

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 آفلاتوکسین‌ها، اکراتوکسین‌ها، زئارانون، دئوکسی نیوالنول، سموم T2، HT2 و فومونیسین‌ها 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 ایمیونوآفینیته 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 عصاره حاصل از استخراج، بالاترین میزان بازیابی به میزان ۶۴/۳ تا ۱۱۲/۱ درصد را به دست داد، در حالی که با استفاده از Oasis HLB، MycoSep 226 و ستون ایمیونوآفینیته میزان بازیابی به ترتیب ۷-۹۹/۶، ۱۰-۹۴/۹ و ۶۱/۳-۹۷/۶ درصد برای همه 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 ۱۰۶/۳ درصد را برای همه مایکوتوکسین‌ها در بین همه نمونه‌ها تأیید کرد. کاربرد این روش روی ۳۰ نمونه 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 مایکوتوکسین‌ها خواهد بود.

واژه‌های کلیدی: مایکوتوکسین، استخراج، خالص‌سازی، غلات، LC-MS/MS

مقدمه مایکوتوکسین‌ها متابولیت‌های طبیعی قارچی هستند که طیف وسیعی از تأثیرات سمی را دارند. از میان صدها مایکوتوکسین، آفلاتوکسین‌ها^۱ (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2)، اکراتوکسین^۲ (OTA)، زئارانون^۳ (ZEA)، دئوکسی نیوالنول^۴ (DON)، فومونیزین‌ها^۵ (FB1, FB2) و سموم T2^۶ و HT2^۷ مهم‌ترین سموم خطرناک 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

^۶ T2- toxin

^۷ HT2 toxin

^۱ Aflatoxins (B1, B2, G1, G2)

^۲ Ochratoxin A (OTA)

^۳ Zearalenone (ZEA)

^۴ Deoxynivalenol (DON)

^۵ Fumonisin (FB1, FB2)

اندازه‌گیری مایکوتوکسین در نمونه‌های غذایی بر پایه 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 تشخیص ZEA، DON، OTA، AFs، FBs، سیتترینین^۱ (CIT) و پاتولین^۲ (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 مواد غذایی 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 OTA، AFs و ZEA گزارش شده است، استخراج DON یا FBs با این ترکیب گزارش نشده است (Rahmani *et al.*, 2009). در حالی 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)، (۱۶: ۸۴) (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 فومونیزین‌ها نسبت حلال

آلی کمتر استونیتریل (۷۰ درصد) توصیه می‌شود (Paepens *et al.*, 2005). در نتیجه، برای استخراج همزمان همه مایکوتوکسین‌های فوق‌الذکر مقادیر مناسبی از استونیتریل در روش‌های جدید استفاده شد. علاوه بر این، پژوهش‌ها نشان دهنده است که مقادیر بالاتر بازیافت سموم با استفاده از حلال استخراج اسیدی به دست می‌آید (Paepens *et al.*, 2005). با در نظر گرفتن توصیه استخراج اسیدی، بسیاری از محققان، از استونیتریل: آب: اسیداستیک (۷۹ : ۲۰ : ۱ حجمی) برای استخراج همه 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^۳ ماده غذایی استخراج شده همراه با سموم به کار می‌رود و گامی اساسی در اندازه‌گیری مایکوتوکسین‌ها مخصوصاً 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 همه گروه‌های مایکوتوکسین‌ها ایجاد شود. خالص‌سازی با استخراج فاز جامد (SPE) (Qiao *et al.*, 2009) و انواع مختلف MycoSep و Multi-Seps (Berthiller *et al.*, 2005) و ستون‌های ایمونوآفینیتی (IACs) (Ventura *et al.*, 2006) برای خالص‌سازی همزمان مایکوتوکسین‌ها بررسی شده‌اند. در میان ستون‌های SPE تجاری موجود، ستون‌های 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

³ Matrix¹ Citrinin² Patulin

سازی نمونه می‌شود و در نتیجه توان نمونه را افزایش می‌دهد. با این حال، بدون در نظر گرفتن مرحله 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، زئارانئون، 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 آزمایشگاه‌ها (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 مرحله خالص سازی قبل از کروماتوگرافی استفاده کردند ولی ۳۷ درصد آنها عصاره‌های استخراج شده را مستقیماً 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 بسیار خوبی نیز توسط آزمایشگاه‌هایی به دست آمد که مستقیماً عصاره‌های استخراج را آنالیز کردند. یافته‌های این پژوهش بازایی بالاتر از حد قابل قبول و تنوع بالای نتایج فومونیزین توسط اکثر آزمایشگاه‌ها را نشان داد که قابل توجه نبود (De Girolamo et al., 2013).

آلومینا هستند و معمولاً برای تجزیه و تحلیل همزمان سموم تریکوتسن^۱ استفاده می‌شوند (Berthiller et al., 2005). ستون‌های ایمونوآفینیتی (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، محلول‌های نهایی بسیار خالص به دست می‌آیند. علاوه بر این، این ستون‌ها نسبت به روش‌های سنتی حلال بسیار کمتری مصرف می‌کنند و می‌توانند خودکار شوند. چندین ستون ایمونوآفینیتی تجاری برای آفلاتوکسین‌ها، فومونیزین‌ها، DON، OTA، تریکوتسن‌های نوع A (T2-toxin) و ZEA موجود است (Lattanzio et al., 2009). عیب اصلی استفاده از ستون‌های ایمونوآفینیتی IAC نیاز به خالص‌سازی همزمان تریکوتسن‌های منفرد (DON) یا گروهی از تریکوتسن‌های مرتبط (سموم T2 و HT2) است. ستون‌های ایمونوآفینیتی چند سمی حاوی آنتی‌بادی برای همه 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 استفاده گسترده از ستون‌های ایمونوآفینیتی 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 عصاره 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

¹ Tricotesens

مطالعه حاضر رویکردی سیستماتیک را برای انتخاب

یک حلال استخراج و روش خالص سازی به منظور استخراج و خالص سازی همزمان DON, ZEA, OTA, AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, HT2 و T2 فومونیزین ها، مقایسه چندگانه روش های آماده سازی نمونه برای استخراج و خالص سازی مؤثر میکوتوکسین های ردیابی از نمونه های غلات خوشه ای، قبل از تجزیه و تحلیل، با استفاده از LC-MS/MS انجام شد. بهترین روش آماده سازی نمونه، بالاترین میزان بازیابی همه میکوتوکسین های هدف را ارائه می دهد. روش بهینه برای تعیین همزمان میکوتوکسین ها در دیگر غلات نیز به کار گرفته شد.

خلاصه مروری بر پژوهش های پیشین در خصوص اندازه گیری میکوتوکسین ها با روش LC-MS/MS در جدول ۱ آمده است.

مواد و روش ها

مواد و شناساگرها

استانداردهای میکوتوکسین های (AFB1, AFB2, AFG1, AFG2, OTA, ZEA, DON) فومونیزین ها (FB1, FB2) و سموم T2 و HT2 از شرکت سیگما (Sigma) آلمان خریداری شدند. متانول و استونیتریل درجه 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 میلی لیتر، (۲۰۰ میلی گرم) از شرکت واترز (Waters) (میلفورد، آمریکا) به دست آمد. ستون های ایمونوآفینیته AOFZDT2TM (IAC) از شرکت وایکم (VICAM، آمریکا) تهیه شد.

محلول استاندارد و آماده سازی نمونه آلوده

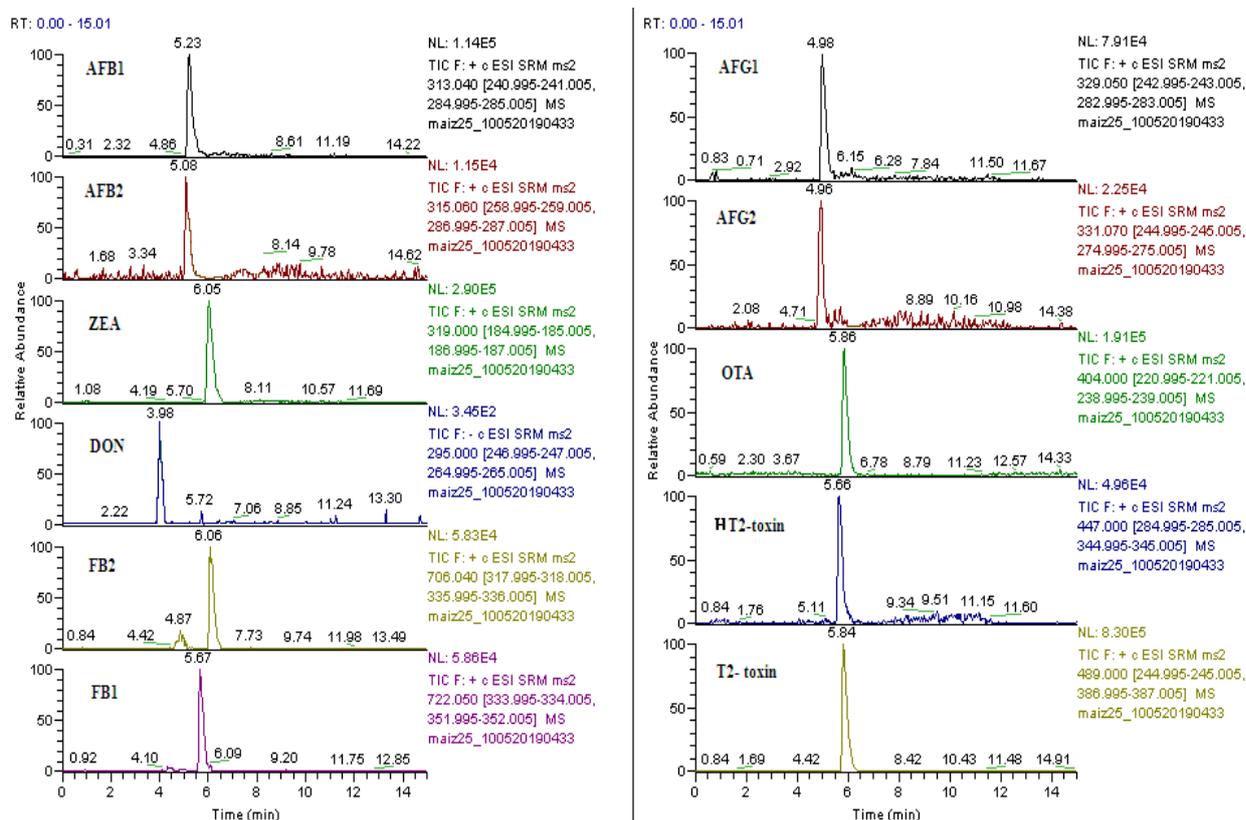
برای تهیه محلول استاندارد مخلوط میکوتوکسین ها، ابتدا حجم ۵۰ میکرولیتر OTA با غلظت ۵۰،۰۰۰ نانوگرم در میلی لیتر) در متانول حل شد تا محلول ذخیره ۲،۵۰۰ نانوگرم بر میلی لیتر تولید شود. یک میلی لیتر از این محلول ذخیره منفرد OTA با ۱ میلی لیتر محلول مخلوط آفلاتوکسین (محلول استاندارد مخلوط AFB1, AFG1 با غلظت 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 غلظت های ۱۰۰، ۳۰، ۱۰۰، ۳۰، ۲۵۰، 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 تهیه محلول استاندارد کاری استفاده شد. تمام محلول های استاندارد کاری در ویال های کهربایی در دمای ۲۰- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

تجهیز و شرایط LC-MS/MS

برای تجزیه و تحلیل LC از سیستم های کروماتوگرافی مایع با شناساگر جرمی کوانتومی (Thermo Scientific، آمریکا) متشکل از یک پمپ دوتایی، یک گاززدا، یک آون ستونی و یک نمونه بردار خودکار استفاده شد. برای آزمون از یک ستون کوتاه C18 به اندازه ۵۰ × ۲/۱ میلی متر، اندازه

استفاده از برنامه گرادیان فاز متحرک شامل متانول و محلول آبی اسید استیک (۱/۰ 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 همان طور نشان می دهد که در کروماتوگرام ظاهر می شوند.

ذرات ۱/۹ میکرومتر (Thermo Scientific، امریکا) بهره 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. مایکوتوکسین ها در کانال های اسکن^۱ (SRM) بررسی شدند. اندازه گیری با کالیبراسیون استاندارد همسان با ماتریس ماده غذایی اجرا شد. از حجم تزریق ۲۰ میکرولیتر و یونیزاسیون الکترواسپری^۲ (ESI) در حالت یون مثبت و منفی استفاده شد. مایکوتوکسین با



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 fomonisinB1(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 نمونه برنج آلوده شده، بدون استفاده از روش خالص سازی

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

² Electrospray ionization (ESI)

¹ Selected reaction monitoring (SRM)

جدول ۱- خلاصه مروری بر پژوهش‌های پیشین در خصوص اندازه‌گیری میکوتوکسین‌ها 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, DON, FBs, ZEA, OTA, HT2 و T2 در غلات	LC-MS/MS	باز یافت 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 میکوتوکسین شامل AFs, OTA, ZEA, DON, HT2, HT2, FBs, در خوراک دام	LC-MS/MS	حد تشخیص ۰/۷ تا ۶۰/۶ میکروگرم در کیلوگرم	(Monbaliu et al., 2010)
استخراج سموم با استونیتریل: آب (۲۰: ۸۰: ۱ حجمی)	فیلتر ۰/۴۵ میکرو متر نیتروسلولز	اندازه گیری ۲۰ میکوتوکسین شامل DON, ZEA, OTA, AFs, HT2 و T2 در خوراک دام	LC-MS/MS	باز یافت سموم ۷۳-۱۱۱ درصد و حد تشخیص ۸ تا ۲۵۰ میکروگرم در کیلوگرم	(Driehuis et al., 2008)
استخراج سموم با استونیتریل: آب (۸۴): ۱۶: ۱ (حجمی)	Mycosep 226	اندازه گیری ۱۷ میکوتوکسین شامل DON, ZEA, OTA, AFs, HT2 و T2	UPLC-MS/MS	باز یافت 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 DON, ZEA, OTA, AFs, HT2 و T2	LC-MS	حد تشخیص ۰/۱ تا ۶/۱ میکروگرم در کیلوگرم	(Tanaka et al., 2006)
استخراج فومونیزین ها با متانول: آب (۷۰: ۳۰: ۱ حجمی) اسیدی شده تا pH ۴ با اسید کلریدریک	ستون IAC	اندازه گیری فومونیسین ها FBs در کورن فلکس	LC-MS/MS	باز یافت 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: ۱ حجمی) و هگزان برای استخراج ترکیبات غیر قطبی	Oasis و HLB MycoSep	اندازه گیری ۲۳ میکوتوکسین شامل DON, ZEA, OTA, AFs, HT2 و FBs, T2	UPLC-MS/MS	باز یافت 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, و OTA, HT2, HT2 در ذرت	LC-MS/MS	باز یافت 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	بدون خالص سازی	اندازه گیری ۱۹ سم شامل AFs, FBs, DON, ZEA, OTA سم T2 و HT2 در مواد غذایی	LC-MS/MS	اندازه گیری ۳۳ سم شامل AFs, FBs, DON, ZEA, OTA سم T2 و HT2 در مواد غذایی	(Sulyok et al., 2010)
استخراج با استونیتریل: آب	بدون خالص سازی	اندازه گیری ۱۱ میکوتوکسین شامل DON, ZEA, OTA, AFs, FBs سم T2 و HT2 در ذرت	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 میکوتوکسین شامل DON, ZEA, OTA, AFs, FBs سم T2 و HT2 در ذرت	LC-MS/MS		(De Girolamo et al., 2013)

آماده سازی نمونه

کدام) برای اندازه گیری به کار رفت (Lattanzio *et al.*,

2007).

برای تهیه نمونه آلوده، ذرت بدون آلودگی با مقدار مناسب مخلوط مایکوتوکسین آلوده شد. غلظت به دست آمده مایکوتوکسین ها 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 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. عصاره استخراج شده بدون اعمال خالص سازی با سه روش خالص سازی فوق الذکر مقایسه شد. عملکرد هر روش خالص سازی در ترکیب با روش استخراج با تجزیه و تحلیل میزان بازیابی مایکوتوکسین ها در سه تکرار تعیین شد.

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

برای خالص سازی با Oasis HLB و ستون ایمونوآفینیتی IAC از عصاره رقیق شده استفاده شد. این عصاره در برخی پژوهش ها استفاده شده بود (Ren *et Sáez et al.*, 2004) (Berthiller *et al.*, 2007) با اندکی تغییرات، حجم ۱۰ میلی لیتر از عصاره 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 خالص سازی عصاره های حاصل از استخراج دو مرحله ای، ابتدا ۱۰ میلی لیتر عصاره B حاوی

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 VDR1، ۷۱۱، 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: مایکوتوکسین ها، ۱۰ گرم نمونه آسیاب شده با ۵۰ میلی لیتر PBS به مدت ۶۰ دقیقه روی یک تکان دهنده به کار گرفته شد، در ۳۰۰۰ دور در دقیقه (به مدت ۱۰ دقیقه)، سانتریفیوژ شد و ۳۵ میلی لیتر از عصاره استخراج شده جمع آوری و با فیلتر میکروفیبر شیشه ای فیلتر گردید (عصاره A). سپس، ۳۵ میلی لیتر متانول به ماده جامد باقی مانده، حاوی ۱۵ میلی لیتر 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 B). سپس مخلوط مقدار مساوی از عصاره A و B (۵ میلی لیتر از هر

برای آنالیز مایکوتوکسین‌ها، بدون خالص‌سازی، ۰/۵ میلی‌لیتر عصاره 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 میلی‌لیتر عصاره A با همان مقدار عصاره B (برابر ۱ گرم نمونه) و عبور از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر، نمونه برای تزریق مستقیم به LC-MS/MS، آماده شد.

اعتبارسنجی

اعتبارسنجی روش با توجه به توصیه‌های عملکرد روش‌های تحلیلی و تفسیر نتایج (Vasquez-Martinez *et al.*, 2011) و اعتبارسنجی روش‌های تحلیلی برای تعیین مایکوتوکسین‌ها در مواد غذایی اجرا گردید (Gilbert & Anklam, 2002) و نتایج با سطوح قابل قبول تعیین شده 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 ZEA, OTA, AFs, HT2-Toxin و T2-Toxin, FB2, FB1, DON, OTA اجرا شد. منحنی‌های کالیبراسیون پنج نقطه‌ای برای مایکوتوکسین‌ها در محدوده 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 تشخیص¹ (LOD) و کمترین حد اندازه‌گیری² (LOQ) با رقت‌های سریالی با کمترین غلظت تعیین و بر اساس نسبت سیگنال/نویز (۳=۳) (S/N) و ۱۰ (S/N = ۱۰) برآورد شد. برای بررسی میزان

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

¹ Limit of Detection (LOD)

² Limit of Quantification (LOQ)

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 بازیابی ها در این تحقیق و ادبیات را می توان با بسیاری از متغیرهای موثر بر استخراج مایکوتوکسین توضیح داد. یکی از مهم ترین تفاوت ها در این تحقیق تغییر در حلال استخراج است که به دلیل وجود فومونیزین ها در این تحقیق، نسبت به بسیاری مقالات، اعمال شد.

در بین تمام روش های خالص سازی، روش های IAC و روش های بدون خالص سازی، به ترتیب با درصد بازیافت ۶۱/۳ تا ۹۷/۶ درصد و ۶۴/۳ تا ۱۱۲/۱ درصد، بالاترین میزان بازیابی را برای همه مایکوتوکسین ها ارائه کردند. با توجه به بالابودن قیمت و زمان آماده سازی نمونه با استفاده از IAC، روش بدون خالص سازی به عنوان روش بهینه برای آماده سازی نمونه ها انتخاب شد. تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) بازیابی مایکوتوکسین ها با استفاده از روش های مختلف استخراج و خالص سازی در جدول ۳ نشان داده شده است. تحلیل واریانس مدل خطی عمومی (GLM) نشان داد که بر اساس بازیابی های به دست آمده بین روش های مختلف استخراج و خالص سازی و سموم تفاوت معنی داری وجود دارد ($p < 0.05$). مقدار بالای مربعات R نشان داد که بیش از ۹۵ درصد تغییر بازیابی را می توان با این متغیرهای استخراج و خالص سازی و تعامل آنها پیش بینی کرد.

با توجه به اهمیت عملکرد روش برای سطوح مختلف آلودگی مایکوتوکسین، در مورد اثر غلظت مایکوتوکسین ها بررسی های بیشتری شده است. استفاده از روش استخراج یک مرحله ای و روش "بدون خالص سازی" در غلظت های مختلف روی مایکوتوکسین ها در نمونه غنی شده، بازیابی در محدوده ۶۴/۳ تا ۱۱۲/۱ درصد به دست آمد که با نتایج گزارش شده دیگر محققان برای همه مایکوتوکسین ها به جز فومونیزین ها همخوانی دارد و الزامات اتحادیه اروپا را برای

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

نتایج و بحث

مقایسه 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) نمونه استخراج شده همراه با ۴ روش خالص سازی بررسی شد. بازیابی به دست آمده از مایکوتوکسین ها و اهمیت تفاوت بین بازیابی های به دست آمده با استفاده از روش های مختلف استخراج و خالص سازی در جدول ۲ نشان داده شده است.

پیش از این گفته شد بهترین روش ها برای استخراج همزمان DON، ZEA، OTA، AFGs، فومونیزین ها، سموم T2 و HT2 استخراج یک مرحله ای با استونیتریل: آب: اسید استیک (۱:۲۰:۷۹) است (Sulyok *et al.*, 2007) و روش های استخراج دو مرحله ای با استفاده از PBS و متانول (Lattanzio *et al.*, 2007). در میان تمام روش های خالص سازی Oasis HLB و MycoSep 226 کمترین بازیابی را ارائه داده اند و میزان بازیابی Oasis HLB در محدوده ۱۱/۸ و ۸۹ درصد برای تقریباً همه مایکوتوکسین ها به جز AFG2، AFG1 و DON است. میزان بازیابی ب برای مایکوتوکسین ها با استفاده از ستون Oasis HLB در محدوده ۱۱/۸ درصد برای HT2 Toxin و ۷۷/۴ درصد برای AFG1 است که مشابه میزان بازیابی برای AFGs گزارش شده در برخی پژوهش های پیشین است (Garon *et al.*, 2006; Richard *et al.*, 2007).

همچنین MycoSep 226 بازیابی بین ۱۱/۵ تا ۸۸/۲ درصد را ارائه می دهد که برای هیچ یک از مایکوتوکسین ها به جز AFB2 قابل قبول نیست. این نتایج نمی تواند نتایج بازیافت خوب گزارش شده در پیشینه تحقیق با MycoSep

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، زئارانئون، دنوکسی نیوالنون، سم T2، سم HT2 و برخی مشتقات این سموم در مدت ۳۰ دقیقه تفکیک شده توسط اسپانجر و همکاران (Spanjer *et al.*, 2008).

جدول ۲ - نتایج بازیابی مایکوتوکسین‌ها با استفاده از دو روش استخراج مختلف و روش‌های خالص سازی مختلف

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

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

انحراف معیار از سه تکرار تعیین بازیابی

حروف کوچک (abc) تفاوت قابل توجهی در بازیابی بین خالص سازی برای هر مایکوتوکسین را نشان می‌دهند (تفاوت بین ستون‌ها)

حروف بزرگ (ABC) تفاوت قابل توجهی را در بازیابی بین حلال‌ها برای هر مایکوتوکسین نشان می‌دهند (تفاوت بین ردیف‌ها)

جدول ۳. تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) بازیابی میکوتوکسین 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

P-value	F-value	درجه آزادی	منبع
۰/۰۰۰	۲۸/۵۸	۱۰	سم
۰/۱۳۶	۲/۲۴	۱	روش استخراج
۰/۰۰۰	۷۷۸/۱۷	۳	روش خالص سازی
۰/۰۰۵	۲/۶۶	۱۰	سم×روش استخراج
۰/۰۰۰	۲۲/۲۶	۳۰	سم×روش خالص سازی
۰/۰۰۰	۸/۷۸	۳	روش استخراج×خالص سازی
۰/۰۰۱	۲/۱۸	۳۰	سم×روش استخراج×خالص سازی

۹۵/۱ = R-sq

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) شماره ۲۰۰۶/۴۰۱ مطابقت خوبی دارد (De Boevre et al., 2012).

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

اعتبارسنجی روش

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

بازیابی فومونیزین ها 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 راحت ترین راه برای بهبود راندمان استخراج و در نتیجه بازیابی فومونیزین ها است و روش چندگانه را برای دیگر میکوتوکسین ها بدون تغییر باقی می گذارد.

این یافته ها با نتایج استخراج میکوتوکسین ها از ذرت، گندم، جو دوسر، دانه های ذرت و نان، استخراج با استونیتریل آبسیداستیک (۷۹ : ۲۰ : ۱)، و یک مرحله چربی زدایی 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

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 آمده، در مقایسه با مقادیری که از دیگر پژوهش‌ها به دست 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 محصولات برای تغذیه حیوانات در سوئد، عصاره‌های استخراج مایکوتوکسین‌ها به دو قسمت تقسیم شدند که یک بخش رقیق و بدون خالص‌سازی و بخش دیگر با استفاده از MultiSep226 خالص‌سازی و سپس برای جداسازی، شناسایی و اندازه‌گیری مایکوتوکسین‌ها با LC-ESI-MS/MS در حالت SRM بررسی گردید. بازیابی برای همه مایکوتوکسین‌ها بالاتر از ۸۶ درصد و حد تشخیص ۰/۱ تا ۷۲ $\mu\text{g/kg}$ و حد اندازه‌گیری از ۲/۵ تا ۱۱۵ $\mu\text{g/kg}$ بود (Tevell Åberg *et al.*, 2013).

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

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

R2	محدوده خطی ($\mu\text{g/L}$)	حد اندازه‌گیری LOQ در ذرت ($\mu\text{g/kg}$)	حد تشخیص LOD در ذرت ($\mu\text{g/kg}$)	حد اندازه‌گیری LOQ در محلول استاندارد ($\mu\text{g/L}$)	حد تشخیص LOD در محلول استاندارد ($\mu\text{g/L}$)	مایکوتوکسین‌ها
۰/۹۹۹	۰/۰۵-۱۰۰	۰/۲۵	۰/۰۸	۰/۱۵	۰/۰۵	آفلاتوکسین B1
۰/۹۹۸	۰/۱۵-۳۰	۰/۷۵	۰/۲۵	۰/۵	۰/۱۵	آفلاتوکسین B2
۰/۹۹۷	۰/۰۵-۱۰۰	۰/۳	۰/۱	۰/۱۵	۰/۰۵	آفلاتوکسین G1
۰/۹۹۵	۰/۲-۳۰	۱	۰/۳	۰/۶	۰/۲	آفلاتوکسین G2
۰/۹۹۷	۰/۱-۲۵۰	۰/۴۵	۰/۱۵	۰/۱۵	۰/۰۵	اکراتوکسین آ
۰/۹۹۵	۱-۲۵۰۰	۱/۵	۰/۵	۰/۳	۰/۱	زئارالنون
۰/۹۲۵	۵-۵۰۰۰	۲۰	۷	۱۵	۵	داکسی نیوالنون
۰/۹۹۳	۵-۲۵۰۰	۲۵	۸	۱۵	۵	فومونیسین B1
۰/۹۹۴	۵-۲۵۰۰	۲۵	۸	۱۵	۵	فومونیسین B2
۰/۹۸۶	۲/۵-۵۰۰۰	۱۵	۵	۷/۵	۲/۵	سم T2
۰/۹۸۵	۲/۵-۵۰۰۰	۱۵	۵	۷/۵	۲/۵	سم HT2

اسپری یونیزاسیون (ESI) در هر دو حالت یون مثبت و منفی انجام شد. میانگین بازیابی مایکوتوکسین‌ها از غلات ۸۳/۵ تا ۱۰۷/۳ درصد بود، در حالی که حد تشخیص (LOD) و حد اندازه‌گیری (LOQ) به ترتیب از ۰/۰۱ تا ۲۵ میکروگرم در کیلوگرم و ۰/۰۲ تا ۴۰ میکروگرم در کیلوگرم بود. روش توسعه یافته برای تعیین مایکوتوکسین‌ها در ۱۰۰ نمونه

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

غلات جمع آوری شده از بازارهای مالزی استفاده شده است. نتایج بررسی ها نشان داد که این روش برای تعیین

کاربرد روش برای سنجش آلودگی نمونه های واقعی

روش LC-MS/MS در اندازه گیری کمی آفلاتوکسین ها، اکراتوکسین آ، زئارالنون، داکسی نیوالنون، فومونیزین ها، سموم T2 و HT2، در ۳۰ نمونه غلات به کار برده شد. تمام نمونه های غلات جمع آوری شده با استفاده از روش جدید LC-MS/MS بررسی شدند و نتایج در جدول ۶ آورده شده است.

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 میکوتوکسین به سطح آلوده شده آن به دست آمد. میزان بازیافت ۷۵/۱ تا ۱۰۶/۳ درصد بود که برای روش های میکوتوکسین در

جدول ۵- بازیافت میکوتوکسین ها با روش استخراج یک مرحله ای و بدون خالص سازی

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

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

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

جدول ۶- آلودگی مایکوتوکسین ها در نمونه های غلات

Table 6- Contamination of mycotoxins in cereal samples

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

(ng/g) (max - min) n

ND : معمولاً مقادیر تشخیص داده نشده را ND می گویند و کمتر از LOQ را به صورت <LOQ گزارش می دهند.

نتیجه گیری

درصد) را در مقایسه با سه روش تمیزکردن دیگر، IAC، Oasis HLB و MycoSep 226 به دست داد. مطالعه اعتبارسنجی نشان داد که این روش برای تعیین همزمان مایکوتوکسین های هدف در غلات به میزان کافی از خطی بودن، حساسیت، دقت و صحت برخوردار است. بنابراین، می توان نتیجه گرفت که این روش برای تعیین مایکوتوکسین به صورت آزمون روتین مناسب است. علاوه بر این، رویکرد تجربی مورد استفاده در این مطالعه می تواند به عنوان مرجعی برای دیگر روش های آماده سازی نمونه استفاده شود.

آماده سازی کارآمد نمونه از طریق انتخاب روش های استخراج و خالص سازی، 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 مایکوتوکسین ها در مقایسه با استخراج دو مرحله ای ارائه داد. علاوه بر این، روش خالص سازی با استفاده از میکروفیلتر فیبر شیشه (بدون خالص سازی) بالاترین میزان بازیابی (۶۴/۳ تا ۱۱۲/۱۱)

تعارض منافع

نویسندگان در زمینه انتشار مقاله ارائه شده به طور کامل از سوء اخلاق نشر، از جمله سرقت ادبی، سوء رفتار جعل داده ها و یا ارسال و انتشار دوگانه، پرهیز نموده اند و منافی تجاری در این راستا ندارند.

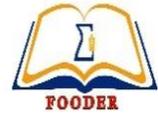
منابع

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., Aldrick, 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, 841-856.
- 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. I., 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. Toxicogenic 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.



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](http://doi.org/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 mycotoxins. 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

