

اختيار الشروط المثلى للتعين المتزامن للأفلاتوكسينات (B_1, B_2, G_1, G_2) بطريقة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء باستعمال الاشتقاق بالخلية الكيميائية الضوئية ومكشاف الفلورة

د. محمد حسان الكردي*

تغريد راهب***

د. هاجر ناصر**

الملخص

تناول البحث دراسة بعض الشروط المثلى للتعين المتزامن للأفلاتوكسينات (B_1, B_2, G_1, G_2) بطريقة الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء باستعمال الاشتقاق بالخلية الكيميائية الضوئية ومكشاف الفلورة، بغية الوصول إلى طريقة انتقائية يمكن اعتمادها للتعين المتزامن للمركبات السابقة وفق تقنية HPLC-FLD. تم فصل الأفلاتوكسينات الأربعة باستعمال عمود الفصل الكروماتوغرافي C_{18} وطور متحرك من الماء: الميثانول: الأسيتونتريل بنسب حجمية (20:20:60 V:V:V) على

*** طالبة دكتوراه، قسم الكيمياء، كلية العلوم، جامعة دمشق.

* أستاذ، قسم الكيمياء، كلية العلوم، جامعة دمشق.

** أستاذ، قسم الكيمياء، كلية العلوم، جامعة تشرين.

الترتيب، ومعدل سرعة تدفق (1 ml/min)، عند درجة حرارة للعمود 40°C، بانتقائية وحساسية جيدة وزمن احتباس مناسب (B_1 Rt=10.867 min, B_2 Rt=9.027 min, G_1 Rt=8.137 min, G_2 Rt=6.951 min) وعند أطوال موجية للكشف (طول موجة الإثارة 365nm، طول موجة الإصدار 435nm) خلال زمن تحليل لم يتجاوز 13 دقيقة. حقق الاشتقاق الكيميائي الضوئي المباشر نتائج أفضل من حيث الصحة والدقة والحساسية وجودة فصل جيدة مقارنة مع طرائق الاشتقاق الأخرى، ومن ثمّ يمكن اعتماد طريقة HPLC-FLD في التحاليل الروتينية لمراقبة الجودة.

الكلمات المفتاحية: أفلاتوكسينات، تعيين، الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء، الاشتقاق بالخلية الكيميائية الضوئية، مكشاف الفلورة.

Optimization of the Simultaneous determination Conditions of Aflatoxins (B₁, B₂, G₁, and G₂) by High-Performance Liquid Chromatography (HPLC) with on-line photochemical derivatization and fluorescence detector

T. Raheb ***

**Dr. Mhd. Hassan Al-
kurdi***

Dr. H. Nasser**

ABSTRACT

Optimal Conditions for the determination of Aflatoxins (B₁, B₂, G₁, G₂), using High-Performance Liquid Chromatography with on-line photochemical derivatization and fluorescence detector (HPLC-FLD).

The four Aflatoxins were separated using a C₁₈ column eluted with an isocratic mobile phase consisting of water:methanol:acetonitrile (60:20:20 V:V:V) respectively, and flow rate (1ml/min), at a column temperature of 40°C, with good selectivity and suitable retention time (B₁ Rt=10.867 min, B₂ Rt=9.027 min, G₁ Rt=8.137 min, G₂ Rt=6.951 min). at wavelength of the detector at 365 nm excitation and 435 nm

*** Ph. D. Student, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Damascus University.

* Professor, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Damascus University.

** Professor, Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Tishreen University.

emission for all Aflatoxins, and the total analysis time did not exceed 13 minutes. Direct photochemical derivatization achieved better results for its sensitivity, linearity, selectivity, precision and ruggedness and good separation quality compared to other derivation methods, thus HPLC-FLD can be adopted in routine quality control analysis.

Keywords: AFB₁, AFB₂, AFG₁, AFG₂, determination, HPLC, RP-HPLC, Photochemical Derivatization, fluorescence detector.

مقدمة: Introduction

تُعدّ السموم الفطرية منتجات أيضاً ثانوية لبعض الأعفان مثل: *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus*, *A. nomiosus*, *A. tamari*, *A. niger* and *A. ochraceoroseus* عندما تنمو على أغذية أو أعلاف محتوية على مواد كربوهيدراتية [1-17]. قد تغزو هذه الأعفان المحاصيل الحقلية، أو تنمو على الأغذية عند تخزينها إذا توافرت لها الظروف الملائمة من رطوبة ودرجات حرارة. تمّ التعرف على أكثر من 400 نوع من السموم الفطرية، وتعد الأفلاتوكسينات أكثرها خطورة، كما لفتت السموم الفطرية الأخرى مثل الأوكرااتوكسين *Ochratoxin* والزايرالينون *Zeralenone* والديوكسينيفينول *Deoxynival* الانتباه إلى أهميتها خلال العقد الماضي.

توصف الأفلاتوكسينات بأنها من أشهر السموم الفطرية التي بُحِثَتْ بشكلٍ مكثفٍ في العالم، حيث ارتبطت عبارة الأفلاتوكسينات بأمراض مختلفة، كالتسمم الأفلاتوكسيني *Aflatoxicosis* في الماشية والحيوانات الأليفة والبشر في جميع أنحاء العالم. ولعل أهمها أربعة أنواع رئيسية هي (B_1 , B_2 , G_1 , G_2)، وأكثرها انتشاراً وخطورة هو الأفلاتوكسين B_1 على الإنسان والحيوان [1-18]، كما توجد مشتقات أخرى لهذه السموم مثل أفلاتوكسين M_1 و M_2 [2,4].

تتلوث المنتجات الغذائية بالأفلاتوكسينات، ولا سيما في البلدان النامية الواقعة في المناطق الحارة والرطبة، ويُقدر أن تأثيرها يصل إلى 25% من الإمدادات الغذائية [19].

تمّ تصنيف الأفلاتوكسينات من قبل الوكالة الدولية لأبحاث السرطان (IARC) على أنها مادة مسرطنة من المجموعة (1) [20]. ويتم كشف وتقدير السموم الفطرية بعدة طرائق، منها:

1- الطرائق البيولوجية *Biological methods*.

2- الطرائق المناعية *Immunological methods* [21].

3- الطرائق الجزيئية *Molecular methods*.

4- الطرائق الكيميائية Chemical methods: تعتمد على التحليل الكيميائي مثل الطرائق الكروماتوغرافية؛ كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (TLC) [22,14]، الكروماتوغرافيا الغازية (GC) [23]، الكروماتوغرافيا السائلة فوق الأداء (UPLC-FLD) [24]، والكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) و-LC MS/MS كتقنيات متطورة بشكل عام لتحديد الأفلاتوكسينات. وعلى الرغم من أن طريقة LC-MS/MS المطورة هي انتقائية، ودقيقة، لكنها غير حساسة بالمقارنة مع تقنية الـ HPLC مع مكشاف الفلورة (FLD) لما تتميز به من السهولة، والسرعة العالية في الفصل، والدقة، والصحة، والمصادقية [25].

مواد البحث وطرائقه: Materials and methods

1- المواد المستعملة والمحاليل: Materials and Solvents

تتمتع المركبات والمحاليل المستخدمة جميعها بدرجة عالية من النقاوة (HPLC-grade):

1. مزيج عياري للأفلاتوكسينات بنقاوة عالية $\leq 99.0\%$ ، إنتاج شركة (SUPELCO).

2. ميثانول (Methanol, CH₃OH) $\leq 99.9\%$ ، إنتاج شركة (Lichrosolv-Germany).

3. أسيتونتريل (Acetonitrile, CH₃CN) $\leq 99.9\%$ ، إنتاج شركة (Lichrosolv-Germany).

4. ماء ثنائي التقطير منزوع الشوارد (de-ionized)، بالإضافة إلى دوارق وماصات زجاجية عيارية بحجوم مختلفة.

2- الأجهزة والأدوات المستعملة: Apparatus and Tools

1. جهاز الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (SHIMADZU) HPLC.

2. حمام مائي يعمل بالأمواج فوق الصوتية (Ultrasonic bath) ماركة Grant.

3. خلية الاشتقاق الكيميائية الضوئية Photochemical Derivatization ماركة
.LCtech

النتائج والمناقشة: Results and Discussion

1- النسبة المثلى لمُذيبات الطور المتحرك: The Optimal Ratio for Mobile Phase Solvents

تمّ اختيار نوع مذيبات الطور المتحرك ونسبها، والمكوّنة من الماء والميثانول والأسيتونتريل، لوحظ تباين واضح في متوسط زمن الاحتفاظ، ومتوسط مساحة القمة الكروماتوغرافية لمركبات الأفلاتوكسينات، إذ تؤثر نسب المذيبات في الفصل الجيد، وزمن الاحتفاظ، ومساحة القمة العائدة لكلّ من مركبات الأفلاتوكسينات. إنّ الفصل غير جيد عند استخدام نسب مزج الماء: الميثانول: الأسيتونتريل (30:15:55) (V:V:V) على الترتيب [26]. بينما ظهرت قمم واضحة، وفصل جيد عند استخدام نسب مزج الماء: الميثانول: الأسيتونتريل (10:40:50 V:V:V) على الترتيب [1]. وظهرت مساحات قمم جيدة، وفصل جيد عند استخدام الطور المتحرك وفق النسب الآتية الماء: الميثانول: الأسيتونتريل (20:20:60 V:V:V) على الترتيب [13]، بمتوسط أزمنة احتفاظ مقبولة، ومتوسط مساحات قمم أفضل بالمقارنة مع النسب السابقة كما هو موضح في الجدول (1).

ومن أجل التوصل إلى عملية فصل مثالية للأفلاتوكسينات، تمّ ترشيح الطور المتحرك قبل استخدامه على مرشحات قطر مساماتها $0.45\mu\text{m}$ ومن ثمّ تنزع جزيئات الغاز من المحلول باستخدام جهاز الأمواج فوق الصوتية Ultrasonic، كما في الشكل (1).



الشكل (1): كروماتوغرام يبين فصل مركبات الأفلاتوكسينات (B_1 , B_2 , G_1 , G_2) عند نسب الطور المتحرك $H_2O:CH_3OH:CH_3CN$ (60:20:20 V:V:V)

2- سرعة التدفق المثلى للطور المتحرك: The Optimal Flow Rate for Mobile Phase

تم في هذه المرحلة حقن محلولين عياريين لمزيج الأفلاتوكسينات مع تغيير في تدفق الطور المتحرك في عمود الفصل الكروماتوغرافي ضمن مجال تراوح ما بين (1.2 - 0.6 ml/min) كما هو موضح بالجدول رقم (2). أظهرت النتائج أنه عند سرعة تدفق (1.0 ml/min) كان متوسط مساحات القمم أفضل مع ضرورة الإشارة إلى الفصل الجيد للقمم الأربع العائدة لمركبات الأفلاتوكسينات، لذلك اختير التدفق (1 ml/min) المقابل للمساحة الأكبر للقمم الكروماتوغرافية. وعند زيادة تدفق الطور المتحرك في عمود الفصل أثر تأثيراً سلبياً في مساحات القمم عند تدفق (1.2 ml/min) وعند تدفق (0.6 ml/min) كان الفصل جيداً، ولكن أزمناً الاحتفاظ كانت كبيرة. وأما عند التدفق (0.8 ml/min) فكان الفصل جيداً، ولا يوجد تداخل بين القمم، وأزمناً الاحتفاظ أقل من السابق، ومساحات القمم أكبر، ولكن عدم ظهور تغير كبير في مساحات القمم، فاستخدم سرعة التدفق (0.8 ml/min) بعد استهلاك عمود الفصل الكروماتوغرافي لفترة من الزمن لتحسين الفصل بين قمة مركب G_1 و B_2 .

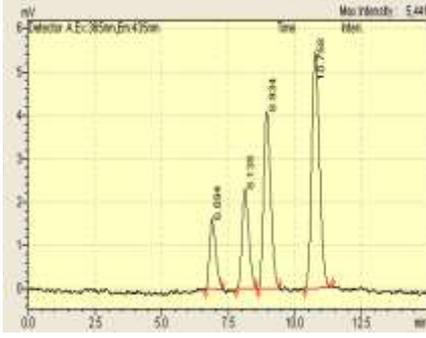
لُوحظ من خلال كروماتوغرامات الفصل والموضحة في الشكل (2)، الانزياح الواضح للقمم الكروماتوغرافية لمركبات الأفلاتوكسينات نتيجة التأثير بتغيرات الضغط، وهذا يعني ازدياد زمن احتفاظ مركبات الأفلاتوكسينات بنقصان التدفق المطبق. كما لُوحظ تناقص المساحة الكروماتوغرافية، وزمن الاحتفاظ لمركبات الأفلاتوكسينات بازدياد تدفق الطور المتحرك المطبق خلال العمود.

الجدول (1) تأثير نسب مكونات الطور المتحرك في متوسط مساحات قمم مركبات الأفلاتوكسينات (B_1, B_2, G_1, G_2) على الترتيب ومتوسط زمن احتفاظها

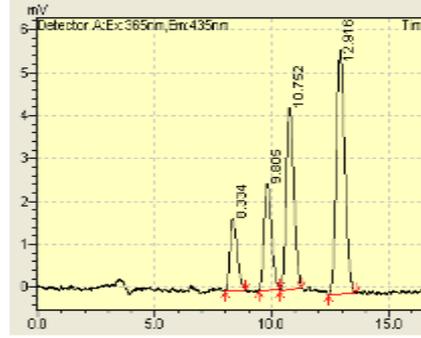
الطور المتحرك (Mobile phase) (V/V)	$W_1: M_1: O_1: E_1: A_1: C_1: N_1$ (60:20:20:10:10:10)		$W_2: M_2: O_2: E_2: A_2: C_2: N_2$ (55:15:20:10:10:10)		$W_3: M_3: O_3: E_3: A_3: C_3: N_3$ (50:10:30:10:10:10)	
	زمن الاحتفاظ (min) Area ± RSD %	زمن الاحتفاظ (min) Area ± RSD %	زمن الاحتفاظ (min) Area ± RSD %	زمن الاحتفاظ (min) Area ± RSD %	زمن الاحتفاظ (min) Area ± RSD %	زمن الاحتفاظ (min) Area ± RSD %
أفلاتوكسينات Aflatoxins	$^{**}Cl = \frac{\sum_{i=1}^n x_i}{n}$					
AF _{G1} (0.80 µg/l)	29399.4 ± 1.384	6349 ± 1.028	25660.6 ± 1.147	4842 ± 0.537	21865.8 ± 1.274	4946 ± 0.372
AF _{B1} (0.65 µg/l)	29399.4 ± 515.243	6349 ± 0.089	25660.6 ± 429.139	4842 ± 0.032	21865.8 ± 145.833	4946 ± 0.022
AF _{G2} (1.60 µg/l)	58828.4 ± 1.176	6351 ± 0.940	51486.4 ± 0.940	4841 ± 0.594	43765.6 ± 0.942	4947 ± 0.359
AF _{B2} (0.65 µg/l)	58828.4 ± 839.116	6351 ± 0.072	51486.4 ± 600.975	4841 ± 0.034	43765.6 ± 512.305	4947 ± 0.023
AF _{G1} (2.65 µg/l)	44483.4 ± 0.954	8137 ± 1.180	13135.6 ± 1.206	5425 ± 0.621	49965.4 ± 0.672	5509 ± 1.446
AF _{B1} (0.65 µg/l)	44483.4 ± 514.882	8137 ± 0.119	13135.6 ± 199.967	5425 ± 0.059	49965.4 ± 141.153	5509 ± 0.072
AF _{G2} (5.30 µg/l)	87063.8 ± 0.771	8136 ± 0.875	26647.8 ± 1.190	5421 ± 0.553	81821.2 ± 0.697	5510 ± 1.849
AF _{B2} (0.65 µg/l)	87063.8 ± 833.411	8136 ± 0.088	26647.8 ± 429.972	5421 ± 0.037	81821.2 ± 616.818	5510 ± 0.072
AF _{G1} (0.825 µg/l)	79700.8 ± 1.967	9407 ± 0.884	34669.4 ± 1.844	5696 ± 0.499	41821.2 ± 1.042	6252 ± 1.119
AF _{B1} (0.65 µg/l)	79700.8 ± 833.340	9407 ± 0.130	34669.4 ± 441.390	5696 ± 0.035	41821.2 ± 541.129	6252 ± 0.036
AF _{G2} (1.65 µg/l)	159401.6 ± 0.448	9409 ± 0.894	69144.6 ± 0.943	5695 ± 0.532	84679.0 ± 0.948	6237 ± 1.199
AF _{B2} (0.65 µg/l)	159401.6 ± 714.124	9409 ± 0.106	69144.6 ± 797.396	5695 ± 0.038	84679.0 ± 494.823	6237 ± 0.083
AF _{G1} (0.675 µg/l)	118151.4 ± 0.547	10456 ± 0.915	76204.8 ± 0.524	6407 ± 0.464	98904.6 ± 0.706	7149 ± 0.655
AF _{B1} (0.65 µg/l)	118151.4 ± 803.560	10456 ± 0.126	76204.8 ± 429.446	6407 ± 0.038	98904.6 ± 865.708	7149 ± 0.039
AF _{G2} (5.35 µg/l)	236560.2 ± 0.281	10467 ± 0.872	157793.2 ± 0.486	6512 ± 0.549	197657.8 ± 0.432	7156 ± 0.672
AF _{B2} (0.65 µg/l)	236560.2 ± 824.718	10467 ± 0.118	157793.2 ± 911.924	6512 ± 0.044	197657.8 ± 1060.159	7156 ± 0.060

T:40°C, Column (C₁₈)_µ = 150mm, λ_{UV} = 435nm, Flow Rate: 1ml/min, Water: Methanol: Acetonitrile

*n=5 تكرارية حقن المحلول العياري للعائد لمركبات الأفلاتوكسينات (B_1, B_2, G_1, G_2).
** حد الثقة عند مستوى ثقة 95%.



(b): تدفق 1 ml/min للطور المتحرك



(a): تدفق 0.8 ml/min للطور المتحرك

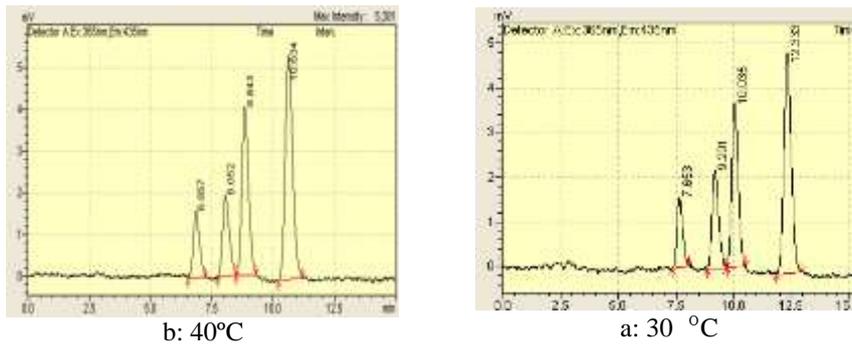
الشكل (2) كروماتوغرام فصل الأفلاتوكسينات (B₁, B₂, G₁, G₂)

(a): عند التدفق 0.8 ml/min (b): عند التدفق 1 ml/min

3- درجة الحرارة المثلى لفرن عمود الفصل الكروماتوغرافي:

Optimal Temperature for Chromatographic Separation Column Oven

درس تجريبياً تأثير درجة حرارة فرن العمود في متوسط أزمنا الاحتفاظ ومساحات قمم مركبات الأفلاتوكسينات، حيث تم تغيير درجة حرارة فرن العمود الكروماتوغرافي C₁₈ بدءاً من درجة حرارة الغرفة (25°C) إلى الدرجة (40°C) بخطوة مقدارها خمس درجات. ولكن عند الدرجة (40°C) كان الأفضل، حيث لوحظ أنه عند درجة الحرارة (40°C) كان متوسط مساحات القمم العائدة لمركبات الأفلاتوكسينات أعلى مقارنة بدرجات الحرارة (25, 30, 35)°C حيث كان الفصل جيداً وعدم تداخل بين القمم.



الشكل (3) تأثير درجة حرارة فرن العمود في متوسط مساحات قمم مركبات الأفلاتوكسينات (B₁, B₂, G₁, G₂) ومتوسط أزمنا الاحتفاظ.

4- الأطوال الموجية لمكشاف الفلورة FLD: طول موجة الإثارة وطول موجة

الإصدار المثلى Optimal Excitation and Emission Wavelengths

طبقت من أجل تحديد الأطوال الموجية لمكشاف الفلورة من ناحية سرعة تدفق الطور المتحرك في عمود الفصل الكروماتوغرافي C₁₈ (1 ml/min)، ودرجة حرارة فرن العمود (40°C)، ونسب مزج مذيبات الطور المتحرك H₂O:CH₃OH:CH₃CN (60:20:20 V:V:V) على الترتيب. لوحظ اختلاف استجابة المكشاف لمركبات الأفلاتوكسينات عند الأطوال الموجية المختارة والمبينة في الجدول (4)، اختلفت مساحات قمم مركبات الأفلاتوكسين باختلاف الأطوال الموجية لمكشاف الفلورة، حيث تبين أن أفضل مساحات القمم عند أطوال الموجية $\lambda_{ex}=365\text{ nm}$, $\lambda_{em}=435\text{ nm}$ للتعين المتزامن للأفلاتوكسينات كما هو واضح في الجدول (4).

الجدول (2) تأثير سرعة تدفق الطور المتحرك في متوسط مساحات قمع مركبات الأفلاتوكسينات (B₁, B₂, G₁, G₂) على الترتيب، ومتوسط زمن احتفاظها

عقار (Flow Mobile phase) (المركبات) Alatrazins	0.6 (ml/min)		0.8 (ml/min)		1.0 (ml/min)		1.2 (ml/min)	
	متوسط مساحات القمع Area = RSD %	عقار زمن الاحتفاظ (min) Rt = RSD %	متوسط مساحات القمع Area = RSD %	عقار زمن الاحتفاظ (min) Rt = RSD %	متوسط مساحات القمع Area = RSD %	عقار زمن الاحتفاظ (min) Rt = RSD %	متوسط مساحات القمع Area = RSD %	عقار زمن الاحتفاظ (min) Rt = RSD %
AFC ₁ (0.80 µg/l)	41134.6 ± 1.096	11.090 ± 0.913	37990.4 ± 1.015	8.378 ± 0.270	29399.4 ± 1.394	6.949 ± 0.028	22563.6 ± 1.472	5.858 ± 0.112
AFC ₂ (1.60 µg/l)	41134.6 ± 59.956	11.090 ± 0.126	32990.4 ± 415.596	8.378 ± 0.028	29399.4 ± 965.243	6.949 ± 0.089	22563.6 ± 112.399	5.858 ± 0.023
AFC ₁ (0.80 µg/l)	82269.2 ± 0.914	11.119 ± 1.139	66103.8 ± 1.194	8.378 ± 0.276	58938.4 ± 1.176	6.951 ± 0.540	45162.4 ± 1.328	5.874 ± 0.342
AFC ₂ (1.60 µg/l)	82269.2 ± 934.949	11.119 ± 0.127	66103.8 ± 990.056	8.378 ± 0.029	58938.4 ± 959.116	6.951 ± 0.072	45162.4 ± 74.406	5.874 ± 0.026
AFC ₁ (2.65 µg/l)	67635.4 ± 0.946	13.053 ± 1.081	50881.6 ± 1.122	9.806 ± 0.414	43453.4 ± 0.954	8.137 ± 1.180	33061.2 ± 0.940	6.927 ± 0.176
AFC ₂ (5.30 µg/l)	67635.4 ± 794.499	13.053 ± 0.176	50881.6 ± 705.868	9.806 ± 0.043	43453.4 ± 514.882	8.137 ± 0.119	33061.2 ± 53.025	6.927 ± 0.015
AFC ₁ (0.80 µg/l)	134317.2 ± 0.407	13.054 ± 0.889	101674.8 ± 0.827	9.807 ± 0.414	87033.8 ± 0.771	8.136 ± 0.875	68691.2 ± 0.543	6.926 ± 0.111
AFC ₂ (1.65 µg/l)	134317.2 ± 1020.260	13.054 ± 0.144	101674.8 ± 1044.043	9.807 ± 0.051	87033.8 ± 833.411	8.136 ± 0.088	68691.2 ± 163.490	6.926 ± 0.027
AFC ₁ (0.80 µg/l)	129216.2 ± 0.381	14.347 ± 1.656	93123.6 ± 0.596	10.881 ± 0.652	79760.8 ± 0.867	9.027 ± 0.884	63072.4 ± 1.066	7.610 ± 0.110
AFC ₂ (1.65 µg/l)	129216.2 ± 777.560	14.347 ± 0.188	93123.6 ± 689.450	10.881 ± 0.092	79760.8 ± 585.340	9.027 ± 0.130	63072.4 ± 84.466	7.610 ± 0.014
AFC ₁ (0.80 µg/l)	244324.2 ± 0.358	14.339 ± 0.984	189163.0 ± 0.408	10.867 ± 0.610	159481.6 ± 0.448	9.019 ± 0.894	126485.2 ± 0.477	7.616 ± 0.139
AFC ₂ (1.65 µg/l)	244324.2 ± 975.744	14.339 ± 0.175	189163.0 ± 943.048	10.867 ± 0.082	159481.6 ± 714.224	9.019 ± 0.100	126485.2 ± 46.613	7.616 ± 0.013
AFC ₁ (2.65 µg/l)	169095.2 ± 0.443	17.315 ± 1.109	136732.8 ± 0.485	13.077 ± 0.709	118351.4 ± 0.547	10.856 ± 0.935	99674.2 ± 0.891	9.185 ± 0.181
AFC ₂ (5.30 µg/l)	169095.2 ± 930.918	17.315 ± 0.238	136732.8 ± 823.733	13.077 ± 0.115	118351.4 ± 603.560	10.856 ± 0.126	99674.2 ± 99.973	9.185 ± 0.021
AFC ₁ (2.65 µg/l)	338190.8 ± 0.254	17.318 ± 1.115	272967.2 ± 0.312	13.057 ± 0.942	236560.2 ± 0.281	10.867 ± 0.872	179447.6 ± 0.438	9.178 ± 0.279
AFC ₂ (5.30 µg/l)	338190.8 ± 1067.069	17.318 ± 0.240	272967.2 ± 1061.713	13.057 ± 0.153	236560.2 ± 824.708	10.867 ± 0.118	179447.6 ± 97.621	9.178 ± 0.043

T: 40°C, Column (C₁₈)_{µg} = 165mm, λ_{em} = 435nm, Mobile Phase: (Water: Methanol: Acetonitrile: 60:20:20 V:V:V)

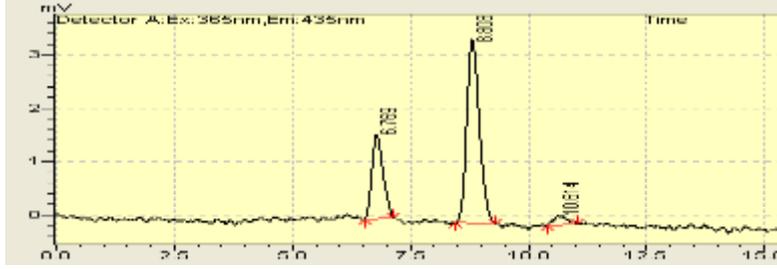
* n=5 تكرارية حقن المحلول العياري العائد لمركبات الأفلاتوكسينات (B₁, B₂, G₁, G₂).
** : حد الثقة عند مستوى ثقة 95%.

الجدول (4) نتائج متوسط مساحات قمم مركبات الأفلاتوكسينات (B₁, B₂, G₁, G₂) على الترتيب عند الأطوال الموجية المختارة.

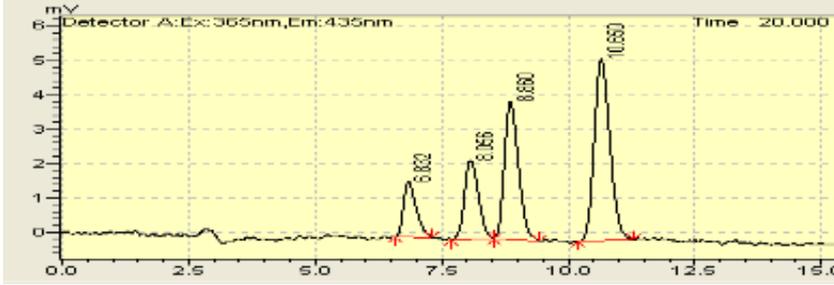
قوة بومبي (إغز) بموجات فوق البنفسج λ _{exc} , nm	360 - 425 nm	360 - 440 nm	365 - 425 nm	365 - 435 nm	365 - 440 nm	365 - 445 nm	365 - 450 nm
المركبات Aflatoxins	خطوط مساحات القمم Area = KSD % "Cl = $\frac{\sum X_i \cdot A_i}{n}$ "	خطوط مساحات القمم Area = KSD % "Cl = $\frac{\sum X_i \cdot A_i}{n}$ "	خطوط مساحات القمم Area = KSD % "Cl = $\frac{\sum X_i \cdot A_i}{n}$ "	خطوط مساحات القمم Area = KSD % "Cl = $\frac{\sum X_i \cdot A_i}{n}$ "	خطوط مساحات القمم Area = KSD % "Cl = $\frac{\sum X_i \cdot A_i}{n}$ "	خطوط مساحات القمم Area = KSD % "Cl = $\frac{\sum X_i \cdot A_i}{n}$ "	خطوط مساحات القمم Area = KSD % "Cl = $\frac{\sum X_i \cdot A_i}{n}$ "
AFC ₁ (0.80 µg/l)	15315 ± 1386	30871 ± 1365	34364 ± 1479	34045 ± 1566	29389 ± 1384	34674 ± 1365	34087 ± 1348
AFC ₂ (1.60 µg/l)	13354 ± 1377	33612 ± 1407	33464 ± 1433	34465 ± 15162	31204 ± 14174	34674 ± 1367	34087 ± 1347
AFC ₃ (2.40 µg/l)	11851 ± 1381	37794 ± 1379	46833 ± 1391	33354 ± 1379	42389 ± 1452	40342 ± 1367	40442 ± 1366
AFC ₄ (3.20 µg/l)	13689 ± 1371	37476 ± 1371	46833 ± 1391	33354 ± 1379	42389 ± 1452	40342 ± 1367	40442 ± 1366
AFC ₅ (4.00 µg/l)	15943 ± 1383	31773 ± 1362	47929 ± 1445	37883 ± 1379	44453 ± 1432	40929 ± 1362	47579 ± 1364
AFC ₆ (4.80 µg/l)	17501 ± 1387	31773 ± 1362	47929 ± 1445	37883 ± 1379	44453 ± 1432	40929 ± 1362	47579 ± 1364
AFC ₇ (5.60 µg/l)	19059 ± 1391	31773 ± 1362	47929 ± 1445	37883 ± 1379	44453 ± 1432	40929 ± 1362	47579 ± 1364
AFC ₈ (6.40 µg/l)	20617 ± 1395	31773 ± 1362	47929 ± 1445	37883 ± 1379	44453 ± 1432	40929 ± 1362	47579 ± 1364
AFC ₉ (7.20 µg/l)	22175 ± 1399	31773 ± 1362	47929 ± 1445	37883 ± 1379	44453 ± 1432	40929 ± 1362	47579 ± 1364
AFC ₁₀ (8.00 µg/l)	23733 ± 1403	31773 ± 1362	47929 ± 1445	37883 ± 1379	44453 ± 1432	40929 ± 1362	47579 ± 1364
AFC ₁₁ (8.80 µg/l)	25291 ± 1407	31773 ± 1362	47929 ± 1445	37883 ± 1379	44453 ± 1432	40929 ± 1362	47579 ± 1364
AFC ₁₂ (9.60 µg/l)	26849 ± 1411	31773 ± 1362	47929 ± 1445	37883 ± 1379	44453 ± 1432	40929 ± 1362	47579 ± 1364
AFC ₁₃ (10.40 µg/l)	28407 ± 1415	31773 ± 1362	47929 ± 1445	37883 ± 1379	44453 ± 1432	40929 ± 1362	47579 ± 1364
AFC ₁₄ (11.20 µg/l)	29965 ± 1419	31773 ± 1362	47929 ± 1445	37883 ± 1379	44453 ± 1432	40929 ± 1362	47579 ± 1364
AFC ₁₅ (12.00 µg/l)	31523 ± 1423	31773 ± 1362	47929 ± 1445	37883 ± 1379	44453 ± 1432	40929 ± 1362	47579 ± 1364
AFC ₁₆ (12.80 µg/l)	33081 ± 1427	31773 ± 1362	47929 ± 1445	37883 ± 1379	44453 ± 1432	40929 ± 1362	47579 ± 1364
AFC ₁₇ (13.60 µg/l)	34639 ± 1431	31773 ± 1362	47929 ± 1445	37883 ± 1379	44453 ± 1432	40929 ± 1362	47579 ± 1364
AFC ₁₈ (14.40 µg/l)	36197 ± 1435	31773 ± 1362	47929 ± 1445	37883 ± 1379	44453 ± 1432	40929 ± 1362	47579 ± 1364
AFC ₁₉ (15.20 µg/l)	37755 ± 1439	31773 ± 1362	47929 ± 1445	37883 ± 1379	44453 ± 1432	40929 ± 1362	47579 ± 1364
AFC ₂₀ (16.00 µg/l)	39313 ± 1443	31773 ± 1362	47929 ± 1445	37883 ± 1379	44453 ± 1432	40929 ± 1362	47579 ± 1364

* n=5: تكرارية حقن المحلول العياري للعائد لمركبات الأفلاتوكسينات (B₁, B₂, G₁, G₂).
*: حد الثقة عند مستوى ثقة 95%

5- طريقة الاشتقاق: تم استخدام الاشتقاق بالخلية الكيميائية الضوئية حيث توضع بين عمود الفصل الكروماتوغرافي ومكشاف FLD. ومن ثم حقن مزيج عياري بتركيز (6.95 µg/l) مع الاشتقاق، ودون اشتقاق، نلاحظ ظهور قمم مركبي B₁ و G₁ ولكن بشكل ضئيل، وفق ما هو واضح بالشكل (5).



b: دون استعمال خلية الاشتقاق الكيميائية الضوئية



a: باستعمال خلية الاشتقاق الكيميائية الضوئية

الشكل (5) كروماتوغرامات فصل الأفلاتوكسينات (B₁, B₂, G₁, G₂) باستعمال خلية الاشتقاق الكيميائية الضوئية، أو عدم استعمالها

6- تكرارية فصل والتعيين المتزامن للأفلاتوكسينات (B₁, B₂, G₁, G₂) باستخدام عمود الفصل الكروماتوغرافي C₁₈ وفق تقانة HPLC-FLD:

تم حقن محلول عياري لمزيج الأفلاتوكسينات بتركيز (6.95 µg/l) بتطبيق الشروط المثلى التي تم التوصل إليها وفق تقانة HPLC-FLD عشرين مكرراً، يوضح الجدول رقم (5) تكرارية فصل مركبات الأفلاتوكسين (B₁, B₂, G₁, G₂) وفق الشروط التحليلية المثلى التي تم

التوصل إليها، تميزت طريقة التعيين المتزامن الأفلاتوكسينات وفق تقنية HPLC-FLD وبتطبيق الشروط المثلى بتكرارية جيدة لعشرين مكرراً؛ إذ سجل متوسط أزمنا الاحتفاظ لمركبات الأفلاتوكسينات

الجدول (5) تكرارية فصل، والتعيين المتزامن لمركبات الأفلاتوكسينات (B₁, B₂, G₁, G₂) بتراكيز (0.80, 2.65, 0.825, 2.675) µg/l على الترتيب باستخدام عمود الفصل الكروماتوغرافي C₁₈

وفق تقنية HPLC-FLD باعتماد الشروط المثلى

التركيز µg/ml	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
B ₁	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80	0.80
B ₂	2.65	2.65	2.65	2.65	2.65	2.65	2.65	2.65	2.65	2.65	2.65	2.65	2.65	2.65	2.65	2.65	2.65	2.65	2.65	2.65
G ₁	0.825	0.825	0.825	0.825	0.825	0.825	0.825	0.825	0.825	0.825	0.825	0.825	0.825	0.825	0.825	0.825	0.825	0.825	0.825	0.825
G ₂	2.675	2.675	2.675	2.675	2.675	2.675	2.675	2.675	2.675	2.675	2.675	2.675	2.675	2.675	2.675	2.675	2.675	2.675	2.675	2.675

*n=20 تكرارية حقن المحلول العياري للعائد لمركبات الأفلاتوكسينات (B₁, B₂, G₁, G₂) على الترتيب.

(B_1 Rt=10.867 min, B_2 Rt=9.027 min, G_1 Rt=8.137 min, G_2 Rt=6.951 min) بانحراف معياري نسبي مؤوي % (0.997, 1.221, 0.837, 0.886) على التوالي. في حين سجل متوسط مساحات القمم، ومتوسط ارتفاعها، ومتوسط عرضها، وفق ما هو وارد في الجدول رقم (5) بانحراف معياري نسبي مؤوي لا يتجاوز 2%.

تطبيق الطريقة المقترحة في التحديد الكمي:

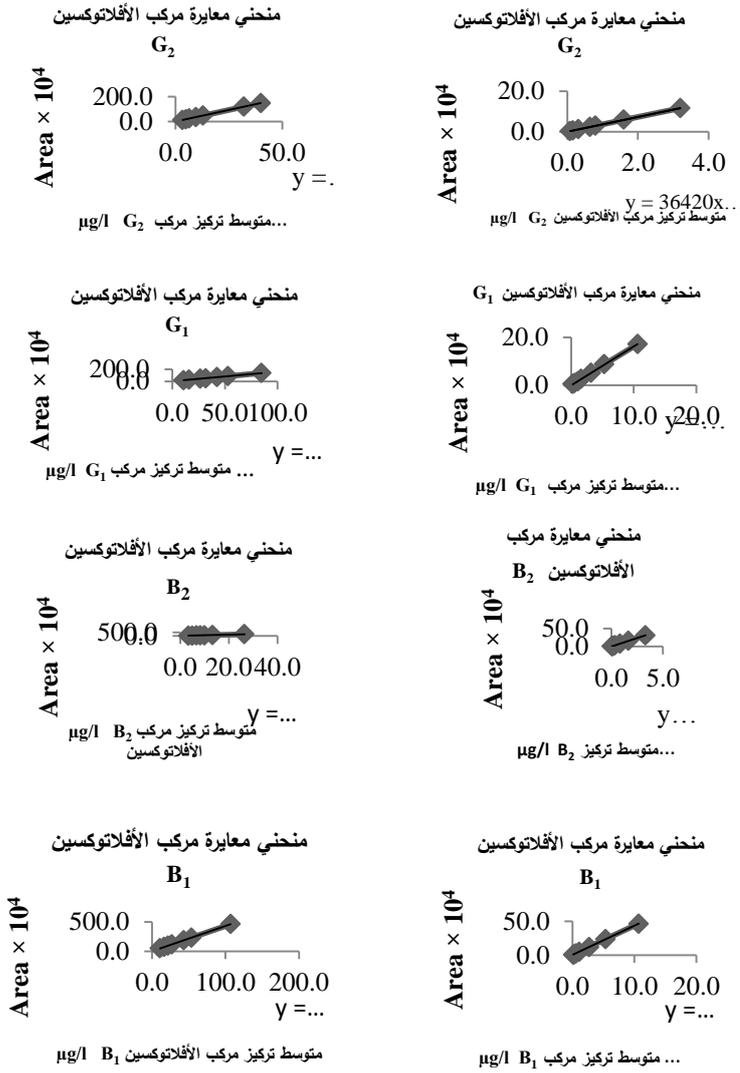
1- إيجاد المجال التحليلي الخطي:

حُفنت المحاليل العيارية لمزيج الأفلاتوكسينات (B_1 , B_2 , G_1 , G_2) بتطبيق الشروط المثلى المبينة في الجدول (11). لُوحظ أن المجال التحليلي الخطي لمركب الأفلاتوكسين G_2 هو $(0.080-40.00) \mu\text{g/l}$ وللمركب G_1 هو $(0.265-84.80) \mu\text{g/l}$ ، وللمركب B_2 هو $(0.04125-26.40) \mu\text{g/l}$ وأما المركب B_1 فكان المجال الخطي هو $(0.13375-133.750) \mu\text{g/l}$. ويوضح ذلك في الجدول رقم (6)، حيث يُلاحظ التناسب بين مساحات القمم العائدة لمركبات الأفلاتوكسينات وتراكيز المحاليل العيارية المستخدمة لمزيج الأفلاتوكسينات، أظهرت مركبات الأفلاتوكسينات خطية ممتازة ضمن المجال التحليلي الخطي لكلٍ منها.

2- منحنى المعايرة: The Calibration Curve

حُضرت سلسلة محاليل عيارية لمركبات الأفلاتوكسين (B_1 , B_2 , G_1 , G_2)، وطُبقت الشروط المثلى السابقة بغية رسم منحنيات المعايرة لمركبات الأفلاتوكسينات وفق التراكيز المذكورة في الجدول رقم (7) من أجل التراكيز المنخفضة، والتراكيز المرتفعة المذكورة في الجدول رقم (8).

تُظهر مركبات الأفلاتوكسينات خطية ممتازة، وبمربع معامل ارتباط $R^2=0.9999$ (Correlation Coefficient) من أجل التراكيز المرتفعة والمنخفضة، ويوضح الشكل (6) منحنيات المعايرة لمركبات الأفلاتوكسينات (B_1 , B_2 , G_1 , G_2) على الترتيب، والتي تميزت بخطية جيدة، وبمربع معامل ارتباط ممتاز $R^2=0.9999$.



الشكل (6) منحنيات المعايرة لمركبات الأفلاتوكسينات (B_1 , B_2 , G_1 , G_2) بتركيز عالية ومنخفضة بتطبيق الشروط المثلى

الجدول (6) متوسط مساحات قمم مركبات الأفلاتوكسينات (B₁, B₂, G₁, G₂) على الترتيب الموافقة لتراكيز مختلفة بتطبيق الشروط المثلى

AFL G ₂	التكرار (µg)	0.006	0.016	0.024	0.032	0.044	0.056	0.068	0.080	0.096	0.112	0.128	0.144
	متوسط مساحة قمة مركب الأفلاتوكسين G ₂ Area × 10 ⁴	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**
AFL G ₁	التكرار (µg)	2.560	3.200	4.000	5.000	6.400	8.000	10.000	12.800	16.000	20.000	25.600	32.000
	متوسط مساحة قمة مركب الأفلاتوكسين G ₁ Area × 10 ⁴	9.416	11.663	14.587	18.234	22.892	28.720	35.888	45.440	57.536	72.224	90.560	113.696
AFL B ₂	التكرار (µg)	0.00325	0.0125	0.0245	0.049	0.098	0.196	0.392	0.784	1.568	3.136	6.272	12.544
	متوسط مساحة قمة مركب الأفلاتوكسين B ₂ Area × 10 ⁴	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**	ND**
AFL B ₁	التكرار (µg)	0.0075	0.0300	0.0600	0.1200	0.2400	0.4800	0.9600	1.9200	3.8400	7.6800	15.3600	30.7200
	متوسط مساحة قمة مركب الأفلاتوكسين B ₁ Area × 10 ⁴	35.418	46.108	61.137	81.517	107.357	142.810	189.746	248.330	318.880	421.152	548.992	709.696

*n=5 تكرارية حقن المحلول العياري لمركبات الأفلاتوكسينات (B₁, B₂, G₁, G₂).
** ND (Not Detected) لم يُكتشف.

الجدول (7) متوسط مساحات قمم مركبات الأفلاتوكسينات (B_1, B_2, G_1, G_2) على الترتيب الموافقة لتراكيز منخفضة بتطبيق الشروط المثلى

AFL G ₂	التركيز ($\mu\text{g/l}$)	0.080	0.160	0.320	0.640	0.800	1.600	3.200
	*متوسط مساحة قمة مركب الأفلاتوكسين G_2 $\text{Area} \times 10^4$	0.324	0.620	1.172	2.288	2.940	5.883	11.663
AFL G ₁	التركيز ($\mu\text{g/l}$)	3.20	4.80	6.40	9.60	12.80	32.0	40.0
	*متوسط مساحة قمة مركب الأفلاتوكسين G_1 $\text{Area} \times 10^4$	11.663	17.787	23.892	35.209	47.550	119.779	148.261
AFL B ₂	التركيز ($\mu\text{g/l}$)	0.04125	0.0825	0.165	0.330	0.825	1.65	3.30
	*متوسط مساحة قمة مركب الأفلاتوكسين B_2 $\text{Area} \times 10^4$	0.409	0.799	1.580	3.199	7.976	15.9482	30.936
AFL B ₁	التركيز ($\mu\text{g/l}$)	0.13375	0.2675	0.5350	1.070	2.6750	5.350	10.70
	*متوسط مساحة قمة مركب الأفلاتوكسين B_1 $\text{Area} \times 10^4$	0.565	1.171	2.339	4.663	11.835	23.656	46.584

*n=5: تكرارية حقن المحلول العياري العائد لمركبات الأفلاتوكسينات (B_1, B_2, G_1, G_2).

الجدول (8) متوسط مساحات قمم مركبات الأفلاتوكسينات (B_1, B_2, G_1, G_2) على الترتيب الموافقة لتراكيز عالية نسبياً بتطبيق الشروط المثلى

AFL G ₂	التركيز ($\mu\text{g/l}$)	3.20	4.80	6.40	9.60	12.80	32.0	40.0
	*متوسط مساحة قمة مركب الأفلاتوكسين G_2 $\text{Area} \times 10^4$	11.663	17.787	23.892	35.209	47.550	119.779	148.261
AFL G ₁	التركيز ($\mu\text{g/l}$)	10.60	15.90	26.50	31.80	42.40	53.0	84.80
	*متوسط مساحة قمة مركب الأفلاتوكسين G_1 $\text{Area} \times 10^4$	17.201	26.429	44.122	51.778	70.085	86.782	138.666
AFL B ₂	التركيز ($\mu\text{g/l}$)	3.30	4.950	6.60	8.250	9.90	13.20	26.40
	*متوسط مساحة قمة مركب الأفلاتوكسين B_2 $\text{Area} \times 10^4$	31.436	45.108	61.237	74.998	89.137	120.934	237.102
AFL B ₁	التركيز ($\mu\text{g/l}$)	10.70	16.050	21.40	26.750	42.80	53.50	107.0
	*متوسط مساحة قمة مركب الأفلاتوكسين B_1 $\text{Area} \times 10^4$	46.584	70.990	93.909	115.398	187.208	229.684	459.536

*n=5: تكرارية حقن المحلول العياري لمركبات الأفلاتوكسينات (B_1, B_2, G_1, G_2).

حد الكشف (LOD) وحدّ التحديد الكمي (LOQ) للجهاز: يُعدّ استخدام الانحراف المعياري لقيم ضجيج (تشويش خلفية الإشارة) إشارة جهاز HPLC-FLD بعد استقرار مكشاف FLD قبل عملية فصل مركبات الأفلاتوكسينات من الطرائق المُعتمدة في حساب حدّ الكشف [27].

الجدول (9) قيم ارتفاع ضجيج خلفية الإشارة الناتجة عن مكشاف الـ FLD

مركب الأفلاتوكسين	n (عدد قَم ضجيج خلفية الإشارة)	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
AFL G ₂	قيم ارتفاع ضجيج خلفية إشارة مكشاف الـ FLD	51	113	129	85	161	65	122	155	131	96
	N ± SD = 110.80 ± 36.365										
AFL G ₁	قيم ارتفاع ضجيج خلفية إشارة مكشاف الـ FLD	44	131	114	122	60	96	156	135	114	55
	N ± SD = 98.4 ± 38.865										
AFL B ₂	قيم ارتفاع ضجيج خلفية إشارة مكشاف الـ FLD	71	151	130	88	52	114	126	168	93	64
	N ± SD = 105.70 ± 38.451										
AFL B ₁	قيم ارتفاع ضجيج خلفية إشارة مكشاف الـ FLD	60	125	134	136	85	155	143	90	56	75
	N ± SD = 105.90 ± 36.650										

الجدول (10) قيم حدّ الكشف، وحدّ التحديد الكمي لمركبات الأفلاتوكسينات (B₁, B₂, G₁, G₂) وفق تقنية HPLC-FLD باستعمال الاشتقاق بالخلية الكيميائية الضوئية

مركب الأفلاتوكسين	G ₂	G ₁	B ₂	B ₁
LOD (µg/l)	0.0030	0.0072	0.0012	0.0025
LOQ (µg/l)	0.0100	0.0238	0.0040	0.0084

باستمرار حقن مركبات الأفلاتوكسينات (B₁, B₂, G₁, G₂) حتى تراكيز منخفضة تبين أن حدّ الكشف العملي:

مركب الأفلاتوكسين	G ₂	G ₁	B ₂	B ₁
LOQ (µg/l)	0.0400	0.1060	0.0248	0.0535

الاستنتاجات والتوصيات: Conclusions and Recommendations

تمّ تحديد الشروط التحليلية المثلى للتعين المتزامن للأفلاتوكسينات الأربعة (B_1, B_2, G_1, G_2)، والمبينة بالجدول رقم (11).
 دلّت الدراسة الإحصائية على أن الطريقة المقترحة بشروطها الجديدة تتمتع بالدقة، والصحة، والمصادقية، وحدّ كشف LOD: ($B_1=0.0030, B_2=0.0072, G_1=0.0012, G_2=0.0025$) $\mu\text{g/l}$ اعتماد الطريقة بشروطها كطريقة تحليلية في المخابر العلمية والبحثية. وتطبيقها على عينات واقعية بشروطها الجديدة.

الجدول (11) الشروط المثلى للتعين المتزامن للأفلاتوكسينات (B_1, B_2, G_1, G_2)

باستخدام عمود الفصل الكروماتوغرافي C_{18}

Water, Methanol and Acetonitrile (60:20:20 V/V/V)	الطور المتحرك Mobile phase
1.0 ml/min	تدفق الطور المتحرك Flow Rate
40°C	درجة حرارة فرن عمود الفصل الكروماتوغرافي Column temperature
مكشاف الفلورة Fluorescence Detector (FLD)	المكشاف Detector
طول موجة الإثارة: Excitation wavelength: 365 nm	الأطوال الموجية لمكشاف الفلورة FLD
طول موجة الإصدار: Emission wavelength: 435 nm	
الخلية الكيميائية الضوئية Post-Column Photochemical	الاشتقاق Derivatization
C_{18} (MN, MACHERY-NAGEL, Made in Germany) (150 × 4.6 mm I.D., particle size 5 μm) with Guard Column.	عمود الفصل الكروماتوغرافي HPLC Column
20 μl	حجم الحقنة Injection Volume

المراجع References

- [1] Makun, H. A., Apeh, D. O., Adeyemi H. Y., Nagago T., Okeke J. O., Mustapha A. S. and Oyinloye B. A., (2014). Determination of Aflatoxins in Sesame, Rice, Millet and Acha from Nigeria using HPLC. *e-Journals in Chemical sciences transactions*. 3(4), 1516-1534.
- [2] Salau IA, Shehu K, Muhammad S. and Umar R.A., (2017). Determination of Aflatoxin levels in groundnut oils marketed in Sokoto State, Nigeria. *International Research Journal of Biochemistry and Biotechnology*, Vol. 4(1), pp. 55-60.
- [3] Ismail A., Riaz M., Akhtar S., Yoo S.H., Park S., Abid M., Aziz M. and Ahmad Z., (2017). Seasonal Variation of Aflatoxin B₁ content in dairy Feed. *Journal of animal and Feed Sciences*, 26, 33-37.
- [4] Ali M., Amir P., Ahmad H., Emambakhsh G., and Azizoloh P., (2017). Determination of total aflatoxin in rice consumption in Yasuj, Iran. *Biosc. Biotech. Res. Comm. (BBRC)*. Special Issue No. 1: 195-198.
- [5] Mohammad A., (2016). Aflatoxins in Pistachio, Detectio and prevention. *Journal of novel Applied Sciences*, 5(1): 27-33.
- [6] Oksan U., Isil V., (2014). Monitoring of Aflatoxins in peanuts. *Turkish Journal of Agricultural and Sciences*. Special Issue, (1).
- [7] Narjis N., Aiza K., Kinza K, Abdul Muqet Kh., and Mateen A., (2016). Quantitative scrutinization of Aflatoxins in different spices from Pakistan. *Hindawi publishing comparison, International Journal of Analytical Chemistry*, Volume (7).
- [8] Wan Ainiza W.M., Jinap S., and sann Y. (2015). Simultaneous determination of aflatoxins and ochratoxin A in single and mixed spices. *Food control*, Vol. 50, pp. 913-918.
- [9] Jeswal P. and Kumar D., (2015). Assessment of co- occurrence of Aflatoxin and Ochratoxin A in medicinal herbs and spices from Bihar State (India). *Crystal Research and Technology*, Vol .1, no. 1, pp. 586-592.
- [10] Yilmaz I, Aluc M., (2014). Determination of Aflatoxin levels in Cashews on Turkish Markets. *FOODBALT*.

- [11] Abdel- Azeem S. M., Diab M. A., and El- Shahat M. F., (2015). Ultra- high pressure Liquid Chromatography–solid phase clean-up for determining aflatoxins in Egyptian Food commodities. *Analysis* 44, 18-24.
- [12] Olalekan–Adeniran, M. A., Adegoke, G.O.; and Aroyeum, S.O., (2016). Anti-aflatoxigenic Effect of *Aframomum danielli* on Peanut Balls (Kulikuli). *IOSR Journal of Environmental Science, Toxicology and Food Technology (IOSR–JESTFT)*, Volume 10, Issue 11, pp 10-15.
- [13] Mai A. M., Marwa R., Ahmed M., Shaimaa H. A., Nahla S., Heba M. H. and Fatma H. A., (2015). Detection of aflatoxins in meat by modified HPLC method. *Egypt. J. Chem. Health*, 1 (1), 945 – 954.
- [14] Nisa, A., Zahra, N. and Yasha, N. B., (2016). Comparative study of aflatoxins in brown rice sample of local and import quality. *International Food Research Journal* 23(1), 243-247.
- [15] Larissa Y. W., Noel D., Phillipe A. N., Pascaline A., Angelique F., Didier M., and Nicolas B., (2017). Occurrence of Mycotoxins in commercial infant formulas locally produced in Ouagadougou (Burkina Faso). *Food control* 73, 518-523.
- [16] Ahmed G., Key Wh., and Coralia V. G., (2018). Determination OF Aflatoxins in rice using quechers and fluorescence HPLC. *Chemistry & Chemical Engineering, Biotechnology, Food Industry*, 19 (2), PP. 133-141.
- [17] Khayoon W. S., Lee T. P. and Salleh B., (2012). High performance liquid chromatographic determination of aflatoxins in chilli, peanut and rice using silica based monolithic column. *Food Chemistry*, 133, 489-496.
- [18] Ferre, F.S., (2016). Worldwide occurrence of mycotoxins in rice. *Food control*, 62, 291-298.
- [19] Wild C.P., (2007). Aflatoxin exposure in developing countries. The critical interface of agriculture and health. *Food and Nutrition Bulletin*, 28, S372-S380.
- [20] IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans, 2002.

- [21] Leszczynska J., Maslowska J., Owczarek A., Kucharska U., (2001). Determination of Aflatoxins in food products by the ELISA method. Czech J. Food Sci., Vol. 19, No.1 : 8-12.
- [22] Elisabete Y. S. O., Luciana H., Glauco T. G., and Elisa Y. H., (2010). Comparison of Thin-layer Chromatography, Spectrofluorimetry and Bright Greenish-yellow Fluorescence Test for Aflatoxin Detection in Corn. Brazilian Archives of Biology and Technology, Vol. 53, n.3: PP. 687-692.
- [23] Michelangelo N. P., (2009). Detection Methods for Mycotoxins in cereal Grains and Cereal Products. Proc. Nat. Sci., Matica Srpska Novi Sad, № 117, 15-25.
- [24] Cui X., Muhammed I., Li R., Jin H., Guo Z., Yang Y., Hamid S., Li J., Cheng P. and Zhang X., (2017). Development of Detection of Aflatoxin B₁ and M₁ in Animal Tissue to Study the Effect of Curcumin on Mycotoxin Clearance Rates; Frontiers in pharmacology, volume 8, Article 650.
- [25] Samaneh N., Nabi S., Shahram S., Gholamreza J. Kh., Ramin N. N., and Esmail S., (2015). Validation of simultaneous analysis method for determination of aflatoxin in Olive oil by high performance liquid chromatography–fluorescence detector. Journal of Food Safety and Hygiene, Vol (1) No. 2: 25-30.
- [26] Marilena M., Marco I., Donatella N., Sonia Lo M., Carmen P.; Validation of confirmatory analytical method for the determination of aflatoxins B₁, B₂, G₁ and G₂ in foods and feed materials by HPLC with on-line photochemical derivatization and Fluorescence detection; Food Additives and contaminants, Vol. 26. No. 10 (October 2009), 1402- 1410.
- [27] Shrivastava A., Gupta B. V., (2011). Methods for the determination of limit of detection and limit of quantitation of the analytical methods. Chronicles of Young Scientists, Vol. 2, Issue 1, 21-25.