

Detection of Some Aflatoxins in Some Locally Marketed Walnut Samples

Dr. Moufid Yassin*
Dr. Sundus J. Yaseen**
Rima Khalil***

(Received 11 / 5 / 2020. Accepted 15 / 7 / 2020)

□ ABSTRACT □

Walnuts are nuts known for their high nutritional value and delicious taste, but they can pose a serious health hazard due to their high possibility of contamination with aflatoxins. Aflatoxins are produced as secondary metabolites in foods that are affected by some fungal species; eating these foods may cause cancer and mutations. This research aims to investigate the presence of aflatoxins in 20 samples of walnuts marketed in Lattakia governorate. AFs were determined using High Performance Liquid Chromatography (HPLC) connected to Fluorescence Detector (FLD); and that was done after extraction of samples with 70% methanol and purification using an immunoaffinity column (IAC). The results showed that 20% of the walnut samples were contaminated with aflatoxins, and the concentration of total aflatoxins and AFB₁ in all the contaminated samples was less than the limits allowed by the European Union and the Syrian Standard Specification, which is 4 µg/kg and 2 µg/kg in the same previous order. The concentrations of total aflatoxins in the studied walnut samples were within the range (0.7-2.86) µg/kg with an average ± SD (0.89 ± 1.69) µg/kg, while AFB₁ was found within the range (0.7-1.76) µg/kg with an average ± SD (1.31 ± 0.54) µg/kg. The appearance percent of the four types of aflatoxins in our studied samples was (15%) for aflatoxin B₁, (5%) for aflatoxin B₂, (5%) for aflatoxin G₁ and (0%) for aflatoxin G₂.

Keywords: Aflatoxins, AFB₁, Walnut, HPLC, Fluorescence.

* Professor in Analytical and Food Chemistry Department, Faculty of Pharmacy, Tishreen University, Lattakia, Syria. Email: moufidy@tishreen.edu.sy moufeedy@hotmail.com

** Doctor in Biochemistry and Microbiology, Faculty of Pharmacy, Kalamoon University, Deir Atieh, Syria. E-Mail: sundus.aljanabi@uok.edu.sy

*** Postgraduate Student, Analytical and Food Chemistry Department, Faculty of Pharmacy- Tishreen University, Lattakia, Syria. E-Mail: rimakhalil1991@gmail.com

التحري عن بعض الأفلاتوكسينات في بعض عينات الجوز المسوقة محلياً

د. مفيد ياسين*

د. سندس ياسين**

ريما رزق خليل***

(تاريخ الإبداع 11 / 5 / 2020. قُبل للنشر في 15 / 7 / 2020)

□ ملخص □

يُعد الجوز من المكسرات المعروفة بقيمتها الغذائية العالية وطعمها اللذيذ ولكنه من جهة ثانية يمكن أن يشكل خطراً على الصحة العامة بسبب احتمالية تلوثه بالأفلاتوكسينات، والأفلاتوكسينات هي سموم فطرية تُنتج كمستقلبات ثانوية في الأغذية التي تغزوها بعض الأنواع الفطرية، ويمكن أن يؤدي تناول هذه الأغذية إلى الإصابة بالسرطان والطفريات. يهدف هذا البحث إلى التحري عن وجود الأفلاتوكسينات في 20 عينة من الجوز المسوقة في محافظة اللاذقية، وتم تحديد تركيز الأفلاتوكسينات فيها باستخدام الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء الموصولة بكاشف الفلورة وذلك بعد استخلاصها باستخدام محلول من الميثانول بتركيز 70% والتنقية باستخدام عمود ألفة مناعية. أظهرت النتائج أن 20% من عينات الجوز كانت ملوثة بالأفلاتوكسينات وكان تركيز الأفلاتوكسينات الكلية و AFB_1 في جميع العينات الملوثة أقل من الحدود المسموح بها من قبل الاتحاد الأوروبي والمواصفة القياسية السورية والتي تبلغ 4 مكغ/كغ و 2 مكغ/كغ على التسلسل، وكانت تراكيز الأفلاتوكسينات الكلية في عينات الجوز المدروسة ضمن المجال (0.7-2.86) مكغ/كغ وبمتوسط $SD \pm (0.89 \pm 1.69)$ مكغ/كغ، أما AFB_1 فوجد ضمن المجال (0.7-1.76) مكغ/كغ وبمتوسط $SD \pm (0.54 \pm 1.31)$ مكغ/كغ، وبلغت نسبة ظهور أنواع الأفلاتوكسينات (15%) للأفلاتوكسين B_1 ، (5%) للأفلاتوكسين B_2 ، (5%) للأفلاتوكسين G_1 و (0%) للأفلاتوكسين G_2 من العدد الكلي للعينات التي شملتها دراستنا.

الكلمات المفتاحية: الأفلاتوكسينات، AFB_1 ، الجوز، الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء، الفلورة.

* أستاذ في قسم الكيمياء التحليلية والغذائية - كلية الصيدلة - جامعة تشرين - اللاذقية - سورية.

E-mail: moufidy@tishreen.edu.sy moufeedy@hotmail.com

** دكتورة في قسم الكيمياء الحيوية والميكروبيولوجي - كلية الصيدلة - جامعة القلمون الخاصة - دير عطية - سورية.

E-Mail: sundus.aljanabi@uok.edu.sy

*** طالبة ماجستير في قسم الكيمياء التحليلية والغذائية - كلية الصيدلة - جامعة تشرين - اللاذقية - سورية.

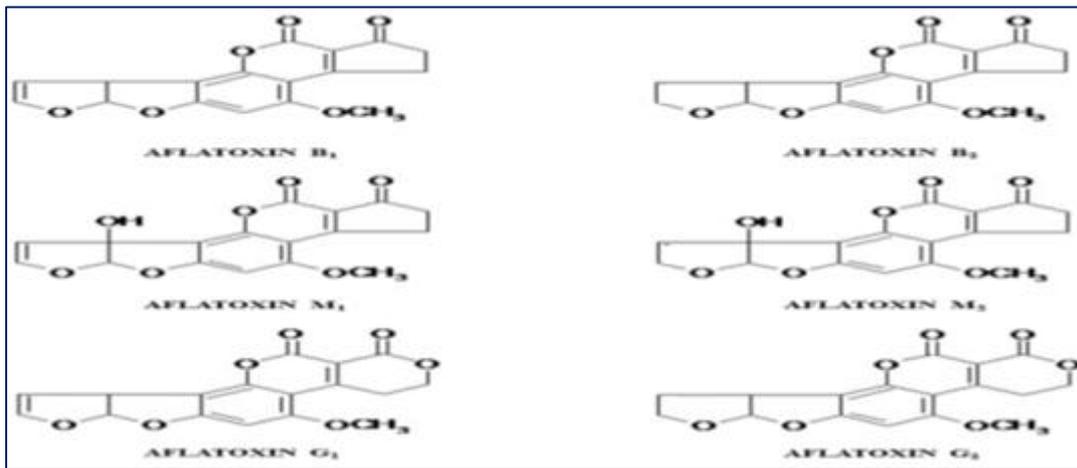
E-mail: rimakhalil1991@gmail.com

مقدمة:

الأفلاتوكسينات (AFs) Aflatoxins هي مستقلبات ثانوية سامة تُنتج بشكل عام من فطر الرشاشية الصفراء *Aspergillus flavus* و *Aspergillus parasiticus* المُتطفلة (Augusto 2004)، وذلك عبر سلسلة تفاعلات أكسدة- إرجاع مُنظمة بشدة عبر طريق متعدد الكيتيد (Lakkireddy, Kasturi *et al.* 2014). يتأثر التركيب الحيوي للأفلاتوكسينات بعدة عوامل صُنفت إلى بيولوجية وفيزيولوجية وتغذوية وبيئية وزراعية (Cuero, Ouellet *et al.* 2003, Torres, Barros *et al.* 2014, Int 2019) والتي قد تمارس تأثيرها في مرحلة قبل و/أو أثناء و/أو بعد الحصاد (Bediako, Ofori *et al.* 2019)؛ كالإصابة بالحشرات وإجهاد النبات، الممارسات الزراعية الجيدة (Torres, Barros *et al.* 2014) وظروف النقل والتخزين للمحاصيل (Diao, Dong *et al.* 2015).

الأفلاتوكسينات بشكل عام هي مشتقات للكومارينات ثنائية الفوران difuranocoumarins (Campbell, Cavalcante *et al.* 2017)، أي هي مركبات حلقة غير متجانسة داخل في تركيبها الأوكسجين وهذا التركيب الكيميائي الفريد يجعلها مواد مولدة للفلورة Flurophore (Alshannaq and Yu 2020). هناك أكثر من 16 نوع مختلف من AFs أهمها AFB_1 ، AFB_2 ، AFG_1 و AFG_2 بالإضافة إلى AFM_1 و AFM_2 اللذان عُزلا لأول مرة من حليب الأبقار وهما مستقلبان للأفلاتوكسين B_1 و B_2 على التوالي (Yu, Li *et al.* 2013, Saleem, Sadia *et al.* 2017) كما يظهر في الشكل (1).

تختلف أنواع الأفلاتوكسينات التي يمكن إيجادها في الأغذية باختلاف الفطور المتواجدة والمنتجة للأفلاتوكسينات وبشكل عام يُنتج *A. flavus* الأفلاتوكسين B_1 و B_2 بينما *A. parasiticus* يُنتج AFB_1 ، AFB_2 ، AFG_1 و AFG_2 (Nyirahakizimana, Mwamburi *et al.* 2013)، مع وجود بعض الاستثناءات اعتماداً على السلالة الفطرية والموقع الجغرافي (Rodrigues, Soares *et al.* 2007).



الشكل (1): التركيب الكيميائي لأهم أنواع الأفلاتوكسينات الملوثة للأغذية (Lakkireddy, Kasturi *et al.* 2014).

تصنف الأفلاتوكسينات كيميائياً إلى مجموعتين رئيسيتين: المجموعة الأولى تحتوي في تركيبها على difurocoumarocyclopentenone وتضم بشكل أساسي AFB_1 ، AFB_2 ، AFM_1 و AFM_2 ، أما المجموعة الثانية

فهي مشتقات من difurocoumarolactone وينتمي لها بشكل رئيسي AFG_1 و AFG_2 (Coppock, Christian *et al.* 2018)، وجميع هذه الأفلاتوكسينات تقاوم درجات حرارة مرتفعة نسبياً وتُعد مركبات ثابتة التركيب في الحرارة (Kabak, Dobson *et al.* 2006, Medina, Gilbert *et al.* 2017).

تُشير الأحرف B و G في أنواع الأفلاتوكسينات إلى لون الفلورة الناتج عند تعريضها للأشعة الكهرومغناطيسية بأطوال موجية في المجال فوق البنفسجي (365 نانومتر)، فالحرف B في AFB_1 و AFB_2 يرمز إلى الفلورة باللون الأزرق (Blue) عند طول موجة 425 نانومتر بينما يرمز الحرف G في AFG_1 و AFG_2 إلى الفلورة باللون الأخضر (Green) عند طول موجة 450 نانومتر (Campbell, Cavalcante *et al.* 2017).

يحدث التسمم بالأفلاتوكسينات غالباً نتيجة دخولها إلى الجسم عبر الطرق التنفسية أو المخاطية أو الجلدية أو عبر استهلاك الأغذية الملوثة بها (Mutegi 2010, Kumar, Mahato *et al.* 2017)، وعند تناول هذه الأغذية الملوثة يحدث تسمم يُطلق عليه اسم التسمم بالأفلاتوكسينات (Aflatoxicosis)، وهذا التسمم يمكن أن يكون حاداً (Mousavi *et al.* 2018, Khaneghah, Eş *et al.* 2018) أو مزمناً (Kumar 2018). يُعد التسمم المزمن هو المسؤول عن التأثيرات الخطيرة للأفلاتوكسينات والتي يأتي في مقدمتها إحداث الطفرات (Al-Hammadi, Marzouqi *et al.* 2014) والسرطان (Cancer 2012, Ostry, Malir *et al.* 2017)، ومن بين كل أنواع الأفلاتوكسينات يُعد AFB_1 أكثرها سميةً وانتشاراً في الطبيعة (Iloabuchi Chinwenwa 2017)، وذلك بسبب التحول الحيوي الذي يخضع له في الجسم (Sudakin 2003, Iqbal, Asi *et al.* 2013).

يُستقلب AFB_1 بشكل رئيسي في كبد الإنسان بواسطة أنزيمات السيتوكروم (Cytochrome P450 (CYP450)، ويعطي عدة مركبات أهمها مركب إيبوكسيدي سام هو $AFB_1-8,9-exo-epoxide$ (AFBO) قادر على الارتباط بالمكونات الخلوية وبالتالي هو يُمثل الشكل الفعال من AFB_1 (Santini and Ritieni 2013, Marchese, Polo *et al.* 2018). ارتباط AFBO مع الحموض النووية يؤدي إلى تغييرات وظيفية في تركيبها (Sudakin 2003, Iqbal, Asi *et al.* 2013)، فمثلاً يتحد AFBO مع الحمض النووي منقوص الأكسجين Deoxyribonucleic acid (DNA) ليشكل المركب ($AFB_1-N_7-guanine$) وهو بدوره قد يتحول إلى Formamidopyrimidine الذي يمكن أن يمنع النسخ والترجمة، أو قد يحفز حدوث الطفرات في DNA أثناء إصلاحه وتضاعفه والموت الخلوي المبرمج والسرطان (Bedard and Massey 2006, Monson, Coulombe *et al.* 2015).

يُعد AFB_1 عامل مسبب لتثبيط النمو وللتغيرات في الجهاز المناعي وسوء التغذية وكذلك للأورام السرطانية في خلايا الكبد (Cancer 2012)، أما باقي أنواع الأفلاتوكسينات فهي أقل قدرة على تشكيل AFBO وبالتالي تكون أقل قدرة على إحداث الطفرات والسرطان والآثار السمية الأخرى بالمقارنة مع AFB_1 (Wild and Turner 2002).

بالإضافة لما سبق ذكره من خطورة الأفلاتوكسينات بسبب تأثيراتها الصحية على الجسم، يجب الإشارة إلى أنّ الأفلاتوكسينات تقاوم درجات حرارة عالية نسبياً مما يجعلها ثابتة (لا تتفكك) إلى حد كبير بعد خضوعها لمعظم المعالجات الحرارية وهذا يزيد من خطورتها (Abuagela 2017).

بشكل عام تصيب الأفلاتوكسينات أنواع مختلفة من الأغذية (Martins, Sant'Ana *et al.* 2017)، وتُعد المكسرات من المصادر الرئيسية للتعرض لهذه السموم؛ وبخاصة الجوز؛ مما يجعل تناول هذه الأغذية يُشكل خطراً كبيراً على

الصحة للإنسان وذلك بسبب احتمالية تلوثها الكبيرة بالإضافة لاستهلاكها المتكرر (Dhanasekaran,)
(Shanmugapriya *et al.* 2011, Lizárraga–Paulín, Moreno–Martínez *et al.* 2011).
انطلاقاً من خطورة الأفلاتوكسينات الملوثة لمختلف الأغذية وضعت الحدود القصوى المسموح بها من قبل الاتحاد
الأوروبي والمواصفة القياسية السورية بالنسبة للأفلاتوكسينات الكلية Total Aflatoxins (مجموع تركيز كل أنواع
الأفلاتوكسينات الموجودة في العينة) وكذلك للأفلاتوكسين B₁ في العديد من الأغذية ومنها الجوز وهي تبلغ 4 مكغ/كغ
لمجموع الأفلاتوكسينات الكلية (Total Aflatoxins) و 2 مكغ/كغ للأفلاتوكسين B₁ (EC 401/2006)، المواصفة
القياسية السورية 2008/2680).

في هذه الدراسة تم التحري عن بعض أنواع الأفلاتوكسينات الموجودة في عدد من عينات الجوز الطازج المعروضة
للبيع في الأسواق المحلية لمحافظة اللاذقية بعد استخلاصها بمحلول من الميثانول 70% والتنقية بواسطة عمود ألفة
مناعية (IAC) Immunoaffinity Column باستخدام تقنية الكروموتوغرافيا السائلة عالية الأداء High
Performance Liquid Chromatography (HPLC) الموصولة مع مكشاف الفلورة، وتم إنجاز هذا البحث في
مخابر كلية الصيدلة في جامعة تشرين وفي مخابر مديرية المخابر المركزية التابعة لوزارة التجارة الداخلية وحماية
المستهلك في دمشق في الفترة الواقعة بين شهر تشرين الأول 2018 وشهر تموز 2019.

أهمية البحث وأهدافه:

تأتي أهمية البحث من خطورة تناول الإنسان للأغذية الملوثة بالأفلاتوكسينات ذات التأثيرات الضارة على الصحة
ومالها من انعكاسات سلبية على الاقتصاد.

أهداف البحث

يهدف البحث إلى التحري عن تركيز بعض الأفلاتوكسينات الملوثة لعينات الجوز المسوقة في محافظة اللاذقية،
سورية.

طرائق البحث ومواده:

• الاعتيان

شملت الدراسة 20 عينة من الجوز الطازج المتوافرة في الأسواق المحلية لمحافظة اللاذقية، سُحبت من خمسة محلات
تجارية؛ من محلين في مدينة جبلة من منطقتي العمارة والدربية وثلاثة محلات في مدينة اللاذقية من مناطق الرمل
الجنوبي والزراعة والشبخ ضاهر.

تم سحب عينة من كل محل تجاري وذلك كل 3 أشهر اعتباراً من موسم بدء الإنتاج لهذه المحاصيل والذي اعتبر بدءاً
من الشهر العاشر (تشرين الأول) في عام 2018 حتى نهاية الشهر السابع (تموز) في عام 2019 ليتم سحب
5 عينات جوز في كل مرحلة زمنية أو دفعة. رمزت كل عينة وفقاً ما يلي: أخذ أول حرف من نوع العينة (جوز ل) ومن
منطقة السحب باللغة الإنكليزية (الرمل R، الشبخضاهر S، الزراعة Z، الدربية D والعمارة A) ورقم الدفعة المسحوبة
(1، 2، 3 و 4) لنحصل على ترميز العينات المسحوبة كما يظهر في الجدول الملحق (1).

في البداية تمت جانسة الأكياس التي تحتوي على الجوز، ومن ثم تم سحب عينة جوز مقدارها 500 غ من كل مكان معتمد لأخذ العينات، وبعد جمع العينات وضعت بأكياس بلاستيكية نظيفة ومحكمة الإغلاق وأصقت على كل كيس بطاقة تعريف كُتب عليها رمز العينة الذي يوضح نوعها ومكان السحب وتاريخه، وتم حفظ العينات في درجة حرارة (-20 م°) ريثما تم التحري عن وجود الأفلاتوكسينات فيها باستخدام HPLC.

• المواد والتجهيزات المستخدمة

استخدمت مجموعة من الأجهزة والأدوات المخبرية المتوفرة في مخابر كلية الصيدلة في جامعة تشرين ومخابر مديرية المخابر المركزية التابعة لوزارة التجارة الداخلية وحماية المستهلك في دمشق وهي موضحة في الجدول (1) والجدول (2) على الترتيب.

جدول (1): التجهيزات المستخدمة في الدراسة.

الطرارز	الجهاز
RADWAG, AS 220/C/2	ميزان ذو حساسية 0.001 غ
Labkit (Chemelex, S.A., Spain)	ميكروبيبيت micropipette بأحجام مختلفة (1-100 ميكرو لتر)
Shimadzu LC-20AT HPLC system, Japan.	جهاز الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء High Performance Liquid Chromatography HPLC
Brisa LC2 C18 (25 x 0,46 cm. 5 µm) (Teknokroma, Barcelona, Spain)	عمود طور عكوس (C18)
Hindico, BL-999-3 IN 1, China	خلاط Blender
AFLARHONE® WIDE (R-Biopharm, Darmstadt, Germany)	عمود ألفة مناعية (IAC) Immunoaffinity Column

الجدول (2): المواد والمحللات المستخدمة في الدراسة.

المادة	الشركة
كلور الصوديوم Sodium Chloride	Sigma-Aldrich
ميثانول للكروماتوغرافيا Methanol HPLC Grade	LiChrosolv® Merck Millipore
ماء منزوع الشوارد رباعي التقطير لجهاز HPLC	محضر في مخابر التموين
أسيتونتريل للكروماتوغرافيا HPLC Acetonitrile HPLC Grade	Biosolve Chimie Dieuze, France
محلول عياري مزيج من AFB ₁ ، AFB ₂ ، AFG ₁ و AFG ₂	Biopharm Rhône Ltd (Darmstadt, Hessen, Germany)

• تحضير المحاليل

❖ الطور المتحرك للكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC:

تم تحضير الطور المتحرك للكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء المكون من الأسيتونتريل والميثانول والماء منزوع الشوارد بنسبة (3:1:1) وذلك بمزج 100مل أسيتونتريل و100مل ميثانول مع 300مل ماء منزوع الشوارد رباعي التقطير معاً.

❖ المحلول الأم من عياري الأفلاتوكسينات:

حُضر المحلول الأم لمزيج الأفلاتوكسينات الأربعة وذلك بأخذ 1مل من المحلول العياري (وهو محلول مزيج من الأفلاتوكسينات الأربعة ذو التركيز 1000نغ/مل لمجموع الأفلاتوكسينات الكلية والحاوي على تراكيز متساوية من كل نوع من الأفلاتوكسينات) الموجود في فيال حجمه 6 مل ومن ثم إكمال الحجم حتى 10مل باستخدام الطور المتحرك للكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء للحصول على التركيز 100نغ/مل لمجموع الأفلاتوكسينات الكلية والذي يحتوي على تركيز متساو من الأفلاتوكسينات الأربعة (AFB₁، AFB₂، AFG₁ و AFG₂) يبلغ 25نغ/مل من كل نوع. يُقصد بمجموع الأفلاتوكسينات الكلية (Total aflatoxins) مجموع كل من AFB₁، AFB₂، AFG₁ و AFG₂.

❖ محاليل السلسلة العيارية:

حُضرت محاليل السلسلة العيارية من المحلول العياري الأم ذي التركيز 100نغ/مل لمجموع الأفلاتوكسينات الكلية حتى الحصول على مجموعة من المحاليل التركيز الفردي لكل نوع من الأفلاتوكسينات فيها هو (20، 10، 5، 2.5، 1.25، 0.625، 0.3125 و 0.156) نغ/مل كما هو موضح في الجدول (3).

الجدول (3): تحضير محاليل السلسلة العيارية.

التركيز مقدراً بوحدة نغ/مل		معلومات المحلول			
تركيز كل من AFB ₁ ، AFG ₁ ، AFB ₂ و AFG ₂	Total AFs	الحجم النهائي (مل)	الحجم المأخوذ من المحلول (مل)	المحلول المحضر منه	رقم محلول السلسلة العيارية
20	80	5	4	المحلول الأم ذي التركيز 100نغ/مل	1
10	40	5	2.5	1	2
5	20	5	2.5	2	3
2.5	10	5	2.5	3	4
1.25	5	5	2.5	4	5
0.625	2.5	5	2.5	5	6
0.312	1.25	5	2.5	6	7
0.156	0.625	5	2.5	7	8

طرائق البحث

1. التحري عن الأفلاتوكسينات باستخدام الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء الموصولة مع كاشف الفلورة

تم التحري عن الأفلاتوكسينات الموجودة في عينات الجوز باستخدام الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء المربوطة مع كاشف الفلورة وفق ما نصت عليه (المواصفة القياسية السورية 2680/ 2008)، وهي الطريقة المتبعة في مديرية المخابر المركزية التابعة لوزارة التجارة الداخلية وحماية المستهلك في دمشق.

1.1 . الشروط الكروماتوغرافية المطبقة

أُستخدِم عمود طور عكوس (C18) ذو الأبعاد $250\text{mm} \times 4.6\text{mm}$ وقطر الحبيبات $5\mu\text{m}$ ومعدل التدفق $1.3\text{ml}/\text{دقيقة}$ ، وحاقن آلي وحُدِد حجم الحقنة بـ 50 ميكرو لتر (v_6)، وضُبط كاشف الفلورة على طول موجة تهيج (Excitation) 360nm وإصدار (Emission) 450nm ، وأُستخدِمت خلية كهروضوئية للاشتقاق موضوعة بعد العمود وقبل الكاشف وطور متحرك (نمط متساير) مكون من الأسيتونتريل والميثانول والماء مقطر بنسبة (3:1:1).

2.1. تحضير محاليل السلسلة العيارية للأفلاتوكسينات

تم تحضير ثمانية محاليل للسلسلة العيارية بدءاً من المحلول العياري الأم (الحاوي على الأفلاتوكسينات الأربعة بكميات متساوية والحاوي على تركيز كلي لمجموع الأفلاتوكسينات الكلية مساوٍ $100\text{ng}/\text{مل}$) للحصول على محاليل تركيز كل نوع من الأفلاتوكسينات فيها هو (20، 10، 5، 2.5، 1.25، 0.625، 0.3125 و $0.156\text{ng}/\text{مل}$)؛ أي أن كل محلول مُحضَر يحتوي بكميات متساوية من AFB_1 ، AFG_1 ، AFB_2 و AFG_2 ؛ وحُضِرَت السلسلة العيارية ثلاث مرات وأُخذ المتوسط الحسابي لمساحات القمم الموافقة لكل تركيز ومُثِلَت السلسلة العيارية لكل نوع بخط بياني وتم الحصول على معادلته الخطية، وتم حساب تركيز الأفلاتوكسينات في العينات المدروسة بتعويض مساحة القمم التي ظهرت في العينات بأزمنة مطابقة لأزمنة الأفلاتوكسينات في المحاليل العيارية- في المعادلات الخطية وتم التعبير عن النتيجة بوحدة $\text{ng}/\text{مل}$ ، وفي حال وجود عينات تجاوز تركيز الأفلاتوكسينات فيها مجال الخطية تم التمديد حتى تصبح ضمن المجال وتم صُربت النتيجة بنسبة التمديد.

3.1. استخلاص الأفلاتوكسينات وتنقيتها في عينات الجوز

تم استخلاص وتنقية الأفلاتوكسينات في عينات الجوز باستخدام طريقة رابطة الكيمائيين المحللين الرسميين (AOAC) Association Of Official Analytical Chemist ذات الرقم 991.31 (Truckness 2000) المعتمدة في (المواصفة القياسية السورية 2680/ 2008) والتي تنص على استخلاص الأفلاتوكسينات بمحلول من الميثانول 70% والتنقية باستخدام أعمدة (IAC) وفق مايلي:

❖ استخلاص الأفلاتوكسينات من عينات الجوز

تم طحن العينة بالخلاط ثم أخذ منها 25g (m_0) وأُضيف له 5g من كلوريد الصوديوم و 125ml من محلول الاستخلاص (v_1) المكون من ميثانول وماء منزوع الشوارد بنسبة (30:70) ثم تم الخلط لمدة 3 دقائق بسرعة 2000 دورة في الدقيقة، تلا ذلك ترشيح الخلاصة باستخدام ورق ترشيح (Whatman No 4) ثم أخذ 15ml من الرشاحة (v_2) وأُضيف له 30ml من الماء منزوع الشوارد ليصبح الحجم الكلي 45ml (v_3)، ثم تم المزج جيداً والترشيح مرة ثانية باستخدام ورق ترشيح مصنوع من ألياف زجاجية وبعدها أخذ 15ml من الرشاحة النهائية (v_4) إلى عمود التنقية.

❖ تنقية خلاصات الجوز

استخدم للتنقية عمود إلفة مناعية (IAC) Immunoaffinity column لكل عينة والذي جُهِز وفق تعليمات الشركة المصنعة، وذلك بتركه يكتسب حرارة الغرفة ومن ثم إفراغ محتواه من المادة الحافظة، بعدها مُرر 15 مل من الرشاحة النهائية (v₄) بسرعة 1 إلى 2 قطرة في الثانية، ثم غُسل العمود مرتين باستخدام 10 مل من الماء منزوع الشوارد للتلخيص من الشوائب، بعدها تم تحرير الأفلاتوكسينات المحتجزة (في حال وجودها) بإضافة 1 مل من الميثانول إلى العمود ثم أفرغ محتوى العمود إلى فيال، وأكمل الحجم بالماء المقطر منزوع الشوارد حتى 2 مل (v₅)، وهكذا أصبحت الخلاصة الموجودة في الفيال جاهزة للحقن على جهاز HPLC.

4.1. حساب تركيز الأفلاتوكسينات في العينات

تم حساب تركيز الأفلاتوكسينات في العينات المدروسة بتطبيق العلاقات التالية:

$$m_t = \frac{m_0 \times v_2 \times v_4}{v_1 \times v_3} \quad (1)$$

$$W_i = \frac{v_5 \times m_i}{v_6 \times m_t} \quad (2)$$

تمثل الرموز المذكورة مايلي:

✓ m_t: الكتلة بالغرام للجزء المأخوذ من عينة التحليل لعمود التنقية.

▪ m₀: كتلة العينة المستخدمة للاستخلاص 25 غ.

▪ V₁: حجم الرشاحة الأولى 125 مل.

▪ V₂: الحجم المأخوذ من الرشاحة الأولى للتمديد 15 مل.

▪ V₃: حجم الرشاحة الثانية كاملة بعد التمديد 45 مل.

▪ V₄: الحجم المأخوذ من الرشاحة الثانية للتنقية 15 مل.

✓ W_i: تركيز الأفلاتوكسينات مقدراً بالميكروغرام/كيلوغرام (µg/kg).

▪ m_i: كتلة الأفلاتوكسينات المحسوبة في الحقنة بالنانوغرام بالاعتماد على المعادلة الخطية.

▪ V₅: حجم الخلاصة بعد التمرير على عمود التنقية والتمديد بالميكرو لتر (2000 ميكرو لتر).

▪ V₆: حجم الحقنة (50 ميكرو لتر).

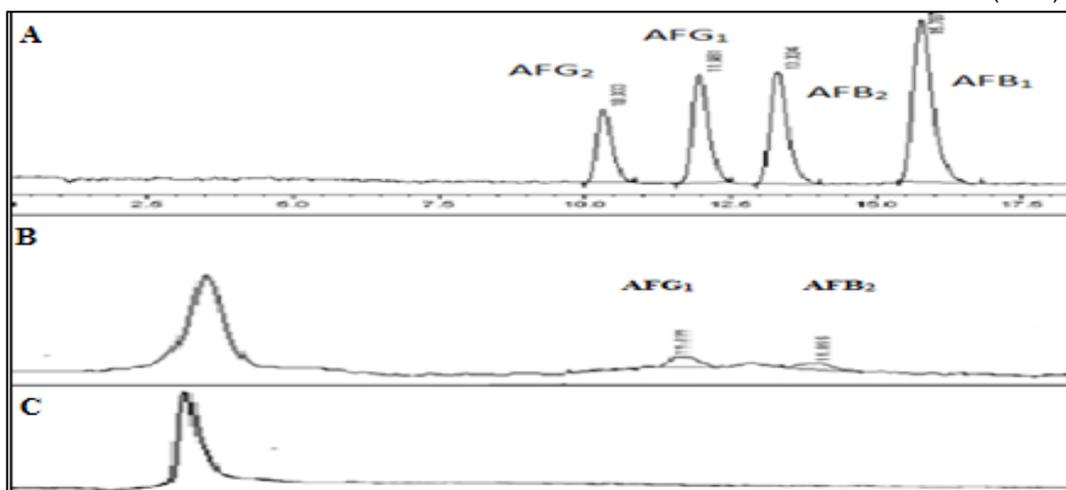
▪ m_t: الكتلة بالغرام للجزء المأخوذ من عينة التحليل من الرشاحة الثانية لعمود التنقية والمحسوب في المعادلة رقم (1).

أخذت ثلاثة مكررات لكل عينة وفي النهاية تم التعبير عن نتيجة الأفلاتوكسينات بمتوسط التركيز ± الانحراف المعياري Standard Deviation (SD) مقدراً بعدد النانوغرامات المتواجدة منها في غرام من الجوز (نغ/غ) أي عدد ميكروغرامات الأفلاتوكسينات في كيلو غرام من الجوز (ميكروغرام/كغ) وفق ما ورد في (المواصفة القياسية السورية 2680/2008).

النتائج والمناقشة:

1. تطبيق الشروط الكروموتوغرافية والحصول على أزمنة الاحتباس لكل نوع من الأفلاتوكسينات

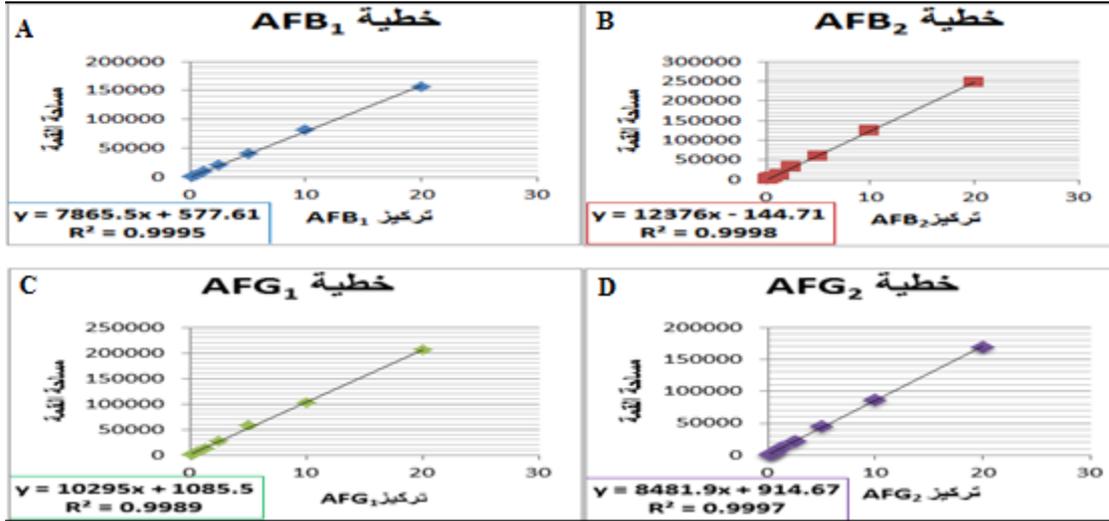
استخدمت الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء الموصولة بكاشف الفلورة للكشف عن الأفلاتوكسينات المتواجدة في الجوز ولتحديد تركيزها باعتبارها الطريقة المرجعية المذكورة في المواصفة القياسية السورية (المواصفة القياسية السورية 2680/2008)، وبعد تطبيق الشروط الكروماتوغرافية المذكورة في الفقرة (1.1) وإمرار حقنة من المحلول العياري ذي التركيز 20 نغ/مل للأفلاتوكسينات الكلية تم الحصول على أزمنة احتباس الأفلاتوكسينات الأربعة المدروسة (AFB_1 ، AFB_2 ، AFG_1 و AFG_2) والتي توافقت (15.7، 13.3، 11.9 و 10.3) دقيقة بالترتيب السابق نفسه كما يوضح الشكل (A-2).



الشكل (2): مجموعة كروماتوغرامات تم الحصول عليها في دراستنا؛ تم تقسيم الشكل إلى ثلاثة أقسام هي A و B و C؛ إذ أنّ القسم (A) يوضح كروماتوغرام العياري مزيج من الأفلاتوكسينات الأربعة AFB_1 ، AFB_2 ، AFG_1 و AFG_2 ذي التركيز 20 نغ/مل للأفلاتوكسينات الكلية، بينما القسم (B) يوضح كروماتوغرام عينة الجوز (JR4) الملوثة بالأفلاتوكسينات إذ ظهرت قمتين هما AFB_2 و AFG_1 ، أما القسم (C) يمثل كروماتوغرام عينة الجوز (JA4) الخالية من الأفلاتوكسينات.

2. تحضير سلسلة عيارية من مزيج الأفلاتوكسينات الأربعة ودراسة الخطية

تم الحصول على المعادلة الخطية وكان مجال الخطية (0.156-20 نغ/مل) لكل أفلاتوكسين من الأفلاتوكسينات الأربعة، وحُسبت تراكيز الأفلاتوكسينات في عينات الجوز بتعويض مساحة القمة في المعادلة الخطية الخاصة بكل نوع والتي تظهر في الشكل (3) ومن ثم التعويض بالمعادلات (1) و (2) المذكورة سابقاً.



الشكل (3): السلسلة العيارية ومعادلة الخطية للأفلاتوكسينات الأربعة، إذ توضح الرموز A، B، C وD المعادلة الخطية للأفلاتوكسينات B_1 ، B_2 ، G_1 و G_2 وفق الترتيب السابق نفسه.

1. نتائج ومناقشة التحري عن الأفلاتوكسينات في عينات الجوز:

عند التحري عن وجود الأفلاتوكسينات في 20 عينة من الجوز الطازج المسوقة في محافظة اللاذقية، أظهرت النتائج أن (4) أربع عينات كانت ملوثة بالأفلاتوكسينات أي ما يعادل نسبة 20% من العينات الكلية كما يظهر في الجدول (4).

الجدول (4): المتوسط \pm SD لتركيز كل من AFB_1 ، AFB_2 ، AFG_1 ، AFG_2 و Total Afs مقدراً بـ (مكغ / كغ) في 20 عينة جوز.

متوسط \pm SD Total Afs	متوسط \pm SD AFG ₂	متوسط \pm SD AFG ₁	متوسط \pm SD AFB ₂	متوسط \pm SD AFB ₁	رمز العينة
1.47±0.11	ND	ND	*ND	1.47±0.11	JR1
0.7±0.1	ND	ND	ND	0.7±0.1	JS1
ND	ND	ND	ND	ND	JZ1
ND	ND	ND	ND	ND	JD1
ND	ND	ND	ND	ND	JA1
ND	ND	ND	ND	ND	JR2
ND	ND	ND	ND	ND	JS2
ND	ND	ND	ND	ND	JZ2
ND	ND	ND	ND	ND	JD2
ND	ND	ND	ND	ND	JA2
ND	ND	ND	ND	ND	JR3
ND	ND	ND	ND	ND	JS3

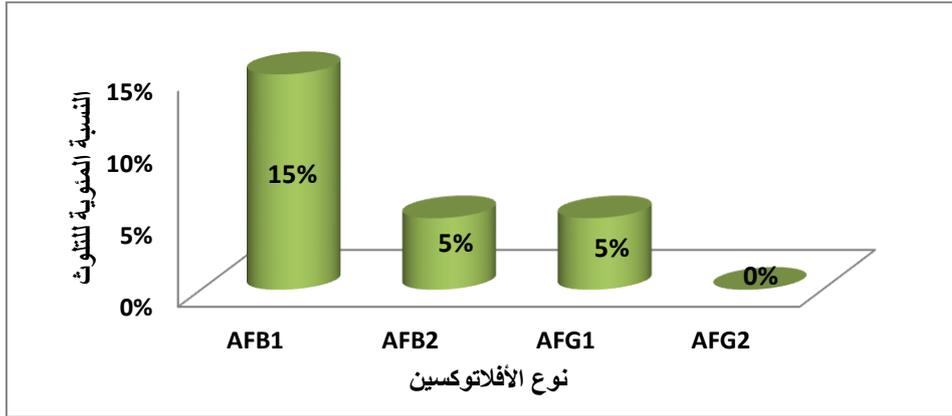
ND	ND	ND	ND	ND	JZ3
ND	ND	ND	ND	ND	JD3
ND	ND	ND	ND	ND	JA3
2.86±0.24	ND	0.63±0.13	2.23±0.16	ND	JR4
ND	ND	ND	ND	ND	JS4
ND	ND	ND	ND	ND	JZ4
1.76±0.1	ND	ND	ND	1.76±0.1	JD4
ND	ND	ND	ND	ND	JA4
1.69±0.89	0.00±0.00	0.63±0.00	2.23±0.00	1.31±0.54	Mean ± SD

ND* (Not Detected) أي لم يتم الكشف عنه النوع المدروس وأعتبر تركيزه مساوياً للصفر في الحسابات.

يظهر في الشكل (B-2) كروماتوغرام العينة JR4 (عينة الجوز المسحوبة من منطقة الرمل في الدفعة الرابعة) وهي العينة التي ظهر فيها AFB₂ و AFG₁ (B-2)، أما الشكل (C-2) فهو يبين كروماتوغرام العينة JA4 (عينة الجوز المسحوبة من منطقة العمارة في الدفعة الرابعة) وهي واحدة من أصل ست عشرة عينة غير ملوثة بالأفلاتوكسينات في دراستنا.

تُظهر نتائجنا أنّ ثلاث عينات من العينات الأربعة الملوثة ظهر فيها AFB₁ لوحده وعينة واحدة ظهر فيها AFB₂ و AFG₁ وكانا معاً ولم يظهر AFG₂ في أي عينة كما يوضح الجدول (4)، وبالتالي كانت أعلى نسبة للتلوث هي للأفلاتوكسين B₁ (15%)، ثم للأفلاتوكسين B₂ و G₁ اللذين وجدا بنسبة (5%)، أما نسبة التلوث بالأفلاتوكسين G₂ فكانت (0%) كما يظهر في الشكل (4)، وسُجل متوسط التركيز الأعلى لمجموع الأفلاتوكسينات الكلية ±SD في العينة JR4 والذي بلغ 0.24±2.86 مكغ/كغ أما للأفلاتوكسين B₁ فكان أعلى تركيز في العينة JD4 وهو 0.1±1.76 مكغ/كغ وفق الجدول (4). كان تركيز الأفلاتوكسينات الكلية في عينات الجوز الملوثة ضمن المجال (0.7-2.86) مكغ/كغ وبمتوسط ±SD (0.89±1.69) مكغ/كغ، أما AFB₁ فكانت تراكيته ضمن المجال (0.7-1.76) مكغ/كغ وبمتوسط ±SD (0.54±1.31) مكغ/كغ، بينما ظهر كل من AFG₁ و AFB₂ في عينة واحدة وبمتوسط تركيز ±SD موافقاً 2.23 ± 0.16 و 0.63 ± 0.13 مكغ/كغ بالتسلسل السابق نفسه كما يوضح الجدول (4).

كشفت نتائجنا أيضاً أنه في جميع عينات الجوز المدروسة كان تركيز الأفلاتوكسينات الكلية و AFB₁ أقل من الحدود المسموح بها من قبل الاتحاد الأوروبي والمواصفة القياسية السورية والتي تبلغ كما ذكر سابقاً 4 مكغ/كغ لمجموع الأفلاتوكسينات الكلية و 2 مكغ/كغ للأفلاتوكسين B₁ كما يوضح الجدول (4).



الشكل (4): مخطط بياني يوضح النسبة المئوية للتلوث بكل نوع من الأفلاتوكسينات الأربعة في 20 عينة من الجوز.

يمكن تفسير انخفاض نسبة التلوث في عينات الجوز المدروسة بعدم توافر الظروف المناسبة لإنتاج الأفلاتوكسينات خلال المراحل المختلفة التي مرت بها العينات، إذ بشكل عام يُعد الجوز من النباتات المحمية بشكل جيد من أي هجوم فطري بسبب وجود القشر الخارجي للثمرة والهيكل الداخلي والأنسجة المغلفة للبذور (Mahoney, Molyneux, et al. 2003)، إضافة إلى أنه يقاوم التلوث بمختلف الميكروبات بسبب إنتاجه مركبات كيميائية تُدعى phytoalexins وهي مواد مضادة للميكروبات تنتجها بعض النباتات (Bediako, Ofori et al. 2019). لكن رغم كل هذه الحماية يمكن أن يتعرض الجوز للتلوث قبل وأثناء وبعد الحصاد بسبب التشققات والكسور التي تسببها الحشرات والطيور والعمليات الميكانيكية (Kabak 2014)، أو كنتيجة للإجهاد الناجم عن ظروف الجفاف والذي يُعزز حدوث تشققات تسهل الإصابة بالفطريات (Okello, Biruma et al. 2010)، وكذلك يقلل إجهاد الجفاف من الدفاعات الطبيعية للنبات ضد الميكروبات إذ يعزز نمو *A. parasiticus* و *A. flavus* (Pitt, Taniwaki et al. 2013) ويقلل إنتاج phytoalexins (Bediako, Ofori et al. 2019). من ناحية أخرى يمكننا تحليل اختلاف أنواع الأفلاتوكسينات الظاهرة أو ظهور نوع دون آخر باحتمال اختلاف الأنواع أو حتى السلالات الفطرية المنتجة للأفلاتوكسينات والتي تختلف فيما بينها بالأنواع التي تنتجها (Nyirahakizimana, Mwamburi et al. 2013). قام العديد من الباحثين حول العالم بالنقصي عن التلوث بالأفلاتوكسينات في الجوز، وبالمقارنة لنتائجنا مع نتائج دراسة إيرانية وجد أنّ هناك تباين في النتائج فقد كانت (90.69%) من عينات الجوز ملوثة بالأفلاتوكسينات وبمجال (0-38.1) مكغ/كغ وبمتوسط $SD \pm (8.4 \pm 14.4)$ مكغ/كغ (Ostadrahimi, Ashrafnejad et al. 2014)، وكذلك خالفت نتائج دراسة أخرى أجريت في نيبال بلغت نسبة تلوث عينات الجوز بالأفلاتوكسينات فيها (52.5%) وبمتوسط $SD \pm (24.0 \pm 210)$ مكغ/كغ (Jeswal, Kumar et al. 2017).

قامت دراسة إيرانية أخرى بالتحري عن وجود AFS في عدد من عينات جوز مقشور وأظهرت نتائجهم أن التراكيز كانت ضمن المجال (1-54) مكغ/كغ للأفلاتوكسينات الكلية، (15.4-35.1) مكغ/كغ للأفلاتوكسين B_1 ، (4-8.1) مكغ/كغ للأفلاتوكسين B_2 ، (1.4-8.2) مكغ/كغ للأفلاتوكسين G_1 وضمن المجال (0-5.1) مكغ/كغ للأفلاتوكسين G_2 وبشكل مخالف لما تم التوصل له في دراستنا (Tahavori, Ghaderi et al. 2012). ظهر عدم التوافق أيضاً بين نتائجنا وما توصل إليه عبد اللطيف نعمة الله وزملاؤه في دراستهم للكشف عن الأفلاتوكسينات الموجودة في عدة عينات من الجوز في مكة، إذ كانت (50%) من العينات ملوثة بالأفلاتوكسينات وخالفت (17.8%) من العينات الملوثة التراكيز المسموح بها من الاتحاد الأوروبي (Neamatallah and Serdar 2013).

من ناحية أخرى أظهرت نتائج دراسة تركيبة أن نسبة ظهور AFB_1 ، AFB_2 ، AFG_1 و AFG_2 في عينات الجوز الملوثة هي 10%، 4%، 6% و 2% على التسلسل، وكانت تراكيز الأفلاتوكسينات الكلية و AFB_1 في (2%) من هذه العينات مخالفة للحدود الأوروبية المسموحة (Kabak 2014) وهذه النتائج مخالفة لنتائج دراستنا. يمكن تعليل اختلاف النتائج بين الدراسات المختلفة حول العالم باختلاف الظروف المواتية للإنتاج بين البلدان التي شملتها هذه الدراسات (Alhussaini 2012)، وبشكل عام يمكن أن يحصل التلوث بالأفلاتوكسينات للجوز في أي وقت منذ النضج حتى البيع والاستهلاك عند توافر الظروف المناسبة للإنتاج لاسيما ارتفاع درجة الحرارة للجوز والرطوبة النسبية مما يرفع نسبة الرطوبة في العينة ودرجة حرارتها وهذا يُعد من المُسببات الأساسية للتلوث بالأفلاتوكسينات (Bayman, Baker *et al.* 2002, Cotty and Jaime-Garcia 2007).

الاستنتاجات والتوصيات:

- ❖ أظهرت النتائج وجود تلوث بالأفلاتوكسينات في بعض عينات الجوز المتوفرة في الأسواق المحلية وكانت نسبة التلوث (20%) من العينات المدروسة.
- ❖ كانت تراكيز الأفلاتوكسينات الكلية ضمن المجال (0.7-2.86) مكغ/كغ، أما AFB_1 فوجد ضمن المجال (0.7-1.76) مكغ/كغ.
- ❖ كانت كل تراكيز الأفلاتوكسينات الكلية و AFB_1 في العينات الملوثة أقل من الحدود المسموح بها من قبل الاتحاد الأوروبي والمواصفة القياسية السورية.

التوصيات:

- ❖ مراقبة مستويات الأفلاتوكسينات في المنتجات الغذائية المختلفة المسوقة في بلادنا وبالأخص في المكسرات.
- ❖ متابعة الدراسة لتشمل أنواعاً وعدداً أكبر من العينات.

References:

- 1) The specification (Syrian Standard 2680/2008). Standards, Standards and Indices for Price Index Numbers Syria 2008.
- 2) Abuagela, M. O. (2017). Inactivation of Aflatoxins B 1, B 2 in Peanuts by Pulsed Light (PL), University of Florida.
- 3) Al-Hammadi, S., F. Marzouqi, A. Al-Mansouri, A. Shahin, M. Al-Shamsi, E. Mensah-Brown and A.-K. Souid (2014). "The cytotoxicity of aflatoxin b1 in human lymphocytes." Sultan Qaboos University medical journal 14(1): e65.
- 4) Alhussaini, M. S. (2012). "Mycobiota and mycotoxins of nuts and some dried fruits from Saudi Arabia." Journal of American Science 8(12): 525-534.
- 5) Alshannaq, A. F. and J.-H. Yu" (2020) A Liquid Chromatographic Method for Rapid and Sensitive Analysis of Aflatoxins in Laboratory Fungal Cultures." Toxins 12(2): 93.
- 6) Augusto, J. (2004). Development of a screening method for determination of aflatoxins, University of Georgia.
- 7) Bayman, P., J. L. Baker and N. E. Mahoney (2002). "Aspergillus on tree nuts: incidence and associations." Mycopathologia 155(3): 161-169.

- 8) Bedard, L. L. and T. E. Massey (2006). "Aflatoxin B1-induced DNA damage and its repair." *Cancer letters* 241(2): 174-183.
- 9) Bediako, K. A., K. Ofori, S. K. Offei, D. Dzidzienyo, J. Y. Asibuo and R. A. Amoah (2019). "Aflatoxin contamination of groundnut (*Arachis hypogaea* L.): Predisposing factors and management interventions." *Food control* 98: 61-67.
- 10) Campbell, K., A. L. F. Cavalcante, P. Galvin-King, M. Oplatowska-Stachowiak, C. Brabet, I. Metayer, D. Montet, S. A. Haughey and C. T. Elliott (2017). "Evaluation of an alternative spectroscopic approach for aflatoxin analysis: Comparative analysis of food and feed samples with UPLC–MS/MS." *Sensors and Actuators B: Chemical* 239: 1087-1097.
- 11) Cancer, I. A. f. R. o. (2012). "A review of human carcinogens. Part F: Chemical agents and related occupations." *IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans*.
- 12) Coppock, R. W., R .G. Christian and B. J. Jacobsen (2018). *Aflatoxins. Veterinary Toxicology*, Elsevier: 983-994.
- 13) Cotty, P. J. and R. Jaime-Garcia (2007). "Influences of climate on aflatoxin producing fungi and aflatoxin contamination." *International journal of food microbiology* 119(1-2): 109-115.
- 14) Cuero, R., T. Ouellet, J. Yu and N. Mogongwa (2003). "Metal ion enhancement of fungal growth, gene expression and aflatoxin synthesis in *Aspergillus flavus*: RT-PCR characterization." *Journal of applied microbiology* 94(6): 953-961.
- 15) Dhanasekaran, D., S. Shanmugapriya, N. Thajuddin and A. Panneerselvam (2011). *Aflatoxins and aflatoxicosis in human and animals. Aflatoxins-Biochemistry and Molecular Biology*, IntechOpen.
- 16) Diao, E., H. Dong, H. Hou, Z. Zhang, N. Ji and W. Ma (2015). "Factors influencing aflatoxin contamination in before and after harvest peanuts: a review." *Journal of Food Research* 4(1): 148.
- 17) EC (401/2006). "Commission Regulation (EC) No. 401/2006 of 23 February 2006 laying down the methods of sampling and analysis for the official control of the levels of mycotoxins in foodstuffs." *Off J Eur Union* 70: 12-34.
- 18) Iloabuchi Chinwenwa, G. (2017). *Synthesis and Interventive Performances of Alumina, Silica and their Complexes in Aflatoxin Adsorption In-Vitro*.
- 19) Int, C. (2019). "Aflatoxins biosynthesis, toxicity and intervention strategies: A review".
- 20) Iqbal, S., M. Asi and A. Ariño (2013). "Aflatoxins".
- 21) Jeswal, P., D. Kumar and M. Kumar (2017). "Fungal incidence and co-contamination of aflatoxins & citrinin in raisins, pistachio nuts, walnuts and almonds marketed in Indo-Gangetic Plain of Bihar " *Global Advanced Research Journal of Agricultural Science*.
- 22) Kabak, B. (2014). "Quantitation of aflatoxins in walnut kernels by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection." *Food Additives & Contaminants: Part B* 7(4): 288-294.
- 23) Kabak, B., A. D. Dobson and I. I. Var (2006). "Strategies to prevent mycotoxin contamination of food and animal feed: a review." *Critical reviews in food science and nutrition* 46(8): 593-619.

- 24) Kumar, P., D. K. Mahato, M. Kamle, T. K. Mohanta and S. G. Kang (2017). "Aflatoxins: a global concern for food safety, human health and their management." *Frontiers in microbiology* 7: 2170.
- 25) Lakkireddy, K., K. Kasturi and S. R. KRS (2014). "Aflatoxins in food and feed: The science of safe food." *practice* 3: 5.
- 26) Lizárraga-Paulín, E. G., E. Moreno-Martínez and S. P. Miranda-Castro (2011). Aflatoxins and their impact on human and animal health: an emerging problem. *Aflatoxins-Biochemistry and Molecular Biology*, IntechOpen.
- 27) Mahoney, N., R. Molyneux, J. McKenna, C. Leslie and G. McGranahan (2003). "Resistance of 'Tulare' walnut (*Juglans regia* cv. Tulare) to aflatoxigenesis." *Journal of food science* 68(2): 619-621.
- 28) Marchese, S., A. Polo, A. Ariano, S. Velotto, S. Costantini and L. Severino (2018). "Aflatoxin B1 and M1: Biological properties and their involvement in cancer development." *Toxins* 10(6): 214.
- 29) Martins, L. M., A. S. Sant'Ana, B. T. Iamanaka, M. I. Berto, J. I. Pitt and M. H. Taniwaki (2017). "Kinetics of aflatoxin degradation during peanut roasting." *Food research international* 97: 178-183.
- 30) Medina, A., M. K. Gilbert, B. M. Mack, G. R. OBrian, A. Rodriguez, D. Bhatnagar, G. Payne and N. Magan (2017). "Interactions between water activity and temperature on the *Aspergillus flavus* transcriptome and aflatoxin B1 production." *International journal of food microbiology* 256: 36-44.
- 31) Monson, M., R. Coulombe and K. Reed (2015). "Aflatoxicosis: Lessons from toxicity and responses to aflatoxin B1 in poultry." *Agriculture*.777-742 :(3)5
- 32) Mousavi Khaneghah, A., I. Eş, S. Raeisi and Y. Fakhri (2018). "Aflatoxins in cereals: State of the art." *Journal of food safety* 38(6): e12532.
- 33) Mutegi, C. K. (2010). The extent of Aflatoxin and *Aspergillus* section *Flavi*, *Penicillium* spp. and *Rhizopus* spp. contamination of peanuts from households in western Kenya and the causative factors of contamination.
- 34) Neamatallah, A. and S. A. Serdar (2013). "Incidence of aflatoxins in commercial nuts in the holy city of Mekkah." *Food control* 29(1): 121.124-
- 35) Nyirahakizimana, H., L. Mwamburi, J. Wakhisi, C. K. Mutegi, M. E. Christie and J. M. Wagacha (2013). "Occurrence of *Aspergillus* species and aflatoxin contamination in raw and roasted peanuts from formal and informal markets in Eldoret and Kericho towns, Kenya." *Advances in Microbiology* 3(4): 333-342.
- 36) Okello, D., M. Biruma and C. Deom (2010). "Overview of groundnuts research in Uganda: Past, present and future." *African Journal of Biotechnology* 9(39): 6448-6459.
- 37) Ostadrahimi, A., F. Ashrafnejad, A. Kazemi, N. Sargheini, R. Mahdavi, M. Farshchian and S. Mahluji (2014). "Aflatoxin in raw and salt-roasted nuts (pistachios, peanuts and walnuts) sold in markets of Tabriz, Iran." *Jundishapur journal of microbiology* 7(1).
- 38) Ostry, V., F. Malir, J. Toman and Y. Grosse (2017). "Mycotoxins as human carcinogens—the IARC Monographs classification." *Mycotoxin research* 33(1): 65-73.
- 39) Pitt, J., M. H. Taniwaki and M. Cole (2013). "Mycotoxin production in major crops as influenced by growing, harvesting, storage and processing, with emphasis on the achievement of Food Safety Objectives." *Food Control* 32(1): 205-215.

- 40) Rodrigues, P., C. Soares, Z. Kozakiewicz, R. Paterson, N. Lima and A. Venâncio (2007). "Identification and characterization of *Aspergillus flavus* and aflatoxins".
- 41) Saleem, F., B. Sadia and F. S. Awan (2017). Control of Aflatoxin Production Using Herbal Plant Extract. Aflatoxin-Control, Analysis, Detection and Health Risks, InTech.
- 42) Santini, A. and A. Ritieni (2013). Aflatoxins: risk, exposure and remediation. Aflatoxins–Recent advances and future prospects, InTech.
- 43) Sudakin, D. L. (2003). "Dietary aflatoxin exposure and chemoprevention of cancer: a clinical review." *Journal of Toxicology: Clinical Toxicology* 41(2): 195-204.
- 44) Tahavori, A., F. Ghaderi and M. Nemati" (2012) Determination of aflatoxins in nuts of Tabriz confectionaries by ELISA and HPLC methods." *Advanced pharmaceutical bulletin* 2(1): 123.
- 45) Torres, A. M., G. G. Barros, S. A. Palacios, S. N. Chulze and P. Battilani (2014). "Review on pre-and post-harvest management of peanuts to minimize aflatoxin contamination." *Food Research International* 62: 11-19.
- 46) Truckness, M. (2000). "AOAC Official Method 991.31, Aflatoxin in corn, raw peanuts, and peanut butter." *J. AOAC Int* 49: 22-24.
- 47) Wild, C. and P. Turner (2002). "The toxicology of aflatoxins as a basis for public health decisions." *Mutagenesis* 17(6): 471-481.
- 48) Yu, L., P. Li, Q. Zhang, W. Zhang, X. Ding and X. Wang (2013). "Graphene oxide: an adsorbent for the extraction and quantification of aflatoxins in peanuts by high-performance liquid chromatography." *Journal of Chromatography A* 1318: 27-34.

جدول ملحق (1): رمز عينات الجوز وأصلها ومكان وتاريخ السحب

JR1	10/2018	الرمل	جوز أوكراني
JS1	10/2018	الشيخخضاهر	جوز ملدوفي
JZ1	10/2018	الزراعة	جوز أمريكي
JD1	10/2018	الدريبة	جوز بلدي
JA1	10/2018	العمارة	جوز أمريكي
JR2	1/2019	الرمل	جوز ملدوفي
JS2	1/2019	الشيخخضاهر	جوز بلدي
JZ2	1/2019	الزراعة	جوز تركي
JD2	1/2019	الدريبة	جوز بلدي
JA2	1/2019	العمارة	جوز أوكراني
JR3	4/2019	الرمل	جوز أمريكي
JS3	4/2019	الشيخخضاهر	جوز أمريكي
JZ3	4/2019	الزراعة	جوز أمريكي

JD3	4/2019	الدرية	جوز ملدوفي
JA3	1/2019	العمارة	جوزأوكراني
JR4	7/2019	الرمل	جوز أوكراني
JS4	7/2019	الشيخضاهر	جوز ملدوفي
JZ4	7/2019	الزراعة	جوز بلدي
JD4	7/2019	الدرية	جوز ملدوفي
JA4	7/2019	العمارة	جوزأمريكي