات القمم ومتوسط ارتفاعها ومتوسط عرضها بحسب ما هو وارد في الجدول رقم (5) بإنحراف معياري نسبي مؤني لا يتجاوز 2%.

جدول رقم (5): تكرارية فصل والتعيين المتزامن لمركبات الأفلاتوكسينات (G₂, G₁, B₂, B₁) بتراكيز 1.60, 5.30, 1.65, 5.35 µg/l على الترتيب باستخدام عمود الفصل الكروماتوغرافي C₁₈ وفق تقنية HPLC-FLD باعتماد الشروط المثلى.

| Peak Aflatoxins | Mean ± RSD% | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|------------------------------|-------------|----------------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| AFL G ₂ 1.60 µg/l | Rt(min) | 6.097 | 5.979 | 5.980 | 5.958 | 6.022 | 5.899 | 6.012 | 5.971 | 5.968 | 5.977 |
| | Area | 151937 | 151877 | 152100 | 151949 | 151987 | 151943 | 151970 | 151980 | 151884 | 152088 |
| | Height | 8435 | 8420 | 8500 | 8432 | 8452 | 8485 | 8437 | 8431 | 8425 | 8499 |
| | Width | 0.4788 ± 1.793 | 0.471 | 0.491 | 0.467 | 0.478 | 0.472 | 0.469 | 0.486 | 0.483 | 0.488 |
| AFL G ₁ 5.30 µg/l | Rt(min) | 6.885 | 6.891 | 6.930 | 6.944 | 6.778 | 6.844 | 6.982 | 6.869 | 6.890 | 6.903 |
| | Area | 214356 | 219350 | 220162 | 217369 | 220270 | 218555 | 216371 | 219366 | 215879 | 214963 |
| | Height | 11119 | 11558 | 11683 | 11349 | 11724 | 11508 | 11234 | 11602 | 11197 | 11123 |
| | Width | 0.514 ± 1.909 | 0.522 | 0.521 | 0.519 | 0.524 | 0.522 | 0.512 | 0.518 | 0.506 | 0.499 |
| AFL B ₂ 1.65 µg/l | Rt(min) | 7.833 | 7.702 | 7.890 | 7.912 | 7.887 | 7.734 | 7.821 | 7.741 | 7.923 | 7.802 |
| | Area | 389747 | 382670 | 387121 | 388601 | 387074 | 386573 | 386573 | 390437 | 386508 | 375317 |
| | Height | 19745 | 19250 | 19344 | 19653 | 19595 | 19440 | 19449 | 19887 | 19399 | 19059 |
| | Width | 0.5494 ± 1.340 | 0.549 | 0.550 | 0.553 | 0.549 | 0.547 | 0.446 | 0.561 | 0.549 | 0.532 |
| AFL B ₁ 5.35 µg/l | Rt(min) | 9.009 | 9.015 | 9.008 | 9.013 | 8.899 | 9.022 | 9.112 | 9.128 | 9.058 | 9.171 |
| | Area | 555456 | 553449 | 554450 | 551062 | 553989 | 554007 | 553465 | 559874 | 556211 | 558444 |
| | Height | 25052 | 24949 | 24998 | 24960 | 24953 | 24946 | 24957 | 25251 | 25044 | 25128 |
| | Width | 0.3527 ± 1.803 | 0.344 | 0.346 | 0.348 | 0.349 | 0.357 | 0.359 | 0.364 | 0.352 | 0.357 |

*n=3: تكرارية حقن المحلول العياري المعائد لمركبات الأفلاتوكسينات (G₂, G₁, B₂, B₁).

4-7- المنحنى المعايرة : The Calibration Curve

حُضرت سلسلة محاليل عيارية لمركبات الأفلاتوكسين (B_1, B_2, G_1, G_2) وطبقت الشروط المثلى السابقة بغية رسم منحنيات المعايرة لمركبات الأفلاتوكسينات وفق التراكيز المذكورة في الجدول رقم (6).
تُظهر مركبات الأفلاتوكسينات خطية ممتازة وبمربع معامل ارتباط (Correlation Coefficient) $R^2=0.9999$ ويوضح الشكل رقم (6) منحنيات المعايرة لمركبات الأفلاتوكسينات (B_1, B_2, G_1, G_2) على الترتيب والتي تميزت بخطية جيدة وبمربع معامل ارتباط ممتاز $R^2=0.9999$.

جدول رقم (6): مساحات قمم الأفلاتوكسينات الأربعة وفق التراكيز المبينة.

| | | | | | | | | | | |
|--------------------|---|---------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|--------|
| AFL G ₂ | التركيز ($\mu\text{g/l}$) | 3.2 | 1.60 | 0.80 | 0.40 | 0.08 | 0.040 | 0.008 | 0.004 | z |
| | *متوسط مساحة قمة مركب الأفلاتوكسين G ₂ | 306227 | 152669 | 75517 | 34992 | 6129 | 3026 | 813 | 384 | 1320 |
| AFL G ₁ | التركيز ($\mu\text{g/l}$) | 10.60 | 5.30 | 2.65 | 1.325 | 0.265 | 0.1325 | 0.0265 | 0.0132 | 0.053 |
| | *متوسط مساحة قمة مركب الأفلاتوكسين G ₁ | 417665 | 206994 | 102830 | 48293 | 8772 | 4505 | 1128 | 820 | 1959 |
| AFL B ₂ | التركيز ($\mu\text{g/l}$) | 3.30 | 1.65 | 0.825 | 0.4125 | 0.0825 | 0.0412 | 0.0082 | 0.0041 | 0.0165 |
| | *متوسط مساحة قمة مركب الأفلاتوكسين B ₂ | 750824 | 371287 | 186112 | 88341 | 16381 | 7889 | 1730 | 792 | 3058 |
| AFL B ₁ | التركيز ($\mu\text{g/l}$) | 10.70 | 5.35 | 2.675 | 1.3375 | 0.2675 | 0.1337 | 0.0267 | 0.0133 | 0.0535 |
| | متوسط مساحة قمة مركب الأفلاتوكسين B ₁ | 1201769 | 598745 | 302154 | 155972 | 25797 | 12269 | 2856 | 1519 | 6666 |

*n=3 تكرارية حقن المحلول العياري العائد لمركبات الأفلاتوكسينات (G_2, G_1, B_2, B_1).

]



الشكل رقم (6): منحنيات المعايرة لمركبات الأفلاتوكسينات (G₁, G₂, B₁, B₂) على الترتيب

4-8- حد الكشف (LOD) وحد التحديد الكمي (LOQ):

يُعدّ استخدام الانحراف المعياري لقيم ضجيج (تشويش خلفية الإشارة) إشارة جهاز HPLC-FLD بعد استقرار مكشاف FLD من الطرائق المُعتمدة في حساب حد الكشف [22]، حي بيّنت النتائج الموضحة في جدول رقم (7) قيم ضجيج التشويش لكل من مركبات الأفلاتوكسينات.

جدول رقم (7): قيم ارتفاع ضجيج خلفية الإشارة الناتجة عن مكشاف الـ FLD.

| مركب | n (عدد قمع ضجيج خلفية الإشارة) | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 |
|----------------------------|---|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| AFL G ₂ | قيم ارتفاع ضجيج خلفية إشارة مكشاف الـ FLD | 71 | 138 | 180 | 35 | 132 | 160 | 96 | 46 | 107 | 66 |
| — N ± SD = 103.1 ± 46.448 | | | | | | | | | | | |
| AFL G ₁ | قيم ارتفاع ضجيج خلفية إشارة مكشاف الـ FLD | 173 | 50 | 159 | 65 | 144 | 55 | 138 | 72 | 37 | 151 |
| — N ± SD = 104.4 ± 50.1003 | | | | | | | | | | | |
| AFL B ₂ | قيم ارتفاع ضجيج خلفية إشارة مكشاف الـ FLD | 189 | 109 | 41 | 171 | 151 | 50 | 75 | 138 | 51 | 77 |
| — N ± SD = 105.2 ± 51.335 | | | | | | | | | | | |
| AFL B ₁ | قيم ارتفاع ضجيج خلفية إشارة مكشاف الـ FLD | 81 | 42 | 128 | 55 | 39 | 155 | 119 | 51 | 162 | 149 |
| — N | | | | | | | | | | | |

*n=3: تكرارية حقن المحلول العياري العائد لمركبات الأفلاتوكسينات (G₂, G₁, B₂, B₁).

طُبقت في حساب حد الكشف وحد التحديد الكمي لمركبات الأفلاتوكسين (G₂, G₁, B₂, B₁) العلاقتين الآتيتين:

$$LOD = 3 \times SD / gA (\mu g/l)$$

$$LOQ = 10 \times SD / gA (\mu g/l)$$

SD: الانحراف المعياري لمتوسط قيم ارتفاع ضجيج خلفية إشارة مكشاف الفلورة FLD.

gA: ميل منحنى معايرة مركبات الأفلاتوكسين (G₂, G₁, B₂, B₁).

يبين الجدول رقم (8) قيم حد الكشف وحد التحديد الكمي لمركبات الأفلاتوكسين (G₂, G₁, B₂, B₁).

جدول رقم (8): قيم حد الكشف وحد التحديد الكمي لمركبات الأفلاتوكسين (G_2 , G_1 , B_2 , B_1) وفق تقنية HPLC-FLD باستعمال الاشتقاق بالخلية الكيمائية الضوئية:

| مركب الأفلاتوكسين | G_2 | G_1 | B_2 | B_1 |
|-------------------------|--------|--------|---------|---------|
| LOD ($\mu\text{g/l}$) | 0.0014 | 0.0038 | 0.00067 | 0.00125 |
| LOQ ($\mu\text{g/l}$) | 0.0048 | 0.0127 | 0.0022 | 0.00411 |

5- المقترحات والتوصيات:

بعد مناقشة نتائج التحاليل بينت النتائج احصائياً أن النسب المثلّي للطور المتحرك كانت Water, Methanol and Acetonitrile (60:30:15 V/V/V) في حين كانت سرعة الطور المتحرك المناسبة عند 1.0 ml/min، ودرجة الحرارة المثالية لفرن العمود 40°C ، والأطوال الموجية لمكشاف الفلورة FLD طول موجة الاثارة .Excitation wavelength: 365 nm، وطول موجة الإصدار Emission wavelength: 440 nm.

بناء على النتائج التي خلص اليها البحث يمكن اعتماد الشروط التحليلية المذكورة سابقاً في الابحاث اللاحقة التي تبحث في تحري الأفلاتوكسينات في الحبوب والتوابل بشكل عام وفي القمح ومنتجاته بشكل خاص، حيث تم اثبات جدوى هذه الطريقة وحساسيتها بالإضافة الى الدقة المطلوبة في التحاليل النوعية لمثل هذه الاجهزة من خلال الدراسات الاحصائية للنتائج والمبينة في متن المقالة، وبالتالي بإمكاننا ان نوصي باستخدام هذه الطريقة واعتمادها بشكل كامل في التحاليل المخبرية البحثية من حيث الدقة والموثوقية.

المراجع

1. Abdulkadar. A H W, Abdulla. A A, Afrah. M A, Jassim. H A, 2004 *Mycotoxins in food products available in Qatar*, Food Control. 543.
2. Lobeau. M, De Lobeau. M, De Saeger. S, Sibanda. L, Barna-Vetr'o. I, C. Van Peteghema, 2005, *Development of a new clean-up tandem assay column for the detection of ochratoxin A in roasted coffee*. Analytical Chimica Act. 538, 57-61.
3. Devegowda. G, Raju, M V L N, Afzali. N, Swami. H V L N, 1998, *Proceedings of the 14th Annual Symposium*, Nottingham University Press, p. 241.
4. Bittencourt. A B F, Oliveira, C A F, Dilkin. P, Correa. B, 2005, Food Control, 16, 117.
5. Milhome. MAL, Lima. CG, De Lima. LK, Lima. FAF, Sousa. DOB, Nascimento. RF, 2014, *Occurrence of aflatoxins in cashew nuts produced in northeastern Brazil*. Food Control. 42:34-7.
6. Anukul. N, Vangnai. K, Mahakarnchanakul. W, 2013, *Significance of regulation limits in mycotoxin contamination in Asia and risk management programs at the national level*. J Food Drug Anal ;21:227e41.
7. Smela. ME, Hamm. ML, Henderson. PT, Harris. CM, Harris. TM, Essigmann. JM, 2002, *The aflatoxin B1 form amidopyrimidine adduct plays a major role in causing the types of mutations observed in human hepatocellular carcinoma*. Proceedings of the National Academy of Sciences. 99:6655–60. [PMC free article] [PubMed] [Google Scholar]
8. Rawal. S, Kim. JE, Coulombe. R, 2010, *Aflatoxin B1 in poultry: toxicology, metabolism and prevention*. Res Vet Sci. 89(3):325–31
9. Ammidaa. N H S, Micheli. L, Palleschi. G, 2004, *Electrochemical immunosensor array using a 96-well screen-printed microplate for aflatoxin B1 detection*. Anal. Chim. Acta, 520, 159.
10. Xiulan. S, Xiaolian. Z, Jian. T, Xiaohong. G, Jun. Z, Chu F S, 2006, *Food Control*, 17, 256.
11. Makun. H A, Apeh. D O, Adeyemi. H Y, Nagago, T, Okeke. J O, Mustapha. A, Oyinloye. B A, 2014, *Determination of Aflatoxins in Sesame, Rice, Millet and Acha from Nigeria using HPLC*. e-Journals in Chemical sciences transactions. 3(4), 1516- 1534.
12. Ferre. F S, 2016, *Worldwide occurrence of mycotoxins in rice*. Food control, 62, 291-298.
13. International Agency for Research on Cancer-IARC. *IARC monographs*, 56, 359 (1993).
14. Samaneh. N, Nabi, S, Shahram, S, Gholamreza, J Kh, Ramin, N N, Esmail. S, 2015, *Validation of simultaneous analysis method for determination of aflatoxin in Olive oil by high performance liquid chromatography–fluorescence detector*. Journal of Food Safety and Hygiene, Vol (1) No. 2: 25-30.
15. Jose R, Magda C, Francisco R, Alvarado H, 2016. Mexico: *Aflatoxin in natural peanut of Mexico: Validation of the biochemical method for extraction and quantification plant*. Biochemical physical volum2. p 126-132
16. Felipe m., et al. 2014. *In house validation of a method for determining aflatoxins B1, B2, and G2 in wheat and dwheat by – products*. Brazil, 2014Unvesity federal, v 49,n,p 255-262.

17. Ahmed G, Key WH, Coralia V. 2018. *Determination of aflatoxins in rice using quenchers and fluorescence HPLC. Department of food science and technology.* 19(2) pp.133-141.
18. Mai A, Marwa R, Ahmed M, et al.,2015 *Detection of aflatoxins in meat by modified HPLC method.* Egypt chem Environ Health 1(1): 945-954.
19. Marilena. M, Marco. I, Donatella. N, Sonia. M, Carmen. P, 2009, *Validation of confirmatory analytical method for the determination of aflatoxins B1, B2, G1 and G2 in foods and feed materials by HPLC with on-line photochemical derivatization and Fluorescence detection.* Food Additives and contaminants, Vol. 26. No. 10, 1402- 1410.
20. Makun. H A, Apeh. D O, Adeyemi. H Y, Nagago. T, Okeke. J O, Mustapha. A S, Oyinloye. B A, 2014, *Determination of Aflatoxins in Sesame, Rice, Millet and Acha from Nigeria using HPLC. e-Journals in Chemical sciences transactions.* 3(4), 1516- 1534.
21. Taheri. N, Roshandel. G, Namjoo. M, 2012, *Aflatoxin contamination in wheat flour samples from golestan province. northeast Iran.* Iran J Public Health. 41(9): 42–47.
22. Shrivastava. A, Gupta. B V, 2011, *Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods.* Chronicles of Young Scientists, Vol.2, Issue 1, 21-25.