List of contents

Page

Summary ----------vii

I- Introduction ---------- 1

II- Review of literatures ---------- 5

1. Methods of analysis ---------- 5
    1-1. Aflatoxins ---------- 5
    1-2. Ochratoxin A ---------- 12
2. Monitoring of mycotoxins ----------16
    2-1. Aflatoxins ----------16
    2-2. Ochratoxin A ----------23
3. Effect of processing on Aflatoxins ----------31
4. Mycotoxins daily intake ----------34
    4-1. Aflatoxins ----------34
    4-2. Ochratoxin A ----------35

III- Materials and Methods ----------37

1. Monitoring of Mycotoxins in certain products ----------37
    1-1. Sampling ----------37
    1-2. Preparing samples for analysis ----------42
2. Effect of processing techniques on levels of Aflatoxins------42
    2-1. Processing procedures----------42
        2-1-1.Peanut samples----------42
        2-1-2. Corn Samples----------43
        2-1-3. Sweet peanut samples----------43

3. Quality Assurance----------44
3-1. Control samples ----------44
3-2. Control charts----------44
3-3. Proficiency tests----------45
4. Method of analysis of Aflatoxins ----------45
4-1.Scope----------45
4-2.Principles----------46
4-3. Apparatus----------46
4-4. Reagents----------47
4-5.Analytical procedures----------49
4-5-1. Extraction----------49
4-5-2. Partitioning---------- 50
4-5-3.Column clean up----------51
4-5-4. Derivatization ----------52
4-6. HPLC conditions----------52
4-7. Calculations----------53
5. Method of analysis of Ochratoxin A ----------53
5-1.Scope----------53
5-2.Principles----------54
5-3. Apparatus----------54
5-4. Reagents----------55
5-5. Analytical procedures----------57
5-5-1. Extraction----------57
5-5-2. Partitioning----------57
5-5-3.Column clean up----------57
5-6. HPLC conditions----------58
5-7. Calculations----------59

and Ochratoxin A ---------- 4
Fig. (2): Chemical structures of Aflatoxins B1, B2, G1 and G2
----------64
Fig. (3): Derivatization of Aflatoxins B1 and G1 using TFA.-----64
Fig. (4): Chromatograms obtained from HPLC for Aflatoxins standard without derivatization by TFA (a) and with derivatization by TFA (b).----------65
Fig. (5): Chromatograms obtained from HPLC for Aflatoxins standard (a), real contaminated peanut sample (b) and not detected peanut sample (c).----------66
Fig. (6): Percentages of Aflatoxins, Contaminated (Violated and < LOQ) and not Detected in Peanut Samples.--------72
Fig. (7): Percentages of Aflatoxins, Contaminated (Violated and < LOQ) and not Detected in Maize Samples.--------73
Fig.(8): Percentages of Aflatoxins, Contaminated and not Detected in Wheat and Barley Samples.---------- 74
Fig. (9): Percentages of Aflatoxins, Contaminated (Violated and < LOQ) and not Detected in Corn Samples.--------- 75
Fig. (10): Percentages of Aflatoxins, Contaminated (Violated and < LOQ) and not Detected in sweet Peanut Samples-
----------76
Fig. (11): Chromatograms obtained from HPLC for Ochratoxin A standard (a), real contaminated barley sample (b) and not detected barley sample (c).----------78
Fig. (12): Percentages of Ochratoxin A, Contaminated (Violated and < LOQ) and not Detected Samples.----------83
Fig (13): Effect of sunlight at different time on Aflatoxins in .

contaminated Peanut samples.---------- 90
Fig (14): Effect of roasting at 150°C on Aflatoxins in
Contaminated Peanut samples. ---------- 90

List of Annexes

Annex (1): Validation of Aflatoxins and Ochratoxin A methods –
----------118
Annex (2): Aflatoxins results during year 2005----------131
Annex (3): Ochratoxin A results during year 2005----------138

IV- Results and discussion---------- 60

1. Monitoring of mycotoxins----------60

1-1.Aflatoxins----------62

1-2.Ochratoxin A---------- 77

2. Effect of processing techniques on Aflatoxins----------87

2-1. Effect of sun light and roasting on peanut samples ----------87

2-2. Effect of heating on corn samples----------91

3. Dietary Intake Study----------92

3-1.Aflatoxins Estimated dietary Intake Study ----------95

3-2.Ochratoxin A Estimated dietary Intake Study-------98

V- Conclusion ----------100

VI- References----------101

VIII- Arabic summary

الملخص العربى

الميكوتوكسينات(Mycotoxins) هى مركبات كيميائية ثانوية تنتج بسبب إصابة بعض المحاصيل الزاعية ببعض أنواع الفطريات سواء أثناء موسم الزراعة أو أثناء التخزين، وهذه السموم الفطرية تسبب ضرر شديد على حياة الإنسان والحيوان فضلا عن الخسائر المادية الناتجة عن فساد الحبوب والتى تقدر فى الولايات المتحدة الأمريكية فقط بحوالى ٩٠٠ مليون دولار أمريكى سنويا.

ويرجع تاريخ الأمراض الناتجة عن الأصابة بالميكوتوكسينات الى القرن السادس عشر الميلادى بوسط القارة الأوروبية حيث ظهر مرض الإرجوتزم (Ergotism) الذى يسبب تشوهات فى الوجه وتآكل فى الأطراف و ينتج عن تناول حبوب الأرز المصابة بنوع من الميكوتوكسينات الناتجة عن الفطر ***Claviceps* spp.**

فى عام ١٩٦٠ وتحديدا ببريطانيا حدث نفوق لعدد حوالى مائة ألف ديك رومى نتيجة لتناول أعلاف نباتية ملوثة بنوع _ لم يكن معروف آن ذاك_ من الميكوتوكسينات عرف بعد ذلك أنه نتج عن إصابة الأعلاف والتى كانت تحتوى على فول سودانى بنوع من الميكوتوكسينات هوالأفلاتوكسين **(Aflatoxin)** ومنذ ذلك الحين عكف العلماء والباحثين على دراسة الميكوتوكسينات بشكل مركز من حيث تقسيمها والاسباب المؤدية لإصابة النباتات بها والأمراض الناتجة عنها سواء للإنسان أو الحيوان فضلا عن طرق الحد من زيادتها أو التخلص منها فى حالة المحاصيل المصابة.

فى عام ١٩٧٤ بشمال غرب الهند أصيب ٣٩٧ شخص بتسمم توفى منهم ١٠٨ شخص نتيجة تناول حبوب ذرة كانت بها نسب تلوث عالية بفطر ***Aspergillus flavus*** . وفى كينيا عام ١٩٨١ استقبلت ثلاث مستشفيات عدد ٢٠ مريض مصابين بحالة تسمم توفى منهم ١٢ مريض جراء الإصابة بفشل كبدى. وقد قامت السلطات بتحليل الأفلاتوكسينات فى بعض حبوب الذرة المجمعة من منزلين للضحايا حيث كانت تحتوى على ١٢ مجم/كجم(جزء فى المليون) و ٣,٢ مجم/كجم من أفلاتوكسين B١ فقط , بينما كانت نسبته ٣٩ ميكروجرام/كجم(جزء فى البليون) و ٨٩ ميكروجرام/كجم فى عينات أخذت من كبد الضحايا.

والفطريات المسببة لهذه الميكوتوكسينات والتى تنتشر بجميع أنحاء العالم لها القدرة على إنتاج مركبات أيضية ثانوية (Secondary metabolites) غالباً ما تكون سامة _ ومسرطنة فى بعض الأنواع مثل الأفلاتوكسينات_ ولها القدرة على إحداث تغيرات بيولوجية غير طبيعية فى الكائن الحى ويطلق على عملية التسمم الناتجة بالتسمم الميكوتوكسينى (Mycotoxicoses).

تم خلال هذه الدراسة التركيز على نوعين من الميكوتوكسينات :

١- الأفلاتوكسينات (Aflatoxins) وهى تنتج عن بعض انواع فطر ***Aspergillus* spp.** التى تصيب عدد كبير من المحاصيل مثل الفول السودانى والمكسرات والذرة والأرز والفواكة المجففة مثل التين وكذلك بعض أنواع التوابل مثل الفلفل الأسود والشطة.

٢- الأوكراتوكسين أ (Ochratoxin A) وهو ينتج عن بعض أنواع فطر ***Aspergillus* spp.** أيضا وكذلك يصيب عدد من المحاصيل كالذرة والأرز وبعض الفواكه المجففة وكذلك حبوب البن.

<u>الهدف من الدراسة:-</u>

١- جمع عينات من الحبوب المختلفة من الأسواق المصرية خلال عام ٢٠٠٥.

٢- تقصى نسب الأفلاتوكسينات والأوكراتوكسين فى تلك العينات باستخدام طرق قياسية معتمدة.

٣- دراسة تأثير عمليات التصنيع أو المعاملة الفيزيائية على مستوى التلوث بالميكوتوكسينات.

٤- حساب المتناول اليومى من الميكوتوكسينات للمواطن المصرى ومقارنته بالمتناول اليومى الموصى به من المنظمات الدولية المعنية بصحة الإنسان مثل لجنة الكودكس (codex alimentarius) المنبثقة من التعاون بين منظمتى الأغذية والزراعة(FAO) والصحة العالمية(WHO) التابعتين للامم المتحدة.

النتائج المتحصل عليها من الدراسة:-

أولاً:- الأفلاتوكسينات

تم تجميع عدد ٤٠٦ عينةخلال عام ٢٠٠٥ من بعض المحاصيل الزراعية التى تستهلك بكميات كبيرة من قبل المواطن المصرى وهى الشعير والذرة البيضاء والذرة الصفراء والأرز والقمح والفول السودانى الخام والمُحلى وقد جمعت العينات من ١٠ محافظات مصرية هى بنى سويف والقاهرة والجيزة والغربية والقليوبية والفيوم والمنوفية والبحيرة والإسماعيلية والشرقية.

ونظرا لانتشار جراثيم الفطريات فى جميع أنحاء العالم وأنها تنمو فقط إذا توافرت الظروف الملائمة مثل أرتفاع درجات الحرارة وكذلك الرطوبة فإن الإصابة تحدث للمحاصيل أثناء الزراعة أو خلال مراحل التخزين ، ولذلك لم تركز الدراسة على نسب التلوث فى كل محافظة على حده لانه لا دخل للعامل البشرى فى الإصابة بالميكوتوكسينات إلا فى ظروف التخزين غير السليمة.

وقد ركزت الدراسة على بعض عمليات التصنيع التى قد تؤدى إلى تقليل نسب التلوث بالميكوتوكسينات. ومن أمثلة هذه المعاملات دراسة تاثير الحرارة على عينات الفول السودانى وكذلك التعريض لضوء الشمس المباشر وكذلك وهو الأمر المهم جدا حساب ما يتناوله المواطن المصرى من الميكوتوكسينات التى قد تؤدى إلى انتشار بعض الأمراض السرطانية.

ويمكن تلخيص نتائج تحليل الأفلاتوكسينات – Total Aflatoxins – فى العينات المجمعة من الأسواق المصرية على النحو التالى:

١. عينات غير ملوثة على الإطلاق وهى عينات الأرز فقد وجد أن جميع العينات التى تم تحليلها أثناء الدراسة غير ملوثة.
٢. عينات منخفضة التلوث وهى عينات الشعير والقمح والذرة حيث وجد أن متوسط التلوث لعينات الشعير ٠,٠٣ ميكروجرام /كجم , بينما سجلت عينات القمح متوسط

تلوث ٠,١٣ ميكروجرام / كجم . أما بالنسبة لعينات الذرة البيضاء Corn فقد كان متوسط التلوث ٠,٤١ ميكروجرام / كجم.

٣. عينات متوسطة التلوث وهى عينات الفول السودانى المُحلى فقد وجد أن متوسط التلوث قدره ٨,٨٧ ميكروجرام / كجم.

٤. عينات مرتفعة التلوث وهى عينات الذرة الصفراء Maize والفول السودانى الخام. فالنسبة لعينات الذرة فقد سجلت أعلى متوسط تلوث وهو ٢٥,٣٥ ميكروجرام / كجم بينما سجلت عينات الفول السودانى متوسط تلوث ٨,٣١ ميكروجرام / كجم.

وقد تناولت الدراسة تأثير بعض المعاملات الفزيائية التى قد تؤدى الى تقليل نسبة التلوث بالأفلاتوكسينات فى عينات الفول السودانى الخام وعينات الذرة الصفراء. وقد تناولت الدراسة تأثير كلا من درجة الحرارة والتعريض لضوء الشمس المباشر على الفول السودانى و كذلك إنتاج الفشار Pop corn من الذرة الصفراء عن طريق التسخين.

وقد وجد أن تعريض الفول السودانى الخام لضوء الشمس المباشر لمدة تتراوح بين نصف ساعة وحتى أربع ساعات قد ساعد على تقليل نسب التلوث بالأفلاتوكسينات بنسب تتراوح بين ١٩ % إلى ٤٨ % بالنسبة للأفلاتوكسين B١ و ٢٤ % إلى ٥١ % بالنسبة للأفلاتوكسين B٢ . ويرجع السبب فى ذلك إلى حساسية الأفلاتوكسينات لأشعة الشمس.

أما بالنسبة لتأثير درجة الحرارة على مستوى التلوث بالأفلاتوكسينات فى عينات الفول السودانى فقد تم التعريض عند ١٥٠ درجة مؤية لمدة ٣٠ و ٦٠ و ٧٥ دقيقة , وقد نتج عن ذلك انخفاض فى نسب التلوث بالأفلاتوكسين B١ بنسب ٤ %, ٣١ % و٤٢ %. وكذلك ٤%, ٢٢% و ٢٣% للأفلاتوكسين B٢ . وقد لوحظ أنه فى حالة تعرض الفول السودانى للحرارة لمدة أكثر من ٧٥ دقيقة فإنه يحدث تغير غير مرغوب فى لون ومذاق الفول السودانى.

تعتبر دراسة المتناول اليومى المُتوقع (EDI) من الأفلاتوكسينات من أهم أهداف الدراسة لأنها تمثل إظهار التأثير المباشر لتلك السموم على صحة المواطن

المصرى. وقد تم حساب المتناول اليومى على جميع المحاصيل التى تناولتها الدراسة بناء على متوسط الاستهلاك اليومى- نقلا عن تقرير منظمة الصحة العالمية لعام ٢٠٠٣م - لكل فرد من كل منتج مقدرا بالجرام فى اليوم, على اعتبار ان متوسط وزن الفرد البالغ ٦٠ كجم.

تم حساب المتناول اليومى من الأفلاتوكسينات خلال عام ٢٠٠٥ م على أساس كلا من المتوسط ونسبة ٩٧,٥ %. وقد وجد أن المتناول اليومى المحسوب على متوسط التلوث بالأفلاتوكسينات هو ٤,٢٤ نانوجرام / كجم من وزن الجسم / يوم. أما بالنسبة للمتناول اليومى المحسوب على نسبة ٩٧,٥ % فكان ٣٥,٠٦ نانوجرام / كجم من وزن الجسم / يوم. وتمثل هاتين النتيجتين ٧٢٤% و ٣٥٠٥ % من المتناول اليومىالمسموح (ADI) الموصى به من لجنة الكودكس الدولية (١ نانوجرام / كجم من وزن الجسم / يوم).

على الرغم من أرتفاع نسب المتناول اليومى للأفلاتوكسينات المتحصل عليها من هذه الدراسة الا أن المعاملة الحرارية والتعريض لضوء الشمس للمحاصيل الزراعية قبل تناولها تقلل_ كما أثبتت الدراسة_ من نسب التلوث وبالتالى من المتناول اليومى. لذلك يوصى بعدم تناول تلك المحاصيل بدون تلك المعاملات أو أحدها على الأقل.

ثانيا:- أوكراتوكسين أ

تم تجميع عدد ٦٠ عينة خلال عام ٢٠٠٥ من بعض المحاصيل الزراعية وهى الشعير والذرة البيضاء والذرة الصفراء والأرز والقمح والأرز المصنع كغذاء للأطفال حديثى الولادة، وقد جمعت العينات من نفس المحافظات العشرة المشار اليها عاليه.

ويمكن تلخيص نتائج تحليل الأوكراتوكسين أ فى العينات المجمعة من الأسواق المصرية على النحو التالى:

١. عينات غير ملوثة إطلاقا وهى عينات الأرز المصنعة كغذاء للأطفال حديثى الولادة.

٢. عينات منخفضة التلوث وهى عينات الذرة البيضاء Corn والأرز والقمح حيث سجلت نسب تلوث ٢٠% ، ٥٠% و ١٨% على الترتيب إلا أن متوسط نسب التلوث لم تتعدى حدود التقدير (Limit of quantitation) وهى ١ ميكروجرام / كجم (جزءفى البليون).

٣. عينات مرتفعة التلوث وهى عينات الذرة الصفراء Maize والشعير، فقد سجلت عينات الذرة اعلى متوسط تلوث وهو ٣,١٧ ميكروجرام / كجم, بينما سجلت عينات الشعير متوسط تلوث ٢,٣٢ ميكروجرام / كجم .

تم حساب المتناول اليومى من الأوكراتوكسين أ خلال عام ٢٠٠٥ م على أساس كلا من المتوسط ونسبة ٩٧,٥ %. وقد وجد أن المتناول اليومى المحسوب على متوسط التلوث بالأوكراتوكسين أ هو ٠,٨٩ نانوجرام / كجم من وزن الجسم / يوم. أما بالنسبة للمتناول اليومى المحسوب على نسبة ٩٧,٥ % فكان ٦,٦٨ نانوجرام / كجم من وزن الجسم / يوم. وتمثل هاتين النتيجتين ٦% و ٤٧ % من المتناول اليوميالمسموح (ADI) الموصى به من لجنة الكودكس الدولية (١٤,٣ نانوجرام / كجم من وزن الجسم / يوم).