

اندازه‌گیری مقدار هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای و آفلاتوکسین B₁ در تخمه آفتابگردان بوداده خانگی

علیرضا بختیاری^{۱،۲}، غلامرضا جاهد خانیکی^۱، ابراهیم مولایی آقایی^۱، نبی شریعتی فر^۱، پریسا شاولی گیلانی^۱، نادر اکبری^۱، بهروز اکبری^۱
آدرگانی^۲، نجمه یزدانفر^۴، پریسا صدیق آرا^۱

۱- گروه بهداشت محیط، بخش ایمنی مواد غذایی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۲- مرکز علمی پژوهش‌های دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران

۳- مرکز تحقیقات سلامت آب، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت و درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران

۴- پژوهشکده توسعه صنایع شیمیایی جهاد دانشگاهی، کرج، ایران

۵- نویسنده مسئول: گروه بهداشت محیط، بخش ایمنی مواد غذایی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران پست الکترونیک: parisasss@yahoo.com

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۹/۱۲

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۶/۱

چکیده

سابقه و هدف: هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای و آفلاتوکسین B₁ به عنوان یکی از رایج‌ترین آلاینده‌های مواد غذایی شناخته می‌شوند. دانه آفتابگردان بوداده به عنوان یکی تنقلات مرسوم از مقبولیت و مصرف بالایی در ایران برخوردار است که احتمال دارد این ترکیبات را هم از محیط و هم حین فرایند بو دادن دریافت کند. هدف این مطالعه شناسایی و اندازه‌گیری هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای و آفلاتوکسین B₁ در پوست و مغز دانه آفتابگردان بوداده تولید شده به صورت خانگی است.

مواد و روش‌ها: برای استخراج هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای، از روش سوکسله استفاده شد؛ محلول استخراج شده از نمونه به دستگاه کروماتوگرافی گازی-طیف سنج جرمی (GC-MS) تزریق و محتوی این ترکیبات با استفاده از منحنی کالیبراسیون اندازه‌گیری شد. آفلاتوکسین B₁ نمونه با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و ستون‌های ایمنوافینیتی اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: از بین ۱۶ نوع هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای، فقط اسنافتن در نمونه حاضر شناسایی شد و مقدار آن در پوست دانه و مغز آن به ترتیب ppm ۰/۴۸±۰/۴ و ppm ۲/۴±۱/۱ اندازه‌گیری شد. ۱۱ درصد مغز نمونه‌ها و ۴۶ درصد پوسته نمونه‌ها از لحاظ وجود مایکوتوکسین مثبت بودند.

نتیجه‌گیری: با توجه به اینکه سرطان‌زایی اسنافتن (Acenaphthene) برای انسان ثابت نشده است؛ همچنین با توجه به اینکه میزان آفلاتوکسین B₁ در کلیه نمونه‌ها کمتر از حد مجاز اعلام شده بود، می‌توان گفت که در صورت مصرف این محصول از لحاظ این دو آلاینده خطر جدی مصرف کننده را تهدید نمی‌کند.

واژگان کلیدی: آلاینده محیطی، دانه آفتابگردان بوداده، کروماتوگرافی گازی، کروماتوگرافی مایع، اسنافتن، آفلاتوکسین B₁

پیام‌های اصلی

- دانه آفتابگردان مستعد آلودگی به PAHs در اثر فرایند بو دادن و آلودگی محیطی با آفلاتوکسین B₁ است.
- میزان آفلاتوکسین B₁ در پوسته دانه‌های آفتابگردان بیشتر از مغز بود.
- میزان PAHs در مغز دانه‌های آفتابگردان بیشتر از پوسته بود.

• مقدمه

هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای از آلوده کننده‌های محیطی هستند که از طریق سوختن ناقص، پیرولیز مواد آلی و فعالیت‌های آتشفشانی تولید می‌شوند (۱، ۲). این ترکیبات بر اساس تعداد حلقه‌های بنزنی به دو دسته کلی هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای سنگین تقسیم می‌شوند. دارای ۵ یا بیشتر حلقه بنزنی در دسته سنگین و هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای دارای کمتر از ۵ حلقه بنزنی در دسته سبک جای می‌گیرند (۳). هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای سنگین در مقایسه با نوع سبک، از پایداری، خاصیت تراژونی و سرطان‌زایی بالاتری برخوردار هستند (۴-۶). بیشترین مواجهه بشر با این ترکیبات خطرناک از طریق غذا است؛ به طوری که، بیش از ۷۰ درصد مواجهه افراد غیر سیگاری از طریق غذا صورت می‌گیرد (۷، ۸). بیشتر آلودگی مواد غذایی به هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای در طول فرایند تولید مواد غذایی (فرایندهای حرارتی) اتفاق می‌افتد، ولی گیاهان هم ممکن است از طریق آب، هوا و خاک به این ترکیبات شیمیایی آلوده شده باشند (۹، ۱۰). فرایندهای بریان کردن، دود دادن و یا کباب کردن روی آتش، مقدار هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای در غذا را افزایش می‌دهند. به علت خطرناک بودن هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای برای سلامت بشر، پایش و اندازه‌گیری مستمر آنها در محیط و مواد غذایی بسیار ضروری است (۱۱). آژانس حفاظت محیط زیست آمریکا بر اساس سمیت و احتمال مواجهه انسانی، ۱۶ مورد از هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای را به صورت یک لیست تحت عنوان هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای با اولویت بالا در آب و مواد غذایی دسته‌بندی کرده است و به ارزیابی آنها در مواد غذایی تأکید دارد (۱۲-۱۴، ۸). آفلاتوکسین B₁ (AFB₁) نیز از آلودگی مطرح در محصولات زراعی است. این مایکوتوکسین در بین آفلاتوکسین‌ها، سمی تر و خطرناک تر است. در طی فرآیند متابولیک به ترکیب بسیار خطرناک ۸، ۹-اپوکسید آفلاتوکسین B₁ تبدیل می‌شود. ترکیب حاصل منجر به سرطان کبد می‌شود. محصولات زراعی با این سم بیشتر در کشورهای گرم سیری و نیمه گرم سیری مشاهده می‌شود (۱۵).

دانه آفتابگردان یک ماده بسیار مغذی است که بیش از ۵۰ درصد آن از چربی تشکیل شده است (۹۰ درصد این چربی از نوع غیر اشباع و بقیه آن به صورت اشباع شده است) (۱۶).

مصرف این دانه خوراکی به عنوان تنقلات و به صورت بو داده در بسیاری از نقاط جهان رواج دارد (۱۷). دانه آفتابگردان بوداده به دلیل فرایند بودادن و دارابودن اسیدهای چرب غیراشباع، می‌تواند منبع قابل توجهی از هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای باشد (۱۸). همچنین این دانه‌ها چنانچه در شرایط نامناسبی نگهداری شوند احتمال آلودگی با آفلاتوکسین B₁ نیز وجود دارد. بر طبق مستندات موجود مقدار این مایکوتوکسین متناسب با عدم رعایت بهداشت حین رشد، برداشت، جابجایی و ذخیره‌سازی تخم آفتابگردان‌ها است (۱۹). از این رو، این مطالعه با هدف تعیین و اندازه‌گیری ۱۶ نوع از هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای و آفلاتوکسین B₁ در دانه آفتابگردان بوداده تهیه شده به شیوه خانگی انجام شد.

• مواد و روش‌ها

۶۳ نمونه خام تخم آفتابگردان (*Helianthus annuus*) از بازار شهر تهران تهیه شد و به شیوه خانگی جهت این مطالعه آماده سازی شد. فرآیند بو دادن همانند روش‌های معمول بو دادن تخمه آفتابگردان به صورت خانگی درون ماهیتابه و روی هیتر در آزمایشگاه صورت گرفت. درجه حرارت ۱۸۰°C تنظیم شد. حین فرآیند بو دادن به میزان ۱ درصد وزنی نمک خوراکی نیز اضافه گردید. مدت زمان بو دادن ۱۰ تا ۱۵ دقیقه صورت گرفت.

اقدامات لازم برای تضمین کیفیت مناسب و اجرای اتخاذ تدابیر لازم برای اطمینان از قابل اعتماد بودن نتایج انجام شد. همگی معرف‌ها و استانداردها دارای Grade GC/HPLC استفاده شده‌اند تا دقت و صحت روش‌ها مورد استفاده تضمین شود. در طول مطالعه از آب دیونیزه استفاده شد. محلول‌های استاندارد به صورت روزانه تهیه شد. حلال‌ها، ایزواکتان و زایلن هم از شرکت میرک آلمان خریداری شدند. همچنین فیلتر بلانچر ساخت ایران نیز تهیه گردید. مخلوط استاندارد کالیبراسیون ۱۶ نوع هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای مختلف (شامل: نفتالن، اسنافتن، اسنافتیلن، آنتراسن، فنانترن، فلورن، فلوئورانترین، بنزو (آ) آنتراسن، کریزین، پیرن، بنزو (آ) پیرن، بنزو (ب) فلوئورانترین، بنزو (کا) فلوئورانترین، دیبنزو (آ، ایچ) آنتراسن، بنزو (جی، ایچ) آی، پیریلین، ایندن و پیرن) به صورت محلول در استونیتریل از شرکت Supelco (Bellefonte, PA, USA) خریداری شد. غلظت هر کدام از هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای در محلول استونیتریل ۲۰۰ mg/L بود.

آماده سازی نمونه

روش سوکسله یکی از روش های قدیمی آماده سازی نمونه است که کارایی آن تأیید شده است (۲۰). مغز دانه و پوست تخمه آفتابگردان از یکدیگر جدا شده و توسط یک آسیاب کن برقی به صورت جداگانه پودر شدند؛ سپس ۵۰ gr از هر نمونه به داخل یک ارلن مایر ۵۰۰ mL ریخته شد؛ در مرحله بعدی ۱۰۰ mL از محلول یک مولار پتاسیم هیدروکسید (KOH) در اتانول به ارلن مایر اضافه گردید؛ سپس ۵ mL زایلن (xylene) استاندارد به عنوان محلول داخلی (با غلظت 1 µg/mL در متانول) هم به مخلوط مورد نظر اضافه شد. در نهایت، این محلول به مدت ۳ ساعت حرارت دید تا حجم آن به دو میلی لیتر کاهش یابد. سپس نمونه پوست دانه به وسیله فیلتر نفوذپذیر شماره ۳ و نمونه مغز دانه به وسیله فیلتر بلانچر (Buchner filter)، فیلتر گردید. برای شست و شوی نمونه ها ۲۰ mL محلول متانول و آب به نسبت ۹:۱ اضافه شد؛ سپس این محلول به همراه ۵۰ mL ایزواکتان به یک کیف جداکننده انتقال داده شد و هر بار به مدت ۵ دقیقه هم زده شد و فاز ایزواکتان آن در یک ظرف جداگانه ریخته شده و با ۱۰۰ mL محلول آب و اتانول به نسبت ۱:۱ شسته شد. محلول ایزواکتان دو بار و هر بار با ۵۰ mL ایزواکتان و ۵ دقیقه هم زدن استخراج شد. سپس ۱۰ gr پودر سدیم سولفات فعال به مجموع محلول ایزواکتان حاصل شده اضافه شده و به مدت ۱ دقیقه توسط دستگاه هم زده شد، در مرحله بعد، این محلول ایزواکتان توسط یک الک فیلتر شد و سپس به روتاری اواپراتور (Rotary Evaporator) با دمای ۵۵ درجه سلسیوس انتقال داده شد تا به حجم ۲ mL برسد.

آنالیز دستگاهی

در این مطالعه، هیدروکربن های آروماتیک چند حلقه ای با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی مجهز به شناساگر طیف سنجی جرمی (GC-MS) مدل Agilent 7890A- 5975 MSD جدا و شناسایی شدند. جداسازی ترکیبات با استفاده از ستون موئینه سیلیس ذوب شده 5% Rxi®-5MS فنیل متیل سیلوکس (۶۰ × ۳۲ mL در ۰/۳۲ در روز و ضخامت فیلم ۰/۲۵ µm). جریان هلیوم (با خلوص ۹۹/۹۹۹ درصد) به عنوان گاز حامل به میزان ۱/۰ میلی لیتر در دقیقه تعیین شد.

دمای محفظه تزریق ۲۹۰°C، دمای اولیه ستون به مدت ۲ دقیقه روی ۷۰°C تنظیم و افزایش درجه حرارت با شیب ۲۰°C در دقیقه تا ۲۲۰°C انجام و در مرحله بعد درجه حرارت آون با سرعت ۵°C در دقیقه به ۲۹۵°C افزایش و در این دما به مدت ۸ دقیقه ثابت ماند. دمای منبع یون در ۲۳۰°C خط انتقال MSD و دمای چهار قطبی ۲۹۰°C و ۱۵۰ انجام شد. ۲ µL از

نمونه های استخراج شده به دستگاه GC-MS تزریق شد. برای شناسایی دقیق و نیز تعیین مقدار ترکیبات، تنظیمات دستگاه بر حالت یون انتخابی (SIM)، مطابق یون مشخصه های ترکیبات مورد بررسی انجام شد. محلول استخراج شده از نمونه های حقیقی و محلول های کالیبراسیون ۵ نقطه ای ۳ بار در شرایط یکسان تزریق شد. اندازه گیری کمی ترکیبات هدف با استفاده از روش شناسایی بر اساس یون مشخصه (SIM) جداسازی شدند و با ترکیب زمان ماند و تطابق طیف جرمی با استانداردهای کالیبراسیون اندازه گیری شده شناسایی شدند. دستگاه کروماتوگرافی و نیز شناساگر اسپکترومتری جرمی، در شرایط کالیبره بوده و نهایتاً اندازه گیری آلاینده های مورد نظر با رسم منحنی کالیبراسیون توسط استاندارد مرجع انجام شد.

برای تهیه محلول استاندارد مخلوط PAH ها، ۰/۵ میلی لیتر از محلول استاندارد ۲۰۰ میلی گرم بر لیتر، به حجم ۱۰ میلی لیتر رسانده و محلول استاندارد کاری ۱۰ ppm تهیه می شود. برای رسم منحنی کالیبراسیون، استانداردهای کاری ۱ تا ۱۰ ppm، با رقیق سازی این محلول، آماده می شود. گراف GC-MS مخلوط PAH ها در شکل S3 و اطلاعات منحنی کالیبراسیون ۱۶ ترکیب PAH مورد بررسی در جدول Table S1 مشاهده می شود.

جهت اندازه گیری آفلاتوکسین B₁ تجزیه و تحلیل نمونه ها با استفاده از دستگاه HPLC Agilent (ویلمینگتون، ایالات متحده آمریکا) مجهز به آشکارساز فلورسانس (FLD) انجام و برای جداسازی اجزا از ستون C18 مارک Eclipse-XDB (ایالات متحده آمریکا) به طول ۲۵ سانتی متر، قطر ۴/۶ میلی متر و ضخامت لایه ۵ میکرومتر استفاده شد. ابتدا عصاره های تهیه شده از نمونه ها از ستون های ایمونوفینیتری حاوی آنتی بادی های اختصاصی AFB₁ عبور داده شد. طول موج آشکارساز در ۳۶۰ و ۴۴۰ نانومتر تنظیم شد. ۵۰ µL حجم تزریق بود. فاز متحرک (متانول / استونیتریل / آب ۲۰:۲۰:۶۰ V / V / V) با سرعت جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه حفظ شد.

دستگاه HPLC و نیز شناساگر FLD، در شرایط کالیبره بوده و نهایتاً اندازه گیری آلاینده مورد نظر با رسم منحنی کالیبراسیون توسط استاندارد مرجع انجام شد. برای تهیه محلول استاندارد آفلاتوکسین B₁، ۰/۲ میلی لیتر از محلول استاندارد ۵۰۰۰ میکروگرم بر لیتر، به حجم ۱۰ میلی لیتر رسانده و محلول استوک ۱۰۰ ppb تهیه می شود. برای رسم منحنی کالیبراسیون، استانداردهای کاری ۰.۱۲۵ تا ۵.۰ ppb، با رقیق سازی این محلول استوک، آماده می شود. گراف HPLC آفلاتوکسین B₁ و منحنی کالیبراسیون مربوطه در شکل های S1 و S2 مشاهده می شود.

آنالیز آماری

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام شد. آمار توصیفی محاسبه گردید و میانگین و انحراف معیار برای داده‌های به‌دست‌آمده استخراج شد. به‌منظور ارزیابی تفاوت‌های معنی‌دار بین دو گروه پوسته و مغز تخم آفتابگردان، از آزمون تحلیل واریانس (ANOVA) استفاده شد. در این مطالعه، آزمون ANOVA برای مقایسه میانگین‌ها در میان گروه‌های مختلف مورد استفاده قرار گرفت و در صورت وجود تفاوت معنی‌دار، آزمون‌های تکمیلی نظیر آزمون T دانشجویی و دانکن برای شناسایی گروه‌های متمایز به کار گرفته شد.

• یافته‌ها

قبل از انجام آنالیز نمونه‌های تخمه آفتابگردان، ابتدا ویژگی‌ها قابلیت روش آنالیز، مانند درصد بازیابی و حد تشخیص کمی و کیفی با استفاده از روش اسپایک محلول استاندارد به نمونه‌های عاری از PAHs مورد ارزیابی قرار گرفت. درصد بازیابی در رنج ۷۷ درصد تا ۱۰۳ درصد بود که با داده‌های سایر تحقیقات مطابقت خوبی داشت. حدود تشخیص کمی و کیفی LOD (limit of detection) و LOQ (limit of)

quantification) نیز محاسبه و در جدول ۱ ارائه گردید. سپس شانزده نوع هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای در پوست و مغز دانه آفتابگردان مورد پایش و اندازه‌گیری قرار گرفتند، از بین این ترکیبات، فقط اسنافتن شناسایی و مقدار آن در پوست دانه و مغز آن به ترتیب 0.48 ± 0.4 ppm و 2.4 ± 1.1 ppm اندازه‌گیری شد. تفاوت معنی‌دار بین میزان اسنافتن و میزان آفاتوکسین B_1 پوسته و دانه تخمه آفتابگردان مشاهده شد. نوع PAHs باقی مانده در پوست دانه آفتابگردان و در مغز دانه آن شناسایی نشدند.

جدول ۲ نتایج میزان آفاتوکسین B_1 به همراه پارامترهای اعتباری را نشان می‌دهد. محدوده‌های دینامیکی خطی (LDRs)، حد تشخیص‌ها و کمیت‌ها (به ترتیب LOD و LOQ)، بازیابی نسبی استخراج و تکرارپذیری و تجدیدپذیری (RSD) توسط دو سطح اسپک آفاتوکسین B_1 به صورت تکرار در یک روز و تکرار در سه روز متوالی محاسبه شد. محدوده دینامیکی خطی $0.125 - 5$ ppb ($R^2 = 0.9994$) بود. برای دقت تکرارپذیری و تجدیدپذیری به ترتیب در محدوده $2.74 - 4.23$ درصد به دست آمد. بازیابی نسبی AFB_1 در سطح $1/0$ ($\mu g/kg$) از 79.22 تا 89.12 درصد بود.

جدول ۱. محتوی هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای در نمونه‌های دانه آفتابگردان بوداده

نوع آلاینده	نام لاتین علمی	LOQ mg/kg	LOD mg/kg	مغز دانه آفتابگردان	پوست تخمه آفتابگردان
نفتالن	Naphthalene	0.9	0.3	-	-
اسنافتن	Acenaphthene	0.9	0.3	2.4 ± 1.1 ppm	0.48 ± 0.4 ppm
اسنافتیلن	Acenaphthylene	0.9	0.3	-	-
پیرن	Pyrene	0.9	0.3	-	-
فلوئوراننتین	Fluoranthene	0.9	0.3	-	-
آنتراسن	Anthracene	1	0.4	-	-
ایندن وپیرن	Indeno[1,2,3-cd]pyrene	1	0.4	-	-
دیبنزو(آ، اچ) آنتراسن	Dibenzo[a,h]anthracene	1	0.4	-	-
بنزو (جی، اچ، آی) پیریلین	Benzo[ghi]perylene	1	0.4	-	-
بنزو (آ) پیرن	Benzo[a]Pyrene	0.9	0.3	-	-
کریزین	Chrysene	0.9	0.3	-	-
بنزو (آ) آنتراسن	Benz[a]anthracene	0.9	0.3	-	-
بنزو (کا) فلوئوراننتین	Benzo[k]fluoranthene	0.9	0.3	-	-
بنزو (ب) فلوئوراننتین	Benzo(b)fluoranthene	0.9	0.3	-	-
فلورن	Fluorene	0.9	0.3	-	-
فنانترن	Phenanthrene	0.9	0.3	-	-

جدول ۲. محتوی آفلاتوکسین B₁ در نمونه‌های دانه آفتابگردان بوداده

نوع آلاینده	نام لاتین علمی	LOQ μg/kg	LOD g/kgμ	مغز دانه آفتابگردان	پوست تخمه آفتابگردان
آفلاتوکسین B ₁	Aflatoxin B ₁	0.125	۰.۰۵	0.045±0.12 ng/g	0.67±1.6- ng/g

• بحث

در مطالعه حاضر ما به پایش و اندازه‌گیری ۱۶ نوع هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای در پوست و مغز دانه آفتابگردان بو داده پرداختیم و فقط موفق به پایش نوع اسنافتن در نمونه‌ها شدیم و سایر هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای شناسایی نشد. همچنین آفلاتوکسین B₁ مورد سنجش قرار گرفت. میزان متوسط این سم در پوسته تخمه و مغز ۰/۶۷ ng/g و ۰/۴۵ ng/g تخمه به ترتیب گزارش شد. بو دادن یک نوع پخت مواد غذایی است که معمولاً بر روی یک منبع حرارتی همانند اجاق صورت می‌گیرد. این نوع فرایند پخت معمولاً در درجه حرارت بالا صورت می‌گیرد و ممکن است برخی از ترکیبات سمی همانند هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای در مواد غذایی تشکیل شود (۲۱). میزان هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای در مواد غذایی بو داده بستگی به درجه حرارت، مدت زمان بو دادن و ترکیبات موجود در مواد غذایی دارد (۲۲). با افزایش درجه حرارت به خصوص بالای ۲۰۰°C میزان این ترکیبات افزایش خواهد یافت. عدم شناسایی هیچ گونه هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای با وزن مولکولی بالا در این محصول ناشی از تهیه این محصول در درجه حرارت‌های پایین‌تر از ۲۰۰°C است. هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای با وزن مولکولی بالا معمولاً در درجه حرارت‌های بالای ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد تشکیل می‌شوند (۲۳). مقدار اسنافتن به ترتیب در پوست دانه و مغز آن ۰/۴۸±۰/۴ ppm و ۲/۴±۱/۱ ppm اندازه‌گیری شد. مقدار این ترکیب در مغز بیشتر از پوسته آن بود علت این تفاوت به علت چربی‌های غیراشباع موجود در مغز دانه آفتابگردان است (۱۶). یکی از علل تشکیل هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای ناشی از پراکسیداسیون چربی هاست لذا در مغز به علت بیشتر بودن چربی، میزان این ترکیبات بیشتر تشکیل می‌شود. بر طبق مدل‌های تجربی هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای در محیط‌های حاوی اسید چرب به ویژه غیر اشباع با پیوندهای دوگانه تشکیل می‌شوند که هرچقدر این پیوندهای دوگانه افزایش یابد میزان هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای نیز افزایش می‌یابد (۲۴).

علی رغم اینکه اسنافتن از نظر IARC در دسته ۳ (سرطان زایی اثبات نشده برای انسان) قرار می‌گیرد (۲۵)؛ این به معنای بی خطر بودن کامل این ترکیب شیمیایی برای انسان نیست، مطالعات حیوانی نشان داده اند که تماس موش‌ها با ۲gr اسنافتن در طول ۳۲ روز، باعث تغییراتی در خون این حیوانات شده و به کبد، کلیه و ریه آنها آسیب وارد کرده است (۲۶). آژانس حفاظت محیط زیست آمریکا (USEPA) حداکثر میزان موجه انسان با اسنافتن را ۰/۰۶ mg از ای کیلوگرم وزن بدن تعیین کرده است (۲۷). پس برای یک انسان ۷۰ kg، حداکثر میزان مواجهه روزانه با اسنافتن 4.2mg است؛ با وجود اینکه این رقم فقط مربوط به مواجهه تغذیه ای نیست و مواجهه تنفسی را هم در بر می‌گیرد، در مقایسه با نتایج این مطالعه، می‌توان گفت که غلظت اسنافتن در مطالعه حاضر نمی‌تواند برای مصرف کننده خطر سلامتی جدی ایجاد کند.

Shavali-gilani و همکاران (۲۰۲۳) مطالعه ای بر ۴ طعم مختلف دانه آفتابگردان بوداده تهیه شده در یکی از کارخانه‌های تهران انجام دادند و میانگین غلظت مجموع هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای را در پوست و مغز دانه آفتابگردان نوع نمکی (که متداول تر است) به ترتیب ۲±۱/۲ ppm و ۱/۸±۰/۸ ppm اندازه‌گیری کردند که اگر مجموع کل دانه را در نظر بگیریم، از غلظت اسنافتن در مطالعه حاضر کمی بیشتر است (۲۸). همچنین در این مطالعه میانگین غلظت مجموع هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای با وزن مولکولی پایین هم به صورت جداگانه برای پوست دانه و مغز آن به ترتیب ۱/۸±۱/۸ ppm و ۰/۶±۰/۵ ppm گزارش شد؛ با توجه به اینکه اسنافتن اندازه‌گیری شده توسط مطالعه حاضر نیز جزو هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای با وزن مولکولی پایین به شمار می‌آید، شاید مقایسه ۲ داده اخیر معقول تر باشد؛ در این صورت میانگین غلظت هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای با وزن مولکولی پایین در مطالعه Shavali-gilani و همکاران از غلظت اسنافتن در مطالعه حاضر به تنهایی، کمی کمتر است (۲۸). در مطالعه Akbari (۲۰۱۷) بر روی دانه آفتابگردان بوداده، اسنافتن شناسایی نشد، ولی مجموع غلظت ۴ نوع هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای شناسایی شده (فنانترن، آنتراسن، فلوئورانترین، بنزو (آ) پیرن) به ترتیب در

دستگاه HPLC با مقدار متوسط $40/6 \text{ ng/g}$ تعیین شد (۳۲). این مقدار هم بیشتر از حد تعیین شده در مطالعه کنونی بود.

نتیجه‌گیری

در این مطالعه، از بین هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای، صرفاً اسنافتن شناسایی شد. هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای با وزن مولکولی بالا در آنالیز نمونه‌ها مشاهده نشد. غلظت اندازه‌گیری شده اسنافتن به علت وجود اسیدهای چرب غیر اشباع در تخمه آفتابگردان بیشتر از پوسته بود. همچنین میزان آفاتوکسین B_1 در پوسته دانه‌های آفتابگردان بیشتر از مغز بود. مقادیر گزارش شده کمتر از استانداردهای جهانی بود. لذا از این جهت، مصرف این محصول ایمن محسوب می‌شود. ولیکن برای ارزیابی دقیق و اظهار نظر قطعی نیازمند ارزیابی خطر می‌باشیم که یکی از محدودیت‌های مطالعه نامشخص بودن سرانه مصرف دانه آفتابگردان بود داده و عدم تعیین ارزیابی خطر است. لذا تعیین سرانه مصرف این محصول برای مطالعاتی آتی پیشنهاد می‌شود.

ملاحظات اخلاقی: نویسندگان کلیه نکات اخلاقی از جمله سرقت ادبی، انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

تقدیر تشکر: این مقاله حاصل از طرح تحقیقاتی مرکز علمی پژوهش‌های دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی تهران در سال ۱۴۰۳ با کد ۷۳۲۵۶ است.

References

1. Lederer M. Analytical chemistry of polycyclic aromatic compounds: by ML Lee, MV Novotny and KD Bartle, Academic Press, New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco, 1981, XII+ 462 pp., price US \$60.00, ISBN 0-12-440840-0. Elsevier; 1981.
2. Moreda W, Pérez-Camino MdC, Cert A. Gas and liquid chromatography of hydrocarbons in edible vegetable oils. *Journal of chromatography A*. 2001;936(1-2):159-71.
3. Yancheshmeh RA, Bakhtiari AR, Mortazavi S. Ecological risk assessment of polycyclic aromatic compounds in the surface sediments of Anzali Wetland in 2010. 2014.
4. Keyte IJ, Harrison RM, Lammel G. Chemical reactivity and long-range transport potential of polycyclic aromatic hydrocarbons—a review. *Chemical Society Reviews*. 2013;42(24):9333-91.
5. McGuire S. Centers for disease control and prevention. 2013. strategies to prevent obesity and other chronic diseases: the CDC guide to strategies to support breastfeeding mothers and babies. Atlanta, GA: US Department of Health and Human Services, 2013. *Advances in Nutrition*. 2014;5(3):291-2.
6. Ewa B, Danuta M-Š. Polycyclic aromatic hydrocarbons and PAH-related DNA adducts. *Journal of applied genetics*. 2017;58:321-30.

پوست و مغز دانه آفتابگردان بوداده $15/9 \pm 4/8 \text{ ppb}$ و 5 ppb گزارش شد که از نظر غلظت مجموع هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای از مطالعه حاضر بسیار کمتر است، ولی از طرف دیگر در مطالعه حاضر برخلاف مطالعه Akbari (۲۰۱۷) بنزو (آ) پیرن که سرطان‌زاترین نوع هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای است، شناسایی نشده است (۲۹). مشابه نتایج تحقیق کنونی در نتایج Öz و همکاران (۲۰۲۱) در کشور ترکیه مشاهده شد. در این تحقیق میزان هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای موجود در نمونه‌های بادام، فندق، بادام‌زمینی و بادام هندی پس از بو دادن بررسی شد و هیچ گونه هیدروکربن‌های آروماتیک چند حلقه‌ای با وزن مولکولی بالا گزارش نشد (۳۰).

در خصوص آفاتوکسین B_1 میزان شناسایی شده کمتر از حد مجاز اعلام شده از سوی استانداردهای بین المللی بود. استاندارد بین المللی کدکس (CXS 193-1995) حد مجاز این مایکوتوکسین را $15 \text{ } \mu\text{g/kg}$ اعلام داشته است. مطالعه‌ای انجام شده توسط Mmongoyo و همکاران (۲۰۱۷) به بررسی میزان آفاتوکسین B_1 تخم آفتابگردان با روش الیزا پرداخته است. در این مطالعه بیشترین مقدار گزارش شده $261/8 \text{ ng/g}$ است که این مقدار از نتایج مطالعه حاضر بیشتر می‌باشد نویسندگان این مطالعه نیز به این نکته اشاره کردند مصرف این محصول دارای خطر برای مصرف کنندگان می‌باشد (۳۱). در مطالعه‌ای دیگر میزان آفاتوکسین در ۱۷۳ نمونه تخم آفتابگردان توسط

7. Rengarajan T, Rajendran P, Nandakumar N, Lokeshkumar B, Rajendran P, Nishigaki I. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons with special focus on cancer. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2015;5(3):182-9.
8. Akbari-Adergani B, Mahmood-Babooi K, Salehi A, Khaniki GJ, Shariatifar N, Sadighara P, et al. GC-MS determination of the content of polycyclic aromatic hydrocarbons in bread and potato Tahdig prepared with the common edible oil. *Environmental Monitoring and Assessment*. 2021;193:1-8.
9. Wenzl T, Simon R, Anklam E, Kleiner J. Analytical methods for polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in food and the environment needed for new food legislation in the European Union. *TrAC Trends in Analytical Chemistry*. 2006;25(7):716-25.
10. Lee J, Jeong J-H, Park S, Lee K-G. Monitoring and risk assessment of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in processed foods and their raw materials. *Food Control*. 2018;92:286-92.
11. Moazzen M, Ahmadkhaniha R, Gorji MEh, Yunesian M, Rastkari N. Magnetic solid-phase extraction based on magnetic multi-walled carbon nanotubes for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in grilled meat samples. *Talanta*. 2013;115:957-65.
12. ATSDR. Toxicology profile for polyaromatic hydrocarbons. CRC Press Boca Raton City, FL; 2005.

13. Rabieimesbah A, Sobhanardakani S, Mehrdad Cheraghi BL. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in surface soil of agricultural lands in Hamedan, Iran. 2022.
14. Manaffar R, Sehatnia B, Sabzi R, Ehsani A. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in water using an electrochemical DNA biosensor. 2015.
15. Sadighara P, Ghanati K. The aflatoxin B1 content of peanut-based foods in Iran: a systematic review. *Reviews on Environmental Health*. 2022;37(1):29-33.
16. FDA. Seeds, sunflower seed kernels, dried: Food and Drug Administration; 2019 [Available from: <https://fdc.nal.usda.gov/fdc-app.html#/food-details/170562/nutrients>].
17. healthline. Are Sunflower Seeds Good for You? Nutrition, Benefits and More 2023 [Available from: <https://www.healthline.com/nutrition/sunflower-seeds#what-they-are>].
18. Guo S, Na Jom K, Ge Y. Influence of roasting condition on flavor profile of sunflower seeds: A flavoromics approach. *Scientific Reports*. 2019;9(1):11295.
19. Mariod AA, Idris YMA. Aflatoxin B1 levels in groundnut and sunflower oils in different Sudanese states. *Food Additives & Contaminants: Part B*. 2015;8(4):266-70.
20. Koina IM, Sarigiannis Y, Hapeshi E. Green Extraction Techniques for the Determination of Active Ingredients in Tea: Current State, Challenges, and Future Perspectives. *Separations*. 2023;10(2):121.
21. Okoronkwo N, Ajuonuma D. Evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbons levels in roasted food samples. *Acad J Sci*. 2014;3(1):1-8.
22. Singh L, Varshney JG, Agarwal T. Polycyclic aromatic hydrocarbons' formation and occurrence in processed food. *Food chemistry*. 2016;199:768-81.
23. Singh L, Agarwal T, Simal-Gandara J. PAHs, diet and cancer prevention: Cooking process driven-strategies. *Trends in Food Science & Technology*. 2020;99:487-506.
24. Nie W, Cai K, Li Y, Tu Z, Hu B, Zhou C, et al. Study of polycyclic aromatic hydrocarbons generated from fatty acids by a model system. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. 2019;99(7):3548-54.
25. IARC. List of Classifications: International Agency for Research on Cancer; [Available from: <https://monographs.iarc.who.int/list-of-classifications/>].
26. USEPA. Acenaphthene: United States Environmental Protection Agency; [Available from: <https://archive.epa.gov/epawaste/hazard/wastemin/web/pdf/acnphthe.pdf>].
27. USEPA. Provisional Peer-Reviewed Toxicity Values for Acenaphthene: United States Environmental Protection Agency; 2011 [Available from: <https://cfpub.epa.gov/ncea/pprtv/documents/Acenaphthene.pdf>].
28. Shavali-Gilani P, Yazdanfar N, Jahed-Khaniki G, Molaee-Aghaee E, Sadighara P. The effect of flavorings on PAHs level in the roasted sunflower seeds. *Scientific Reports*. 2023;13(1):17508.
29. Akbari-adargani B, Khaki T, Jahed G, Ahmadvani R, Rezapour S, Sadighara P. Polycyclic aromatic hydrocarbons in shell and kernel of roasted sunflower seeds. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2017;9(6):994.
30. Öz E, Ekiz E, Savaş A, Aoudeh E, El-Aty AA, Öz F. Impact of roasting level on fatty acid composition, oil and polycyclic aromatic hydrocarbon contents of various dried nuts. *Turkish Journal of Agriculture and Forestry*. 2021;45(2):213-21.
31. Mmongoyo JA, Wu F, Linz JE, Nair MG, Mugula JK, Tempelman RJ, et al. Aflatoxin levels in sunflower seeds and cakes collected from micro-and small-scale sunflower oil processors in Tanzania. *PloS one*. 2017;12(4):e0175801.
32. Beheshti HR, Asadi M. Aflatoxins in sunflower and safflower seeds from Iran. *Food Additives and Contaminants: Part B*. 2013;6(1):68-71.

Assessment of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and Aflatoxin B₁ in Homemade Roasted Sunflower Seeds

Bakhtiyari A^{1,2}, Jahed Khaniki G¹, Molaee-aghaee E¹, Shariatifar N¹, Shavali-gilani P¹, Akbari N¹, Akbari-Adergani B³, Yazdanfar N⁴, Sadighara P^{*1}

1-Department of Environmental Health, Food Safety Division, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2- Student's Scientific Research Center, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3-Water Safety Research Center, Food and Drug Administration, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran

4- Iranian Institute of R&D in Chemical Industries (IRDICI) (ACECR), Tehran, Iran

5- *Corresponding author: Department of Environmental Health, Food Safety Division, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran. Email: parisasss@yahoo.com

Received 22 Aug, 2024

Accepted 2 Dec, 2024

Background and Objectives: Polycyclic aromatic hydrocarbons and aflatoxin B₁ are addressed as one of the most common food contaminants. Roasted sunflower seeds as traditional snacks include high acceptance and consumption in Iran, which is likely to receive the contaminants from the environment and during the roasting process. The aim of this study was to identify and assess polycyclic aromatic hydrocarbons and aflatoxin B₁ in the skin and core of home-produced roasted sunflower seeds.

Materials and methods: Soxhlet method was used to extract polycyclic aromatic hydrocarbons. The solution extracted from the sample was injected into a gas chromatography-mass spectrometer and the content of these components were assessed using calibration curve. Aflatoxin B₁ of the sample was assessed using high-performance liquid chromatography and immunoaffinity columns.

Results: From the 16 types of polycyclic aromatic hydrocarbons, acenaphthene was detected in the present sample and its quantity was assessed in the seed shells and kernels as 0.4 ppm $\pm$ 0.4 and 1.1 ppm $\pm$ 2.4, respectively. Moreover, 11 % of the kernel samples and 46% of the shell samples were positive for the mycotoxin.

Conclusion: Since carcinogenicity of acenaphthene has not been verified for humans and the level of aflatoxin B₁ in all samples was lower than the permissible limits, it can be concluded that this product does not pose a serious risk to the consumers for these two contaminants.

Keywords: Environmental contaminants, Roasted sunflower seeds, Gas chromatography, Liquid chromatography, Snaftan, Aflatoxin B₁