



Kerman University of Medical Sciences

Pharmaceutics Research Center

Ph.D. by Research

Title:

**Effect of temperature, microwave and adsorbent materials in reducing
aflatoxin level and the study of prevalence and the effective factors on
aflatoxin level in medicinal herbs and spices from different areas of Iran**

By: Moslem Lari Najafi

Supervisors:

١-Dr Payam Khazaeli

٢-Dr Mahmoud Reza Heidari

Advisors:

١-Dr Mitra Mehrabani

٢-Dr Gholamreza Asadikaram

Year: ٢٠١٨

بسمه تعالی

سور تجلسه دفاع از پایان نامه دکتری تخصصی (Ph.D.)

دانشگاه علوم پزشکی کرمان
مدرسه تحصیلات تکمیلی دانشگاه

جلسه دفاعیه پایان نامه تحصیلی آقای مسلم لاری نجفی دانشجوی دکتری تخصصی (Ph.D.) رشته دکتری پژوهشی فارماسیوتیکس مرکز تحقیقات فارماسیوتیکس دانشگاه علوم پزشکی کرمان تحت عنوان: بررسی میزان تاثیر حرارت، ماکروویو و مواد جاذب در کاهش سطح آفلاتوکسین و مطالعه شیوع آلودگی و فاکتورهای موثر بر میزان آفلاتوکسین گیاهان دارویی و ادویجات در مناطق مختلف کشور ساعت ۱۱:۳۰ روز دوشنبه مورخ ۹۷/۴/۴ با حضور اعضای محترم هیات داوران متشکل از:

امضاء	نام و نام خانوادگی	سمت
	۱- دکتر پیام خراشلی ۲- دکتر محمود رضا حیدری	الف: استاد (ان) راهنمای پژوهشی
	۱- دکتر مینا مهرنایی ۲- دکتر علیرضا اسدی کرم	ب: استاد (ان) مشاور
	دکتر عباس برداختی	ب: عضو هیات داوران (داخلی)
	دکتر سمیه کریمی مهاجری	ج: عضو هیات داوران (داخلی) و نماینده معاونت آموزشی دانشگاه
	دکتر شهاب مقصودی	ج: عضو هیات داوران (خارجی)
	دکتر حسن بردانپناه	ح: عضو هیات داوران (خارجی)
	دکتر بهزاد بهنام	د: مدیر تحصیلات تکمیلی دانشکده (ناظر)
	دکتر علیرضا دهقان نوده	د: رئیس مرکز تحقیقات فارماسیوتیکس
	دکتر مهدی عباسزاده	نماینده تحصیلات تکمیلی مرکز تحقیقات فارماسیوتیکس

تشکیل گردید و ضمن ارزیابی با درجه الف و نمره ۲۰ مورد تأیید قرار گرفت

مهر و امضاء معاون آموزشی دانشکده

مقدمه و هدف: مایکوتوکسین ها سموم طبیعی هستند که توسط گونه های مختلف قارچ تولید و موجب مرگ جانوران، گیاهان و انسان می شوند. مایکوتوکسین ها اغلب در تعداد زیادی از محصولات کشاورزی و غذایی در سراسر جهان یافت می شود که در مراحل مختلف می توانند منجر به آلودگی شوند. با این وجود، این قارچ ها به مناطق خاص جغرافیایی یا آب و هوایی خاصی وابسته نیستند. در واقع، رشد قارچی و تولید سموم تنها در صورتی اتفاق می افتد که شرایط محیط مناسب باشد. آفاتوکسین ها مهمترین گروهی از مایکوتوکسین ها هستند که توسط گونه های مختلف قارچ اسپرژیلوس تولید می شوند، به عنوان مثال اسپرژیلوس فلاووس و اسپرژیلوس پارازیتیکوس. هدف از این مطالعه، بررسی شیوع آلودگی آفاتوکسین در گیاهان و ادویه ها در مناطق مختلف ایران و تعیین عوامل مؤثر بر آن است. ارزیابی و کنترل آلودگی در گیاهان و ادویه ها که در صنایع غذایی استفاده می شود، می تواند سلامت مصرف کنندگان را تضمین و رقابت در بازار بین المللی را افزایش دهد.

روشها: در مرحله اول، ۱۲۰ نمونه از گیاهان و ادویه ها (سماق، بابونه، زیره سبز، زیره سیاه، زردچوبه، برگ بو، فلفل سیاه، فلفل قرمز، مریم گلی، دانه ریحان، آویشن، نعنای، زنجبیل، رازیانه) فرم های فله و بسته بندی برای اندازه گیری سطح آفاتوکسین از مناطق مختلف ایران تهیه شد. آفاتوکسین با استفاده از متانول ۸۰٪ استخراج شد و سپس از طریق ستون ایمنونوفیتی جداسازی شد. شناسایی با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، مجهز به سیستم تشخیص فلورسنس در طول موج های تحریک و طول موج انتشار ۳۶۵ و ۴۳۵ نانومتر انجام شد. با توجه به نتایج حاصل از اندازه گیری آفاتوکسین در نمونه های گیاهی و ادویه، تمام نمونه های پودر فلفل قرمز دارای بیشترین آلودگی است که پودر فلفل قرمز برای اثر دما، اشعه ماکروویو و مواد جاذب انتخاب شد. در مرحله بعد، اثر دما بر روی فلفل قرمز فلفل قرمز آلوده مورد ارزیابی

قرار گرفت. در مرحله بعد اثر اشعه ماکروویو بر فلفل قرمز فلفل قرمز آلوده مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت، اثر مواد جاذب (بتونیت، زئولیت و زغال فعال) بر فلفل قرمز آلوده مورد بررسی قرار گرفت.

یافته ها: در مرحله اول، بیشترین میزان آلودگی در نمونه های گیاهان و ادویه ها به آفلاتوکسین B₁ ۳۰/۸٪ مربوط می شود که بیشترین میزان آلودگی آفلاتوکسین در فلفل قرمز ۱۰۰٪ گزارش شد. بررسی عوامل مؤثر بر سطح آفلاتوکسین نشان دهنده اختلاف معنی داری بین نمونه ها با رطوبت بود ($P < ۰/۰۵$). همچنین نتایج نشان داد که سطح آفلاتوکسین تحت تأثیر بسته بندی نمونه ها قرار نگرفته است ($P > ۰/۰۵$). در مرحله بعد، درمان نشان دهنده کاهش سطح آفلاتوکسین در نمونه ها است که در دمای ۹۰ درجه سانتیگراد برای ۳۰ تا ۲۴۰ دقیقه حرارت کاهش قابل ملاحظه ای مشاهده شد. نتایج نشان داد که کاهش ۲۲/۰۱٪ برای آفلاتوکسین B₁ و کاهش ۲۷/۸۵٪ برای آفلاتوکسین B₂ است که اختلاف معنی داری بین میزان کاهش سطح آفلاتوکسین در شرایط مختلف درمان مشاهده شد ($P < ۰/۰۵$). در مرحله بعد، همچنین درمان نشان دهنده کاهش سطح آفلاتوکسین در نمونه ها است که به مدت ۳۰ تا ۲۴۰ ثانیه در ۹۰۰ وات با اشعه ماکروویو کاهش قابل ملاحظه ای مشاهده شد. نتایج نشان می دهد که کاهش ۳۷/۵۲٪ برای آفلاتوکسین B₁ و کاهش ۳۳/۸۶٪ برای آفلاتوکسین B₂ است که اختلاف معنی داری بین میزان کاهش سطح آفلاتوکسین در شرایط مختلف درمان مشاهده شد ($P < ۰/۰۵$). در مرحله نهایی، اختلاف معنی داری بین کاهش سطح آفلاتوکسین در شرایط مختلف درمان مشاهده نشد.

نتیجه گیری: با توجه به استفاده گسترده از ادویه ها به عنوان اجزاء تشکیل دهنده مواد غذایی، آلودگی به آفلاتوکسین می تواند یک تهدید جدی باشد. بنابراین نظارت منظم ادویه ها به شدت توصیه می شود.

کلمات کلیدی: آفلاتوکسین، HPLC، حرارت، ماکروویو، مواد جاذب، گیاهان دارویی

Abstract

Background and Objectives: Mycotoxins are natural toxins, which are produced by several fungal species and are associated with morbidity or even mortality in animals, plants, and humans. Mycotoxins are often found in a large number of agricultural and food products throughout the world. In different stages such as the production, harvest, transport, and storage of agricultural products, mycotoxins can result in the contamination of human food or animal feed. Nevertheless, these fungi are not endemic to specific geographical areas or climates. In fact, fungal growth and toxin production occur only if the environment and conditions are suitable. AFs are the most important group of mycotoxins, produced by different *Aspergillus* species, i.e., *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. The aim of this study was to investigate the prevalence of aflatoxin contamination in herbs and spices in different regions of Iran and determine the effective factors. Seaidly assessment and control of toxin contamination in herbs and spices, used in food industries, can guarantee the health of consumers and promote competition in the international market.

Methods: At the first step, 120 samples of herbs and spices (Sumac, Chamomile, Green cumin, Black cumin, Turmeric, Bay leaf, Black pepper, Red pepper, Sage, Basil seeds, Thyme, Mint, Ginger, Fennel) in both bulk and packaged forms were prepared in order to measure aflatoxin level from different regions of Iran. Aflatoxin was extracted, using 80% methanol and then purified via immunoaffinity column. Detection were performed, using high performance liquid chromatography, equipped with a fluorescence detection system at excitation and emission wavelengths of 360 and 430 nm, respectively. According to the results Afs content of herb and spice samples, all samples of red pepper powder have the highest contamination which red pepper powder for effect of temperature, microwave radiation and adsorbent materials were selected. In the next step, the effect of temperature on Afs contaminated red pepper was evaluated

in a laboratory setting. In the next step, the effect of microwave radiation on Afs contaminated red pepper was evaluated in a laboratory setting. In the final part, the reducing effect of adsorbent materials (bentonite, zeolite, and activated charcoal) on Afs contaminated red pepper was evaluated.

Results: At the first step, the highest prevalence of aflatoxin contamination in samples of herbs and spices was attributed to AFB₁ (30,8%). Also, the highest prevalence of aflatoxin contamination was reported in red pepper (100%). Examination of factors affecting aflatoxin level showed a significant difference between the samples in terms of moisture ($P < 0,05$). Also, as the results indicated, aflatoxin level was not significantly influenced by the packaging of the samples ($P > 0,05$). In the next step, although treatment showed different degrees of AFs reduction in the samples, a substantial decrease was reported in samples heated at 90°C for 30-45 min. The findings indicated a 22,0% decline in the amount of AFB₁ and a 27,8% reduction in AFB₂. There was a significant difference in AFs level decrease under different treatment conditions ($P < 0,05$). In the next step, although treatment showed some level of AFs degradation, a significant reduction has been reported in the AFs concentrations of the samples influenced at 900 watts for 30-45 seconds. The findings indicated a 37,0% decline in the amount of AFB₁ and a 33,8% reduction in AFB₂. Moreover, a significant difference was observed between AFs level decrease in different treatment conditions ($P < 0,05$). In the final part, no significant difference was observed between AFs level decrease in different treatment conditions.

Conclusion: AFs contamination could be a serious threat, given the prevalent use of spices as ingredients in food preparation. Therefore, regular monitoring of spices, is highly recommended.

Keywords: Aflatoxin, HPLC, Temperature, Microwave, Adsorbents, Medicinal herb

