



الجمهورية العربية السورية
وزارة التعليم العالي والبحث العلمي
جامعة دمشق
كلية الهندسة الزراعية
قسم علوم الأغذية

تعيين محتوى الأوكراتوكسين في بعض الأغذية الملوثة وتأثير أشعة الميكروويف في انخفاضها

رسالة أعدت لنيل درجة الماجستير في الهندسة الزراعية

(قسم علوم الأغذية)

إعداد المهندس : حسن عبد الكريم دنيا

بإشراف

المشرف المشارك

المشرف العلمي

الدكتور جهاد التل

الأستاذ الدكتور أنور الحاج علي

دكتوراه في كيمياء وتحليل الأغذية

أستاذ في قسم علوم الأغذية

وزارة التجارة الداخلية وحماية المستهلك

كلية الهندسة الزراعية - جامعة دمشق

تصريح

أُصِرَّحَ بأنَّ البحث الموصوف في هذه الرّسالة تحت عنوان :

" تعيين محتوى الأوكراتوكسين في بعض الأغذية الملوثة وتأثير أشعة الميكروويف في انخفاضها " ، لم يُسبق أن قُدِّمَ للحصول على أيّة درجة جامعية أُخرى، وغير مُقدّم حالياً لذلك، وأنّ كافة العمل، والنتائج المذكورة هي جهودِي الشّخصية، وبتوجيه من المُشرف العلمي والمُشرف المشارك، وأنّ المراجع التي ذُكرت في الرّسالة تُسبّط إلى مصادرها ضمن النّص وفي قائمة المراجع.

المُرشّح

حسن عبد الكريم دنيا

Declaration

To whom it may concern: I declare that the present research work entitled

" Determination the content Ochratoxin in some contaminated foods and the effect of microwave radiation on its decrease" is a new research work, and has neither been already accepted for any degree, nor has been submitted concurrently for any other degree. All the mentioned results are my own efforts and done by direct supervision of my guides. All the referred literature was cited, and well-documented in the list of references.

Candidate

Hasan Abd Alkarem Dounea

شهادة

نشهد بأن العمل الموصوف في هذه الرسالة :

" تعيين محتوى الأوكراتوكسين في بعض الأغذية الملوثة وتأثير أشعة الميكروويف في انخفاضها " ، جاء نتيجة بحثٍ علميٍّ قام به المرشح حسن عبد الكريم دنيا بإشراف الدكتور أنور الحاج علي الأستاذ في قسم علوم الأغذية، كلية الهندسة الزراعية - جامعة دمشق، والدكتور جهاد التل دكتور في مديرية المواصفات الفنية والمخابر لدى وزارة التجارة الداخلية وحماية المستهلك، وأنّ المراجع المستخدمة في هذه الرسالة موثقة أصولاً ضمن النصّ.

المُشرف المشارك

المُشرف العلمي

المرشح

د. جهاد التل

أ. د. أنور الحاج علي

م. حسن عبد الكريم دنيا

Certificate

It is hereby certificated that the work described in this thesis:

" Determination the content of Ochratoxin in some contaminated foods and the effect of microwave radiation on its decrease " is the result of the scientific research done by candidate Hasan Abd Alkarem Dounea under the supervision of Prof. Anwar Alhaj Ali, Food Science Department, Faculty of Agriculture Engineering, Damascus University, and Prof. Jihad Altal In Technical Affairs and Quality Laboratory, Damascus, Syria, and any reference to other research works has been duly acknowledged in the text.

Candidate

Eng. Hasan Abd Alkarem Dounea

Supervision

Prof. Anwar Alhaj Ali

Co - supervision

Prof. Jihad Altal

قُدِّمَتْ هذه الرسالة استكمالاً لمتطلبات نيل درجة الماجستير في قسم علوم الأغذية في كلية الهندسة الزراعية - جامعة دمشق، وأُجيزَتْ من السَّادة أعضاء لجنة الحكم.

This thesis has been submitted as partial fulfillment of the requirements for the Master Degree in Department of Food sciences, Faculty of Agriculture Engineering - Damascus University. The thesis has been approved by referee committee.

نوقشت هذه الرسالة بتاريخ 2023 / 7 / 6

لجنة الحكم على الرسالة:

أ.د. محمد محمد

الأستاذ في قسم علوم الأغذية - كلية الهندسة الزراعية - جامعة دمشق

أ.د. جهاد سمعان

الأستاذ المساعد في قسم علوم الأغذية - كلية الهندسة الزراعية - جامعة دمشق

أ.د. أنور الحاج علي

الأستاذ في قسم علوم الأغذية - كلية الهندسة الزراعية - جامعة دمشق

كلمة الشكر

بسم الله الرحمن الرحيم

﴿ وَلَقَدْ آتَيْنَا دَاوُودَ وَسُلَيْمَانَ عِلْمًا وَقَالَا الْحَمْدُ لِلَّهِ الَّذِي فَضَّلَنَا عَلَى كَثِيرٍ مِّنْ عِبَادِهِ

الْمُؤْمِنِينَ ﴾ { سورة النمل : 15 }

الحمد لله عز وجل الذي وفقنا لإتمام هذا البحث ومنحنا الصحة والعافية والعزيمة.

الأساتذة المشرفين

وفاء ليد مدت للعون ولنفس جادت بالكرم وتحلت بالعطاء، إلى الذين تبناوا هذا المشروع منذ أن كان في المهد فكرة إلى أن أصبح المحتوى كتاباً، إلى أساتذتي الكرام الأستاذ الدكتور أنور الحاج علي والدكتور جهاد النل، كل الشكر لقبولهما الإشراف على هذه الرسالة وكل ما قدماه من توجيه ونصح لي.

الأساتذة أعضاء لجنة الحكم

الأستاذ الدكتور محمد محمد، الأستاذ الدكتور أنور الحاج علي، الأستاذ الدكتور جهاد سمعان الذين تكبدوا العناء لتحكيم هذه الرسالة والمشاركة في المناقشة وإبداء الملاحظات والتوجيهات الحكيمة، كما يسعني أن أتقدم بالشكر لعميد كلية الهندسة الزراعية الأستاذة الدكتورة عفراء سلوم.

الإهداء

اللهم لك الحمد حمداً كثيراً طيباً مباركاً كما ينبغي لجلال وجهك وعظيم سلطانك.

* * *

إلى رَجُلِي الأول، إلى أعظم رجال الكون، إلى من كان لي قدوة وعلمي أن أكون قدوة
..... أبي الغالي

* * *

إلى من علمتني أن الحب ليس له عمر، وأن العطاء ليس له حدود، إلى من نسجت من دعائها
منديل رجاء يهون لي دربي، إلى من هي أجمل من الحب وأغلى من الصحة
وأعز من الحياة أُمِّي الغالية

* * *

إلى من تطلعوا إلى نجاحي بنظرات الأمل، إلى من شجعوني على مواصلة درب العلم إلى
من أرى مستقبلي بعيونهم، إلى من أتعامل بوجودهم ... إلى ضلعي الثابت إخوتي

* * *

إلى زهور رافقتي بعمر الزهور، إلى رفاق الروح، إلى من عرفت كيف أجدهم وعلموني
ألا أضيعهم، إلى من تشاركت معهم الضحكات وصعوبة الأيام أحلام ، أُمِّي ، آيلا

* * *

إلى الروح التي لم تفارقني دعواتها يوماً ولن أنساها من دعائي ... جِدتِي رحمها الله

* * *

إلى كل من وقف معنا في ظل هذه الظروف الصعبة، إلى كل من ساندنا ودعّمنا للوصول
لهذه الدرجة، إلى كل من ترك بصمة في حياتنا، إلى كل صاحب فضل.

إليكم جميعاً

* * *

المهندس : حسن عبد الكريم دنيا

فهرس المحتويات Table of Content

الرقم	العنوان	رقم الصفحة
	الملخص العربي	i
الفصل الأول : المقدمة		
1	المقدمة	1
	• مشكلة البحث	2
	• تساؤلات البحث	2
	• فرضيات البحث	3
	• مسلمات البحث	3
	• أهداف البحث	4
	• أهمية موضوع البحث	4
	• مسوغات البحث	4
	• حدود البحث	5
الفصل الثاني : الدراسة المرجعية		
2	الدراسة المرجعية	7
	2 - 1 تعريف السموم الفطرية وتحديدھا في الأغذية	7
	2 - 2 التركيب الكيميائي للأوكراتوكسين A (OTA)	8
	2 - 3 تلوث الأغذية والأعلاف بالأوكراتوكسين A	10
	2 - 4 التأثيرات الصحية الضارة للأوكراتوكسين A على الإنسان والحيوان	12
	2 - 5 العوامل المؤثرة في إنتاج Ochratoxin A (OTA)	19

21	2 - 6 الطرائق التحليلية المستخدمة في تقدير Ochratoxin A	
21	1-6-2 كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) Thin layer chromatography	
22	2-6-2 تقانة التحليل المناعي المرتبط بالأنزيم (ELISA)	
22	3-6-2 جهاز الكروماتوغرافيا السائلة ذات الأداء العالي (HPLC)	
23	2 - 7 طرائق خفض الأوكراتوكسين A في الأغذية	
24	1-7-2 استخدام البلازما الجوية الباردة (CAP)	
26	2-7-2 استخدام البولي فينولات و الفلافونيدات	
27	3-7-2 استخدام الزيوت العطرية الطبيعية (NEOs)	
28	4-7-2 استخدام المواد المغناطيسية والجسيمات النانوية	
29	5-7-2 استخدام الأشعة المؤينة وأشعة الميكروويف	
الفصل الثالث : مواد البحث وطرائقه		
32	مواد البحث وطرائقه	3
32	1-3 جمع العينات	
32	2-3 الأجهزة والمواد المستخدمة	
33	3-3 طرائق تحاليل الكروماتوغرافيا	
33	1-3-3 تحضير المحلول القياسي الأم ومحاليل العمل القياسية	
34	2-3-3 تعيين الشروط المثلى لتقدير الأوكراتوكسين A بواسطة HPLC	
36	4-3 تحضير عينات الطحين والأرز والقهوة الخضراء لاستخلاص Ochratoxin A	
36	5-3 تحضير عينات القهوة المحمصة والمطحونة لاستخلاص Ochratoxin A	
37	6-3 تعريض عينات الطحين والزيرو والقهوة بأنواعها لأشعة الميكروويف	
37	7-3 التحليل الإحصائي والنتائج	

الفصل الرابع: النتائج والمناقشة		
4	النتائج و المناقشة	39
	1-4 تعيين زمن ظهور OTA باختلاف نسب مكونات الطور الحامل	39
	2-4 الخطية	41
	3-4 حد الكشف وحد التقدير الكمي	42
	4-4 التكرارية	42
	5-4 الإحكام الوسطي	43
	6-4 الاسترجاع	44
	7-4 نتائج تقدير الأوكراتوكسين A في عينات الطحين	44
	8-4 نتائج تقدير الأوكراتوكسين A في عينات الأرز	45
	9-4 نتائج تقدير الأوكراتوكسين A في عينات القهوة	47
	10-4 نتائج تأثير أشعة الميكروويف في خفض OTA في عينات الطحين الزيرو	48
	11-4 نتائج تأثير أشعة الميكروويف في خفض معدل تركيز الأوكراتوكسين A مع الزمن في حجم حبيبات القهوة.	50
الفصل الخامس : الاستنتاجات والتوصيات		
5	1-5 الاستنتاجات	53
	2-5 التوصيات	54
الفصل السادس : المراجع		
6	قائمة المراجع	56
	الملخص الأجني (Abstract)	ii

فهرس الجداول

رقم الصفحة	العنوان	رقم الجدول
10	الرقم الكيميائي والصيغة الجزيئية والكتلة الجزيئية لأنواع الأوكراتوكسين	1
14	ملخص المدخول الأعلى الذي يمكن تحمله من OTA بحسب المنظمات الدولية	2
40	اختلاف زمن ظهور OTA باختلاف نسبة مكونات الطور الحامل	3
42	حد التقدير الكمي وحد الكشف لـ OTA	4
42	تكرارية تركيز الأوكراتوكسين A القياسي بين المحلول القياسي والمقاس فعلياً	5
43	الإحكام الوسطي لحقن الأوكراتوكسين A القياسي لمدة 9 مرات خلال 3 أيام	6
44	النسبة المئوية للاسترجاع تركيز الأوكراتوكسين A في عينات الأرز والطحين والقهوة	7
45	كمية الأوكراتوكسين A في عينات أنواع الطحين في السوق السورية	8
46	كمية الأوكراتوكسين A في عينات أصناف الأرز من الشركات المستوردة في السوق السورية	9
48	كمية الأوكراتوكسين A في عينات أنواع حبوب القهوة من الشركات المستوردة في السوق السورية	10
49	تأثير أشعة الميكروويف في خفض تراكيز الأوكراتوكسين A مع الزمن في عينات الطحين الزيرو	11
51	تأثير أشعة الميكروويف في خفض معدل تركيز الأوكراتوكسين A مع الزمن في حجم حبيبات القهوة الملوثة بتركيز 100 ميكروغرام/كغ	12

فهرس الأشكال

رقم الشكل	العنوان	رقم الصفحة
1	التركيب الكيمائي للأوكراتوكسينات (A ، B ،C)	9
2	مخطط الكروماتوغرام لزمن ظهور (OTA) بتركيز 10 ميكروغرام / لتر في زمن 5.80 دقيقة	40
3	خطية منحنى المعايرة (OTA) القياسي باستخدام كاشف الفلورة	41
4	تأثير أشعة الميكروويف في تركيز Ochratoxin A في عينات الطحين الزيرو	50
5	تأثير أشعة الميكروويف في خفض معدل تركيز الأوكراتوكسين A مع الزمن في حجم حبيبات القهوة الملوثة بتركيز 100 ميكروغرام/ كغ	51

قائمة المصطلحات والاختصارات List Of Terminologies And Acronyms

المختصر	In English	المعنى العربي
AA	Aristolochic Acid	حمض الأرستولوكيك
AFB1	Aflatoxin B1	سم افلاتوكسين B1
AFB2	Aflatoxin B2	سم افلاتوكسين B2
AME	Alternariol Monomethyl Ether	إيثر أحادي ميثيل التيرناريول
AOH	Alternariol	ألتيراريول
BEN	Balkan Endemic Nephropathy	مرض اعتلال الكلية المتوطن في البلقان
CAP	Cold Atmospheric Plasma	البلازما الجوية الباردة
CIN	Chronic Interstitial Nephropathy	مرض اعتلال الكلية الخلالي المزمن
DNA	DeoxyriboNucleic Acid	الحمض النووي الريبى منقوص الأوكسجين
DON	Deoxynivalenol	الديوكسيني فالينول
ELISA	Enzyme-Linked Immunoabsorbent Assay	تقانة التحليل المناعي المرتبط بالأنزيم
EFSA	European Food Safety Authority	هيئة سلامة الأغذية الأوروبية
FAO	Food and Agriculture Organization	منظمة الأغذية والزراعة العالمية
HPLC	High-Performance liquid Chromatography	الكروماتوغرافيا السائلة ذات الأداء العالي

IARC	International Agency for Research on Cancer	الوكالة الدولية للأبحاث على السرطان
JECFA	The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives	لجنة الخبراء المشتركة بين منظمة الأغذية ومنظمة الصحة العالمية المعنية بالمواد المضافة إلى الأغذية
LOAEL	Lowest Observed Adverse Effect Level	أدنى مستوى ملاحظ للتأثير السلبي
LOD	Limit of Detection	حد الكشف
LOQ	Limit of Quantification	حد التقدير الكمي
NCRI	Negligible Cancer Risk Intake	المدخول الذي لا يؤدي إلى الإصابة بالسرطان
NEOs	Natural essential oils	الزيوت العطرية الطبيعية
NOAEL	No Observed Adverse Effect Level	عدم ملاحظة أي مستوى من التأثير السلبي
OTA	Ochratoxin A	سم أوكراتوكسين A
OTB	Ochratoxin B	سم أوكراتوكسين B
OTC	Ochratoxin C	سم أوكراتوكسين C
PBS	Phosphate Buffer solutions	محلول الفوسفات الموقفي
PTDI	Provisional Tolerable Daily Intake	المدخول اليومي المؤقت المسموح به
PTWI	Provisional Tolerable Weekly Intake	المدخول الأسبوعي المؤقت المسموح به
RF	Fluorescence detector	كاشف الفلورة
RONS	Reactive Oxygen Nitrogen Species	مركبات الأوكسجين والنيتروجين النشطة
RSD	Relative Standard Deviation	الانحراف المعياري النسبي

SCF	Scientific Committee on Food	اللجنة العلمية على الغذاء
SD	Standard Deviation	الانحراف المعياري
SEN	Selenium Nanoparticles	جسيمات السيلينيوم النانوية
SLN	Silver and solid Lipid Nanoparticles	الجسيمات النانوية الفضية
SPE	Soild Phase Extraction	الاستخلاص بالطور الصلب
SPSS	Statistical Package for Social Sciences	الحزمة الإحصائية للعلوم الاجتماعية
TDI	Tolerable Daily Intake	المدخول اليومي المسموح به
TLC	Thin layer chromatography	كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة
WHO	World health organization	منظمة الصحة العالمية
ZEN	Zearalenone	سم الزيرالينون
ZON	Zinc Oxide Nanoparticle	الجسيمات النانوية لأكسيد الزنك

الملخص

جُمعت عينات عشوائية من شركات مختلفة من أنواع الطحين (الزير و الموحّد والمستورد) و من عدة مطاحن، وأنواع الأرز (الهندي والمصري والأمريكي والإسباني) وأنواع القهوة الخضراء والمحمصة والمطحونة لبعض الشركات المشهورة محلياً و بمعدل 6 مكررات لكل عينة خلال أعوام من 2020 وحتى 2022 من السوق المحلية لتعيين محتوى الأوكراتوكسين A فيها وذلك باختيار الزمن الأفضل لتقدير الأوكراتوكسين A بواسطة الكروماتوغرافيا السائلة ذات الأداء العالي (HPLC) وتأثير أشعة الميكروويف في تقليل محتوى الأغذية الملوثة بالأوكراتوكسين A. بينت النتائج بأن الطور الحامل المؤلف من الماء و الميثانول و الأسيتونتريل وحمض الخل الثلجي بنسبة (60 : 19 : 19: 2) قد أعطى أفضل زمن لخروج المركب مع ضمان الاحتفاظ بصلاحية العمود لمدة 7 أشهر مقارنة مع النسب الأخرى لطور المتحرك. وكان التدفق المناسب 1 مل / دقيقة كافياً لإعطاء ذروة مثالية من Ochratoxin A (OTA) في زمن (5.80) دقيقة. وكان محتوى طحين الزير و الطحين الموحّد و الطحين المستورد من OTA قد بلغ في حده الأعلى 0.125 ميكروغرام / كغ في الشركة B. بينما كانت حبوب القهوة الخضراء في حدها الأعلى 0.130 ميكروغرام / كغ في قهوة موكا مقارنة مع القهوة الكولومبية والقهوة البرازيلية. أما حبوب الأرز فكانت في حدها الأعلى في الشركة F بقيمة 0.130 ميكروغرام / كغ للأرز الإسباني. وكانت جميع قيم مكونات OTA ضمن حدود المواصفة القياسية السورية والسوق الأوروبية المشتركة. كما بينت نتائج تأثير أشعة الميكروويف في تقليل محتوى OTA بأن انخفاضه يبدأ فعلياً وبشكل تدريجي بزمن تعرض من 6 دقائق تسخين وحتى 10 دقائق عند طاقة 100% من التردد البالغ 2450 ميغا هرتز للميكروويف.

الكلمات المفتاحية: أوكراتوكسين A، HPLC، أنواع الطحين، حبوب الأرز، حبوب القهوة، أشعة الميكروويف .

الفصل الأول

المقدمة

INTRODUCTION

1 - 1 المقدمة Introduction :

تعرف الميكوتوكسينات بأنها مركبات بيولوجية تنتجها مجموعة من الفطريات والتي لها القدرة على إنتاج مركبات أضرار ثانوية عندما تنمو على بيئة مناسبة لها، وهي مركبات نشطة بيولوجياً تدفع الجسم الحي لتكوين أجسام مضادة لها، وأغلبها سام للإنسان والحيوان والنبات والكائنات الحية الدقيقة لذلك يطلق عليها اسم Mycotoxin أي السموم الفطرية.

تنتقل السموم الفطرية إلى طعام الإنسان والحيوان عن طريق تلوث الغذاء أو الطعام المقدم بالفطر المفرز لهذه السموم ويسمى ذلك بالتلوث المباشر إذ تشجع المادة الغذائية على نمو الفطر سواء في أثناء مراحل الإنتاج أو في أثناء نقله أو تخزينه. أو قد يكون التلوث غير مباشر نتيجة تلوث مكونات المادة الغذائية بالميكوتوكسين لحيوانات سبق تغذيتها على أعلاف ملوثة بالسموم الفطرية.

يوجد أربعة أنواع من الفطور قادرة على إنتاج السموم على مستوى العالم وهي الأسبرجيليس (*Aspergillus Spp*) والفيوزاريوم (*Fusarium Spp*) والبنسليوم (*Penicillium Spp*) والكلافيسيس (*Claviceps Spp*) والتيرناريا حديثاً من الأرجنتين.

تم التعرف على حوالي 500 نوع من السموم الفطرية حالياً وبلا شك يوجد العديد من الأنواع سوف يتم اكتشافها في المستقبل القريب، ومن أشهر أنواع السموم الفطرية هي كالتالي: الأفلاتوكسينات Aflatoxins والزيروالينون Zearalenone و التراي كوشين Trichothecene و السترينين Citrinin و الباتولين Patulin والأوكراتوكسين Ochratoxin بأنواعه الثلاثة.

ميزت ثلاثة أنواع من سموم الأوكراتوكسين (Ochratoxin A (OTA)، Ochratoxin B (OTB)، Ochratoxin C (OTC) والتي تلوث بذور حبوب القمح والذرة والمحاصيل الزيتية وحبوب القهوة ومنتجاتها.

تتميز سموم الأوكراتوكسين بأنها ذات أوزان جزيئية منخفضة، ولها القدرة على الوصول إلى الهدف (منطقة التأثير داخل الجسم) ، وتكون سرعة التخلص منها عن طريق الجهاز الهضمي أقل من سرعة

امتصاصها من قبل الجسم ولا يمكن التخلص منها بسهولة عن طريق عملية الإخراج أو التبرز، كما أن لها القابلية على التجمع في الأنسجة المختلفة.

تعد سموم الأوكراتوكسين قليلة الذوبان في الماء والهيدروكربونات وقابلة للذوبان في الميثانول والأسيتون والكلوروفورم، وتكون غير مستقرة نسبياً في الضوء والهواء وخاصة في الأشعة فوق البنفسجية وفي ظروف الأكسدة وفي محاليل ذات pH أقل من 3 وأكثر من 10. يتحلل الأوكراتوكسين في درجة حرارة 250 م°، ويتحطم بالكامل بالتعقيم بوجود الأمونيا.

• مشكلة البحث :

نظراً لأهمية منتجات الحبوب (الطحين وأنواعه) والأرز وأصنافه والقهوة ومنتجاتها في تغذية الإنسان اليومية كوسيلة لمصادر الطاقة والفيتامينات والعناصر المعدنية، فلا بد من معرفة ملوثاتها بالسموم الفطرية (الأفلاتوكسينات و الأوكراتوكسينات كحالة خاصة) بسبب تزايدها في تلك المنتجات نتيجة تخزينها السيئ والتي تؤدي إلى ضرر صحي وخاصة OTA المسبب للفشل الكلوي، فلا بد من إيجاد طريقة لتحديد كمياتها في تلك المنتجات وتأثير أشعة الميكروويف في انخفاضها، فقد توخينا من خلال هذا البحث تسليط الضوء على تعيين مستويات OTA في منتجات الحبوب (الطحين وأنواعه) والأرز وأصنافه والقهوة ومنتجاتها وتأثير أشعة الميكروويف في انخفاضها.

• تساؤلات البحث :

1. هل تتواجد سموم الأوكراتوكسين A في الطحين وأنواعه والأرز وأصنافه والقهوة المستوردة بأنواعها ؟
2. ما هي التراكيز المسموح بها في الأغذية وحدودها في المواصفات القياسية السورية والأوربية ؟
3. كيف يمكن تقديرها في الكروماتوغرافيا السائلة ذات الأداء العالي وتعديل الطريقة للوصول إلى الزمن الدقيق لتحديد تركيزها بتغيرات الطور المتحرك ؟

4. كيف يمكن تخفيف تركيز الأوكراتوكسين A في الأغذية بطريقة سهلة واقتصادية باستخدام أشعة الميكروويف ؟

• فرضيات البحث :

إمكانية إيجاد طريقة معدلة لتعيين مستويات OTA ضمن الظروف الحالية محلياً في منتجات الحبوب (الطحين وأنواعه) والأرز وأصنافه والقهوة ومنتجاتها بواسطة HPLC مع إمكانية تخفيض مستوياتها باستخدام أشعة الميكروويف.

• مسلمات البحث :

1. تُعد منتجات الحبوب (الطحين والأرز) من أكثر المنتجات الرئيسية استعمالاً في تغذية الإنسان وذات أهمية كبيرة في إنتاج الأغذية وهي عُرضة للإصابة بالفطريات سواء بالإنتاج أو التخزين.
2. تعد القهوة من أكثر المشروبات استهلاكاً على نطاق واسع في العالم وخصوصاً في سورية.
3. لا تتوفر معلومات محلية كافية في سورية عن كميات سموم الأوكراتوكسين A المتواجدة في المنتجات المستوردة من الحبوب (الطحين وأنواعه) وحبوب القهوة (أنواعها ومنتجاتها) وحبوب الأرز وأصنافه.
4. صعوبة تقدير الأوكراتوكسين A وتحديد الإشارة لزمن خروج المركب بالكروماتوغرافيا السائلة ذات الأداء العالي بتغير ظروف الطور المتحرك.
5. تعيين مستوى الأوكراتوكسين A في المنتجات الغذائية المستهلكة في سورية ومدى مطابقتها للمواصفة القياسية السورية والمواصفات الأوروبية.
6. لا تتوفر معلومات عن تأثير أشعة الميكروويف في خفض مستوى الأوكراتوكسين A.

• أهداف البحث :

1. تطوير طريقة لتقدير الأوكراتوكسين A في الأغذية الملوثة بواسطة الكروماتوغرافيا السائلة ذات الأداء العالي والمزود بمطياف تألقي.
2. تعيين مستوى الأوكراتوكسين A في بعض الأغذية الملوثة (الطحين، الأرز والقهوة بأنواعها).
3. تأثير أشعة الميكروويف في تقليل محتوى الأغذية الملوثة بالأوكراتوكسين A.

• أهمية موضوع البحث :

نظراً لأهمية منتجات الحبوب (الطحين وأنواعه) والأرز وأصنافه والقهوة ومنتجاتها في غذاء الشعب السوري واعتماده بشكل خاص على منتجات الحبوب (الطحين وأنواعه) والأرز وأصنافه في غذائه اليومي وكذلك القهوة ومنتجاتها باستخداماتها اليومية فلا بد من معرفة مقدار تلوثها بالميكوتوكسينات وخاصة OTA مع معرفة طرائق تخفيض مستوياتها باستخدام أشعة الميكروويف.

• مسوغات البحث :

نظراً لارتفاع مستويات المايكوتوكسينات وخاصة OTA في منتجات الحبوب (الطحين وأنواعه) والأرز وأصنافه والقهوة ومنتجاتها وعدم معرفة تراكيزها في تلك المواد المخزنة أو المستوردة إلى الجمهورية العربية السورية وعدم توفر معلومات علمية محلية في سورية عن كميات سموم الأوكراتوكسين المتواجدة في منتجات الحبوب (الطحين وأنواعه) والأرز وأصنافه وحبوب القهوة (أنواعها ومنتجاتها) على الرغم أن المواصفة القياسية السورية قد حددت الحدود القصوى لتواجدها بحسب المواصفات الأوروبية إلا أنها تفتقر إلى طريقة لتحديد المحتوى منها كمياً في المنتجات المحلية والمستوردة فقد هدف هذا البحث إلى تعديل طريقة لتعيين محتوى الأوكراتوكسين A في بعض الأغذية الملوثة بواسطة الكروماتوغرافيا عالية الأداء وتأثير أشعة الميكروويف في انخفاضها.

• حدود البحث :

- أُمنّت المواد الأولية اللازمة للبحث (الطحين ومنتجاته) و (الأرز وأصنافه) والقهوة ومنتجاتها من شركات مختلفة منتجة في سورية ومستوردة عام 2020 حتى 2022 م .
- جُمعت الدراسة المرجعية خلال أشهر تشرين الأول وتشيرين الثاني وكانون الأول لعام 2020 م.
- تم شراء محاليل أوكراتوكسين A القياسية ومحاليل الطور المتحرك وأعمدة مناعية من شركات عالمية خلال شهر حزيران 2020 م .
- حُضرت محاليل العمل القياسية ومحاليل الطور المتحرك خلال شهر أيلول 2020 م .
- عُيّن الطور المتحرك المناسب لتقدير OTA بنهاية شهر كانون الأول 2020 م .
- عُيّن تركيز أوكراتوكسين A في عينات الطحين المحلية والمستوردة في شهر شباط 2021 م .
- عُيّن تركيز أوكراتوكسين A في عينات الأرز المستوردة في شهر حزيران 2021 م .
- عُيّن تركيز أوكراتوكسين A في عينات القهوة المستوردة في شهر تشرين الأول 2021 م .
- دُرِس تأثير أشعة الميكروويف على عينات طحين الزيرو خلال شهر شباط 2022 م .
- نُشرت مقالة في مجلة جامعة دمشق للعلوم الزراعية بتاريخ شهر نيسان 2022 م .
- دُرِس تأثير أشعة الميكروويف على عينات الأرز والقهوة خلال شهر حزيران وتموز 2022 م .
- تَمّت مناقشة النتائج وتحليلها إحصائياً ما بين آب وحتى كانون الأول من عام 2022 م .
- كُتبت الأطروحة ما بين شهر كانون الثاني وآذار عام 2023 م .

الفصل الثاني

الدراسة المرجعية

LITERATURE REVIEW

2 - الدراسة المرجعية : Literature review

2 - 1 تعريف السموم الفطرية وتحديدتها في الأغذية :

تُشكل السموم الفطرية مصدر قلق عالمي كبير وتحدياً كبيراً لسلامة الأغذية بسبب آثارها الضارة، ويظن أن يكون انتشارها في المحاصيل الغذائية في حدود 80 - 60 % وقد وجد أن أكثر من 932 مليون دولار أمريكي من الخسائر المالية السنوية في السلع الزراعية المبلغ عنها عالمياً ملوثة بالسموم الفطرية (Adebo et al., 2021; Moretti et al., 2019) .

تُعد السموم الفطرية نواتج أيضية ثانوية تنتجها مجموعة متنوعة من الفطريات الخيطية، بما في ذلك الأنواع من أجناس *Aspergillus* ، *Fusarium* ، و *Penicillium* ، و *Alternaria* ، و *Claviceps* التي تنمو في ظل ظروف مناخية مختلفة على السلع الزراعية (Sofia et al., 2011). قدرت منظمة الأغذية والزراعة العالمية (FAO) أن ما يصل إلى ربع المحاصيل الغذائية في العالم ملوثة بشكل كبير بالمستقلبات الثانوية السامة بدرجات مختلفة (Awad, et al, 2012) .

تتنتمي الأوكراتوكسينات إلى عائلة من المستقلبات الفطرية الثانوية المتشابهة بنيوياً والتي تنتجها سلالات مختلفة من فطريات *Penicillium* و *Aspergillus* (Rosa et al., 2008). مُيزت ثلاثة أنواع من سموم الأوكراتوكسين *Ochratoxin A* (OTA) و *Ochratoxin B* (OTB) و *Ochratoxin C* (OTC) والتي تُلوّث بذور حبوب القمح والذرة والمحاصيل الزيتية وحبوب القهوة ومنتجاتها (Bittencourt et al., 2005, 117) .

يُعد الأوكراتوكسين *Ochratoxin A* (OTA) هو المستقلب الأكثر شيوعاً والأكثر خطورة ، لأنه عامل سام للكلية ومسرطن (Rosa et al., 2008). بالإضافة إلى ذلك، فإن تعرض الإنسان لمدة طويلة للوجبات الغذائية الملوثة بالأوكراتوكسين A يؤدي إلى عدد من المشكلات الصحية مثل سرطان الكلى والكبد وضعف جهاز المناعة (Stoev and Vet., 2010) ، وقد صَنَفَتِ الوكالة الدولية للأبحاث

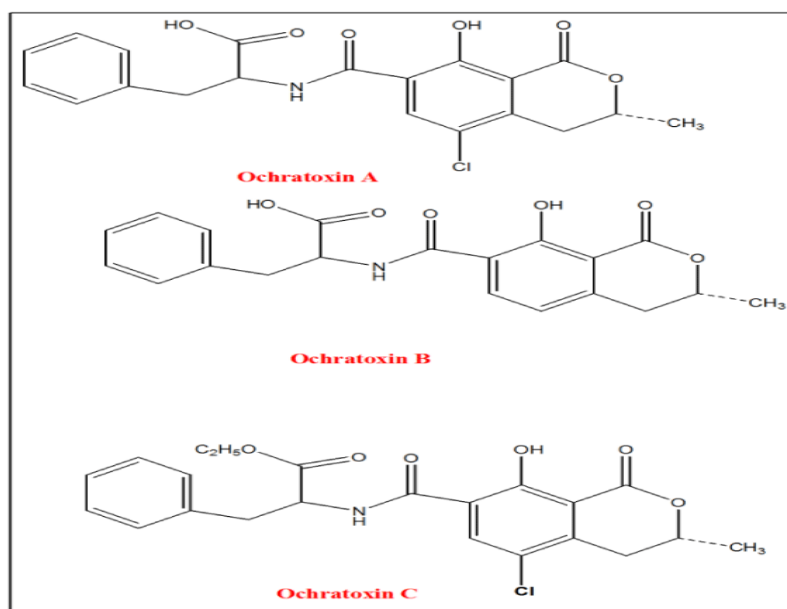
على السرطان (IARC) كمادة مسرطنة محتملة للإنسان (IARC., 1993) وبالمثل ، يمكن أن يؤدي Ochratoxin A إلى مشكلة صحية خطيرة للحيوان في أثناء التغذية على المنتجات الزراعية الملوثة بهذه الأنواع من السموم الفطرية . كالتأثيرات الصحية السامة على الكبد، والمسرطنة، والسمية للجينات، والمناعة، والتأثيرات السامة للأعصاب على الحيوانات (Lucchetta et al., 2010).

أظهرت إحدى النتائج الحديثة للبحث وجود Ochratoxin A في خبز القمح وخبز الذرة بنسبة 9 ، 12 ، 70 ميكروغرام / كغ على التوالي (Ali et al., 2013) ، وجد أن خبز الذرة يحتوي على نسبة عالية من Ochratoxin A و أن الذرة تمثل مشكلة عالمية بسبب محتواها العالي من Ochratoxin A خاصة أن حبات الذرة هي ركيزة جيدة لعدوى الفطريات وإنتاج السموم الفطرية الضارة لكل من البشر والحيوانات. ومع ذلك، فإن هذه المنتجات (خبز القمح و خبز الذرة) تؤدي دوراً مهماً في البلدان النامية وخاصة في النظم الغذائية، وبالتالي تُشكل إصابة هذه المحاصيل الغذائية (القمح والذرة) بالفطريات المنتجة للأوكراتوكسين A تحدياً كبيراً لسلامة الأغذية (Molhannad et al., 2013).

2 - 2 التركيب الكيميائي للأوكراتوكسين A (OTA) :

الأوكراتوكسينات هي مجموعة من السموم الفطرية التي تنتج كمستقلبات ثانوية بواسطة عدة فطريات من أجناس *Aspergillus* و *Penicillium* وتشير البيانات الموثقة في الدراسات المبكرة إلى أن Ochratoxins تم تحديدها لأول مرة وتمييزها من المزارع الفطرية من قبل الكيميائيين في جنوب إفريقيا في عام 1965 م ولها ثلاثة أنواع هي Ochratoxin A ، Ochratoxin B ، Ochratoxin C (Temesgen and Teshome., 2018) ، هذه الأنواع الثلاثة من Ochratoxins ترتبط ارتباطاً وثيقاً بالبنية الجزيئية. ولذلك فإن الاختلاف بين المركبات الثلاثة السابقة هو أن Ochratoxin B (OTB) هو شكل غير مكلور من Ochratoxin A (OTA) و Ochratoxin C (OTC) هو إستر إيثيل OTA كما هو موضح في الشكل (1) (Sofia et al., 2011). يعد Ochratoxin A أكثر الأوكراتوكسينات سمية وهو يشبه الحمض الأميني فينيل الأنين في البنية الهيكلية. ويحتوي

الاسم الكيميائي لـ Ochratoxin A على 7-carboxy-5-chloro-8-hydroxy-4,4-dihydro- 3(R)-methyl isocoumarin (Ochratoxin α : OT α) الذي يرتبط من خلال مجموعة 7-carboxy ب-1 β -فينيل الأنين بواسطة رابطة ببتيدية . ويوضح الجدول (1) الرقم الكيميائي المختصر والصيغة الجزيئية والكتلة الجزيئية لكل نوع من أنواع Ochratoxins (Gumus *et al.*, 2018) . من ناحية أخرى، يظهر Ochratoxin A خصائص مختلفة في المحلول الحمضي والقلوي. على سبيل المثال، في حالة الأس الهيدروجيني الحمضي والمتعادل ، فإن Ochratoxin A قابل للذوبان بسهولة في المذيبات العضوية القطبية مثل الكحول والكيون والكلوروفورم، بينما في حالة المحلول القلوي يكون قابلاً للذوبان في بيكربونات الصوديوم المائية وفي جميع المحاليل القلوية بشكل عام. ومع ذلك، فإن جزيء OTA قابل للذوبان بشكل طفيف في الماء وإيثير البترول والهيدروكربونات المشبعة (Andre and Ali., 2010).



شكل (1) التركيب الكيميائي للأوكراتوكسينات (A ، B ، C) ، (Sofia *et al.*, 2011).

جدول (1) الرقم الكيميائي والصيغة الجزيئية والكتلة الجزيئية لأنواع الأوكراتوكسين

الاسم	OTA	OTB	OTC
الرقم الكيميائي المختصر	303 - 47 - 9	4825 - 86 - 9	4865 - 85 - 4
الصيغة الجزيئية	$C_{20}H_{18}ClNO_6$	$C_{20}H_{19}NO_6$	$C_{22}H_{22}ClNO_6$
الوزن الجزيئي (غ / مول)	403.8	369.4	431.9

المصدر (Gumus et al., 2018) .

2 - 3 تلوث الأغذية والأعلاف بالأوكراتوكسين A :

الأوكراتوكسين A هو أحد المستقلبات الثانوية لمجموعة السموم الفطرية ويمكن أن يتواجد في عدد من المنتجات الزراعية وفي الأعلاف الحيوانية (Gumus et al., 2018) . تشير الدراسات إلى أن Ochratoxin A كان موجوداً في عدد من المواد الغذائية المصنعة وغير المصنعة ، وأنواع من المشروبات الكحولية المختلفة. فقد تواجد Ochratoxin A في أنواع مختلفة من الحبوب والحبوب واللب واللحوم (Frantisek et al., 2016; Pittet, 1998; Zhao et al., 2020; Meftah et al., 2015)، وفي المشروبات الكحولية مثل البيرة والنبيذ (El et al., 2019; Balendres et al., 2019). وكذلك، وجد Ochratoxin A في بعض الفواكه المجففة والقهوة (Balendres et al., 2019; Peter., 2016) ، ولكن الحبوب تحتل المركز الأول من حيث التلوث بـ Ochratoxin A بنسبة 60 % بسبب احتواء الحبوب على نسبة رطوبة عالية تزيد أحياناً عن 20 % (Eskola et al., 2019) . وبالتالي، لحماية المستهلك من مختلف المخاطر الصحية، تم تعيين نسب مختلفة من الحدود القصوى المسموح بها لـ Ochratoxin A في المواد الغذائية المختلفة والمشروبات الكحولية من قبل المنظمات الدولية. بحيث حددت المفوضية الأوروبية الحدود القصوى لـ Ochratoxin A المسموح بها كما يلي : 5 نانوغرام / غرام في الحبوب الخام، و3 نانوغرام / غرام في منتجات الحبوب ، و10 نانوغرام / غرام في القهوة والفواكه المجففة ، و2 ميكروغرام / لتر في النبيذ و0.5 نانوغرام / غرام في أغذية الأطفال القائمة على الحبوب (Durate et al., 2010) . وكذلك تم تحديد الحدود القصوى لـ Ochratoxin A أيضاً في

الأطعمة ذات الأصل الحيواني مثل منتجات لحم الخنزير، أو كلى الخنزير، أو كبد الخنزير، بسبب تعرض الخنازير في الغالب لـ *Ochratoxin A* من خلال علفها الملوثة بالفطريات المنتجة للسموم (Peter., 2016).

ينتج *Ochratoxin A* إما عن طريق فطر *Penicillium* في الحبوب ومنتجات الحبوب الغذائية أو عن طريق فطر *Aspergillus* في النبيذ والعنب والقهوة والكاكاو (Maria et al., 2012). وبناءً على ذلك أولت العديد من المجتمعات العلمية في الآونة الأخيرة، اهتماماً متزايداً بتأثيرات السمية *Ochratoxin A* بسبب خطورتها على صحة الإنسان والحيوان (Mantle., 2002). بشكل عام، تتعرض الحيوانات بشكل مباشر للسموم الفطرية من خلال استهلاك العلف الملوثة بالفطريات المنتجة للسموم، ويكون التعرض البشري عبر أحد المسارين، إما التعرض المباشر بسبب استهلاك المنتجات النباتية المصابة بالفطريات، أو التعرض غير المباشر من خلال استهلاك منتجات حيوانية ملوثة بالسموم الفطرية (Scudamore and MacDonald., 1998).

من جهة أخرى يشير تقرير منظمة الأغذية والزراعة (FAO) (Awad et al., 2012) أن حوالي 12 % من إجمالي *Ochratoxin A* يأتي من استهلاك القهوة. ويؤدي استهلاك هذه الأطعمة والمنتجات الحيوانية الملوثة إلى العديد من المشاكل الصحية للإنسان، فقد ثبت أن *Ochratoxin A* سام للكلية، ومحفز لطفرات الخلايا السرطانية، ومضعف للمناعة، ومسبب للسرطان (Durate et al., 2010).

لا يقتصر تأثير *Ochratoxin A* على صحة الإنسان والحيوان فحسب، بل تأثيراته سلبية على اقتصاد البلد ونظام التجارة. وفقاً للعديد من الدراسات التجريبية، تشير البيانات إلى أن تأثير السموم الفطرية يؤدي إلى مشكلة خطيرة في نظام التسويق في البلدان النامية. فقد أظهرت الدراسات أن حوالي 2.3 مليون كيس من الذرة تم رفضها تماماً من التسويق والاستهلاك في أثناء وجود الأفلاتوكسين في كينيا من عام 2004 حتى عام 2006 (Marechera., 2015). علاوة على ذلك، فإن التحقيق الأخير في المنتجات

الزراعية المختلفة لبلد مماثل وخاصة سعر الذرة انخفض بمقدار النصف من 1800 إلى 900 شلن كينيا بسبب تأثيرات السموم الفطرية (Medina et al., 2017). علاوة على ذلك، تعد القهوة واحدة من أكثر المشروبات استهلاكاً على نطاق واسع في جميع أنحاء العالم وهي مهمة للنقد الأجنبي في البلدان النامية والمتقدمة. ومع ذلك، فإن وجود Ochratoxin A في القهوة قد حظي باهتمام كبير في سوق تجارة البن الدولية (Kulandaivelu et al., 2011).

2- 4 التأثيرات الصحية الضارة للأوكراتوكسين A على الإنسان و الحيوان :

يتكون تقييم المخاطر، وتقدير حجم واحتمالية التأثير الضار على السكان بواسطة عوامل أو أنشطة معينة، من أربع خطوات رئيسية، وهي : تحديد المخاطر، وتوصيف الخطر أو تقييم الاستجابة للجرعة ، وتقييم التعرض ، وتوصيف المخاطر (Council NR., 1983). تم توضيح الخطوات الأربع المتضمنة في تقدير المخاطر أدناه (Liu and Wu., 2010) ، فجرى تحديد المخاطر، وتحديد ما إذا كان التعرض لعامل ما يمكن أن يزيد من حدوث حالة صحية معينة . بالنسبة لـ OTA في التقييمات التي أجرتها مؤسسات متعددة ، بما في ذلك الوكالة الدولية لأبحاث السرطان (IARC) ، ومنظمة الصحة الكندية ، ولجنة الخبراء المشتركة بين منظمة الأغذية والزراعة ومنظمة الصحة العالمية المعنية بالمواد المضافة إلى الأغذية (JECFA) وهيئة سلامة الأغذية الأوروبية (EFSA) (EFSA., 2006;) IARC., 1993; JECFA., 1991) ، تم تحديد Ochratoxin A على أنه مادة مسرطنة كلوية و يسبب تأثيرات سامة للكلية، ومطفرة ، ومثبطة للمناعة في أنواع حيوانية متعددة (Kuiper-Goodman and Scott., 1989; O'Brien and Dietrich., 2005). بالنسبة للبشر، كان تحديد المخاطر أكثر صعوبة. ارتبطت العديد من الآثار الضارة في صحة الإنسان، بما في ذلك أمراض الكلى (اعتلال الكلية المتوطن في دول البلقان (BEN)) واعتلال الكلية الخلالي المزمن (CIN) بالتعرض للأوكراتوكسين A، لكن هذه الارتباطات كانت حتى الآن أقل حسماً من تلك المتعلقة بالآثار الضارة المرتبطة بالأوكراتوكسين A في الدراسات المخبرية على الحيوانات . تشمل السمات المميزة لـ BEN

نمطاً عائلياً ولكن غير موروث من المرض، والمظاهر الأولية بعد العيش في قرية مستوطنة لمدة 15 عاماً أو أكثر، والارتباط بسرطان المسالك البولية العلوية (Grollman *et al.*, 2007) ومع ذلك، فقد ظهر حمض الأرسنولوكيك (AA)، وهو مادة سامة تُنتج في أعشاب أرسنولوشيا الموجودة بشكل شائع في حقول الحبوب في دول البلقان (بلغاريا ، رومانيا ، يوغسلافيا) ، على أنه العامل المسبب الأكثر احتمالاً لـ BEN، حيث وقد عثر على مستويات DNA - أرسنلاكتام مرتفعة في القشرة الكلوية لمرضى BEN ولكن ليس في المرضى الذين يعانون من أمراض الكلى المزمنة الأخرى . في حين لا يبدو أن مرضى CIN لديهم النمط العائلي كما في BEN، وقد تكون الأعراض حادة أو مزمنة مع ظهور الحالات في أي مكان من بضعة أيام إلى 5 أشهر. تم افتراض أن مسببات CIN تشمل العدوى والسموم مثل OTA أو ردود الفعل على الأدوية (Baker and Pusey., 2004) . يدرس توصيف المخاطر أو تقييم الجرعة والاستجابة العلاقة بين المستويات المختلفة للتعرض لمادة ما وما يرتبط به من حدوث المرض في مجموعة من الحيوانات أو البشر. وتُستخدم بيانات الاستجابة للجرعة (LOAEL) من الدراسات التي أجريت على الحيوانات لتوكسين معين لاستقراء التعرض اليومي أو الأسبوعي المقبول للإنسان، والذي لا يُتوقع حدوث آثار ضارة بسببه. تتضمن هذه الخطوة عادةً مراجعة للدراسات السمية لتحديد مقاييس التعرض المناسبة (Kuiper-Goodman *et al.*, 2010) ، مثل المدخول اليومي أو الأسبوعي الذي يمكن تحمله أو الجرعات الضئيلة التي لا تسبب الإصابة بالسرطان . في حالة OTA، قامت هيئات تنظيمية واستشارية متنوعة بتقييم بيانات الاستجابة للجرعة بشأن OTA و وضعت مقاييس التعرض الذي يمكن تحمله لـ OTA لدى البشر، وهذه النتائج لخصت في الجدول (2)

جدول (2) ملخص المدخول الأعلى الذي يمكن تحمله من OTA بحسب المنظمات الدولية

المرجع	الحدود	وحدة الحد الأعلى الذي يمكن تحمله *	المنظمة
EFSA., 2006	120 نانوغرام / كغ / الأسبوع	PTWI	هيئة سلامة الأغذية الأوروبية
Kuiper-Goodman <i>et al.</i> , 2010	3 نانوغرام / كغ / اليوم	PTDI	هيئة الصحة الكندية
Kuiper-Goodman <i>et al.</i> , 2010	4 نانوغرام / كغ / اليوم	NCRI	هيئة الصحة الكندية
JECFA., 2007	100 نانوغرام / كغ / الأسبوع	PTWI	لجنة الخبراء المشتركة WHO/FAO للمضافات الغذائية
Lopez <i>et al.</i> 2002	5 نانوغرام / كغ / اليوم	TDI	مجموعة خبراء الشمال حول سلامة الأغذية
EFSA., 2006	5 نانوغرام / كغ / اليوم	PTDI	اللجنة العلمية للأغذية (SCF) التابعة للاتحاد الأوروبي
* الحد الأعلى الذي يمكن تحمله يشير إلى أعلى مستوى من المدخول اليومي من المغذيات والذي من المحتمل ألا يشكل أي خطر من حيث الآثار الصحية الضارة. TDI: المدخول اليومي المسموح به ، PTDI : المدخول اليومي المؤقت المسموح به ، PTWI : المدخول الأسبوعي المؤقت المسموح به ، NCRI : المدخول الذي لا يؤدي إلى الإصابة بالسرطان.			

كانت الدراسات المختلفة للجرعة والاستجابة في الحيوانات هي الأساس لقرارات المجموعات الاستشارية بشأن مداخل OTA الأسبوعية أو اليومية الآمنة للإنسان. قامت لجنة الخبراء المشتركة (JECFA) بتقييم OTA لأول مرة في اجتماعها السابع والثلاثين (JECFA., 1991) وتحديد المدخول الأسبوعي المؤقت المسموح به (PTWI) عند 112 نانوغرام OTA لكل كيلوغرام من وزن الجسم في الأسبوع بناءً على دراسة الاستجابة للجرعة التي تسبب تدهور وظائف الكلى في الخنازير، فكان أدنى مستوى تأثير ضار ملحوظ 8 ميكروغرام / كيلوغرام من وزن الجسم / يوم (Elling., 1979; Krogh., 1974).

أعادت لجنة الخبراء المشتركة (JECFA) تقييم OTA في اجتماعها الرابع والأربعين، مع مراعاة البيانات السمية الجديدة. تم تأكيد PTWI، ولكن تم تقريبه إلى 100 نانوغرام / كجم من وزن الجسم / الأسبوع. نُتج عن أحدث تقييم لـ OTA في الاجتماع الثامن والستين في عام 2008 الاحتفاظ بـ PTWI الذي تم تحديده سابقاً. تقدر JECFA حالياً التعرض للأوكراتوكسين A من الحبوب، استناداً إلى البيانات الأوروبية، بحوالي 17 - 8 نانوغرام / كيلوغرام من وزن الجسم / الأسبوع أقل بكثير من PTWI. قامت الهيئة الأوروبية لسلامة الأغذية (EFSA) باستنباط PTWI لأوكراتوكسين A من 120 نانوغرام / كيلوغرام من وزن الجسم / الأسبوع، بناءً على 8 ميكروغرام / كيلوغرام من وزن الجسم / اليوم لقيمة LOAEL المستخدم في تقييم لجنة الخبراء المشتركة (EFSA., 2006). تم تطبيق عامل عدم اليقين قدره 450، بدلاً من 500 مستخدم في لجنة الخبراء المشتركة بين الوكالات، على أدنى مستوى ذي تأثير ضار. استند عامل عدم اليقين المركب هذا إلى عامل داخل الأنواع قدره 10، وعامل بين الأنواع 15، وعامل 3 لاستخدام LOAEL بدلاً من مستوى تأثير ضار غير ملحوظ (NOAEL). استند العامل بين الأنواع 15 إلى عمر النصف الأطول لـ OTA في البشر والقروود بدلاً من الخنازير على النحو الذي حدده (Hagelberg et al., 1989).

اختار فريق تقييم المخاطر التابع لهيئة الصحة الكندية (Kuiper-Goodman et al., 2010) إعادة تقييم PTWI التابع للهيئة الأوروبية للرقابة المالية من أجل Ochratoxin A، بافتراض أن استخدام

LOAEL بدلاً من NOAEL لم يكن مناسباً نظراً لقلّة عدد الحيوانات لكل مجموعة ، وأن 4 فقط من

كل 9 خنازير في المجموعة الأقل جرعة أظهرت تغيرات وظيفية في الكلى .

بدلاً من استخدام NOAEL أو LOAEL ، تم اشتقاق جرعة معيارية تقابل استجابة 10 % أعلى من

الشاهد (BD10) ، وتم الجمع بين عوامل عدم اليقين البالغة 10 للتنوع داخل الأنواع، و 25 للتنوع بين

الأنواع، و 2 لاستخدام دراسة دون المزمّة بدلاً من الدراسة المزمّة في عامل عدم يقين مركب قدره 500.

بتطبيق عامل عدم اليقين المركب هذا على عامل BD10 البالغ 1.56 ميكروغرام / كيلوغرام من وزن

الجسم / اليوم ، نتج TDI قدره 3 نانوغرام / كيلوغرام من وزن الجسم / يوم ، بعد التقريب (Kuiper-

Goodman *et al.*, 2010) ، وهو عملياً أكثر صرامة من حدود لجنة الخبراء المشتركة (JECFA)

أو الهيئة الأوروبية لسلامة الأغذية (EFSA) . بالإضافة إلى ذلك، اشترقت وزارة الصحة الكندية كمية

ضئيلة من مخاطر الإصابة بالسرطان (NCRI) من أجل OTA ، حيث كان التعرض المرتبط بزيادة

خطر الإصابة بالسرطان بنسبة 1:100000 وما يعادله في وحدات TDI. تم استخدام الجرعة الورمية

التي من المحتمل أن يكون فيها 5 % من الحيوانات مصابة بأورام (TD05) لاشتقاق قيم NTP الخاصة

ب OTA (Palumbo *et al.*, 2015) ، وقد حُدّدت هذه الجرعة على أنها 19.6 ميكروغرام / كيلوغرام

من وزن الجسم / يوم . تم بعد ذلك قسمة TD05 على 5000، وهو الاستقراء الخطي إلى الصفر، وهذا

أدى إلى مؤشر NCRI قدره 4 نانوغرام / كجم من وزن الجسم / يوم (Kuiper-Goodman *et al.*, 2010).

يشمل تقييم التعرض تقدير شدة تعرض الإنسان للمواد السامة وتكراره ومدته . التعرض للأوكراتوكسين هو

تابع لتركيز الأوكراتوكسين في المواد الغذائية، وكذلك كمية هذه المواد الغذائية التي يتم تناولها في

مجموعات سكانية مختلفة. اعتماداً على الموقع والمواسم ومقدار الزمن الذي يتم فيه تخزين الغذاء، قد

تختلف كمية الغذاء ومستويات التلوث بشكل كبير حتى بالنسبة للسكان أنفسهم أو الفرد نفسه، قد يتم تقدير

تعرض الإنسان للأوكراتوكسين A باستخدام مسوحات الأغذية جنباً إلى جنب مع مراقبة الأوكراتوكسين A في السلع، أو المؤشرات الحيوية للتعرض (Scott., 2005) .

من خلال تحديد نطاقات تلوث الأغذية بالأوكراتوكسين A ، يمكن تقدير التعرض للأوكراتوكسين A من مستويات المدخول المعروفة لسلع معينة (Jørgensen et al., 1996) ، ومع ذلك، فإن دقة هذا التقدير محدودة بسبب التباين الكبير في محتوى OTA في السلع، فضلاً عن التباين في العادات الغذائية (Fazekas et al., 2005) .

توفر لجنة الخبراء المشتركة (JECFA) بيانات مستقيضة عن تراكيز التعرض للأوكراتوكسين A في السلع (JECFA., 2001) ، ومع ذلك ، فإن 85 % من السلع التي تم أخذ عينات منها بما في ذلك القمح والشيلم والشعير والشوفان والخضراوات المجففة والزيتون والحليب جاءت من أوروبا. ومع ذلك، لوحظ أن OTA يظهر في القهوة في بلدان مثل البرازيل وكندا وأوروبا واليابان والولايات المتحدة الأمريكية (JECFA., 2001). في الدنمارك والنرويج والمملكة المتحدة، تم العثور على OTA في عينات الشوفان، أما في ألمانيا، فقد تم العثور على مستويات عالية من OTA في الحبوب غير المصنعة والشيلم والحنطة السوداء، بمستويات تتراوح بين 125 - 95.6 ميكروغرام / كغ. في أفريقيا، تم العثور على OTA في القمح والشعير والحبوب والخضراوات المجففة والزيتون على وجه التحديد، فقد وجدت مستويات عالية من OTA ، بحد أقصى 33000 ميكروغرام / كغ في القمح والشعير والحبوب المختلطة والخضراوات المجففة والزيتون في السكان التونسيين (Maaroufi et al., 1995) في نيجيريا وغانا وبوركينا فاسو، تم اكتشاف OTA في الذرة الرفيعة والدخن (Bui-Klimke and Wu., 2015) .

هناك طريقة أكثر دقة لتقدير التعرض، عندما يكون ذلك ممكناً، من خلال قياس المؤشرات الحيوية البشرية للتعرض للأوكراتوكسين A (Duarte et al., 2011). على الرغم من أنه لم يتم التحقق من صحة OTA في المصل أو OTA البولي ، فقد تم استخدام البيانات في دراسات متعددة لتقدير التعرض

OTA . تم العثور على OTA في المصل نظراً لعمره النصفى الطويل الذي يبلغ حوالي 35 يوماً (Studer-Rohr *et al.*, 2000) ، ويتم إفرازه في البول على شكل OTA أو أحد مشتقاته.

تم اكتشاف OTA في مصل الدم لأول مرة في عام 1977 وكان أحد أكثر أساليب المراقبة الحيوية استخداماً للتعرض البشري للأوكراتوكسين A . يؤدي الامتصاص الكلوي والدورة المعوية الكبدية والارتباط ببروتينات البلازما إلى نصف عمر طويل لـ OTA في الجسم، الأمر الذي يسمح باكتشافه في دم الإنسان (Dahlmann *et al.*, 1998; Roth *et al.*, 1988). أجريت دراسات وبائية في بلدان متعددة ، بما في ذلك رومانيا (Voo *et al.*, 2002) ، وإسبانيا (Jimenez *et al.*, 1998) ، وجمهورية التشيك (Malir *et al.*, 2001) ، وتركيا (Ozcelik *et al.*, 2001) ، وإيطاليا (Breitholtz- Emanuelsson *et al.*, 1994) ، ومصر (Wafa *et al.*, 1998) ، والجزائر (Khalef *et al.*, 1993) ، وتونس (Abid *et al.*, 2003; Hassen *et al.*, 2004) ، وقد ربطوا ارتفاع مستويات OTA في الدم أو البلازما بإصابة المرضى باضطرابات الكلى والمسالك البولية مقارنةً بالعينات الشاهدة، على الرغم من أن الارتباطات قد لا تكون سببية (Scott, 2005) .

على الرغم من أن العديد من الدراسات قد استخدمت OTA في المصل كمؤشر حيوي بشري للتعرض لـ OTA ، فقد لوحظ تباين كبير في العينات المدروسة. لوحظ أن مستويات OTA في الدم تتفاوت حتى عشرة أضعاف عند فرد واحد عند اختبارها على مدى عشر سنوات (Radic *et al.*, 1997) ، وفي عينات تم اختبارها عدة مرات على مدار عام واحد في توسكانا (Palli *et al.*, 1999) . علاوة على ذلك ، أظهرت دراسات في ألمانيا (Martlbauer *et al.*, 1996) ، وسويسرا (Studer-Rohr *et al.*, 2000) ، وجمهورية التشيك (Ruprich and Ostry., 1993) ، واليابان (Kawamura *et al.*, 1993) ، وبلغاريا (Petkova -Bocharova *et al.*, 2003) تبايناً عالياً داخل مستويات الأوكراتوكسين A في الأشخاص الذين تم اختبارهم بمرور الوقت . من المحتمل أن يرجع هذا التباين إلى الإنخفاض في تراكيز OTA في البلازما بناءً على عمر النصف لـ OTA (Scott., 2005) .

على غرار الإنسان، تتعرض الحيوانات لما يسببه Ochratoxin A ، إذ يؤدي تناول الأعلاف الحاسوبية على OTA إلى التسمم الذي يمكن أن يسبب الموت (Madhavan and Gopalan., 1968) . بمجرد تعرض الحيوانات للأوكراتوكسين ، تظهر علامات سريرية مختلفة تؤدي إلى تلف الكبد ، وانخفاض معدل زيادة الوزن ، وانخفاض الإنتاج مثل البيض واللحم والحليب (Patterson and Allcroft., 1970) ونتيجة لذلك ، تحدث خسائر اقتصادية كبيرة في هذه المنتجات. يعتقد عدد قليل من العلماء أن تلوث Ochratoxin A كان مرتبطاً بنقص المغذيات الدقيقة في الحيوانات، تشمل المظاهر السريرية للتسمم القدرة التناسلية المنخفضة، والخلل الوظيفي المعدي المعوي، وانخفاض استقلاب العلف (Robens and Richord., 1992). ومع ذلك، فإن قابلية الحيوانات للإصابة بالسرطان عن طريق Ochratoxin A تختلف باختلاف الجنس والعمر والأنواع والحالة الهرمونية والتغذية للحيوان (Alim et al., 2014) .

2 - 5 العوامل المؤثرة في إنتاج Ochratoxin A (OTA) :

يتأثر تكوين Ochratoxin A في الأغذية والأعلاف بمجموعة من العوامل، وأهم العوامل غير الحية التي تؤثر على نمو الفطريات وإنتاج Ochratoxin A توافر الماء ودرجة الحرارة وتركيب الغاز المحيط (Naresh and David., 2005) . ربما يكون النشاط المائي هو العامل الأكثر أهمية الذي يؤثر على إنبات ونمو الفطريات على ركائز غنية بالمغذيات. أظهرت الدراسات السابقة أن تلوث Ochratoxin A قد نَتَجَ عن *P. verrucosum* عند نشاط مائي قدره 0.95 ودرجة حرارة 25 °م (Bucheli and Taniwaki., 2002). على غرار النشاط المائي، تعد درجة الحرارة أيضاً العامل الثاني والمشارك الرئيس في إنتاج Ochratoxin A في السلع الزراعية المختلفة، فقد وجد أن درجة الحرارة المثلى لإنتاج Ochratoxin A تتراوح بين 25 - 30 °م لفطر *A. ochraceus* و 10 - 20 °م لفطر *carbonarius* و 20 - 25 °م لفطر *A. niger* (Ramos et al., 1998; Belli et al., 2005) . لا تؤثر عوامل النشاط المائي ودرجة الحرارة فحسب على تكوين OTA ، ولكن بعض البلدان أيضاً تخلق ظروفًا مواتية لتكوين Ochratoxin A في الأغذية والأعلاف المختلفة. على سبيل المثال، في بلدان أمريكا الجنوبية

وجنوب آسيا وأفريقيا حيث المناخ حار وجاف، وبالتالي فإن فطريات جنس *Aspergillus* هي المنتج الرئيس لـ OTA . وبالمثل، في البلدان المعتدلة الحرارة مثل الولايات المتحدة وكندا وأوروبا، حيث تسهم درجات الحرارة المعتدلة في جعل فطريات جنس *Penicillium* هي المنتج الرئيس لـ OTA (Kuruc et al., 2015).

تعد محتويات رطوبة الحبوب من العوامل المهمة لنمو الفطريات وإنتاج OTA، وتشير العديد من البيانات إلى أن *P. verrucosum* موجود في الغالب في الحبوب التي تحتوي على نسبة رطوبة أعلى من حوالي 14.5 % (Cairns et al., 2015). بالإضافة إلى ذلك فإن فطر *P. verrucosum* ينمو وينتج Ochratoxin A على حبوب مختلفة (مثل القمح) عندما يتراوح محتوى الرطوبة بين 18 - 22 % (Ahmad and Jae., 2017) . ومع ذلك، عندما تم الكشف عن محتوى الرطوبة أقل من 17 % فإن احتمال نمو *P. verrucosum* وإنتاج Ochratoxin A يكون منخفضاً جداً (Marta and Bedaso., 2016). على غرار درجة الحرارة ومحتويات الرطوبة، يعد تركيب الغاز من العوامل الأخرى المؤثرة على نمو الفطريات وإنتاج Ochratoxin A في المواد الغذائية المختلفة والفواكه المجففة والمشروبات الكحولية والقهوة وفقاً لـ (Cairns et al., 2015) ، يسهم تركيب الغاز المحيط بشكل كبير في نمو فطر *P. verrucosum* وتكوين Ochratoxin A في حبوب القمح الملقحة لمدة 28 يوماً بحرارة 25° م . يعتمد إنتاج Ochratoxin A في منتج ما إلى حد كبير على نوع واحد أو أكثر من الفطريات التي تلوث المنتج بسبب وجود عوامل مواتية للنمو من حيث المناخ، والظروف البيئية وطريقة التعامل مع الممارسات التصنيعية مثل النقل والتجفيف والمعالجة والتخزين والطرائق الزراعية تؤدي دوراً مهماً في نمو الفطريات وإنتاج OTA (Marta and Bedaso., 2016; Ogara et al., 2017). تتعرض جميع المنتجات إلى التلوث بالسموم الفطرية بما في ذلك المواد الغذائية المصنعة وغير المصنعة التي يتم تخزينها بطرائق غير مناسبة أي أنها تتعرض لدرجات الحرارة والرطوبة المرتفعتين لمدة طويلة من الزمن وهذا يخلق ظروفاً مواتية لنمو الفطريات المنتجة للسموم الفطرية (Ahmad and Jae., 2017) .

2 - 6 الطرائق التحليلية المستخدمة في تقدير Ochratoxin A :

طورت عدة طرائق لتحديد Ochratoxin A في مجموعة متنوعة من السلع الغذائية بما في ذلك الحبوب (الشعير، الذرة، نخالة القمح، القهوة، الكاكاو) والمشروبات الكحولية (النبيذ و البيرة) والفواكه المجففة. وستتم مناقشة بعض الطرائق التحليلية المستخدمة لفصل وتقدير Ochratoxin A من مختلف المواد الغذائية والأعلاف والمشروبات الكحولية فيما يأتي :

2 - 6 - 1 كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة Thin layer chromatography (TLC) :

TLC هي تقنية تستخدم لعزل المزائج غير المتطابقة. في أثناء إجراء التجارب، يتم تغطية صفائح من رقائق الألمنيوم أو البلاستيك أو الزجاج بطبقة رقيقة من المواد الماصة كأكسيد الألمنيوم أو السيليلوز أو هلام السيليكا (Reich and Schibli., 2007) على غرار طرائق الفصل اللوني الأخرى، يعتمد كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة على مبادئ الفصل ذاتها. يعتمد الفصل على التقارب النسبي للمركبات تجاه كلا الطورين، حيث يتحرك الطور المتحرك فوق سطح الطور الثابت (Reich and Schibli., 2007). من ناحية أخرى، فإن كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة هي أكثر تقنيات الفصل والكشف انتشاراً لتقدير الأفلاتوكسين منذ تطويرها في الستينيات (Santos and Vargas., 2002) ليس لتحليل الأفلاتوكسين فقط ولكن أيضاً لتحديد Ochratoxin A من منتجات المحاصيل الزراعية المختلفة. وهي قادرة على الكشف عن 2.4 - 4 ميكروغرام / كغ من Ochratoxin A ، و 10 ميكروغرام / كغ من Ochratoxin A من الأرز والقمح على التوالي (Pittet and Royer., 2002). لا يزال استخدام تحليل كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة للسموم الفطرية شائعاً للأغراض الكيفية وشبه الكمية. يرجع السبب الرئيس إلى ارتفاع معدل نقل العينات وانخفاض تكلفة التحليل وسهولة تحديد المركبات المستهدفة باستخدام التحليل الطيفي للأشعة فوق البنفسجية خاصة في البلدان النامية. ومع ذلك، عند مقارنتها بتقنيات كروماتوغرافيا أخرى، فإن حد الكشف في كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة مرتفع، والقدرة على الفصل محدودة تنقصها الأتمتة (Jarmila et al., 2013).

2 - 6 - 2 تقانة التحليل المناعي المرتبط بالأنزيم (ELISA) :

هي تقنية فحص قائمة على الصفائح تُستخدم للكشف عن المواد مثل الببتيدات والبروتينات والأجسام المضادة والهرمونات وقياسها. على غرار الطرائق التحليلية التي نوقشت سابقاً، فإن طرائق ELISA لها مزاياها وقيودها الخاصة في أثناء إجراء التحليل. تتميز طرائق ELISA بمزايا بسبب بساطتها وعدد العينات الكبير الذي يمكن تحليله في الوقت نفسه. بالإضافة إلى ذلك، تتطلب عينات صغيرة الحجم و تنقية أسرع وأقل تكلفة (Reich and Schibli., 2007). ومع ذلك، فإن طرائق ELISA أقل دقة وحساسية وكفاءة مقارنة بتقنيات الكروماتوغرافيا الأخرى مثل HPLC (Rasic et al., 2009). بالإضافة إلى ذلك، تسجل نتائج إيجابية أو سلبية زائفة بسبب التفاعلات المتقاطعة بين الجزيئات أو التداخلات. لذلك، لا ينبغي استخدام تقانة التحليل المناعي المرتبط بالأنزيم (ELISA) كطريقة كمية في التحليل، ويجب استخدامها فقط مع الأطعمة التي تم اختبارها على نطاق واسع وثبتت فعاليتها (Scott., 2002). علاوة على ذلك، أظهر أحد التقارير الموثقة أنه في أثناء استخدام طريقة (ELISA) ، يجب استخدام ضوابط كافية لكل اختبار، لضمان صحة القياس الكمي ما لم يكن من الصعب الحصول على نتيجة دقيقة (Sharaf et al., 2020).

2 - 6 - 3 جهاز الكروماتوغرافيا السائلة ذات الأداء العالي (HPLC) :

يتم تطوير طرائق تحليلية أكثر تقدماً وحساسية لتحديد Ochratoxin A في المواد المحللة نظراً للتطوير الكبير في الأجهزة والتقنيات التحليلية. مثل الأشكال الأخرى للكروماتوغرافيا، تسمح الكروماتوغرافيا السائلة ذات الأداء العالي HPLC بفصل المكونات الكيميائية من خلال استخدام طور متحرك و طور ثابت. تكون الأطوار المتحركة والثابتة سائلة وصلبة على التوالي. في الآونة الأخيرة، أصبحت تقنية الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) أكثر شيوعاً وأفضل طرائق التحليل لتقدير السموم الفطرية مقارنة بالطرائق الكروماتوغرافيا الأخرى (Pruslin et al., 1991). على سبيل المثال، بالمقارنة مع طرائق كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة، يعد HPLC سريعاً وفعالاً للغاية (Valenta., 1998)،

والسبب في ذلك أنه يستخدم المضخة، بدلاً من الجاذبية، لدفع المذيب السائل من خلال مادة ممتصة صلبة، مع فصل مكونات كيميائية مختلفة في أثناء تحركها بسرعات مختلفة (Jarmila *et al.*, 2013)، علاوة على ذلك، يمكن إتمام العملية في حوالي 10 إلى 30 دقيقة، وهي توفر دقة عالية. كما ذكرنا سابقاً، يتم استخدام عدد من الطرائق لتقدير Ochratoxin A من مواد غذائية مختلفة من أصل نباتي وحيواني. ومع ذلك، فإن التحليل الكروماتوغرافي السائل عالي الأداء مع كاشف الضوء الفلوري (HPLC-FLD) وتقنيات التنقية بعمود الانجذاب المناعي تُستخدم في المقام الأول لتقدير Ochratoxin A في عدد كبير من أنواع المواد الغذائية من أصل حيواني ونباتي (Frantisek *et al.*, 2016). لقد وثقت الدراسة الحديثة أن استخدام عمود الانجذاب المناعي في خطوات التنقية في أثناء تحليل السموم الفطرية له مزايا عديدة، على سبيل المثال، تنقية العينة المستخلصة والدقة والسرعة وأخيراً تقليل بعض التداخل من التحليل (Scott and Trucksess., 1997; Castellari *et al.*, 2000). بالإضافة إلى ذلك، تتمثل المزايا الأساسية لتقنيات التنقية هذه في الارتباط النوعي لـ Ochratoxin A بالمستضد والإزالة شبه الكاملة للمواد المتداخلة (Castellari *et al.*, 2000). ومع ذلك، في حالة Ochratoxin A، يمكن ملاحظة تقليل الاسترجاع إذا تم الإستخلاص في حالة قلوية، لأن Ochratoxin A يتم تحويله إلى Ochratoxin A (OP-OA) الذي لا يرتبط بالمستضدات (Castegnaro *et al.*, 2006).

2- 7 طرائق خفض الأوكراتوكسين A في الأغذية :

هناك العديد من الطرائق لتقليل الأفلاتوكسينات و OTA كالطرائق الفيزيائية (التنظيف ، التسخين ، الإشعاع ، الامتزاز) ، والطرائق الكيميائية (المعالجة بالمركبات الكيماوية، المعالجة بالأوزون) ، والطرائق البيولوجية (تطبيق البكتيريا، الخميرة وسلالات *Aspergillus* غير السامة) . اهتم العديد من الباحثين بتقليل الأفلاتوكسينات و OTA في الغذاء والأعلاف. ومنها المعاملة بفرن الميكرويف لتقليل الأفلاتوكسين B1 و Ochratoxin A في دقيق الذرة طالما أن دقيق الذرة له استخدامات واسعة وتعد الذرة

واحدة من أكثر المحاصيل تلوثاً بالسموم الفطرية (Maryam and Iranian., 2015) ، وهناك طرائق

أخرى حديثة لتخفيض نسبة الأفلاتوكسينات والأوكراتوكسين في الأغذية وأهمها :

2 - 7 - 1 استخدام البلازما الجوية الباردة (CAP) :

البلازما عبارة عن غاز مؤين جزئياً أو كلياً يُعرف عموماً بالحالة الرابعة للمادة، ويتولد من تطبيق التيار

الكهربائي خلال الغاز المتعادل الشحنة الذي يتسبب في تفكك الجزيئات الغازية (Kiš et al., 2020;)

(Wielogorska et al., 2019). يتم تفريغ البلازما عندما يتجاوز الجهد المطبق جهد الانهيار

(breakdown voltage) لتكوين أنواع الأوكسجين والنيتروجين النشيطة (RONS) ويمكن توليد

البلازما الباردة غير الحرارية عند الضغط الجوي تحت ظروف درجة الحرارة المحيطة مع استهلاك

منخفض نسبياً للطاقة (Hojnik et al., 2021; Wielogorska et al., 2019) .

يمكن استخدام البلازما الجوية الباردة (CAP) بشكل مباشر أو غير مباشر عن طريق تعريض الماء

والمحاليل الواقية والأحماض لإصدار البلازما التي تشكل مطهرات غسيل واسعة النطاق (Ali et al.,)

(2022; Esua et al., 2021) . تُعزى الخصائص المضادة للميكروبات والقدرة على تحليل الجزيئات

الكيميائية الحيوية المعقدة إلى مزيج فريد من المواد الكيميائية التفاعلية مثل O_2^- و O_3 و H_2O_2 و

OH و $ONOO^-$ و NO_2^- و NO_3^- وفوتونات الأشعة فوق البنفسجية والمجال الكهربائي ، والتي

تظل قريبة إلى درجة الحرارة المحيطة لمنح الخصائص غير الحرارية (Esua et al., 2021; Hojnik)

(2019; Wielogorska et al., 2019; Sen et al., 2021; et al., 2021) . وبالتالي، تعد CAP غير

الحرارية إستراتيجية مبتكرة وسريعة وقليلة التكلفة لإزالة التلوث الناتج عن الكائنات الحية الدقيقة المسببة

للأمراض في الأطعمة والمنتجات الزراعية، دون آثار كبيرة على الجودة (Esua et al., 2021)،

لكن الكفاءة تعتمد على التركيب الجزيئي للسموم الفطرية وظروف المعالجة، على سبيل المثال، تم

إثبات أن كفاءة تحلل الديوكسي فالينول (DON) على القمح تتأثر بجهد البلازما ونوع الغاز ووقت

المعالجة وخصائص المادة الغذائية ومحتوى الرطوبة في الغذاء. ومع ذلك، كان 50 كيلو فولت و8

دقائق من بلازما الهواء الجوي كافيين للتسبب في انخفاض بنسبة 25.82 % ، وكانت الرطوبة العالية مفيدة حيث تحسنت الكفاءة من 9.59 إلى 36.10 % مع زيادة محتوى الرطوبة من 8 إلى 20 % . لوحظت تأثيرات ضئيلة في جودة القمح باستثناء زيادة طفيفة في البياض (Chen *et al.*, 2022) ، وبالمثل ، فإن كفاءة تحليل توكسين T-2 ومشتقه الرئيس HT-2 على دقيق الشوفان قد تأثرت برطوبة الدقيق ووقت التعرض ونوع الغاز المستخدم لتوليد البلازما الباردة . تمت أكسدة العينات بكفاءة بواسطة ذرات الأوكسجين من البلازما الباردة لإنتاج ثاني أكسيد الكربون وأكسيد النيتروجين الضروريين لتحقيق أعلى التخفيضات بنسبة 43.25 % و 38.54 % لسموم T-2 و HT-2 على التوالي، عندما تم استخدام N₂ كغاز مولد (Kiš *et al.*, 2020) . في دراسة أخرى، أدت زيادة الجهد المطبق من 10 إلى 30 كيلو فولت إلى خفض 56.5 - 1.3 % و 62.8 - 8.1 % على التوالي في التيراريول (AOH) وإيثر أحادي ميثيل التيرناريول (AME) الذين ينتجهما فطر *Alternaria* الذي تمت إضافته إلى عصير العناب (Wang *et al.*, 2022) ، علاوة على ذلك ، تم الكشف عن بلازما التفريغ الإكليلي كأفضل مصدر قادر على إنتاج العديد من المؤكسدات، وتم تحقيق التحلل الأمثل لـ AFB₁ في نطاق 45 - 56 % في الأرز والقمح بعد 30 دقيقة (Puligundla *et al.*, 2020) ، يُعزى انخفاض النشاط الحيوي لـ AFB₁ إلى اختفاء الرابطة المزدوجة C8 = C9 في حلقة الفوروفوران بالإضافة إلى تعديل حلقة اللاكتون والسيكلوبنتانول ومجموعة الميثوكسيل من التأثيرات المؤكسدة لمركبات لـ HO₂ و OH و H₂O₂ و O₃ و H و CHO وفوتونات الأشعة فوق البنفسجية والإلكترونات . ثبت أيضاً أن CAP أكثر فعالية في تقليل AFB₁ و AFB₂ (إجمالي الأفلاتوكسين) على البندق بنسبة 73 - 70 % بالمقارنة مع 47 - 15 % لإشعاع جاما، مع الحد الأدنى من التأثيرات على السمات الحسية (Sen *et al.*, 2019) ، كما تم إثبات الإمكانيات الواعدة لتقنية CAP لتوليد منتجات غير في ضارة أثناء تحليل السموم الفطرية (Wielogorska *et al.*, 2019) .

2 - 7 - 2 استخدام البولي فينولات و الفلافونيدات :

استخدمت المغذيات النباتية بشكل رئيس البولي فينولات و الفلافونيدات مؤخراً في أنظمة غذائية مختلفة نظراً لفعاليتها البيولوجية، وخاصة الخصائص المضادة للفيروسات والبكتيريا والمضادة للأكسدة والمضادة للالتهابات (Mehany *et al.*, 2021). تختلف الآليات الجزيئية لمركبات البولي فينولات والفلافونيدات ضد السموم الفطرية، ويمكن النظر إليها من وجهات نظر مختلفة : (1) يبدو أن خصائصها المضادة للأكسدة وميلها للدهون يؤدي دوراً رئيساً في فعاليتها الحيوية ، (2) تثبيط إنتاج السموم الفطرية من خلال التركيب البنيوي والتعديلات في الغشاء الفطري ، (3) تقليل تعبير المورثة المنظمة لإنتاج السموم الفطرية، (4) تثبيط النشاط الأنزيمي (Ahmed *et al.*, 2022). في هذا الصدد أوصى (Hamad *et al.*, 2021) باستخدام مستخلصات النباتات الطبيعية والبولي فينولات المأخوذة منها كنهج حيوي لتثبيط نمو الفطريات وإنتاج السموم الفطرية، فثبت أن مادة البولي فينول لها تأثيرات مثبطة ضد تراكم الباتولين بحيث يتم تنظيم المورثات المشاركة في مسار التخليق الحيوي للباتولين بواسطة الأومبيليفيرون والكويريستي (Sanzani *et al.*, 2009). تم تأكيد التأثيرات المثبطة لأحماض الكلوروجينيك وأحماض الغاليك في إنتاج AFB1 في الفاصولياء في دراسة لتحديد القدرة المثبطة للمركبات الفينولية ضد إنتاج السموم الفطرية (Telles *et al.*, 2017). تم تحقيق انخفاض بنسبة 95 % على الأقل في تراكم الباتولين عند اختبار مركبات الفلافانول مثل هيسبيريدين و نيوهيسبيريدين و هسبريتين غليكوزيد ونارينجين المستخرجة من المنتجات الثانوية للمحاصيل (Salas *et al.*, 2012).

كشفت (Makhuvele *et al.*, 2020) أن الفينولات الفعالة بيولوجياً المقترنة بـ β -cyclodextrin القائمة على تقنية الإسفنج النانوي تقدم إمكانات واعدة لتثبيط هجوم الفطريات وإزالة السموم الفطرية. عادةً ما تُظهر المجمعات الغذائية الطبيعية التي تحتوي على العديد من المركبات الفعالة غير الغذائية إمكانات مضادات الأكسدة والخصائص الطبية أخرى، وقد كشفت الدراسات أن هذه الجزيئات الفعالة بيولوجياً

والمستخلصات العشبية الطبيعية تمتلك القدرة على عكس التأثير الضار للسموم الفطرية بكفاءة كبيرة (Sharma and Patial., 2021).

2 - 7 - 3 استخدام الزيوت العطرية الطبيعية (NEOs) :

تعد الزيوت العطرية الطبيعية (NEOs) وجزئياتها الفعالة بيولوجياً من المضافات الخضراء المضادة لنمو الفطريات وإنتاج السموم التي تلوث المنتجات الغذائية، لأنها صديقة للبيئة مع مقاومة منخفضة للأدوية وفعالية عالية (Chaudhari et al., 2019; Mutlu-Ingok et al., 2020) ، تُعزى آليات فعالية الزيوت العطرية الطبيعية ضد الفطريات والسموم إلى تثبيط الأنزيمات الرئيسية المسؤولة عن تفكيك الكربوهيدرات وتوليد السموم الفطرية وتعطيل الخلايا والأغشية الفطرية (Tian et al., 2011)، ويمكن أن يحدث ذلك عبر مسارات مختلفة : (1) التأثير في التعبير المورثي للفطريات ، (2) تعطيل جدار الخلية أو غشاء الخلية للكائنات الحية الدقيقة بواسطة البولي فينول ، (3) تلف بنية غشاء الخلية وجدار الخلية (Cai et al., 2022). تم إجراء عدة تجارب في المختبر للزيوت العطرية المضادة لنمو الفطريات وإنتاج السموم، والقدرة المثبطة والمضادة للأكسدة من زيت نبات المردقوش الشائع (*Origanum majorana* L) المغلف في مستحلب النانو، وهذا يشير إلى الإمكانيات الواعدة كمواد حافظة غذائية جديدة ضد السموم الفطرية لتحسين سلامة الغذاء (Chaudhari et al., 2020) . في دراسات أخرى، منع الكابيسيسين إنتاج (OTA) في العنب بواسطة *Aspergillus section Nigri* و *A.carbonarius* بنسبة 78.1 و 61.5 % على التوالي، في حين تم منع إنتاج (OTA) تماماً بواسطة الثوم والزيوت العطرية البرية ، وتم تقليل التخليق الحيوي بشكل كبير عن طريق الزيوت العطرية للميرمية والنعناع (Kollia et al., 2019; Ozcakmak et al., 2017) . تم الإبلاغ أيضاً عن أن زيت الكركم يمكن أن يُظهر نشاطاً عالياً مضاداً للفطر *A. flavus* وإنتاج الأفلاتوكسين في الذرة (Hu et al., 2017) ، في حين أن قدرة الزيت العطري لنبات النعناع المدبب (*Mentha spicata*) على تثبيط سموم الأفلاتوكسين المنتجة من *A. flavus* في الحمص لمدة تصل إلى عام واحد يُعزى إلى

الغشاء البلازمي (Kedia et al., 2016) . أظهرت الزيوت العطرية الطبيعية أيضاً إمكانات كبيرة لتنشيط الزيرالينون (ZEN) ، وقد أثرت الزيوت العطرية للجريب فروت والليمون وزيت النخيل والأوكالبتوس على مستويات ZEN وحد الزيت العطري للكرم (Curcuma longa) من نمو فطر Fusarium graminearum وتكوين ZEN إلى مستويات منخفضة حتى 3 و 3.5 ملغ / لتر، على التوالي (Naveen Kumar et al., 2016; Pietrzak et al., 2015) .

2 - 7 - 4 استخدام المواد المغناطيسية والجسيمات النانوية :

ظهرت دراسات في الآونة الأخيرة لدعم الوسائل الصديقة للبيئة والمنخفضة التكلفة والفعالة للسيطرة على السموم الفطرية من خلال استخدام المواد المغناطيسية والجسيمات النانوية. على سبيل المثال، تبين أن الجسيمات المغناطيسية (Fe_3O_4) المطلية بالكيترولان فعالة في امتصاص الباتولين من عصير الفاكهة، ويمكن أن يؤدي اقتران النانو سليلوز مع حمض الريتينويك إلى امتصاص AFB1 من مجموعة متنوعة من المواد الغذائية دون أي أثر للسمية، اعتماداً على التركيز ودرجة الحموضة (Jebali et al., 2015; Luo et al., 2017). كانت الجسيمات النانوية المغناطيسية مثل الطين النانوي، والهلام النانوي، والمغمايت (maghemite) النشط سطحياً، والمواد النانوية مثل الجسيمات النانوية لأكسيد الزنك (ZON)، والجسيمات النانوية الفضية (SLN) ، وجسيمات النحاس النانوية وجسيمات السيلينيوم النانوية (SEN) فعالة في إزالة السموم الفطرية وربطها في الأعلاف الزراعية والأغذية (Abd-Elsalam et al., 2016; Magro et al., 2017; al., 2017). تم تقليل AFB1 و الديوكسي نيفالينول (DON) بنسبة 63 و 76 % على التوالي بواسطة SEN المنتج من فطر Trichoderma harzianum JF309 (Hu et al., 2019). منع SLN نمو الفطريات المنتجة للأفلاتوكسين والأوكراتوكسين وتراكم OTA والأفلاتوكسين في وسط أساسه الذرة، وكان استخدام ZON فعالاً ضد نمو أنواع Fusarium و Aspergillus و Penicillium وإنتاج AFB1 و OTA و AFB2 في المواد الغذائية (Gómez et al., 2013; Hassan et al., 2019; al., 2019) .

2 - 7 - 5 استخدام الأشعة المؤينة و أشعة الميكروويف :

يمكن استخدام التشعيع كبديل عن المعاملة الحرارية للسيطرة على السموم الفطرية. يشار إلى هذه المعاملة غير الحرارية أحياناً باسم البسترة الباردة لأنها يمكن أن تحد من الأحياء الممرضة في الأغذية بدون رفع درجة حرارة المنتج. تعد معاملة الأغذية المصنعة بالأشعة المؤينة بجرعات عالية طريقة آمنة ومقبولة بالنسبة للمستهلك طالما بقيت الأغذية مقبولة الطعم (Farkas *et al.*, 2016; Ehlermann., 2014). تم استخدام الأشعة المؤينة التي تتضمن الحزم الإلكترونية وأشعة غاما للسيطرة على الفطريات المنتجة للسموم الفطرية و تحطيمها في العديد من الأغذية والأعلاف الحيوانية (Barkai-Golan and Follett., 2017; Calado *et al.*, 2014; Kabak *et al.*, 2006). تعتمد كفاءة التشعيع على العديد من العوامل مثل تركيب المادة الغذائية، محتوى الرطوبة، جرعة الإشعاع، نمط السم الفطري، وتركيز السم الفطري. ولكن سُجلت نتائج متضاربة فيما يتعلق بتحطيم OTA بواسطة أشعة غاما. على الرغم من أن بعض الباحثين قد سجلوا انخفاضاً كبيراً في $OTA \leq 50\%$ (Ben Mustapha *et al.*, 2014; Mehrez *et al.*, 2016; Kanapitsas *et al.*, 2016; Jalili *et al.*, 2012). ووجد باحثون آخرون انخفاضاً قليلاً في OTA (Calado *et al.*, 2018; Di Stefano *et al.*, 2014). يمكن أن يغطي انخفاض السم الفطري بإنتاج مواد ثانوية سامة، ويجب أن تبين الدراسات السمية الخلوية سلامة هذه المواد الغذائية المعاملة لإزالة السموم الفطرية. تعد اختبارات السمية الخلوية في الزجاج باستخدام خطوط الخلايا طرائق سريعة وحساسة لاختبار تراكيز مجموعة واسعة من المواد الكيميائية . يستخدم خط الخلايا البشرية المشتقة من الأورام الكبدية (HepG2) بشكل واسع في الأبحاث المتعلقة بالسموم من أجل الكشف ، والاستقلاب ، و السمية الجينية والسمية الخلوية للملوثات البيئية والغذائية (Knasmüller *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2004). أظهرت المعاملة بأشعة الميكروويف بمستويات طاقة عالية قدرة كبيرة على تحطيم السموم الفطرية. فقد وجد انخفاض بمقدار 95% في السموم الفطرية بالتسخين في الميكروويف لعينات ملوثة عند استخدام طاقة 6 كيلو واط لمدة 4 دقائق (Slaron *et al.*, 1980) ،

وقد وجدت نتيجة مشابهة عند تعريض الفستق السوداني الملوث بالسموم الفطرية لأشعة الميكروويف بطاقة 1.6 كيلو واط لمدة 16 دقيقة أو 3.2 كيلو واط لمدة 5 دقائق (Luter *et al.*, 1982). وقد وجد أن المعاملة بحرارة 150°م أو أعلى كانت مطلوبة للحصول على تخفيض 95 % في السموم الفطرية الكلية ، وأن تعريض الفستق السوداني لأشعة الميكروويف بطاقة ضعيفة قيمتها 0.7 كيلو واط لمدة 8.5 دقيقة (وهي الطريقة المستخدمة في المنازل كانت أقل فعالية ، فقد تحطم أقل من 61 % من أفلاتوكسين B1 وأقل من 40 % من أفلاتوكسين G1 في الفستق السوداني الملوث طبيعياً (Pluyer *et al.*, 1987). كما قيم (Pérez-Flores *et al* 2011) فعالية إزالة السموم الفطرية من الذرة بواسطة تعديل طريقة تصنيع التورتيا حيث طهي جريش الذرة الممزوج بالماء والدابوق (غلوتين) في فرن الميكروويف، وقد أدت هذه الطريقة إلى تخفيض 84 % في محتوى أفلاتوكسين B1. وفي دراسة أخرى (Alkadi and Altal., 2019) حول استخدام أشعة الميكروويف في تخفيض محتوى أفلاتوكسين B1 و OTA ، وجد أن أشعة الميكروويف قادرة جزئياً على تحطيم أفلاتوكسين B1 و OTA ، وأن درجة تحطيم أفلاتوكسين B1 و OTA تعتمد على زمن التعريض للتسخين في الميكروويف والتركيز الأولي لأفلاتوكسين B1 و OTA في العينة. كما وجد أن تحطيم أفلاتوكسين B1 و OTA يزداد بزيادة مستوى طاقة أشعة فرن الميكروويف. كما وجد أن تأثير أشعة الميكروويف على تحطيم أفلاتوكسين B1 و OTA فعال فقط في فترة التعريض الطويلة والمستويات العالية من طاقة فرن الميكروويف ، ويمكن أن يكون هذا ناتجاً عن مقاومة معظم السموم الفطرية للحرارة (Peraica *et al.*, 2002).

الفصل الثالث

مواد البحث وطرائقه

**MATERIALS
AND METHODS**

3 - مواد البحث وطرائقه :

3 - 1 جمع العينات :

جُمعت عينات عشوائية من أنواع الطحين (الزيرو والموحد والمستورد) ومن عدة مطاحن ، وأنواع الأرز (الهندي والمصري والأمريكي والإسباني) وأنواع القهوة الخضراء والمحمصة والمطحونة لبعض الشركات المشهورة محلياً وبتواريخ مختلفة وبمعدل 6 مكررات لكل عينة خلال المدة من 2020 وحتى 2022 من السوق المحلية وتم ترقيم عينات الطحين (A ،B ،C) وعينات الأرز (D ،E ،F) أما عينات القهوة فقد تم تسميتها بحسب بلد المنشأ (قهوة كولومبيا ، قهوة برازيلية ، قهوة موكا) ثم حفظت العينات في زجاجات معتمدة لحين تحليلها في مخابر كلية الهندسة الزراعية (قسم علوم الأغذية) ومخابر مديرية المواصفات الفنية والمخابر في وزارة التجارة الداخلية وحماية المستهلك.

3 - 2 الأجهزة و المواد المستخدمة :

- جهاز الكروماتوغرافيا السائلة ذات الأداء العالي HPLC ماركة Shimadzu صنع اليابان سنة 2010 والذي يتألف من مضخة واحدة طراز LC - 20AT وحاقن آلي طراز SIL - 20A وفرن طراز CTO - 20A وكاشف الفلورة Fluorescence detector طراز RF - 10AX بطول موجة انبعاث 333 نانومتر ، وطول موجة إصدار 460 نانومتر . والمتصل بحاسوب لتخزين النتائج المتحصل عليها ومعالجتها وفق نظام LC - Solution .
- الميكروويف صناعي ماركة Samsung سعة 34 لتراً موديل ME6124ST - 1 / XSG .
- مطحنة ماركة Heavy Duty Spice Grinder موديل GX-05 بسرعة 28000 دورة/ دقيقة .
- مثقلة ماركة Heraeus-christ بسرعة دوران 3000 دورة / دقيقة.
- جهاز الأمواج فوق الصوتية Ultrasonic من Daihan – Korea .

- عمود الفصل Separation column تم الفصل بواسطة عمود فصل من نوع ODS C18 (mm 250 x 4.6) Chroma bond من إنتاج شركة اسبانية .
- أعمدة مناعية لاستخلاص الأوكراتوكسين A ماركة Aflatest .
- أعمدة الطور الصلب (SPE) ماركة Teknokroma-Germany .
- محلول قياسي جاهز من الأوكراتوكسين A على شكل أمبولة 1 مل بتركيز 1 ميكروغرام / مل (محلول بالميتانول) من شركة Supelco الأمريكية.
- ميتانول Methanol عالي النقاوة (HPLC – grad) من إنتاج شركة Merck-Germany .
- الأسيتونتريل عالي النقاوة (HPLC – grad) من إنتاج شركة Merck-Germany .
- ماء منزوع الشوارد ذو الناقلية 0.05 ميل سيمنز (MS) .
- بيكربونات الصوديوم.
- حمض الخل الثلجي.
- محلول الفوسفات الموقفي (PBS) .
- ورق ترشيح 15 مل ماركة MN الألمانية.
- زجاجات معيارية مختلفة السعات.

3 - 3 طرائق تحاليل الكروماتوغرافيا :

3 - 3 - 1 تحضير المحلول القياسي الأم ومحاليل العمل القياسية :

حُضر المحلول القياسي الأم من الأوكراتوكسين A بتركيز 40 ميكروغرام / لتر وذلك بتمديد محتوى الأمبولة (1 ميكروغرام / مل) بالميتانول باستخدام دورق معياري 25 مليلتر أما محاليل العمل القياسية فحضرت بتركيز (2 ، 5 ، 10 ، 20 ميكروغرام / لتر) من OTA ووضعت جميع المحاليل في جهاز الأمواج فوق الصوتية لمدة 15 دقيقة وذلك لإتمام المزج والذوبان والتخلص من الفقاعات الهوائية. حفظت المحاليل في المجمدة على درجة - 20 م° .

3 - 2 - 3 تعيين الشروط المثلى لتقدير الأوكراتوكسين A بواسطة HPLC :

تم التحليل في جهاز (HPLC) باستخدام نظام الإزاحة الثابت (Isocratic elution) بمعدل تدفق (0.5 - 1.00 مل / دقيقة). واستخدم طور حامل مؤلف من (ماء: ميثانول: أسيتونتريل: حمض الخل الثلجي) وينسب مزج من ثلاث مراحل مختلفة : المرحلة الأولى (70 : 14 : 14 : 2) ، والمرحلة الثانية (60 : 19 : 19 : 2) والمرحلة الثالثة (50 : 24 : 24 : 2) كحجم لكل من الطور المتحرك وباستخدام عمود ODS C18 مع كاشف الفلورة بطول موجة انبعاث 333 نانومتر، وطول موجة إصدار 460 نانومتر مع حقن محلول قياسي من الأوكراتوكسين A من شركة Supelco الأمريكية لتحديد الطور الحامل المناسب والزمن اللازم لفصل Ochratoxin A مع تحديد مدة صلاحية العمود للاستخدام .

أكدت الطريقة Method Validation بقياس الخطية (Linearity) ، وقياس حد الكشف LOD (Limit of Detection) ، وقياس حد التقدير الكمي LOQ (Limit of Quantification) ، وقياس الإحكام (Precision) ، وقياس استرجاع الطريقة (Recovery) مع تحديد الخطية (Linearity) بطريقة مشابهة لـ (Ermer and Mille.,2006) وقد أنشئ منحنى معياري (Calibratuion Curve) باستخدام طريقة المحلول المعياري الخارجي External Standard باستخدام أربعة محاليل متدرجة (2 ، 5 ، 10 ، 20 ميكروغرام / لتر) من OTA ، ودرست خطية الكاشف عند طول الموجة انبعاث 333 نانومتر ، و طول موجة إصدار 460 نانومتر .

تم تحديد حد التقدير الكمي LOQ (Limit of Quantification) هو أقل تركيز من المادة يمكن قياسه كمياً والذي يسبب إشارة S (Signal) تعادل 9 مرات تشويش N (Noise) خط الأساس (base line) ($LOQ = 9 \times S / N$) .

أما حد الكشف LOD (Limit of Detection) هو أقل تركيز من المادة في العينة يمكن تحديده نوعياً دون تحديد كميته تحت الشروط التجريبية المستخدمة والذي يسبب إشارة S (Signal) تعادل 3 مرات تشويش N (Noise) خط الأساس (base line) أي

(LOD = 3 X S / N) (Epshtein, 2004) . استخدم منحني المعايرة الخطية لتقدير

LOD و LOQ (Snyder et al.,1997) وذلك وفقاً لما يلي :

$$LOD = 3 X S / N$$

$$LOQ = 9 X S / N$$

حيث S / N نسبة الإشارة الى الضجيج في خط الأساس .

أما الإحكام (Precision) فحدد بقياس التكرارية (Intra - day precision) والإحكام الوسطي

(Inter - day precision) . قدرت التكرارية بتحليل محلول قياسي من لـ OTA بتراكيز

(5، 10، 20 ميكروغرام / لتر) وتم حقنها 9 مرات في اليوم نفسه . أما الإحكام الوسطي فحدد بإجراء

العملية نفسها خلال ثلاثة أيام . وقورنت النتائج بـ % RSD (Relative Standard Deviation)

حيث يجب أن تكون قيمته أصغر أو تساوي 2 (Snyder et al.,1997) .

ويعبر عن % RSD بالمعادلة التالية :

$$\% RSD = (SD / mean) X 100$$

SD : الانحراف المعياري

Mean : المتوسط

أما الاسترجاع (Recovery) فهو اختبار كفاءة الاستخلاص والفصل و التعيين بإضافة ثلاثة تراكيز

مختلفة من الأوكراتوكسين A هي (5، 10، 20) ميكروغرام / لتر وحسب معدل الاسترجاع وفقاً

للمعادلة التالية :

معدل الاسترجاع % = (الكمية المسترجعة / الكمية المضافة) × 100 حسب (Self., 2005) .

3 - 4 تحضير عينات الطحين والأرز والقهوة الخضراء لاستخلاص Ochratoxin A :

حضرت العينات وفق الطريقة المقترحة من قبل (Cheli., 2013) بوزن 10 غ من العينة المطحونة وأضيف لها 40 مل من مزيج (الميثانول : ماء) بنسبة (30 : 70) ، مُزجت جيداً ورُشحت ، وأخذ 4 مل من الرشاحة ومُزجت مع 50 مل من محلول الفوسفات الموقى (PBS) ومُمرت على العمود المناعي Immunoaffinity وأُزِحت العينة المحتوية على الأوكراتوكسين A من العمود المناعي Immunoaffinity بواسطة 3 مل من الميثانول. وأخذ 1 مل من العينة المحتوية على الأوكراتوكسين A وقُدرت بواسطة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC).

3 - 5 تحضير عينات القهوة المحمصة والمطحونة لاستخلاص Ochratoxin A :

حضرت العينات وفق الطريقة المقترحة من قبل (Cheli., 2013) بوزن 15 غ من العينة وأضيف لها 160 مل من مزيج (الأسيتونتريل : ماء) بنسبة (60 : 40) ، مُزجت جيداً وثقلت بالمتقلة ورُشحت، وأخذ 10 مل من الرشاحة ومُزجت مع 10 مل من مزيج (الأسيتونتريل : ماء) ومُمرت على عمود التنقية SPE ومن ثم مرر 10 مل ميثانول و5 مل بيكرونات الصوديوم وجفف العمود بواسطة الهواء . ثم أُزِح الأوكراتوكسين A من عمود التنقية باستخدام 15 مل من مزيج (ميثانول : ماء) بنسبة (7 : 93). ومُرر 10 مل من الرشاحة السابقة على عمود مناعي Immunoaffinity ثم تمت إزاحة العينة المحتوية على الأوكراتوكسين A من العمود المناعي Immunoaffinity بواسطة 3 مل من الميثانول. وأخذ 1 مل من العينة المحتوية على الأوكراتوكسين A وقُدرت بواسطة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) .

3 - 6 تعريض عينات الطحين الزيرو والقهوة بأنواعها لأشعة الميكروويف :

دُرس تأثير أشعة الميكروويف على عينات من الطحين الزيرو والقهوة بأنواعها (ناعم طحيني ، خشن وسط ، حبوب كاملة) الخالية من الأوكراتوكسين A ، فأضيفت ثلاثة تركيزات من الأوكراتوكسين A (100 ، 75 ، 50) ميكروغرام / كغ ، و حُل كل تركيز ب 5 مل من الميثانول ومُزج مع 5 غرام لكل من عينات الطحين الزيرو والقهوة بأنواعها (ناعم طحيني ، خشن وسط ، حبوب كاملة) .

وضُعت كل عينة في ورق مخروطي سعة 250 مل مع إضافة محلول يحتوي على الميثانول والماء (80 : 20) . ثم عُوملت كل عينة من (الطحين الزيرو و القهوة بأنواعها) بأشعة الميكروويف لمراحل زمنية مختلفة (2 ، 4 ، 6 ، 8 ، 10 دقائق) وعلى شدة 2450 ميغاهرتز . ثم أُستخلص الأوكراتوكسين A حسب الفترات السابقة، وقُدر الأوكراتوكسين A بعد المعاملات بواسطة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) (Alkadi and Altal., 2019) .

3 - 7 التحليل الإحصائي و النتائج :

أُجريت التحاليل الإحصائية للبيانات بحساب المتوسط الحسابي والانحراف المعياري لستة مكررات لكل نوع من أنواع الطحين والأرز والقهوة، ومقارنة الفروق بين المتوسطات لكل نوع باستخدام أقل فرق معنوي بمستوى ثقة 5% عن طريق البرنامج الإحصائي (SPSS 21) للعينات المدروسة كافة.

الفصل الرابع

النتائج والمناقشة

**RESULTS AND
DESCUSSION**

4 - النتائج والمناقشة :

4 - 1 تعيين زمن ظهور OTA باختلاف نسب مكونات الطور الحامل :

يبين الجدول (3) اختلاف زمن ظهور OTA باختلاف نسب مكونات الطور الحامل حسب (Algül and Kara., 2014) مع بعض التعديلات المقترحة في هذا البحث من حيث الحقن المستمر 1 مل من OTA تركيز 10 ميكروغرام / لتر يومياً في جهاز الكروماتوغرافيا السائلة لمدة 9 أشهر. ويلاحظ أن زمن ظهور OTA يختلف باختلاف نسب مكونات الطور الحامل وقد وجد بعد عدة تجارب أن الطور الحامل المؤلف من الماء والميثانول والأسيتونتريل وحمض الخل الثلجي بنسبة (60:19:19:2) قد أعطى أفضل زمن لظهور المركب مع ضمان الاحتفاظ بصلاحية العمود لـ 7 أشهر مقارنة مع النسب الأخرى. وكان التدفق المناسب 1 مل / دقيقة كافياً لإعطاء إشارة مثالية مع زمن ظهور جيد، فكان زمن ظهور OTA (5.80) دقيقة كما هو موضح بالشكل (2) و كانت امتصاصية أوكراتوكسين A أفضل ما يمكن عند طول موجة انبعاث 333 نانومتر، وطول موجة إصدار 460 نانومتر وهذه النتائج اختلفت مع (Paíga et al., 2009, 199) بزمن خروج 10.25 دقيقة مع اختلاف نسب مزج الطور الحامل (60 : 20 : 20) لكل من الماء والميثانول والأسيتونتريل على التوالي. وتوافقت مع (Elaridi, et al., 2019, 471) بنسبة مزج 60 % ماء و 20 % ميثانول و 20 % الأسيتونتريل وبوسط من حمض الخل الثلجي والتي أدت إلى ظهور مركب OTA بزمن 4.8 - 5.3 دقيقة.

الجدول (3) اختلاف زمن ظهور OTA باختلاف نسبة مكونات الطور الحامل

صلاحية العمود شهر	زمن خروج OTA دقيقة	الطور الحامل
		ماء : ميثانول : الأسيتونتريل : حمض الخل
4 أشهر	12.30 / د مشوش	2 : 14 : 14 : 70
7 أشهر	5.80 / د واضح	2 : 19 : 19 : 60
9 شهر	4.10 / د غير واضح	2 : 24 : 24 : 50

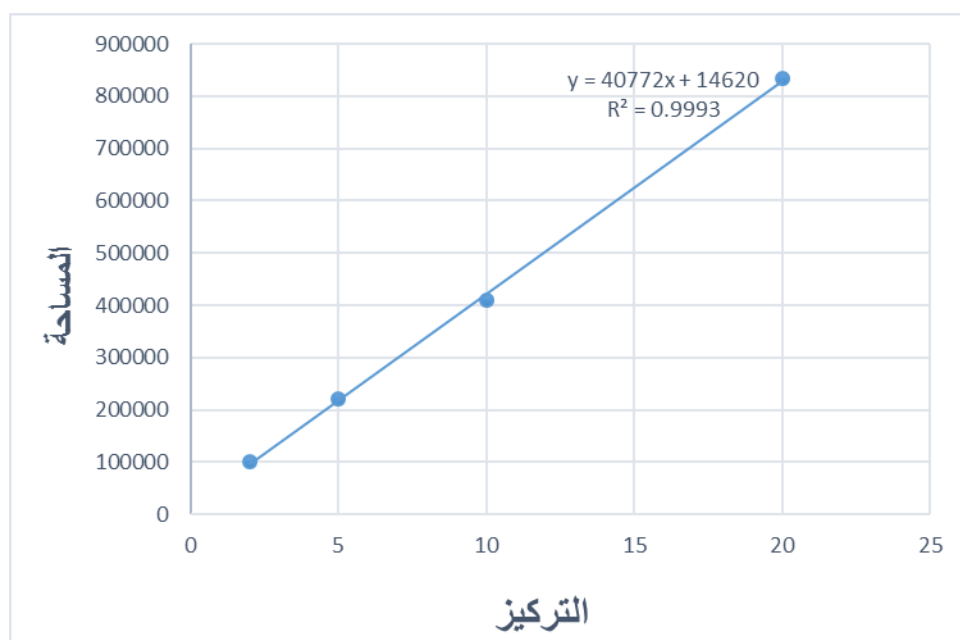


الشكل (2) مخطط الكروماتوغرام لزمن ظهور (OTA) بتركيز 10 ميكروغرام / لتر في زمن 5.80 دقيقة.

4 - 2 الخطية :

دُرست الخطية عند 4 محاليل متدرجة من محلول الأوكراتوكسين A القياسي (2 ، 5 ، 10 ، 20 ميكروغرام / لتر) وحسبت متوسطات المساحة الناتجة عنها بمعادلة الانحدار الخطية التالية :

$Y = 40772x + 14620$ مع تعيين معامل التحديد (R^2) يساوي 0.9993 . ويبين الشكل (3) خطية منحنى المعايرة لـ (OTA) .



الشكل (3) : خطية منحنى المعايرة (OTA) القياسي باستخدام كاشف الفلورة .

4 - 3 حد الكشف وحد التقدير الكمي :

تم استخدام طريقة منحني المعايرة الخطية لتقدير LOD و LOQ (Snyder et al.,1997)، أظهرت النتائج أن قيمة LOQ كانت 0.45 ميكروغرام / لتر، في حين كانت قيمة LOD 0.15 ميكروغرام / لتر، إن انخفاض هذه القيم يدل على حساسية طريقة التحليل المتبعة. كما هو موضح في الجدول (4) .

الجدول (4) حد التقدير الكمي وحد الكشف لـ OTA

حد التقدير الكمي (LOQ) ميكروغرام / لتر	حد الكشف (LOD) ميكروغرام / لتر	نسبة الإشارة الى الضجيج في خط الأساس S / N	معامل التحديد (R ²)
0.45	0.15	0.05	0.999

4 - 4 التكرارية :

حُدثت التكرارية بحقن الأوكراتوكسين A القياسي بتركيزات (5 ، 10 ، 20 ميكروغرام / لتر) 9 مرات في اليوم الواحد وحسب RSD حيث بلغت قيمته 0.950 % وكانت قيمته أقل من 2 % كما هو موضح في

الجدول (5)

الجدول (5) تكرارية تركيز الأوكراتوكسين A القياسي بين المحلول القياسي والمقاس فعلياً

تركيز المحلول القياسي النظري ميكروغرام / لتر	متوسط تركيز المحلول القياسي المقاس (n = 9) ميكروغرام / لتر	% RSD
5	4.632 ± 0.82	0.925
10	9.873 ± 0.73	0.943
20	19.541 ± 0.61	0.982
المتوسط		0.950

4 - 5 الإحكام الوسطي :

حُدِّد الإحكام الوسطي بحقن الأوكراتوكسين A القياسي بتركيز (5 ، 10 ، 20 ميكروغرام / لتر) ولمدة 9 مرات خلال ثلاثة أيام وحسب RSD حيث بلغت قيمته 1.219 % وكانت قيمته أقل من 2 % كما هو موضح في الجدول (6) .

الجدول (6) الإحكام الوسطي لحقن الأوكراتوكسين A القياسي لمدة 9 مرات خلال 3 أيام

اليوم	تركيز المحلول القياسي النظري ميكروغرام / لتر	متوسط تركيز المحلول القياسي الفعلي ميكروغرام / لتر (n = 9)	% RSD
اليوم الأول	5	4.532 ± 0.61	1.323
اليوم الثاني	5	4.351 ± 0.72	1.140
اليوم الثالث	5	4.672 ± 0.83	1.203
اليوم الأول	10	9.468 ± 0.63	1.130
اليوم الثاني	10	9.737 ± 0.92	1.190
اليوم الثالث	10	9.364 ± 0.74	1.301
اليوم الأول	20	19.637 ± 0.85	1.217
اليوم الثاني	20	19.148 ± 0.64	1.314
اليوم الثالث	20	19.752 ± 0.95	1.159
المتوسط			1.219

4 - 6 الاسترجاع :

بلغت النسبة المئوية للاسترجاع الطريقة بتقدير الأوكراتوكسين A في عينات الطحين والأرز (80.212 ، 84.012 ، 82.632 %) عند تراكيز (5 ، 10 ، 20 ميكروغرام / لتر) من الأوكراتوكسين A على التوالي. بينما كانت (75.458 ، 77.290 ، 73.697) في طريقة تقدير القهوة وذلك عند تراكيز (5 ، 10 ، 20 ميكروغرام / لتر) من الأوكراتوكسين A كما هو موضح في الجدول (7).

الجدول (7) النسبة المئوية للاسترجاع تركيز الأوكراتوكسين A في عينات الأرز والطحين والقهوة.

% RSD	الاسترجاع %		الأوكراتوكسين A
	عينات الطحين	عينات القهوة	
1.245	80.212 ± 0.952	75.458 ± 1.232	5 ميكروغرام / لتر
1.197	84.012 ± 0.883	77.290 ± 1.376	10 ميكروغرام / لتر
1.255	82.632 ± 0.740	73.697 ± 0.945	20 ميكروغرام / لتر

4 - 7 نتائج تقدير الأوكراتوكسين A في عينات الطحين :

يبين الجدول (8) مستويات الأوكراتوكسين A في عينات أنواع الطحين من الشركات المنتجة والمستوردة في السوق السورية و يلاحظ أن الحدود الدنيا كانت بقيمة 0.096 ميكروغرام / كغ للطحين الموحد من الشركة A و القيمة العليا كانت بقيمة 0.125 ميكروغرام / كغ للطحين المستورد من قبل الشركة B، أما متوسط كمية الأوكراتوكسين A للشركات المنتجة والمستوردة (A ، B ، C) لطحين الزيرو والطحين الموحد والطحين المستورد فقد بلغ 0.107 و 0.109 و 0.116 ميكروغرام / كغ على التوالي. في حين كانت قيم OTA في القمح ومنتجاته في الجزائر ما بين 3 إلى 15 ميكروغرام / كغ وبمتوسط 9 ميكروغرام / كغ وهي قيم مرتفعة عند مقارنتها مع المواصفات الأوروبية المشتركة بحد يزيد عن 3 ميكروغرام / كغ (European Commission, 2005,3). وقد بين كل من (Bullerman and Bianchini.,2007) بأن عملية الطحن ونسبة الاستخراج ونوع المطحنة يمكن أن تؤدي إلى التخفيف

من تركيز OTA بسبب إزالة النخالة من حبوب القمح وبالتالي يكون محتوى جنين القمح من OTA أقل ما يمكن (Cheli., 2013). وقد توافقت نتائجنا مع ما وجدته (Duarte et al., 2011, 187) في دراستهم عن كميات الأوكراتوكسين A المتناولة من حبوب القمح ومنتجاته وخاصة الطحين. كما أن هذه القيم المدروسة لدينا كانت ضمن حدود المواصفة القياسية السورية رقم 2680 لعام 2008 و ضمن الحدود الدولية التي أقرتها السوق الأوروبية المشتركة بحد لا يزيد عن 3 ميكروغرام / كغ European (Commission, 2005,3) .

الجدول (8) كمية الأوكراتوكسين A في عينات أنواع الطحين في السوق السورية

(µg / kg) Ochratoxin A			الشركات المنتجة والمستوردة
طحين مستورد	الطحين الموحد	طحين الزير	
0.105 ± 0.004 ^c	0.096 ± 0.005 ^c	0.103 ± 0.001 ^b	A
0.125 ± 0.002 ^a	0.118 ± 0.003 ^a	0.102 ± 0.004 ^b	B
0.120 ± 0.001 ^b	0.115 ± 0.004 ^b	0.116 ± 0.005 ^a	C
0.116 ± 0.002	0.109 ± 0.004	0.107 ± 0.003	المتوسط الحسابي n = 6

- القيمة تمثل متوسط ستة مكررات .

- تدل الأحرف المتشابهة في العمود الواحد على عدم وجود فروق معنوية على مستوى ثقة $P \leq 0.05$.

4 - 8 نتائج تقدير الأوكراتوكسين A في عينات الأرز :

أظهرت النتائج كما هي موضحة في الجدول (9) مستويات الأوكراتوكسين A في عينات أصناف الأرز من الشركات المستوردة في السوق السورية فيلاحظ بأن الحدود الدنيا كانت بقيمة 0.103 ميكروغرام / كغ للأرز الإسباني من الشركة E والقيمة العليا كانت بقيمة 0.130 ميكروغرام / كغ للأرز الإسباني من الشركة F. أما متوسط كمية الأوكراتوكسين A للشركات المستوردة (D, E, F) لحبوب الأرز المصري والهندي والأمريكي والإسباني بقيم بلغت 0.116 و 0.109 و 0.122 و 0.116 ميكروغرام / كغ على التوالي. وهذه النتائج تتوافق مع ما وجدته (Toman, et al., 2016, 32) في دراستهم عن كميات الأوكراتوكسين A الموجودة في الأرز المباع في أسواق التشيك وسلوفاكيا عند

استخدام الكروماتوغرافيا السائلة في التقدير. وقد بين (Igbal et al., 2016) في نتائج دراسته التي بحثت 208 عينات من الأرز ومنتجاته في باكستان بأن 35 % من العينات كانت ملوثة بأفلاتوكسين B1 و 24 % من العينات الأخيرة كانت محتوية على OTA بقيم ما بين 8.9 إلى 12.4 ميكروغرام/ كغ وكانت الفروق معنوية ما بين الأرز الخام و غير المقشور والمبيض حيث كانت القيم منخفضة في الأرز المعامل بالتبييض إلا أن جميع هذه القيم كانت مرتفعة عند مقارنتها مع المواصفات الأوروبية المشتركة بحد يزيد عن 5 ميكروغرام / كغ (European Commission, 2005,3). كما أن هذه القيم المدروسة لدينا كانت ضمن حدود المواصفة القياسية السورية رقم 2680 لعام 2008 و ضمن الحدود الدولية التي أقرتها السوق الأوروبية المشتركة بحد لا يزيد عن 5 ميكروغرام / كغ European (Commission, 2005,3).

الجدول (9) كمية الأوكراتوكسين A في عينات أصناف الأرز من الشركات المستوردة في السوق السورية

Ochratoxin A (µg / kg)				الشركات المستوردة
الأرز الإسباني	الأرز الأمريكي	الأرز الهندي	الأرز المصري	
0.115 ± 0.004 ^b	0.125 ± 0.004 ^a	0.108 ± 0.003 ^b	0.120 ± 0.005 ^a	D
0.103 ± 0.005 ^c	0.118 ± 0.001 ^b	0.115 ± 0.004 ^a	0.119 ± 0.003 ^a	E
0.130 ± 0.003 ^a	0.124 ± 0.005 ^a	0.105 ± 0.001 ^c	0.111 ± 0.002 ^b	F
0.116 ± 0.004	0.122 ± 0.004	0.109 ± 0.002	0.116 ± 0.003	المتوسط n = 6

- القيمة تمثل متوسط ستة مكررات .

- تدل الأحرف المتشابهة في العمود الواحد على عدم وجود فروق معنوية على مستوى ثقة $P \leq 0.05$.

4 - 9 نتائج تقدير الأوكراتوكسين A في عينات القهوة :

يبين الجدول (10) مستويات الأوكراتوكسين A في عينات أنواع حبوب القهوة من الشركات المستوردة في السوق السورية حيث يلاحظ بأن الحدود الدنيا كانت بقيمة 0.105 ميكروغرام / كغ للقهوة البرازيلية المطحونة والقيمة العليا كانت بقيمة 0.130 ميكروغرام / كغ لحبوب القهوة الخضراء موكا أما متوسط كمية أوكراتوكسين A للقهوة الكولومبية والقهوة البرازيلية وقهوة موكا فقد بلغ 0.111 و 0.116 و 0.110 ميكروغرام / كغ على التوالي. كما يلاحظ بأن كمية أوكراتوكسين A في الحبوب الخضراء كانت بقيم 0.118 و 0.128 و 0.130 ميكروغرام / كغ لكل من القهوة الكولومبية والقهوة البرازيلية وقهوة موكا على التوالي. وهذه النتائج تتوافق مع ما وجدته (Dietrich et al., 2017, 341) في دراستهم عن كميات الأوكراتوكسين A المتواجدة في حبوب القهوة. كما أن هذه القيم المدروسة لدينا كانت ضمن حدود المواصفة القياسية السورية رقم 2680 لعام 2008 و ضمن الحدود الدولية التي أقرتها السوق الأوروبية المشتركة بحد لا يزيد عن 5 ميكروغرام / كغ European Commission, (2005, 3). وقد بينت دراسة (Pera et al ., 2008) في البرازيل أن تحميص حبوب القهوة الخضراء ما بين 3 و 10 دقائق وبحسب نوعية لون الحبوب فاتحة أو وسط أو غامقة ودرجة حرارة التحميص ما بين 150 م° إلى 165 م° أدت إلى تخفيض مستوى OTA من 65 % وحتى 90 %. وأكد الباحثون أنفسهم بأن طريقة تحضير القهوة يؤثر في محتوى OTA بتخفيض تركيزه مثل القهوة السريعة الإيطالية (Moka Express) والمحضرة بماء ساخن يغلي لمدة قصيرة، في حين أن القهوة التركية المحضرة بطريقة التسريب لسحب القهوة بالماء الساخن لمدة 10 دقائق تكون غير فعالة في خفضه.

الجدول (10) كمية الأوكراتوكسين A في عينات أنواع حبوب القهوة من الشركات المستوردة في السوق السورية

(µg / kg) Ochratoxin A			حبوب القهوة
قهوة كولومبية	قهوة برازيلية	قهوة موكا	
0.118 ± 0.003 ^a	0.128 ± 0.005 ^a	0.130 ± 0.005 ^a	حبوب خضراء
0.110 ± 0.004 ^b	0.118 ± 0.004 ^b	0.111 ± 0.004 ^b	حبوب محمصة
0.106 ± 0.001 ^c	0.105 ± 0.002 ^c	0.108 ± 0.003 ^c	حبوب مطحونة
0.111 ± 0.002	0.117 ± 0.003	0.116 ± 0.004	المتوسط n = 6

- القيمة تمثل متوسط ستة مكررات .

- تدل الأحرف المتشابهة في العمود الواحد على عدم وجود فروق معنوية على مستوى ثقة $P \leq 0.05$.

4 - 10 نتائج تأثير أشعة الميكروويف في خفض OTA في عينات الطحين الزيرو :

يبين الجدول (11) تأثير أشعة الميكروويف في تقليل محتوى الأغذية الملوثة بإضافة تراكيز مختلفة من الأوكراتوكسين A (100 ، 75 ، 50 ميكروغرام / كغ) في عينات الطحين الزيرو، حيث يلاحظ بأن زيادة زمن التسخين تؤدي إلى تقليل تركيز OTA عند طاقة 100 % من التردد البالغ 2450 ميغا هرتز. ففي عينات الشاهد المضاف إليه تركيز 100، 75 ، 50 ميكروغرام / كغ انخفض التركيز إلى 62.7 و 47.02 و 31.03 ميكروغرام / كغ على التوالي في زمن تعرض لمدة 10 دقائق حيث كانت نسبة الفقد من المحتوى من الأوكراتوكسين A 37.3 % . كما يلاحظ من الشكل رقم (4) بأن الزمن اللازم الفعلي لتخفيض التركيز يبدأ بعد 6 دقائق من زمن التسخين للتركيز المضافة كافة من 100، 75، 50 ميكروغرام / كغ في عينات الطحين الزيرو. وهذا يعود إلى الرطوبة والوسط المائي للعينات المعاملة بالميكروويف التي تؤدي إلى انخفاض OTA بارتفاع درجة حرارة الوسط. وتوافقت هذه النتائج مع كل من (Pluyer et al.,1987) ، (Duarte et al .,2010, 187) ، (Toman.,2016,32). وقد بين (Pluyer et al.,1987) بأن أشعة الميكروويف تكون فعالة في تخفيض OTA في الفستق ما بين 48 إلى 61 % من قيمة OTA المضافة للعينات. كما بين (Jalil et al.,2020) بدراسته عن تأثير أشعة الميكروويف بتحميم الكاجو بالطرائق التقليدية في إيران بعد النقع لمدة 5، 10، 24 ساعة أدت إلى تخفيض OTA

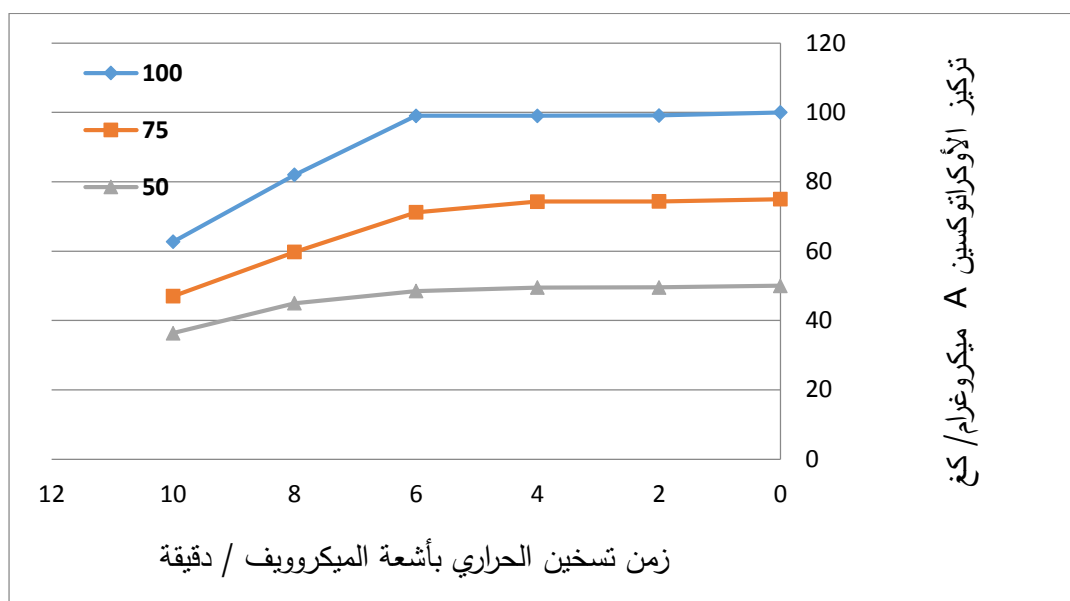
في العينات كافة ما بين 60 إلى 65 % من قيمة العينات الملوثة بتركيز 100 ميكروغرام / كغ وكانت استنتاجاتهم بأن الطريقة التقليدية بالتحميم تؤدي إلى تقليل تركيز OTA وعند استخدام أشعة الميكروويف مع التحميم يزداد انخفاض OTA حتى 65 % بدون تغير لطعم ونكهة الكاجو. وكان استنتاجهم بأنه من الصعب التخلص نهائياً من OTA بشكل كامل أو بزيادة الحرارة عن 150 م° سواء حرارياً بأشعة الميكروويف أو بزيادة الحرارة العادية والتي تؤدي إلى انخفاض جودة الكاجو.

الجدول (11) تأثير أشعة الميكروويف في خفض تراكيز الأوكراتوكسين A مع الزمن في عينات الطحين الزيرو

(µg / kg) Ochratoxin A			زمن التعرض للأشعة / د
50	75	100	0
49.55 ± 0.54 ^a	74.32 ± 0.62 ^a	99.10 ± 0.90 ^a	2
49.52 ± 0.33 ^a	74.28 ± 0.55 ^a	99.50 ± 0.07 ^a	4
44.47 ± 0.43 ^b	68.31 ± 0.45 ^b	90.94 ± 1.2 ^b	6
39.99 ± 0.34 ^c	59.77 ± 0.62 ^c	79.99 ± 1.6 ^c	8
31.32 ± 0.45 ^d	47.02 ± 0.33 ^d	62.70 ± 1.8 ^d	10

- تشير القيمة إلى متوسط ثلاثة مكررات.

- تدل الأحرف المتشابهة في العمود الواحد على عدم وجود فروق معنوية على مستوى ثقة $P \leq 0.05$.



الشكل (4) تأثير أشعة الميكروويف في تركيز Ochratoxin A في عينات الطحين الزيرو.

4 - 11 نتائج تأثير أشعة الميكروويف في خفض معدل تركيز الأوكراتوكسين A مع الزمن

في حجم حبيبات القهوة :

يبين الجدول (12) والشكل (5) تأثير أشعة الميكروويف في خفض معدل تركيز الأوكراتوكسين A مع الزمن في حجم حبيبات القهوة (ناعم طحيني، خشن وسط وجبوب كاملة) الملوثة بتركيز 100 ميكروغرام/كغ. إذ يلاحظ بأن القهوة الناعمة والخشنة والوسط والحبوب الكاملة كان تأثير أشعة الميكروويف في خفض معدل تركيز OTA في نهاية 10 دقائق من التسخين إلى 33.5 و 40.3 و 51.4 % من القيمة الملوثة لكل منهما على التوالي. وهذا يعود إلى أن تلوث السموم الفطرية غالباً ما تتوضع وتنمو على السطوح الخارجية للحبوب الغذائية المخزنة بظروف سيئة (Graziani, et al., 2012). وبشكل عام تكون الميكوتوكسينات من الناحية الفيزيائية والكيميائية أو تخفيضها حيويًا أمرًا في غاية الصعوبة. والسبب في ذلك يعود إلى طبيعته بتحمل الحرارة مثل OTA والتي تعتمد بشكل أساسي على المحتوى المائي للمادة الغذائية. فعند تعرض حبوب القمح أو القهوة إلى حرارة عالية يكون

انخفاض OTA على درجات حرارة عالية 150 م° مع مدة زمنية تصل ل 200 دقيقة فعالاً بنسبة 50

% ويزداد الانخفاض بترطيب الحبوب المعالجة (Bullerman and Bianchini., 2007) ،

(Graziani, et al., 2012). لذلك يجب العمل على تخزين الحبوب الغذائية بالشروط النظامية لمنع

نمو الفطريات المنتجة للميكوتوكسينات وانتظار الطرائق الجديدة العلمية لإمكانية انخفاضها 100 %.

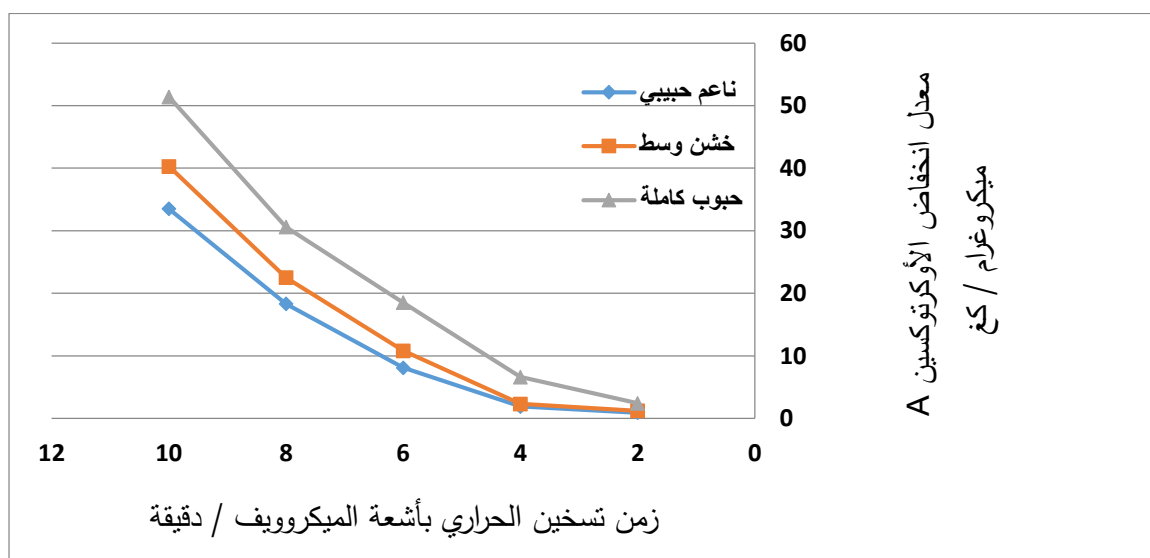
الجدول (12) تأثير أشعة الميكروويف في خفض معدل تركيز الأوكراتوكسين A مع الزمن في حجم حبيبات القهوة الملوثة بتركيز

100 ميكروغرام / كغ

زمن التسخين الحراري بأشعة الميكروويف / دقيقة					حجم الحبيبات
10	8	6	4	2	
33.5 ± 1.3 ^c	18.3 ± 1.2 ^c	8.1 ± 0.8 ^c	1.9 ± 0.1 ^c	0.9 ± 0.1 ^c	ناعم طحيني
40.3 ± 2.2 ^b	22.5 ± 2.5 ^b	10.8 ± 0.5 ^b	2.3 ± 0.2 ^b	1.2 ± 0.1 ^b	خشن وسط
51.4 ± 3.2 ^a	30.6 ± 2.8 ^a	18.5 ± 0.4 ^a	6.6 ± 0.6 ^a	2.4 ± 0.4 ^a	حبوب كاملة

- تشير القيمة إلى متوسط النسبة المئوية للفقد معبر عنها %.

- تدل الأحرف المتشابهة في العمود الواحد على عدم وجود فروق معنوية على مستوى ثقة $P \leq 0.05$.



الشكل (5) تأثير أشعة الميكروويف في خفض معدل تركيز الأوكراتوكسين A مع الزمن في حجم حبيبات القهوة الملوثة بتركيز

100 ميكروغرام / كغ .

الفصل الخامس

الاستنتاجات والتوصيات

CONCLUSIONS

AND

RECOMMENDATIONS

5-1 الإستنتاجات :

1. بينت النتائج بأن الطور الحامل المؤلف من الماء والميثانول والأسيتونتريل وحمض الخل الثلجي بنسب (60 : 19 : 19 : 2) أعطى أفضل زمن لفصل المركب OTA (5.80) دقيقة وكان التدفق المناسب 1 مل / دقيقة مع دقة الإحكام والاسترجاع .
2. أظهرت النتائج بأن محتوى طحين الزيرو والطحين الموحد والطحين المستورد من OTA كان في حده الأعلى 0.125 ميكرو غرام / كغ في الشركة B في حين كانت حبوب القهوة الخضراء موكا في حدها الأعلى 0.130 ميكرو غرام / كغ مقارنة مع القهوة الخضراء الكولومبية والقهوة الخضراء البرازيلية .
3. بلغت كميات OTA في حبوب الأرز في حدها الأعلى في الشركة F بقيمة 0.130 ميكرو غرام / كغ للأرز الإسباني .
4. كانت جميع قيم مكونات OTA في أنواع الطحين وأنواع القهوة وأنواع الأرز المستورد ضمن حدود المواصفة القياسية السورية والسوق الأوروبية المشتركة .
5. خفضت أشعة الميكروويف محتوى الأوكراتوكسين A في عينات الطحين الزيرو وكانت نسبة الفقد 37.3 % في جميع المعاملات .
6. أظهرت النتائج أن مدة التعرض لأشعة الميكروويف تؤثر في معدل تركيز الأوكراتوكسين A في الأغذية الملوثة في عينات الطحين الزيرو وحببيات القهوة (ناعم طحيني، خشن وسط وحبوب كاملة) بتخفيضها في الدقيقة السادسة من التعرض ولمدة عشر دقائق .
7. بينت النتائج بأن مقدار تخفيض OTA يكون أكبر بالتعرض لأشعة الميكروويف بزيادة التلوث وبحجم حبيبات المادة الغذائية حتى 51 % لحبوب القهوة الكاملة الملوثة بتركيز 100 ميكرو غرام / كغ .

5-2 التوصيات :

1. التأكيد على اعتماد استخدام طريقة الكروماتوغرافيا السائلة ذات الأداء العالي لتقدير OTA في الحبوب غير المصنعة ومنتجاتها وأغذية الأطفال الرضع ضمن الظروف العملية في بحثنا وتحديد تركيزها بسبب حملتها العالية من الفطور المفزة لسموم الأوكراتوكسين A .
2. إجراء المزيد من الدراسات للتحري عن المركبات الناتجة عن تأثير أشعة الميكروويف على الأوكراتوكسين A ومعرفة مدى سميتها .

الفصل السادس

المراجع

REFERENCES

6 - المراجع

6 - 1 المراجع العربية :

المواصفة القياسية السورية. (2008). الحدود القصوى للسموم الفطرية المسموح بها في الأغذية والأعلاف (مايكوتوكسينات)، رقم 2680، وزارة الصناعة، هيئة المواصفات والمقاييس العربية السورية، دمشق، سورية.

6 - 2 المراجع الأجنبية :

- Abd-Elsalam, K., A., Hashim, A. F., Alghuthaymi, M. A. and Said-Galiev, E. (2017). Nanobiotechnological strategies for toxigenic fungi and mycotoxin control. In A. M. Grumezescu (Ed.), Food preservation (pp. 337 – 364). Elsevier Academic Press.
- Abid, S., Hassen, W., Achour, A., Skhiri, H., Maaroufi, K., Ellouz, F., Creppy, E. and Bacha, H. (2003). Ochratoxin A and chronic human nephropathy in Tunisia: is the situation endemic? Human and Experimental Toxicology. 22 : 77 – 84.
- Adebo, O. A., Molelekoa, T., Makhuvele, R., Adebisi, J. A., Oyediji, A. B. and Gbashi, S. (2021). A review on novel non-thermal food processing techniques for mycotoxin reduction. International Journal of Food Science and Technology, 56 (1), 13 – 27.
- Ahmad, A. and Jae H. (2017). Occurrence, Toxicity, and Analysis of major Mycotoxins in Food. Occurrence, Toxicity, and Analysis of major Mycotoxins in Food 14 : 632 - 638.
- Ahmed, O. S., Tardif, C., Rouger, C., Atanasova, V., Richard-Forget, F. and Waffo-T'eguo, P. (2022). Naturally occurring phenolic compounds as

- promising antimycotoxin agents**: Where are we now ? Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety.
- Ali, A., Shehzad, A., Muhammad, R. and Muhammad, S. (2013). **Ochratoxin A in Cereal Products, Potential Hazards and Prevention strategies: A Review**. Journal of Food Sciences 23 : 52 - 61.
- Ali, M., Sun, D. W., Cheng, J. H., and Johnson Esua, O. (2022). **Effects of combined treatment of plasma activated liquid and ultrasound for degradation of chlorothalonil fungicide residues in tomato**. Food Chemistry, 371, Article 131162.
- Algül, I. and Kara, D. (2014). **Determination and chemometric evaluation of total aflatoxin, aflatoxin B1, ochratoxin A and heavy metals content in corn flours from Turkey**. Food Chem. 157 : 70 – 76.
- Alim, N., Naseem, Z., Yasha, N. and Sajia H. (2014). **Aflatoxin: A potential threat to human health**. Journal of Food Science 24 : 256 – 271.
- Alkadi, H and Altal, J. (2019). **Effect of microwave oven processing treatments on reduction of Aflatoxin B1 and Ochratoxin A in maize flour**. European Journal of Chemistry 10 (3) : 224 - 227.
- Andre, K. and Ali, A. (2010). **Ochratoxin A: General overview and actual molecular status**. Journal of Toxins 2 : 461 - 493.
- Awad, K. Ghareeb and J. Böhm. (2012). **Occurrence, Health Risks and Methods of Analysis for Aflatoxins and Ochratoxin A**. J. Vet. Anim. Sci. (2012), Vol. 2 : 1 - 10.
- Baker, R.J. and Pusey CD. (2004). **The changing profile of acute tubulointerstitial nephritis**. Nephrol Dial Transplant 19 : 8 – 11.
- Barkai-Golan, R., and Follett, P. A (2017). Irradiation effects on mycotoxin accumulation, p. 41-46. In R. Barkai-Golan and P. A. Follett (ed.), **Irradiation for quality improvement, microbial safety and phytosanitation of fresh produce**. Academic Press, New York.

- Balendres, M., Karlousky, P. and Cumagun C. (2019). **Mycotogenic fungi and mycotoxin agricultural crop commodities in Philippines.** Journal of Food Science 8 : 249.
- Bellí, N., Mitchell, D., Marín, S. and Alegre, I. (2005). **Ochratoxin A-producing fungi in Spanish wine grapes and their relationship with meteorological conditions.** Journal of Plant Pathology 113 : 233 - 239.
- Ben Mustapha, M., Bousselmi, M., Jerbi, T. Ben Bettaïeb N., and Fattouch S. (2014). **Gamma radiation effects on microbiological, physico-chemical and antioxidant properties of Tunisian millet (Pennisetum glaucum L.R.Br.).** Food Chem. 154:230 – 237.
- Bittencourt, A., Oliveira, F., Dilkin, P. and Correa, B. (2005). **“Mycotoxin occurrence in corn meal and flour traded in Sao Paulo, Brazil,”** Food Control, vol. 16, no. 2, pp. 117 – 120.
- Breitholtz-Emanuelsson, A., Minervini, F., Hult, K. and Visconti A. (1994). **Ochratoxin A in human serum samples collected in southern Italy from healthy individuals and individuals suffering from different kidney disorders.** Natural Toxins. 2 : 366 – 370.
- Bucheli, P. and Taniwaki, M. (2002). **Research on the origin and the impact of postharvest handling and manufacturing on the presence of ochratoxin A in coffee – Review.** Food Addit Contam 19 : 655 – 665.
- Bui-Klimke, T. R. and Wu, F. (2015). **Ochratoxin A and human health risk: A review of the evidence.** Crit Rev Food Sci Nutr. 2015 November 10; 55(13) : 1860 – 1869.
- Bullerman, L.B. and Bianchini, A., (2007). **Stability of mycotoxins during food processing.** International journal of food microbiology, 119, 140 – 146.
- Cai, J., Yan, R., Shi, J., Chen, J., Long, M. and Wu, W. (2022). **Antifungal and mycotoxin detoxification ability of essential oils: A review.** Phytotherapy Research, 36 (1), 62 – 72.
- Cairns, V., Aldred, D. and Magan, N. (2015). **Water, temperature and gas composition interactions affect growth and Ochratoxin A production by**

- isolates of *Penicillium verrucosum* on wheat grain**. J Appl Microbiol 99 : 1215 - 1221.
- Calado, T., Venâncio, A. and Abrunhosa, L. (2014). **Irradiation for mold and mycotoxin control: a review.Compr**. Rev. Food Sci. Food Saf. 13 : 1049 – 1061.
- Calado, T., Fernández-Cruz, Cabo Verde, M. L., Venâncio, A and Abrunhosa L. (2018). **Gamma irradiation effects on ochratoxin A: degradation, cytotoxicity and application in food**. Food Chem. 240 : 463 – 471.
- Castegnaro, M., Tozlovanu, M., Wild, C., Molinié, A.and Pfoh L. (2006). **Advantages and drawbacks of Immunoaffinity columns in analysis of mycotoxins in food**. Mol Nutr Food Res 50 : 480 - 487.
- Castellari, M., Fabbri, S., Fabiani, A.and Amati, A. (2000). **Comparison of different Immunoaffinity clean-up procedures for high-performance liquid chromatographic analysis of Ochratoxin A in wines**. J Chromatogr A 888 : 129 – 136.
- Chaudhari, A. K., Dwivedy, A. K., Singh, V. K., Das, S., Singh, A., and Dubey, N. K. (2019). **Essential oils and their bioactive compounds as green preservatives against fungal and mycotoxin contamination of food commodities with special reference to their nanoencapsulation**. Environmental Science and Pollution Research, 26 (25), 25414 – 25431.
- Chaudhari, A. K., Singh, V. K., Das, S., Deepika, Prasad, J.and Dwivedy, A. K. (2020). **Improvement of in vitro and in situ antifungal, AFB1 inhibitory and antioxidant activity of *Origanum majorana* L. essential oil through nanoemulsion and recommending as novel food preservative**. Food and Chemical Toxicology, 143, Article 111536.
- Chen, X., Qiu, Y., Zhang, J., Guo, Y., Ding, Y., and Lyu, F. (2022). **Degradation efficiency and products of deoxynivalenol treated by cold plasma and its application in wheat**. Food Control, 136, Article 108874.
- Cheli, F. (2013). **Effect of milling procedures on mycotoxin distribution in wheat fractions: a review**. Food science and technology, 54, 307 – 314.

- Council, NR., editor.(1983). **National Research Council (NRC) Risk assessment in the Federal Government: Managing the process.** Washington, DC: National Academy Press.
- Dahlmann, A., Dantzler, WH., Silbernagl, S. and Gekle, M.(1998). **Detailed mapping of ochratoxin A reabsorption along the rat nephron in vivo: the nephrotoxin can be reabsorbed in all nephron segments by different mechanisms.** J Pharmacol Esp Ther. 286 : 157 – 162.
- Di Stefano, V., R. Pitonzo, N. Cicero, and M. C. D'Oca. (2014). **Mycotoxin contamination of animal feedingstuff: detoxification by gamma-irradiation and reduction of aflatoxins and ochratoxin A concentrations.**Food Addit. Contam. A31 : 2034 – 2039.
- Dietrich,D., Schlatter,j and Schlatter, S.R.(2017). **The occurrence of ochratoxin A in coffee** Food Chem Toxicol. (2017) ; 33(5) : 341 - 55.
- Duarte, S.C, Pena, A, and Lino C. M.(2011). **Human ochratoxin A biomarkers- From exposure to effect.** Critical Reviews in Toxicology. 41 : 187 – 212.
- Duarte, S. C., Pena, A, and Lino, C. M. (2010). **A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products.** Food Microbiology, 27(2), 187 – 198.
- Ehlermann, D. A. E. (2016). **Wholesomeness of irradiated food.** Radiat. Phys. Chem. 129 : 24 – 29.
- El, D., Gambacorta, L. and Solfrizzo, M. (2019). **Multi mycotoxin occurrence in species and herbs commercialized in Lebanon.** Journal of Food Control 95 : 63 - 70.
- Elaridi, J., Yamani, O., Matri, A., Dakroub, S and Attieh, Z.(2019) . **Determination of Ochratoxin A (OTA), Ochratoxin B (OTB), T-2, and HT-2 Toxins in Wheat Grains, Wheat Flour, and Bread in Lebanon by LC-MS/MS** . Toxin, 11, 471.
- Elling, F.(1979). **Ochratoxin A-induced mycotoxic porcine nephropathy: Alterations in enzyme activity in tubular cells.** Acta Pathol. Microbiol. Scand. 87 : 237 – 243.

- Epshtein, N. A . (2004) . **Structure of chemical compounds, methods of analysis and process control, validation of HPLC techniques for pharmaceutical analysis** . Chemistry Journal , 38 : 212 - 228.
- Ermer, J. and Miller, J. H. (2006). **Method Validation in Pharmaceutical Analysis, WILEY-VCH Verlag GmbH & Co** . KGaA , Weinheim.
- Eskola M, Kos G, Elliott T, Krska R. (2019). **Worldwide contamination of food crops with mycotoxins**. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 60 (223).
- Esua, O. J., Cheng, J.-H., and Sun, D.-W. (2021). **Functionalization of water as a nonthermal approach for ensuring safety and quality of meat and seafood products**. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 61(3), 431 – 449.
- European Commission. (2005). **Commission regulation No 123/ 2005 of 26 January 2005 amending regulation (EC) No 466/2001 as regards ochratoxin A**. Official Journal of the European Communities, L-25, 3 – 5.
- European Food Safety Authority (EFSA).(2006). **Opinion of the scientific panel on contaminants in the food chain on a request from the commission related to ochratoxin A in food**. 365 : 1 – 56.
- Farkas, J., Ehlermann, D. A. E. and Mohácsi-Farkas, C. (2014). **Food technologies: food irradiation, p. 178–186.In Y. Motarjemi (ed.), Encyclopedia of food safety**. Academic Press, New York.
- Fazekas, B., Tar, A.and Kovacs, M.(2005). **Ochratoxin A content of urine samples of healthy humans in Hungary**. Acta Vet Hung. 53 : 35 – 44.
- Frantisek, M., Annie, L., Vladimir, O. and Jakub, T. (2016). **Ochratoxin A: 50 Years of Research**. Journal of Toxins 8 : 191.
- Gómez, J. V., Tarazona, A., Mateo, F., Jiménez, M., and Mateo, E. M. (2019). **Potential impact of engineered silver nanoparticles in the control of aflatoxins, ochratoxin A and the main aflatoxigenic and ochratoxigenic species affecting foods**. Food Control, 101, 58 – 68.

- Graziani, G., Santini, A., Feeacane, R., and Ritiene, A.(2012). **Microwave-assisted Extraction of Ochratoxin A from Roasted Coffee Beans: An Alternative Analytical Approach.** J Food research. V. 3.
- Grollman, AP., Shibutani, S., Moriya, M., Miller, F., Wu L, Moll U, Suzuki N, Fernandes, A., Rosenquist, T., Medverec, Z., Jakovina, K., Brdar, B., Slade, N., Turesky, RJ., Goodenough, AK., Rieger, R., Vukelic, M.and Jelakovic B.(2007). **Aristolochic acid and the etiology of endemic (Balkan) nephropathy.** Proc Natl Acad Sci U S A. 104 : 12129 – 12134.
- Gumus, R, Ercan, N.and Imik H. (2018). **Determination of Ochratoxin A levels in mixed feed and feed stuffs used in some laying hens and ruminants enterprises of Sivas city.** Journal of Poultry Science 20: 85 -90.
- Hagelberg, S., Hult, K.and Fuchs R.(1989). **Toxicokinetics of ochratoxin A in several species and its plasma-binding properties.** J Appl Toxicol. 9:91–96.
- Hamad, G. M., Mohdaly, A. A., El-Nogoumy, B. A., Ramadan, M. F., Hassan, S. A., and Zeitoun, A. M. (2021). **Detoxification of aflatoxin B1 and ochratoxin A using Salvia farinacea and Azadirachta indica water extract and application in meat products.** Applied Biochemistry and Biotechnology, 193(10), 3098 – 3120.
- Hassan, A. A., Howayda, M. E., and ,Mahmoud, H. H. (2013). **Effect of zinc oxide nanoparticles on the growth of mycotoxigenic mould.** Studies in Chemical Process Technology (SCPT), 1(4), 66 – 74.
- Hassen, W., Abid, S., Achour, A., Creppy, E.and Bacha H.(2004). **Ochratoxin A and beta2-microglobulinuria in healthy individuals and in chronic interstitial nephropathy patients in the centre of Tunisia: a hot spot of Ochratoxin A exposure.** Toxicology. 199 : 185 – 193.
- Hojnik, N., Modic, M., Walsh, J., ~Zigon, D., Javornik, U.and Plavec, J. (2021). **Unravelling the pathways of air plasma induced aflatoxin B1 degradation and detoxification.** Journal of Hazardous Materials, 403, Article 123593.

- Hu, D., Yu, S., Yu, D., Liu, N., Tang, Y. and Fan, Y. (2017). **Biogenic Trichoderma harzianum-derived selenium nanoparticles with control functionalities originating from diverse recognition metabolites against phytopathogens and mycotoxins.** Food Control, 106, Article 106748.
- Hu, D., Yu, S., Yu, D., Liu, N., Tang, Y. and Fan, Y. (2019). **Biogenic Trichoderma harzianum-derived selenium nanoparticles with control functionalities originating from diverse recognition metabolites against phytopathogens and mycotoxins.** Food Control, 106, Article 106748.
- International Agency for Research on Cancer (IARC) .(1993). **Monography on the evaluation of carcinogenic risks to humans some naturally occurring substance.** Journal of International agency for research on cancer 56 : 489 - 496.
- Iqbal,sh., Rafique, M., Hanif,U.,Zuber,M., Jinap,S.(2016). **The presence of aflatoxins and ochratoxin A in rice and rice products; and evaluation of dietary intake.** Food Chem. Nov 1 ; 210 : 135 - 40.
- Jalili, M., S. Jinap, and M. A. Noranizan. 2012. **Aflatoxins and ochratoxin A reduction in black and white pepper by gamma radiation.** Radiat. Phys. Chem. 81 : 1786 – 1788.
- Jalil, M., Selamat, J, and Rachid,L.(2020).**Effect of thermal processing and traditional flavouring mixture on mycotoxin reduction in pistachio.** World Mycotoxin Journal: 13 (3)- Pages : 381 – 389.
- Jarmila, SS., Frantisek, M., Vladimir, O. and Tomas R. (2013). **Determination of Ochratoxin A in Food by High Performance Liquid Chromatography.** Journal of Analytical Letters 46 : 1495 - 1504.
- Jebali, A., Yasini Ardakani, S. A., Sedighi, N., and Hekmatimoghaddam, S. (2015). **Nanocellulose conjugated with retinoic acid: Its capability to adsorb aflatoxin B1.** Cellulose, 22(1), 363 – 372.
- Jimenez, AM., Lopez de Cerain, A., Gonzalez-Penas, E., Bello, J., Betebeder, AM. and Creppy EE.(1998). **Exposure to ochratoxin A in Europe:**

- comparison with a region of northern Spain. Journal of Toxicology-Toxin Reviews.** 17 : 479 – 491.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA) (1991). **Evaluation of certain food additives and contaminants (Thirty-seventh report)** .WHO Technical Report Series.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA).(2001). **Safety Evaluations of Certain Mycotoxins in Food.** JECFA Food Additives Series.
- Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA).(2007). **Evaluation of certain food additives and contaminants (Sixty-eighth report) of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)** **WHO** .Technical Report Series.
- Jørgensen, K., Rasmussen, G.and Thorup I.(1996). **Ochratoxin A in Danish cereals 1986–1992.** Food Addit. Contam. 13 : 95 – 104.
- Kabak, B., Dobson, A. D. W. and Var, I. (2006). **Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review.**Crit. Rev. Food Sci. Nutr. 46 : 593 – 619.
- Kanapitsas, A., A. Batrinou, A. Aravantinos, C. Sflomos, and P. Markaki. (2016). **Gamma radiation inhibits the production of ochratoxin A byAspergillus carbonarius. Development of a method for OTA determination in raisins.** Food Biosci. 15 : 42 – 48.
- Kawamura, O., Maki, S., Sato, S.and Ueno Y.(1993). **Ochratoxin A in livestock and human sera in Japan quantified by a sensitive ELISA.** In: Creppy EE, Castegnaro M, Dirheimer G, editors. Human chratoxicosis and its pathologies. France: Montrouge; pp. 123 – 127.
- Kedia, A., Dwivedy, A. K., Jha, D. K., and Dubey, N. K. (2016). **Efficacy of Mentha spicata essential oil in suppression of Aspergillus flavus and aflatoxin contamination in chickpea with particular emphasis to mode of antifungal action.** Protoplasma, 253 (3), 647 – 653.

- Khalef, A., Zidane, C., Charef, A., Gharbi, A., Tadjerouna, M., Betbeder, AM. and Creppy EE. (1993). **Ochratoxicose humaine en Algerie.** In: Creppy EE, Castegnaro M, Dirheimer G, editors. Human ochratoxicosis and its pathologies. France: Montrouge; pp. 167 – 174.
- Ki's, M., Milo'sevi'c, S., Vuli'c, A., Herceg, Z., Vuku'si'c, T., and Pleadin, J. (2020). **Efficacy of low pressure DBD plasma in the reduction of T-2 and HT-2 toxin in oat flour.** Food Chemistry, 316, Article 126372.
- Knasmüller, S., V. Mersch-Sundermann, S. Kevekordes, F. Darroudi, W. W. Huber, C. Hoelzl, J. Bichler, and B. J. Majer. (2004). **Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; current state of knowledge.** Toxicology 198 : 315 – 328.
- Kollia, E., Proestos, C., Zoumpoulakis, P., and Markaki, P. (2019). **Capsaicin, an inhibitor of Ochratoxin A production by Aspergillus section Nigri strains in grapes (Vitis vinifera L.).** Food Additives & Contaminants Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment, 36(11), 1709 – 1721.
- Krogh, P. (1974). **Mycotoxic porcine nephropathy: A possible model for Balkan endemic nephropathy.** In: Puhlev A, ditor. Endemic Nephropathy. Sofia: Publishing House of the Bulgarian Academy of Science; pp. 266 – 270.
- Kuiper-Goodman, T., Hilts, C., Billiard, SM., Kiparissis, Y., Richard, IK. and Hayward, S. (2010). **Health risk assessment of ochratoxin A for all age-sex strata in a market economy.** Food Additives and Contaminants 27:212 – 240.
- Kumar, S., A. Kunwar, S. Gautam, and A. Sharma. 2012. **Inactivation of ochratoxin A. ochraceus spores and detoxification of Ochratoxin A in coffee beans by gamma irradiation.** Food Sci. 77: T44 – T51.
- Kuiper-Goodman, T. and Scott, PM. (1989). **Risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A.** Biomed Environ Sci. 2: 179 – 248.

- Kulandaivelu, V., Thirukonda, N., Rajeev, B. and Periyasamy, P. (2011). **Management of Aspergillus ochraceus and Ochratoxin-A contamination in coffee during on-farm processing through commercial yeast inoculation.** Journal of Biological Control 57: 215 - 222.
- Kuruc. J., Hegstad, H., Lee, K. and Wolf-Hall, C. (2015). **Infestation and Quantification of Ochratoxigenic Fungi in Barley and Wheat Naturally Contaminated with Ochratoxin A.** J Food Prot 78: 1350 - 1356.
- Liu, Y. and Wu, F. (2010). **Global burden of aflatoxin-induced hepatocellular carcinoma: a risk assessment.** Env Health Perspec 118 : 818 – 824.
- Lopez, A., Penas-Gonzalez, E., Jimenez, A., M. and Bello, J. (2002). **Contribution to the study of ochratoxin A in Spanish wines.** Food additives and contaminants. (11).
- Lucchetta, G., Bazzo, G., Dal, C. and Bellotto, M. (2010). **Occurrence of black aspergilli and Ochratoxin A on grapes in Italy.** Journal of Toxins 2: 840 – 855.
- Luo, Y., Zhou, Z., and Yue, T. (2017). **Synthesis and characterization of nontoxic chitosan-coated Fe₃O₄ particles for patulin adsorption in a juice-pH simulation aqueous.** Food Chemistry, 221, 317 – 323.
- Luter, L., Wysolouzil, W. and Kashyap, S.C. (1982). **The destruction of aflatoxins in peanuts by microwave roasting.** Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 15: 236 - 238.
- Maaroufi, K., Achour, A., Betbeder, A.M., Hammami, M., Ellouz, F., Creppy, E.E. and Bacha, H. (1995). **Foodstuffs and human blood contamination by the mycotoxin ochratoxin A: Correlation with chronic interstitial nephropathy in Tunisia.** Archives of Toxicology, 69: 552 – 558.
- Madhavan, T. and Gopalan, C. (1968). **The effects of dietary protein on carcinogens of ochratoxins.** Arch Pathol, 80: 133 – 137.
- Magro, M., Moritz, D. E., Bonaiuto, E., Baratella, D., Terzo, M. and Jakubec, P. (2016). **Citrinin mycotoxin recognition and removal by naked magnetic nanoparticles.** Food Chemistry, 203, 505 – 512.

- Makhuvele, R., Naidu, K., Gbashi, S., Thipe, V. C., Adebo, O. A., and Njobeh, P. B. (2020). **The use of plant extracts and their phytochemicals for control of toxigenic fungi and mycotoxins.** Heliyon, 6 (10), 5291.
- Malir, F., Brndiar, M., Roubal. T., Severa. J., Fixa, P., Kacerovsky, J., Zahradnik, J., Osterreicher, J., Knizek, H. and Cerna M.A. (2001). **study of the accumulation of ochratoxin A (OTA) in patients with chronic renal insufficiency (CHRI) in the Czech Republic.** Mycotoxin Research, 17 : 39 – 44.
- Mantle, P.(2002). **Risk assessment and the importance of Ochratoxins.** International Biodeterioration & Biodegradation 50 : 143 - 146.
- Marechera, G. (2015). **Estimation of the potential adoption of Ala safe among smallholder maize farmers in lower eastern Kenya.** African Journal of Agriculture and Resource Economics 10 : 72 - 85.
- Maria, P., Maria, L., Juan, M. and Sofia, C .(2012). **Control of Ochratoxin A production in grapes.** Journal of Toxin 4 : 364 - 372.
- Marta, T. and Bedaso, K.(2016). **Occurrence, importance and control of mycotoxins: A review.** Journal of Cogent Food & Agriculture 2: 1191 -1203.
- Martlbauer, E., Usleber, E. and Straka M.(1996). **Mycotoxin Workshop.** Germany: Kulmbach;. Ochratoxin A im Serum eines Lehrstuhlkollektivs: 1990–1995; pp. 97 – 101.
- Maryam, J. and Iranian J.(2015). **Remediation strategies for mycotoxin control in feed.** Health Safety Environ. 3 (1), 445 - 459.
- Medina, A., Akbar, A., Baazeem, A. and Magan, N .(2017). **Climate change, food security and mycotoxins.** Journal of Food Science 31: 143 - 154.
- Meftah, S., Abid, S. and Dias, T. (2015). **Mechanisms underlying the effect of commercial starter culture and a native yeast on Ochratoxin A production in meat product.** Journal of Risk Assessment 33: 157 - 166.
- Mehany, T., Khalifa, I., Barakat, H., Althwab, S. A., Alharbi, Y. M., and El-Sohaimy, S. (2021). **Polyphenols as promising biologically active**

- substances for preventing SARS-CoV-2: A review with research evidence and underlying mechanisms.** Food Bioscience, 40, Article 100891.
- Mehrez, A., I. Maatouk, R. Romero-González, A. B. Amara, M. Kraiem, A. G. Frenich, and A. Landoulsi. (2016). **Assessment of ochratoxin A stability following gamma irradiation: experimental approaches for feed detoxification perspectives.** World Mycotoxin J. 9 : 289 – 298.
- Molhannad, R., Ali, A., Mohammad, S. and Shehzad A. (2013). **Ochratoxin A in cereal products potential hazards and prevention strategies: A review.** Journal of Food Science 23: 52 – 61.
- Moretti, A., Pascale, M., and Logrieco, A. F. (2019). **Mycotoxin risks under a climate change scenario in Europe.** Trends in Food Science & Technology, 84, 38 – 40.
- Mutlu-Ingok, A., Devecioglu, D., Dikmetas, D. N., Karbancioglu-Guler, F., and Capanoglu, E. (2020). **Antibacterial, antifungal, antimycotoxigenic, and antioxidant activities of essential oils: An updated review.** Molecules, 25(20), 4711.
- Naresh, M. and David, A. (2005). **Conditions of formation of Ochratoxin A in drying, transport and in different commodities.** Food Addit Contam 1: 10 -16.
- Naveen Kumar, K., Venkataramana, M., Allen, J. A., Chandranayaka, S., Murali, H. S., and Batra, H. V. (2016). **Role of Curcuma longa L. essential oil in controlling the growth and zearalenone production of Fusarium graminearum.** LWT - Food Science and Technology, 69, 522 – 528.
- O'Brien, E. and Dietrich, DR. (2005). **Ochratoxin A: the continuing enigma.** Crit Review Toxicol. 35 : 33 – 60.
- Ogara, M., Zarafi, A., Alabi, O., Banwo, O. and Krska, R. (2017). **Mycotoxin patterns in ear rot infected maize: A review comprehensive case study in Nigeria.** Food Control 73 : 1159 - 1168.
- Ozcakmak, S., Gul, O., Dervisoglu, M., Yilmaz, A., Sagdic, O., and Arici, M. (2017). **Comparison of the effect of some essential oils on the growth of**

- Penicillium verrucosum and its ochratoxin a production.** Journal of Food Processing and Preservation, 41(1), 1 – 9.
- Ozcelik, N., Kosar, A. and Sosal, D. (2001). **Ochratoxin A in human serum samples collected in Isparta-Turkey from healthy individuals and individuals suffering from different urinary disorders.** Toxicology Letters. 121 : 9 – 13.
- Paíga, P., Morais, S., Correia, M., Delerue-Matos, C., and Alves, A. (2009). **Determination of Ochratoxin A in Bread: Evaluation of Microwave-Assisted Extraction Using an Orthogonal Composite Design Coupled with Response Surface Methodology.** Journal of Environmental Analytical Chemistry, 89 (3), 199 – 210.
- Palli, D., Miraglia, M., Saieva, C., Masala, G., Cava, E., Colatosti, M., Corsi, AM., Russo, A. and Brera, C. (1999). **Serum levels of ochratoxin A in healthy adults in Tuscany: Correlation with individual characteristics and between repeat measurements.** Cancer Epidemiology, Biomarkers, Prevention. 8 : 265 – 269.
- Palumbo, D., Teresa, L., O'keeffe, Yvonne, S., Carlo, Ho., Santillan J. (2015). **Occurrence of Ochratoxin A Contamination and Detection of Ochratoxigenic Aspergillus Species in Retail Samples of Dried Fruits and Nuts.** Journal of food protection p : 836 – 842.
- Patterson, D. and Allcroft, R. (1970). **Metabolism of ochratoxins in susceptible and resistance animal species.** Journal of Food and Toxicology 8: 43 – 53.
- Pera, L., Avellone, G., Lo Turco, V., Di Bella, G., Agozzino, P., Dugo, G. (2008). **Influence of roasting and different brewing processes on the ochratoxin A content in coffee determined by high-performance liquid chromatography-fluorescence detection (HPLC-FLD).** Food Chem Nov1 ; 210 :135 - 40.
- Peraica, M., Domijan, A., Jurjevic, Z., Cvjetkovic, B. (2002). **Prevention of exposure to mycotoxins from food and feed. Arh. Hig. Raba. Toksikol.** 53:229 – 237.

- Pérez-Florest ,G.C.,E.Moreno-Martinez., A.Mendez-Albores. (2011) .**Effect of Microwave Heating during Alkaline-Cooking of Aflatoxin Contaminated Maize** .Journal of Food Science76 : 48 - 52.
- Peter, K. (2016). **Assessment of the levels of Ochratoxin A in coffee bean from the coffee growing region of Kamba, Kenya**. Journal of Food Science and Quality Management 53 : 55 - 70.
- Petkova-Bocharova, T., Castegnaro, M., Pfohl-Leskowicz, A., Garren, L., Grosso, F., Nikolov, I., Vrabcheva, T., Dragacci, S.and Chernozemsky IN.(2003). **Analysis of ochratoxin A in serum and urine of inhabitants from an area with Balkan endemic nephropathy: a one-month follow-up study**. J Agric Food Chem. 52 : 2404 – 2410.
- Pietrzak, K., Twaru`zek, M., Czy`zowska, A., Kosicki, R., and Gutarowska, B. (2015). **Influence of silver nanoparticles on metabolism and toxicity of moulds**. Acta Biochimica Polonica, 62 (4).
- Pittet, A .(1998). **Natural occurrence of mycotoxin in foods and feeds**. Journal of Rev Med Vet 6 : 479 - 492.
- Pittet, A.and Royer, D. (2002). **Rapid, low cost Thin Layer Chromatographic screening for the detection of OTA in green coffee**. J Agric Food Chem 50 : 243 - 247.
- Pluyer, H. R., Ahmed, E. M.and Wei, C. I. J.(1987). **Remediation strategies for mycotoxin control in feed**.Food Protect. 50 (6), 504 - 508.
- Pruslin, F., Winston, R,and Rodman, TC. (1991). **Caveats and suggestions for the ELISA**. J Immunol Methods 137 : 27 – 35.
- Puligundla, P., Lee, T., and Mok, C. (2020). **Effect of corona discharge plasma jet treatment on the degradation of aflatoxin B1 on glass slides and in spiked food commodities**. Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie, 124, Article 108333.
- Radic, B., Fuchs, R., Peraica, M,and Lucic, A.(1997). **Ochratoxin A in human sera in the area with endemic nephropathy in Croatia**. Toxicology Letters. 91 : 105 – 109.

- Samarajeewa, U., Sen, A. C., Cohen M. D., Wei, C. I. (1990). **Detoxification of Aflatoxins in Foods and Feeds by Physical and Chemical Methods Food Protect.** 53 (6) : 489 – 501.
- Ramos, A., Labernia, N., Marin, S., Sanchis, V. and Magan, N. (1998). **Effect of water activity and temperature on growth and ochratoxin production by three strains of Aspergillus ochraceus on a barley extract medium and on barley grains.** Int J Food Microbiol 44 : 133 - 140.
- Rašić, D., Domijan, M., Ivic, D. and Cvjetković, B. (2009). **ELISA and HPLC analysis of ochratoxin A in red wines of Croatia.** Journal of food control 20 : 590 – 592.
- Reich, E. and Schibli, A. (2007). **High- performance thin- layer chromatography for the analysis of medicinal plants.** Theme.
- Slaron, T., Thirouin, D., Perrin, L. and Frere, G. (1980). **Microwave treatment of biological food product.** Indust. Aliment. Agricol. 12 : 1305 - 1312.
- Robens, J. and Richord, J. (1992). **Contamination and Toxicological.** Journal of Environmental Contamination 127 : 69 - 85.
- Rosa, V., Antonella, A., Carlo, G. and Francesco, P. (2008). **Determination of Ochratoxin A in green coffee beans by solid phase micro extraction and liquid chromatography with fluorescence detection.** Journal of Chromatography A 1187 : 145 - 150.
- Roth, A., Chakor, K., Creppy, E.E., Kane, A., Roschenthaler, R. and Dirheimer G. (1988). **Evidence for an enterohepatic circulation of ochratoxin A in mice.** Toxicology. 48 : 293 – 308.
- Ruprich, J. and Ostry, V. (1993). **Health risk assessment of the mycotoxin ochratoxin A to humans: Czech Republic - Brno - 1991/92.** Central European Journal of Public Health. 1 : 86 – 93.
- Salas, M. P., Reynoso, C. M., C´eliz, G., Daz, M., and Resnik, S. L. (2012). **Efficacy of flavanones obtained from citrus residues to prevent patulin contamination.** Food Research International, 48 (2), 930 – 934.

- Santos, E. and Vargas, A. (2002). **Immunoaffinity column clean up and thin layer chromatography for determination of OTA in green coffee**. Food Addit Contam 19 : 447 - 458.
- Sanzani, S. M., Schena, L., Nigro, F., de Girolamo, A., and Ippolito, A. (2009). **Effect of quercetin and umbelliferone on the transcript level of Penicillium expansum genes involved in patulin biosynthesis**. European Journal of Plant Pathology, 125 (2), 223 – 233.
- Scott, P. (2002). **Methods of analysis for OTA**. Journal of mycotoxins and Food Safety 10 : 117 - 134.
- Scott, P. and Trucksess, M. (1997). **Application of Immunoaffinity columns to mycotoxin analysis**. J AOAC Int 80 : 941 – 994.
- Scott, P.M. (2005). **Biomarkers of human exposure to ochratoxin A**. Food Addit Contam. 22 (Suppl 1) : 99 – 107.
- Scudamore, K. and MacDonald, S. (1998). **A collaborative studies of an HPLC method for determination of Ochratoxin a in wheat using Immunoaffinity Column clean-up**. Food Addit Contam 15 : 401 - 410.
- Self, R. (2005) . **Extraction of Organic Analytes from Foods** , Cambridge, Published by The Royal Society of Chemistry.
- Sen, Y., Onal-Ulusoy, B., and Mutlu, M. (2019). **Detoxification of hazelnuts by different cold plasmas and gamma irradiation treatments**. Innovative Food Science & Emerging Technologies, 54, 252 – 259.
- Sharaf, S., Moawiya, A., Haddad, F. and Parisi, S. (2020). **Validation of HPLC and Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) Techniques for Detection and Quantification of Aflatoxins in Different Food Samples**. Foods 9 : 661.
- Sharma, V., and Patial, V. (2021). **Food mycotoxins: Dietary interventions implicated in the prevention of mycotoxicosis**. ACS Food Science & Technology, 1 (10), 1717 – 1739.
- Slaron ,T.,Thirouin,D ,. Perrin,L . ang Frere ,G . (1980) . **Microwave treatment of biological food product**. Indust . Aliment . Agricol .12 : 1305 - 1312.

- Snyder, L. R., Kirkland, J. J. and Glajch, J. L. (1997). **Practical HPLC Method Development (2nd ed)**. J. Wiley, New York.
- Sofia, C., Angelina, P. and Celeste, M. (2011). **Human Ochratoxin A biomarkers from exposure to effect**. Crit Rev Toxicol 41: 187 - 212.
- Stoev, D. and Vet, H. (2010). **Toxicol**. Journal of food science 6: 40 - 46.
- Studer-Rohr, I., Schlatter, J. and Dietrich, DR. (2000). **Kinetic parameters and intraindividual fluctuations of ochratoxin A plasma levels in humans**. Arch. Toxicol. 74 : 499 – 510.
- Telles, A. C., Kupski, L., and Furlong, E. B. (2017). **Phenolic compound in beans as protection against mycotoxins**. Food Chemistry, 214, 293 – 299.
- Temesgen, A. and Teshome G. (2018). **Major mycotoxin, occurrence, prevention and control approach**. Journal of Biotechnology 12: 1-11.
- Tian, J., Ban, X., Zeng, H., He, J., Huang, B., and Wang, Y. (2011). **Chemical composition and antifungal activity of essential oil from Cicuta virosa L. var. latisecta Celak**. International Journal of Food Microbiology, 145(2–3), 464 – 470.
- Toman, J., Malíř, F., Ostrý, V., Grosse, Y., Dvořák, V., Roubal, T. and Neuchlová L. (2016). **The occurrence of ochratoxin A in white and parboiled rice**. Czech J. Food Sci., 34 : 32 - 38.
- Valenta, H. (1998). **Chromatographic techniques**. Journal of Chromatography 75 : 211 - 242.
- Voo, S., Drugarin, D., Biriescu, A., Margineanu, F., Olariu, RT. and Koreck IA. (2002). **Ochratoxin A serum levels in patients with Balkan nephropathy**. Central European Journal of Occupational and Environmental Medicine. 8 : 178 – 182.
- Wafa, EW., Yahya, RS., Sobh MA., Eraky, I., El-Baz, M., El-Gayar, HA. and Betbeder, AM, Creppy EE. (1998). **Human ochratoxicosis and nephropathy in Egypt: a preliminary study**. Human and Experimental Toxicology. 17 : 124 – 129.

- Wang, X., Han, Y., Niu, H., Zhang, L., Xiang, Q., and Zong, W. (2022). **Alternaria mycotoxin degradation and quality evaluation of jujube juice by cold plasma treatment.** Food Control, 137, Article 108926.
- Wielogorska, E., Ahmed, Y., Meneely, J., Graham, W. G., Elliott, C. T., and Gilmore, B. F. (2019). **A holistic study to understand the detoxification of mycotoxins in maize and impact on its molecular integrity using cold atmospheric plasma treatment.** Food Chemistry, 301, Article 125281.
- Zhao, Y., Yuan, Y., Bai, X. and Liao, X. (2020). **Multi mycotoxins analysis in liquid milk by UHPLC after magnetic solid phase extraction based on PEGYLATED multi walled carbon nano tube.** Food Chemistry 305: 125429.

"Abstract"

Randomized samples were collected from different companies of flour (high quality , standard and imported) and from several mills, types of rice (Indian, Egyptian, American and Spanish) and coffee beans (green, roasted and ground coffee) from some well-known local companies at a rate of 6 replicates sample between the year of 2020 to 2022 to determine the content of ochratoxin A by high performance liquid chromatography (HPLC) and the effect of microwave radiation on reducing the content of food contaminated with OTA. The results showed that the carrier phase consisting of water, methanol and acetonitrile and glacial acetic acid at a ratio of (60: 19: 19: 2) exhibited the best time for separated peak with long usage of column up to 7 months compared with other ratios. A suitable flow of 1 ml /min in a mint was sufficient to give an optimal peak (OTA) in a time of (5.80) min. The content of OTA in high quality, Standard Flour and Imported Flour was at its maximum of 0.125 µg/kg in Company B while green coffee beans (Moka) had a higher limit of 0.130 µg/kg compared to Colombian coffee and Brazilian coffee. As for rice grains, it was the highest value of 0.130 µg/kg for Spanish rice from company F. All (OTA) content values were within the Syrian standard and the EEC limits. The results of the effect of microwave radiation on reducing OTA content showed that increasing the heating time up to 6 minutes leads to a decrease in the concentration of (OTA) at 100% energy of the frequency of 2450 MHz.

Key words:

Ochratoxin A, HPLC, Kinds of flour, Cereals of rice, Coffee beans,
Microwave radiation .



**Syrian Arabic Republic
Ministry of Higher Education and
Scientific Research
Damascus University
Faculty of Agriculture Engineering
Department of Food Sciences**

**Determination the Content of Ochratoxin in
some Contaminated Foods and the Effect of
Microwave Radiation on its Decrease**

**A dissertation submitted in fulfilment of the requirements for
the degree of (master) in the faculty of Agriculture Engineering
(Department of Food Sciences)**

**By Engineer
Hasan Abd Alkarem Dounea**

Supervisors

**Co-supervision
Dr. Jihad Altal
PhD in Food Chemistry and
Analysis
Ministry of Internal Trade
and Consumer Protection**

**Supervision
Prof. Anwar Alhaj Ali
Professor in the Department
of Food Sciences - Faculty of
Agriculture - Damascus**