

## ***Contamination Rate of Eggs with Mycotoxins in Mazandaran Province, Iran 2019***

Majid Saeedi<sup>1</sup>,  
Mohammad Reza Shiran<sup>2</sup>,  
Esmail Babanezhad<sup>3</sup>,  
Haniyeh Pazoki<sup>4</sup>,  
Sahar Abaskhani-Davanlo<sup>4</sup>,  
Fatemeh Khaleghi<sup>5</sup>

<sup>1</sup> Professor, Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran  
<sup>2</sup> Associate Professor, The Health of Plant and Livestock Products Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran  
<sup>3</sup> Assistant Professor, The Health of Plant and Livestock Products Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran  
<sup>4</sup> MSc in Chemistry, The Health of Plant and Livestock Products Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran  
<sup>5</sup> PhD in Natural Products, The Health of Plant and Livestock Products Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received December 24, 2019 ; Accepted May 13, 2020)

### ***Abstract***

**Background and purpose:** Contamination of food with mycotoxins is among the major threats to food security, and human and animal health that cause significant economic losses in countries. This contamination is found in poultry and animal products and can pose risks to human health. Despite the mass production and consumption of egg, this product has not been well evaluated for the presence of mycotoxins. According to previous studies, there is high possibility of fungal infections and consequently production of mycotoxins in poultry feed. Here, we aimed to perform a quality control study on the safety of this product in Mazandaran province market by developing current techniques.

**Materials and methods:** In this experimental study, 45 egg samples were collected from three cities in summer 2019, during two phases. Aflatoxin and ochratoxin were extracted using appropriate solvents. In the ELISA method, the extracted samples were directly analyzed while being purified by immunoaffinity column for HPLC measurement.

**Results:** Among the samples examined, aflatoxin G<sub>2</sub> (0.010 to 4.726 µg/Kg) was found in 36 cases. These values are lower than maximum residue limit allowed for foods. Ochratoxin was not detected in any sample.

**Conclusion:** According to current study, there were low levels of aflatoxin in the eggs and they can be considered as a safe food in terms of aflatoxin contamination.

**Keywords:** aflatoxin, ochratoxin, ELISA, HPLC, egg

**J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 30(186): 58-67 (Persian).**

\* **Corresponding Author:** Fatemeh Khaleghi - The Health of Plant and Livestock Products Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: ftkhaleghi@yahoo.com)

## بررسی میزان آلودگی تخم مرغ های موجود در استان مازندران به مایکوتوکسین ها در سال 1398

مجید سعیدی<sup>1</sup>

محمدرضا شیران<sup>2</sup>

اسماعیل بابانژاد<sup>3</sup>

هانیه پازوکی<sup>4</sup>

سحر عباسخانی دوانلو<sup>4</sup>

فاطمه خالقی<sup>5</sup>

### چکیده

**سابقه و هدف:** آلودگی به مایکوتوکسین ها در مواد غذایی یک تهدید عمده برای سلامتی انسان و حیوانات است که باعث خسارات اقتصادی قابل توجهی می شود. از آنجا که این آلودگی در بدن طیور و حیوانات یافت می شود، می تواند خطراتی را به سلامتی انسان وارد نماید. با وجود تولید و مصرف انبوه تخم مرغ، این محصول از نظر وجود مایکوتوکسین ها آنچنان که باید مورد بررسی قرار نگرفته است. طبق مطالعات پیشین، امکان آلودگی های قارچی و در نتیجه تولید مایکوتوکسین ها در غذای طیور بسیار بالاست. مطالعه حاضر امیدوار است بتواند با توسعه تکنیک های موجود، یک مطالعه کنترل کیفی در مورد وضعیت ایمنی این محصول در بازار مازندران نشان دهد.

**مواد و روش ها:** در این مطالعه تجربی، تعداد 45 نمونه تخم مرغ از سه شهر در استان مازندران در تابستان سال 1398 طی دو مرحله جمع آوری و آفلاتوکسین و اکراتوکسین موجود در آن ها با استفاده از حلال های مناسب استخراج شد. سپس در روش الایزا نمونه های استخراج شده به طور مستقیم و برای اندازه گیری به روش HPLC ابتدا با ستون ایمونوآفینیتی خالص سازی انجام گرفت و سپس مورد آنالیز قرار گرفتند.

**یافته ها:** از میان نمونه های بررسی شده، در 36 مورد، آفلاتوکسین G<sub>2</sub> با مقدار حداقل 0/010 تا حداکثر 4/726 µg/Kg شناسایی شد که این مقادیر، از حد مجاز در نظر گرفته شده برای مواد غذایی کم تر می باشند. در هیچ کدام از نمونه ها، اکراتوکسین مشاهده نشد.

**استنتاج:** بر اساس یافته های مطالعه حاضر، میزان آفلاتوکسین موجود در تخم مرغ ناچیز بوده و به نظر می رسد بتوان تخم مرغ را به عنوان یک غذای ایمن از دیدگاه آلودگی به آفلاتوکسین، در نظر گرفت.

**واژه های کلیدی:** آفلاتوکسین، اکراتوکسین، الایزا، HPLC، تخم مرغ

### مقدمه

همراه داشته و سلامتی انسان ها و ایمنی مواد غذایی را تحت تاثیر قرار دهند. به دلیل فراگیر بودن توزیع قارچ ها در سراسر جهان، آن ها به عنوان آلاینده های اجتناب ناپذیر

مایکوتوکسین ها متابولیت های ثانویه ای هستند که توسط برخی از گونه های قارچی نظیر آسپرژیلوس و پنی سیلیوم تولید می شوند که ممکن است مخاطراتی را به

E-mail: ftkhaleghi@yahoo.com

**مؤلف مسئول: فاطمه خالقی** - ساری: دانشگاه علوم پزشکی مازندران - مرکز تحقیقات سلامت فرآورده های گیاهی و دامی

1. استاد، گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

2. دانشیار، مرکز تحقیقات سلامت فرآورده های گیاهی و دامی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

3. استادیار، مرکز تحقیقات سلامت فرآورده های گیاهی و دامی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

4. فوق لیسانس شیمی، مرکز تحقیقات سلامت فرآورده های گیاهی و دامی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

5. Ph.D شیمی ترکیبات طبیعی، مرکز تحقیقات سلامت فرآورده های گیاهی و دامی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

© تاریخ دریافت: 1398/10/30 تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: 1398/11/2 تاریخ تصویب: 1399/2/24

مواد غذایی و خوراک دام و طیور در نظر گرفته می شوند. در میان مایکوتوکسین ها، شش گروه شامل آفلاتوکسین ها (AFs)، اکراتوکسین A (OTA)، فومونیسین ها، داکسی نیوالنول (DON)، پاتولین و تریکوتسن ها شایع ترین سموم قارچی هستند که در خوراک حیوانات و غذای انسان وجود دارند (1).

آفلاتوکسین (Aflatoxin) واژه کوتاه شده *Aspergillus flavus* toxin به معنی سم یکی از گونه های قارچی مولد آن می باشد. بیش از 20 نوع آفلاتوکسین مختلف شناسایی شده است که فقط انواع B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> و G<sub>2</sub> به طور طبیعی تولید می شوند و سایر آفلاتوکسین ها مانند M<sub>1</sub>, M<sub>2</sub>, P<sub>1</sub>, Q<sub>1</sub>، آفلاتوکسیکول و سایر موارد، تولیدات متابولیکی میکروبی یا حیوانی هستند. آفلاتوکسین های M<sub>1</sub> و M<sub>2</sub> متابولیت های هیدروکسیله B<sub>1</sub> و B<sub>2</sub> هستند. آفلاتوکسین B<sub>1</sub> عمده ترین آفلاتوکسینی است که تولید می شود و سمی ترین ترکیب این گروه نیز می باشد، که به عنوان ترکیبی با سمیت زیاد (LD<sub>50</sub> 1-50 میکروگرم بر کیلوگرم) برای بیش تر گونه های طیور در نظر گرفته می شود. سمیت آفلاتوکسین های G<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> و G<sub>2</sub> به ترتیب 20، 50 و 10 درصد سمیت آفلاتوکسین B<sub>1</sub> در گونه های مختلف حیوانی و سلول های پستانداران در محیط های کشت بوده است (2,3). در بین گونه های مختلف طیور و در بین سن های مختلف، تفاوت در حساسیت به مسمومیت با آفلاتوکسین وجود دارد. آفلاتوکسین B<sub>1</sub> در سطوح کم تر از نصف LD<sub>50</sub> موجب مسمومیت شدید کبدی می گردد. کبد محل اصلی مسمومیت زدایی از آفلاتوکسین بوده و سمی بودن آفلاتوکسین B<sub>1</sub> برای کبد، تقریباً در تمام حیوانات به اثبات رسیده است. متابولیت های آفلاتوکسین به طور عمده از طریق صفرا، ادرار و ترشحات دستگاه گوارش دفع می گردند. متابولیت های آفلاتوکسین بر خلاف شیب غلظت پلاسمایی، با نرخ دفع بیش تری نسبت به سایر روش های دفع، به صفرا ترشح می شوند (4-6). تبدیل زیستی آفلاتوکسین در جهت مسمومیت زدایی و

تسهیل دفع، شامل مراحل ابتدا اکسیداسیون، احیا و هیدرولیز و سپس ترکیب با مواد با منشا داخلی جهت افزایش حلالیت در آب می باشد. تجمع آفلاتوکسین ها در بدن نیز عمدتاً در کبد و کلیه ها صورت می گیرد که در تبدیل زیستی آن ها دخالت دارند. مرغ های گوشتی و تخمگذار می توانند قسمت عمده آفلاتوکسین B<sub>1</sub> موجود در خوراک مصرف شده را متابولیزه و دفع کنند (7). در حالت ایجاد مسمومیت مزمن با آفلاتوکسین در مرغ های مادر که تولیدکننده تخم مرغ نطفه دار برای تولید جوجه بکروزه گوشتی هستند، راندامان غذایی، میزان وزن گیری، تولید تخم مرغ (به دلیل کاهش سنتز و انتقال مواد پیش ساز زرده در کبد) و توانایی جوجه درآوری تخم های آن ها کاهش می یابد. حساسیت این مرغ ها به شاخص کاهش تولید تخم مرغ بیش تر از کاهش جوجه درآوری و مرگ و میر جنینی بوده است، که نشان دهنده ورود کم تر این سم به تخم مرغ می باشد (8). در صورت وجود مقدار زیاد آفلاتوکسین در جیره مرغ های تخمگذار، شاخص های وزن تخم مرغ و تولید تخم مرغ که شاخص های اقتصادی مهمی برای پرورش دهنده مرغ تخمگذار می باشد، کاهش یافته و سریعاً جلب توجه نموده و تولیدکننده تخم مرغ را از وجود مشکل جدی در مزرعه آگاه می سازد. لذا موارد مسمومیت حاد با آفلاتوکسین به علت ایجاد زیان اقتصادی چشمگیر، سریعاً مدیریت می شوند. گزارش منابع نشان می دهد مقادیر آفلاتوکسینی که به طور طبیعی در خوراک طیور یافت می شود به طور متوسط کم تر از 200 میکروگرم در کیلوگرم می باشد (9، 10)، بنابراین، با توجه به وجود حداقل 500 میکروگرم آفلاتوکسین در کیلوگرم خوراک، میزان ضریب ناچیز انتقال سم به تخم مرغ و توانایی مرغان در سم زدایی سریع و موثر از آفلاتوکسین، احتمالاً از منظر بقایای آفلاتوکسین در فرآورده های طیور مانند تخم مرغ، مقادیر ناچیزی باقی مانده ممکن است وجود داشته باشد (11).

قارچی و نهایتاً افزایش تولید مایکوتوکسین‌ها در انواع مواد غذایی و خوراک دام و طیور می‌شود. با در نظر گرفتن جایگاه ویژه‌ای که تخم مرغ در سفره غذایی ایرانیان دارد و به دلیل احتمال آلودگی خوراک دام و طیور به کپک و بعضاً تغذیه آن‌ها با نان کپک زده، در این مطالعه به بررسی تخم مرغ‌های توزیع شده در سه شهر استان مازندران از لحاظ میزان آلودگی به برخی مایکوتوکسین‌ها پرداخته شد تا علاوه بر حصول آگاهی از سلامت آن‌ها، بتوان به روشی دقیق با توان تشخیصی قابل قبول برای اندازه‌گیری آفلاتوکسین و اکراتوکسین در تخم مرغ دست یافت.

## مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، فسفات هیدروژن دی سدیم بدون آب، فسفات دی هیدروژن پتاسیم، کلرید سدیم، برمید پتاسیم، کلرید پتاسیم، اسید نیتریک، استونیتریل، متانول، آب با درجه خلوص کروماتوگرافی مایع، هگزان نرمال یا سیکلو هگزان، ساخت شرکت مرک آلمان تهیه شدند. محلول استاندارد ذخیره آفلاتوکسین‌ها شامل 1000 نانوگرم از انواع آفلاتوکسین B<sub>1</sub>, G<sub>1</sub> و 200 نانوگرم از انواع B<sub>2</sub>, G<sub>2</sub> در یک میلی‌لیتر متانول می‌باشد. جهت اندازه‌گیری اکراتوکسین، محلول استاندارد ذخیره اکراتوکسین، شامل 1000 نانوگرم از آنالیت اکراتوکسین A در یک میلی‌لیتر حلال بنزن - اسید استیک به نسبت حجمی 99 حجم بنزن، 1 حجم اسید استیک، از شرکت ایرانی علوم حیاتی فاروق، مورد استفاده قرار گرفتند. از کیت الایزا با برند Bio-Shield از شرکت Prognosis کشور یونان برای اندازه‌گیری آفلاتوکسین و کیت با برند Neogen Europe ساخت کشور آلمان جهت اندازه‌گیری اکراتوکسین استفاده شد. تعداد 45 نمونه تخم مرغ شامل سنتی و صنعتی، به صورت تصادفی از سطح عرضه سه شهر از شهرهای استان مازندران (بابلسر، قائم‌شهر و ساری) در تابستان سال 1398 طی دو مرحله نمونه برداری شدند. در مرحله اول 30 نمونه (جهت

اکراتوکسین از مشتقات ایزوکومارین و محصول اصلی بیش تر گونه‌های آسپرژیلوس و پنی‌سلیم است. اکراتوکسین A (OTA) فراوان‌ترین و سمی‌ترین مایکوتوکسین در میان این گروه و از گونه نفروتوکسین‌ها است که باعث بروز صدمات جدی در کلیه، کاهش وزن‌گیری، کاهش بهره‌وری خوراک و افزایش شیوع بیماری‌ها شده و همچنین توانایی سرکوب سیستم ایمنی را نیز دارد (12).

این سم از نظر عامل تلفات در طیور، قوی‌تر از انواع آفلاتوکسین نیز می‌باشد. در بسیاری موارد مصرف مداوم جیره‌ای که به مقدار کمی از این نوع سم آلوده است، منجر به تلفات مستقیم نمی‌شود بلکه با کاهش عملکرد گله موجب ضرر اقتصادی در پایان دوره پرورش خواهد شد. به‌طور کلی، میزان اکراتوکسین A در خوراک‌های حیوانی در مقایسه با مواد غذایی انسانی بیش‌تر است. خوراک دام، طیور و آبزیان عموماً از غلات و حبوبات و فرآورده‌های جانبی آن‌ها تشکیل شده است که محیط مناسبی برای رشد سویه‌های قارچی تولیدکننده سم اکراتوکسین می‌باشند (13).

تخم مرغ نه تنها یک وعده غذایی مقبول از دیدگاه طعم، منبع غذایی کامل و همچنین عنصر جدایی‌ناپذیر برای تهیه بسیاری از غذاها است، بلکه به عنوان یک منبع غذایی طبیعی و کامل در سفره غذایی ایرانیان مطرح می‌باشد. این ویژگی، به علت مواد مغذی استثنایی تخم مرغ است که به عنوان منبع قابل توجهی از پروتئین با کیفیت بالا که دارای تمام 9 اسید آمینه ضروری و مقادیر عمده‌ای از ویتامین‌ها و مواد معدنی ضروری است، مورد توجه می‌باشد (14). علاوه بر این کولین تخم مرغ صرف نظر از تأثیر قابل توجهی که بر روی عملکرد مغز و سیستم عصبی برای رشد و نمو جنین و کودک و همچنین تقویت حافظه دارد، بر روی سلامت قلب و عروق نیز موثر است (15). استان مازندران واقع در شمال ایران، دارای آب و هوای معتدل با رطوبت بالا است که از جمله عواملی می‌باشد که باعث افزایش آلودگی

آزمون افلاتوکسین توتال با روش HPLC<sup>1</sup>) و در مرحله دوم 15 نمونه جهت آزمون افلاتوکسین توتال با هر دو روش الایزا و HPLC و همچنین اندازه گیری اکرآتوکسین با هر دو روش الایزا و HPLC مورد مطالعه قرار گرفتند. در تمامی موارد از هر سری از نمونه‌ها، 3 عدد تخم مرغ جمع آوری و جهت آماده سازی نمونه و سنجش موارد یاد شده، به آزمایشگاه ارسال شدند.

#### آماده سازی نمونه تخم مرغ برای آزمون افلاتوکسین توتال با روش های الایزا و HPLC

جهت اندازه گیری افلاتوکسین از دستگاه HPLC مجهز به دکتور فلورسانس با طول موج تهیجی 365 nm و طول موج نشری 435 nm و ستون با فاز معکوس C<sub>18</sub> و کبری سل استفاده شده است. محلول فاز متحرک: 6 حجم آب + 3 حجم متانول + 2 حجم استون نیتریل + 350 میکرولیتر HNO<sub>3</sub> با مولاریته 4 و 0/12 گرم KBr به ازای یک لیتر و سرعت جریان 1 ml/min و حجم تزریق 100 μl انتخاب شده است (16). در آماده سازی نمونه تخم مرغ برای روش های الایزا و HPLC در آزمون افلاتوکسین Total، ابتدا زرده و سفیده تخم مرغ را مخلوط کرده، سپس 5 گرم از نمونه، وزن شده و با متانول 70 درصد به حجم 25 میلی لیتر رسانده شد. سپس به مدت 10 دقیقه ورتکس شده و در دمای 5°C- به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ شد. 15 ml از محلول رویی حاصل از انتقال به دکانتور، 4/5 میلی لیتر هگزان نرمال به آن افزوده شد. پس از دو فاز شدن، 15 ml فاز آبی را جدا کرده و 5 ml برای آزمون الایزا (کیت با برند Bio-Shield از شرکت Prognosis کشور یونان) برداشته شد. 10 ml باقیمانده از فاز آبی ابتدا با استفاده از گاز نیترژن به حجم 5 میلی لیتر رسانده و در نهایت با آب مقطر دیونیزه به حجم 10 ml رسانده و از ستون ایمینوآفینیتی مخصوص افلاتوکسین با برند Bio-TeZ آلمان عبور داده شد. به

1. High performance liquid chromatography

منظور حذف ترکیبات ناخواسته ابتدا 10 ml آب مقطر از ستون ایمینوآفینیتی عبور داده و پس از خشک کردن با فشار هوای مثبت، نهایتاً افلاتوکسین جذب شده، با عبور 1500 μl متانول واجذب شده و پس از رقیق سازی با 1500 μl آب مقطر، ورتکس و سپس فیلتراسیون با PTFE، در نهایت به دستگاه HPLC تزریق شد. برای رسم منحنی کالیبراسیون برای B<sub>1</sub>,G<sub>1</sub> از گستره 0/36-3/6ppb و برای B<sub>2</sub>,G<sub>2</sub> از گستره 0/07-0/72 ppb استفاده شد.

#### آماده سازی نمونه تخم مرغ برای آزمون اکرآتوکسین با روش های الایزا و HPLC

تعداد 15 نمونه تخم مرغ شامل سنتی و صنعتی و از هر نمونه 3 عدد از سطح عرضه سه شهر از شهرهای استان مازندران (بابلسر، قائمشهر و ساری) جمع آوری و به آزمایشگاه ارسال شدند.

در آماده سازی نمونه تخم مرغ برای روش های الایزا و HPLC در آزمون اکرآتوکسین A، ابتدا زرده تخم مرغ را جدا کرده، سپس 5 گرم از آن با متانول 70 درصد به حجم 25 میلی لیتر رسانده شد. سپس به مدت 10 دقیقه ورتکس شده و در دمای 5°C- به مدت 10 دقیقه سانتریفیوژ شد. 15 ml از محلول رویی حاصل از سانتریفیوژ برداشته و پس از انتقال به دکانتور، 4/5 میلی لیتر نرمال هگزان به آن افزوده شد. پس از دو فاز شدن، 15 ml فاز آبی را جدا کرده و 5 ml برای آزمون الایزا (کیت با برند Neogen Europe) برداشته شد.

جهت تخلیص اکرآتوکسین A در روش HPLC، 10 ml مابقی از ستون ایمینوآفینیتی مخصوص اکرآتوکسین با برند Bio TeZ آلمان عبور داده شد. در ادامه پس از عبور 10ml آب مقطر و خشک کردن با فشار هوای مثبت، نهایتاً ستون با عبور 1500 μl متانول- اسید استیک به نسبت حجمی 98 به 2 واجذب شده و پس از رقیق سازی با 1500 μl آب مقطر، ابتدا ورتکس، سپس با PTFE فیلتر و در نهایت به دستگاه HPLC تزریق شد. برای اندازه گیری اکرآتوکسین A از دستگاه

حدود 20 درصد هیچکدام از آفلاتوکسین‌های  $B_1$ ،  $B_2$ ،  $G_1$  و  $G_2$  قابل تشخیص نبوده (ND) و در حدود 80 درصد مابقی نیز فقط آفلاتوکسین  $G_2$  با مقدار ناچیز شناسایی شد. مقدار  $G_2$  شناسایی شده از حداقل 0/010 تا حداکثر 4/726 ppb تشخیص داده شد که به مراتب از حد مجاز در نظر گرفته شده برای مواد غذایی که حداکثر 15 ppb برای آفلاتوکسین توتال در انواع مواد غذایی است، کم‌تر می‌باشند (جدول شماره 1).

در این پژوهش تلاش شد با بهینه سازی روش‌های استخراج نمونه، قابلیت دستگاه الایزا در مقایسه با HPLC (به عنوان Gold Standard) نیز مورد بررسی قرار گیرد. درصد ریکاوری روش آزمون (شامل مرحله استخراج با حلال، مرحله جذب و واجذب از ستون ایمونوآفینیتی) با استفاده از نمونه استاندارد با غلظت مشخص و همچنین نمونه تخم مرغ آغشته به مایکوتوکسین‌ها مورد بررسی قرار گرفت.

نتایج نشان داد، با کاهش درصد متانول محلول عبوری از ستون ایمونوآفینیتی راندمان یا ریکاوری بهبود یافت. در نهایت با استفاده از محلول حاوی متانول 35 درصد بیش‌ترین راندمان (85 درصد) حاصل شد. همچنین به دلیل عدم دسترسی به نمونه CRM، صحت روش به وسیله آغشته کردن نمونه تخم مرغ با محلول استاندارد مورد بررسی قرار گرفت. برای ارزیابی دقت روش آزمون نیز از یک نمونه مشخص 5 بار تکرار صورت گرفت.

همچنین اندازه‌گیری آفلاتوکسین توتال با روش الایزا با کیت Bio-Shield بر روی 15 نمونه مرحله دوم انجام شد. نتایج نشان داد که فقط یک مورد آلوده به آفلاتوکسین توتال می‌باشد که مقدار یافت شده (0/72 میلی‌گرم بر کیلوگرم) از بیشینه رواداری برای آفلاتوکسین توتال در انواع مواد غذایی (15 ppb) بسیار کم‌تر است.

در ادامه میزان اکراتوکسین A در نمونه‌های مرحله دوم، با هر دو روش HPLC و الایزا (با کیت Neogen مورد آنالیز قرار گرفتند (جدول شماره 2). نتایج حاصل از آزمون اکراتوکسین A نشان می‌دهد که میزان

HPLC مجهز به دکتور فلورسانس با طول موج تهییجی 333 nm و طول موج نشری 477nm و ستون با فاز معکوس  $C_{18}$  و کبری سل استفاده شده است. محلول فاز متحرک: 99 حجم آب + 99 حجم استونیتریل + 2 حجم اسید استیک می‌باشد. سرعت جریان: 1 ml/min و حجم تزریق: 100  $\mu$ l انتخاب شد (17). برای اندازه‌گیری اکراتوکسین A به روش الایزا، ابتدا 100 میکرولیتر از کانبجوگیت در هر چاهک قرمز ریخته شد. سپس 100 میکرولیتر از استانداردهای اکراتوکسین ( غلظت‌های 0، 2، 5، 10، 25ppb) به ترتیب از  $A_1$  تا  $E_1$  در چاهک‌های قرمز ریخته شد. 100 میکرولیتر از نمونه‌های آماده شده نیز در مابقی چاهک‌ها ریخته شدند. سه بار محتویات هر چاهک را با کمک سمپلر پر و خالی کرده تا مخلوط شوند. سپس 100 میکرولیتر از هر چاهک برداشته به چاهک‌های سفید محتوی آنتی‌بادی منتقل گردید. پلیت پوشانده و به مدت چند ثانیه تکان داده شد. به مدت 10 دقیقه در دمای اتاق و در محیطی تاریک انکوبیت شد. بعد از 10 دقیقه محتویات چاهک‌ها خارج و 5 بار با آب مقطر شستشو داده شد و 3 بار هم بر روی دستمال کاغذی به صورت وارونه و به آرامی ضربه زده شد. 100 میکرولیتر از سوبسترا به چاهک‌ها اضافه و پلیت پوشانده و به مدت چند ثانیه تکان داده شد. سپس به مدت 10 دقیقه در دمای اتاق و در محیطی تاریک انکوبیت شد. بعد از این مرحله 100 میکرولیتر محلول متوقف‌کننده (stop solution) به هر چاهک اضافه گردید. نتایج در مدت زمان 20 دقیقه بعد از ریخته شدن محلول متوقف‌کننده خوانده شد. جهت رسم منحنی کالیبراسیون برای استانداردهای تزریقی به دستگاه HPLC در گستره غلظت 10، 7/5، 5، 2/5، 1 استفاده شد.

## یافته‌ها

نمونه‌ها پس از آماده‌سازی و استخراج آفلاتوکسین و تخلیص توسط ستون ایمونوآفینیتی، با استفاده از روش HPLC مورد آنالیز قرار گرفتند. که از این تعداد، در

جدول شماره 2: میزان آفلاتوکسین و اکراتوکسین نمونه های تخم مرغ جمع آوری شده در مرحله دوم از سطح توزیع شهرهای بابلسر (B)، قائمشهر (G) و ساری (S) در استان مازندران با استفاده از دستگاه Elisa و HPLC

Elisa (Neogen)		HPLC		Elisa (Bio shield)		#
Ochratoxin	Ochratoxin	Ochratoxin	Aflatoxin Total ppb	Aflatoxin	Total ppb	
ND	ND	ND	ND	ND	S11	1
ND	ND	ND	ND	ND	S12	2
ND	ND	ND	ND	ND	S13	3
ND	ND	0/72	ND	ND	S14	4
ND	ND	ND	ND	ND	S15	5
ND	ND	ND	ND	ND	B11	6
ND	ND	ND	ND	ND	B12	7
ND	ND	ND	ND	ND	B13	8
ND	ND	ND	ND	ND	B14	9
ND	ND	ND	ND	ND	B15	10
ND	ND	ND	ND	ND	G11	11
ND	ND	ND	ND	ND	G12	12
ND	ND	ND	ND	ND	G13	13
ND	ND	ND	ND	ND	G14	14
ND	ND	ND	ND	ND	G15	15

### بحث

با توجه به احتمال آلودگی خوراکی مرغ های تخمگذار صنعتی و همچنین تغذیه طیور خانگی با نان کپک زده، ابتدا 30 نمونه تخم مرغ سنتی و صنعتی از سطح عرضه سه شهر در استان جمع آوری شدند و از لحاظ وجود آفلاتوکسین های گروه B و G توسط روش HPLC مورد آزمایش قرار گرفتند. با توجه به وجود آفلاتوکسین G<sub>2</sub> در تعدادی از نمونه ها که نشان دهنده فعالیت قارچ آسپرژیلوس و وجود آفلاتوکسین در جیره غذایی مرغ های مربوطه می باشد، آزمایش با 15 نمونه جدید از همان شهرها و این بار با هر دو روش الایزا و HPLC تکرار گردید. همچنین به دلیل فراوانی سم قوی و خطرناک اکراتوکسین A در خوراک طیور (که عمدتاً از غلات می باشند)، وجود این سم را که ساختار متیل استری داشته (18) و در حلال های آلی قطبی به خوبی حل می شود، در زرده 15 نمونه تخم مرغ سری دوم مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه سعی شد با توجه به هزینه بالای تامین دستگاه HPLC برای بسیاری از مراکز تحقیقاتی و خدمات آزمایشگاهی، قابلیت روش الایزا به عنوان یک روش جایگزین برای انجام آزمون آفلاتوکسین و اکراتوکسین برای نمونه تخم مرغ مورد بررسی قرار گیرد.

اکراتوکسین در تمامی نمونه ها در هر دو روش غیر قابل تشخیص گزارش شده است. لازم به ذکر است که حد تشخیص (LOD) انواع آفلاتوکسین در دستگاه HPLC برای B<sub>1</sub>، B<sub>2</sub>، G<sub>1</sub> و G<sub>2</sub> به ترتیب 0/0516533، 0/020309009، 0/036064403، 0/004639218 میلی گرم بر کیلوگرم و حد تشخیص HPLC برای اکراتوکسین 0/518679 میلی گرم بر کیلوگرم به دست آمده است. حد تشخیص الایزا برای آفلاتوکسین توتال 1ppb برای کیت Bio-Shield و همچنین حد تشخیص الایزا برای اکراتوکسین 1ppb برای کیت Neogen می باشد.

جدول شماره 1: میزان آفلاتوکسین نمونه های تخم مرغ جمع آوری شده از سطح توزیع شهرهای بابلسر (B)، قائمشهر (G) و ساری (S) در استان مازندران با استفاده از دستگاه HPLC

#	HPLC				
	B <sub>1</sub> (ppb)	B <sub>2</sub> (ppb)	G <sub>1</sub> (ppb)	G <sub>2</sub> (ppb)	
S1	ND	ND	ND	0/063	1
S2	ND	ND	ND	0/043	2
S3	ND	ND	ND	ND	3
S4	ND	ND	ND	0/068	4
S5	ND	ND	ND	ND	5
S6	ND	ND	ND	0/076	6
S7	ND	ND	ND	0/026	7
S8	ND	ND	ND	0/111	8
S9	ND	ND	ND	ND	9
S10	ND	ND	ND	0/072	10
B1	ND	ND	ND	4/726	11
B2	ND	ND	ND	0/522	12
B3	ND	ND	ND	ND	13
B4	ND	ND	ND	0/126	14
B5	ND	ND	ND	0/040	15
B6	ND	ND	ND	0/211	16
B7	ND	ND	ND	ND	17
B8	ND	ND	ND	0/125	18
B9	ND	ND	ND	0/112	19
B10	ND	ND	ND	0/081	20
G1	ND	ND	ND	0/147	21
G2	ND	ND	ND	0/086	22
G3	ND	ND	ND	0/052	23
G4	ND	ND	ND	0/042	24
G5	ND	ND	ND	ND	25
G6	ND	ND	ND	0/051	26
G7	ND	ND	ND	0/059	27
G8	ND	ND	ND	0/101	28
G9	ND	ND	ND	ND	29
G10	ND	ND	ND	ND	30
S11	ND	ND	ND	0/027	31
S12	ND	ND	ND	ND	32
S13	ND	ND	ND	0/056	33
S14	ND	ND	ND	0/065	34
S15	ND	ND	ND	0/037	35
B11	ND	ND	ND	0/026	36
B12	ND	ND	ND	0/030	37
B13	ND	ND	ND	0/031	38
B14	ND	ND	ND	0/045	39
B15	ND	ND	ND	0/033	40
G11	ND	ND	ND	0/024	41
G12	ND	ND	ND	0/024	42
G13	ND	ND	ND	0/086	43
G14	ND	ND	ND	0/040	44
G15	ND	ND	ND	0/063	45

با توجه به نتایج بدست آمده در تعدادی از نمونه‌ها تنها سم آفلاتوکسین  $G_2$  که ضعیف‌ترین سم از این دسته می‌باشد (2) شناسایی گردید، که این امر می‌تواند نشانه متابولیزه شدن سموم خطرناک‌تر در بدن مرغ و تبدیل آن‌ها به اشکال ضعیف‌تر مانند آفلاتوکسیکول باشد (3). مقایسه نتایج حاصل از اندازه‌گیری با روش HPLC با داده‌های به‌دست آمده از روش الیزا می‌تواند نشان‌دهنده این باشد که دقت و حساسیت روش الیزا در حد HPLC نبوده و به‌نظر می‌رسد که کیت‌های مورد استفاده توان تشخیص آفلاتوکسین در مقادیر کم در تخم مرغ را ندارند، اگرچه به نظر می‌رسد تحقیقات پیش‌تری در این خصوص باید انجام پذیرد. نتایج به‌دست آمده با گزارشات حاصل از بررسی‌های پیشین همسو بوده و بیانگر این واقعیت می‌باشد که میزان آلودگی تخم مرغ‌های حاصل از مرغ‌های تخمگذار تغذیه شده با جیره غذایی با احتمال آلودگی، بسیار ناچیز می‌باشد.

نتایج تعدادی از تحقیقات نشان داده است که در تخم مرغ‌های تخمگذار بعد از تغذیه اجباری به مدت 7 روز از جیره‌های آلوده شده به مقادیر زیاد آفلاتوکسین نزدیک به غلظت‌های مسمومیت‌زا که منجر به ایجاد مرگ و میر نیز گردیده است (100-400 قسمت در میلیون)، آفلاتوکسین  $B_1$  (به مقدار 0/2-3/3 قسمت در بیلیون: نسبت انتقال به تخم مرغ = 50000 تا 1320 به 1)، آفلاتوکسیکول و سایر متابولیت‌های آفلاتوکسین به غیر از  $M_1$  دفع کرده‌اند. آفلاتوکسین  $M_1$  فقط در بافت کلیه‌های این مرغ‌ها یافت شد. مدت 7 روز بعد از حذف آفلاتوکسین از جیره، مقادیر ناچیزی از آفلاتوکسیکول در تخم مرغ یافت شد. بقایای آفلاتوکسینی در تخم مرغ با نرخی مشابه با افزایش آن، کاهش پیدا کرد. همچنین، نیمه عمر کل آفلاتوکسین‌های نشان‌دار شده با  $^{14}C$  در بدن مرغ تخمگذار 67 ساعت برآورد شد. کاهش تولید تخم مرغ، کاهش وزن تخم مرغ، افزایش چربی کبد و تغییر برخی شاخص‌های بیوشیمیایی سرم، بارزترین علائم مسمومیت مزمن

آفلاتوکسینی در مرغ‌های تخمگذار گزارش شده است (1,2,6,19,20). مطابق بررسی‌های انجام شده، با تزریق وریدی آفلاتوکسین  $B_1$  نشاندار شده با  $C^{14}$  به جوجه‌های مرغ تخمگذار نیمه عمر پلاسمايي آن 1/5 دقیقه محاسبه شد. این سم به سرعت در صفر ظاهر شده و غلظت آن به 7 برابر مقادیر پلاسما رسید. نسبت ماده نشاندار دفع شده از صفر، ادرار و محتویات روده به ترتیب مقادیر 70، 15 و 15 درصد بود (6). اگرچه آفلاتوکسین در کبد و ماهیچه جوجه‌های تغذیه شده با جیره‌های آلوده (1mg آفلاتوکسین نشان‌دار شده با  $C^{14}$ ) یافت می‌شود، نتایج آزمایشات نشان داده است که در مدت نسبتاً کوتاهی بعد از حذف توکسین از جیره، جوجه‌ها می‌توانند آفلاتوکسین را متابولیزه و از بافت‌های بدنی خود حذف کنند. برای کاهش معنی‌دار بقایای آفلاتوکسینی از بافت‌های خوراکی، 72 ساعت زمان نیاز است (21).

در مرغ‌های تخمگذار دریافت‌کننده جیره آلوده شده با حداقل 500 میکروگرم آفلاتوکسین  $B_1$  در کیلوگرم خوراک، گرچه تولید تخم مرغ تحت تاثیر قرار نگرفت، ولی بقایای آفلاتوکسین  $B_1$  در تخم مرغ یافت شد و نسبت انتقال سم آفلاتوکسین  $B_1$  از خوراک به تخم مرغ معادل 5000 به 1 گزارش شد (11). در تحقیق مشابه دیگری با تغذیه مرغ‌های تخمگذار از سطوح مختلف آفلاتوکسین  $B_1$  (190 تا 965 قسمت در بیلیون) نسبت انتقال آفلاتوکسین  $B_1$  از خوراک به تخم مرغ معادل 1350-450 به 1 محاسبه شد (20). در مطالعه دیگری نیز با تغذیه مرغ‌های تخمگذار از سطوح مختلف آفلاتوکسین  $B_1$  (25 تا 100 قسمت در بیلیون) نسبت انتقال آفلاتوکسین  $B_1$  از خوراک به تخم مرغ معادل 1430-625 به 1 محاسبه شد (3). در بررسی وجود بقایای آفلاتوکسینی در تخم مرغ‌های موجود در سوپرمارکت‌ها مشاهده شده است که تمامی تخم مرغ‌ها حاوی بقایای آفلاتوکسینی نیستند و تنها در درصدی از تخم‌ها ممکن است بقایای آفلاتوکسینی یافت شود

وجود و فعالیت قارچ آسپرژیلوس در جیره غذایی مرغان تخمگذار این سموم در بدن مرغ متابولیزه شده و مقدار بسیار ناچیزی از آفلاتوکسین G<sub>2</sub> که کم خطرترین آن‌هاست وارد تخم مرغ می‌شود. بنابراین مطابق گزارشات حاصل از سایر مطالعات و نتایج حاصل از مطالعه حاضر به نظر می‌رسد که می‌توان تخم مرغ را به عنوان یک منبع غذایی طبیعی، ایمن از لحاظ احتمال آلودگی به مایکوتوکسین‌های گروه B و G و اکراتوکسین و همچنین قابل استفاده برای تمام اقشار جامعه در تمام سنین و با کم‌ترین نگرانی در این خصوص در نظر گرفت.

### سپاسگزاری

این مطالعه با کد طرح 3073 در معاونت محترم تحقیقات و فن آوری دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی مازندران با اخذ کد اخلاق IR.MAZUMS..REC.1397.3073 به تصویب رسیده است و مورد حمایت مالی قرار گرفته است.

### References

- Selamat J, Iqbal SZ. Food safety: Basic concepts, recent issues, and future challenges. Food Saf Basic Concepts, Recent Issues, Futur Challenges. Berlin: Springer; 2016.
- Dhanasekaran D, Shanmugapriya S, Thajuddin N, Panneerselvam A. Aflatoxins and Aflatoxicosis in Human and Animals. Aflatoxins Biochem Mol Biol 2011; 221-254.
- Aly SA, Anwer W. Effect of naturally contaminated feed with aflatoxins on performance of laying hens and the carryover of aflatoxin B1 residues in table eggs. Pakistan J Nutr 2009; 8(2): 181-186.
- Giancarlo B, Elisabetta B, Edmondo C, Valeriana C, Giuseppina T. Determination of ochratoxin A in eggs and target tissues of experimentally drugged hens using HPLC-FLD. Food Chem 2011; 126(3): 1278-1282.
- Shehata AA, Ali H, Ghazali NH. Detection of Aflatoxin and antibacterial residues in different types of table eggs with studying of the effect of heat treatment. BENHA VETER MED J 2014; 27(2): 177-187.
- El-yazeed HA, Hanafy H, Soliman NR, Refai M. Trials for Reducing Aflatoxin B 1 Residues in Chicken Meat and Eggs using a Newly Developed Aflatoxin B 1 Vaccine. 2015; 3(11): 6-14.
- Putt DA, Ding X, Coon MJ, Hollenberg PF. Metabolism of aflatoxin B1 by rabbit and rat nasal mucosa microsomes and purified cytochrome P450, including isoforms 2A10

(30-16 درصد) که ممکن است بر توانایی‌های فردی و وضعیت سلامتی مرغ‌های تخمگذار در خنثی‌سازی سم دلالت کند (5). روش‌های گوناگونی برای اندازه‌گیری آفلاتوکسین در مواد غذایی از قبیل Elisa, TLC و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) با دتکتورهای فلورسانس و MS/MS برای اندازه‌گیری آفلاتوکسین مورد استفاده قرار گرفته است. کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با دتکتورهای فلورسانس از بهترین روش‌ها برای اندازه‌گیری آفلاتوکسین‌های گروه B و G در مواد غذایی می‌باشد (22). سازمان خواربار و کشاورزی ملل متحد (FAO) میزان استاندارد و حد مجاز آفلاتوکسین در مواد غذایی انسان را 5 میکروگرم بر کیلوگرم اعلام نموده که کشور ما نیز از این قانون پیروی می‌کند (23).

نتایج حاصل از بررسی سلامت تخم مرغ‌های جمع‌آوری شده از سطح استان مازندران نشان داد که تعدادی از نمونه‌ها تنها حاوی مقادیر بسیار کم آفلاتوکسین G<sub>2</sub> می‌باشند که نشان می‌دهد علی‌رغم احتمال بالای

- and 2A11. *Carcinogenesis* 1995; 16(6): 1411-1417.
8. Wacoo AP, Wendi D, Vuzi PC, Hawumba JF. Methods for Detection of Aflatoxins in Agricultural Food Crops. *J Appl Chem* 2014; 2014: 1-15.
  9. Pal M, Gizaw F, Abera F, Shukla PK, Hazarika RA. Mycotoxins : A growing concern to human and animal health. *Beverage Food world* 2015; 42(5): 42-50.
  10. Pourelmi MR, Palizdar MH, Shirali S, Barami AR. Aflatoxin B1 contamination in local and industrial eggs measured by ELISA technique in Mazandaran. *Europ J Zoological Res* 2013; 2(6): 89-92.
  11. Oliveira CA, Kobashigawa E, Reis TA, Mestieri L, Albuquerque R, Correa B. Aflatoxin B1 residues in eggs of laying hens fed a diet containing different levels of the mycotoxin. *Food Addit Contam* 2000; 17(6): 459-462.
  12. Curtui VG, Gareis M, Usleber E, Märtilbauer E. Survey of Romanian slaughtered pigs for the occurrence of mycotoxins ochratoxins A and B, and zearalenone. *Food Addit Contam* 2001; 18(8): 730-738.
  13. Petzinger E, Weidenbach A. Mycotoxins in the food chain: The role of ochratoxins. *Livestock Product Sci* 2002; 76(3): 245-250.
  14. Smolders L, DeWit NJW, Balvers MGJ, Obeid R, Vissers MMM, Esser D. Natural choline from egg yolk phospholipids is more efficiently absorbed compared with choline bitartrate; outcomes of a randomized trial in healthy adults. *Nutrients* 2019; 11(11).
  15. Melough MM, Chung SJ, Fernandez ML, Chun OK. Association of eggs with dietary nutrient adequacy and cardiovascular risk factors in US adults. *Public Health Nutr* 2019; 22(11): 2033-4042.
  16. 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. (2011); ISIRI, NO.6872. 1<sup>st</sup> Revision. (Persian).
  17. Institute of standards and Industrial Research of Iran. Foodstuffs-Cereal and cereal's products-Determination of ochratoxin A by HPLC method and immunoaffinity column clean up-Test method; ISIRI, NO.9238. 1<sup>st</sup> ed. Institute of Standards and Industrial Research of Iran; 2010. (Persian).
  18. Ringot D, Chango A, Schneider YJ, Larondelle Y. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. *Chem Biol Interact* 2006; 159(1): 18-46.
  19. Sawhney DS, Vadehra DV, Baker RC. The metabolism of 14C aflatoxins in laying hens. *Poult Sci*. 1973; 52(4): 1302-1309.
  20. Wolzak A, Pearson AM, Coleman TH, Pestka JJ, Gray JJ. Aflatoxin deposition and clearance in the eggs of laying hens. *Food Chem Toxicol* 1985; 23(12): 1057-1061.
  21. Obioha WI, Stahr HM, Kraft AA. Distribution and effects of aflatoxin in chicken tissues after feeding radiolabeled (14C) aflatoxin B1. *J Food Prot* 1986; 49(10): 799-805.
  22. Houshyarfard M, Javadi D. The *Aspergillus flavus* susceptibility of hazelnut varieties (*Corylus avellana* L.) in laboratory conditions. *J Nuts* 2018;9(2): 181-188 (Persian).
  23. Alshannaq A, Yu JH. Occurrence, toxicity, and analysis of major mycotoxins in food. *Int J Environ Res Public Health* 2017; 14(6): 623.