# تعیین میزان مایکوتوکسین زیرالنون در آرد نانوایی‌های شهر خرم آباد به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

غلامرضا هوشمند[1]، مهدی گودرزی *[1]، بهاره گودرزی[2]، محمد رضا رشیدی نوش آبادی[1]، عیسی مطهری تبار[1]، نوشین اسد مسجدی[1]

۱- گروه فارماکولوژی و سم شناسی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، اهواز، ایران.

۲- گروه شیمی، دانشکده علوم، دانشگاه لرستان، خرم‌آباد، ایران.

یافته / دوره شانزدهم / شماره ۳ / پاییز ۹۳ / مسلسل ۶۱

## چکیده

دریافت مقاله: ۹۳/۷/۱۶ پذیرش مقاله: ۹۳/۸/۱۰

* **مقدمه:** زیرالنون یک مایکوتوکسین استروژنیک است که توسط چندین گونه از قارچ های فوزاریومی تولید می شود و به دلیل اثرات استروژنیک قوی و رخداد گسترده آن، مورد توجه خاصی قرار گرفته شده است. گندم و آرد آن یکی از مهمترین منابع غذایی انسان می‌باشند که ممکن است توسط زیرالنون آلوده شوند. بنابراین این مطالعه برای تعیین میزان آلودگی آرد گندم به زیرالنون انجام شد.

* **مواد و روش‌ها:** پس از استخراج زیرالنون از نمونه های آرد گندم با حلال استخراجی استونیتریل- آب ، مرحله خالص سازی سم بر پایه ستون های ایمونوافینیتی انجام گرفت. نمونه ها به کمک دستگاه **HPLC** با استفاده از ستون **C۱۸** با ابعاد **۲۵۰×۴/۶ mm** و اندازه ذرات **۵ µm** ، آشکارساز فلورسانس، فازمتحرک مخلوط استونیتریل و آب (۳ به ۲) با سرعت جریان **۱ ml/min** آنالیز شدند.

* **یافته‌ها:** نتایج مطالعه نشان دادکه در ۵ درصد از نمونه های آرد، سطوح زیرالنون بالاتر از حد مجاز ۲۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم می‌باشد. میانگین غلظت زیرالنون در نمونه ها ۵۴ میکروگرم بر کیلوگرم بود. حد تشخیص و حد کمی بودن توسط این روش به ترتیب ۳/۵ و ۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم بود.

* **بحث و نتیجه‌گیری:** اگر چه میانگین غلظت زیرالنون در نمونه ها پایین تر از ماکزیمم سطح توصیه شده بوسیله کدکس بود، ولی وجود مقادیر زیرالنون در این نمونه ها، نیاز بهبود شرایط نگهداری به منظور کاهش سطح آلودگی زیرالنون در گندم را معلوم می دارد.

* **واژه‌های کلیدی:** زیرالنون، گندم، ستون ایمنوافینیتی، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا.

*آدرس مکاتبه نویسنده مسئول: اهواز، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، دانشکده داروسازی، گروه فارماکولوژی و سم شناسی.

پست الکترونیک: Gmehdi_787@yahoo.com

## مقدمه

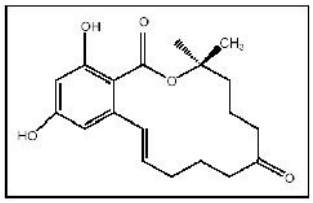
گندم محصولی استراتژیک و مهم در زندگی انسان محسوب می‌شود. به دلیل نقش اصلی گندم و محصولات آردی آن در جیره غذایی انسان و حیوان، در صورت آلودگی با عوامل تهدیدکننده سلامتی، نقش بسیار مهمی در به خطر انداختن سلامت انسان می‌تواند ایفا نماید. نان که عمدتاً از گندم بدست می‌آید در صورت آلوده بودن سیلوهای غلات به میکروارگانیسم‌ها به خصوص قارچها و یا آلوده شدن آرد در انبار و یا محل نگهداری آرد در نانوایی‌ها، مسمومیت مزمن ایجاد می‌کند.

قارچها میکروارگانیسم‌هایی با فعالیت متابولیکی بسیار بالا می‌باشند. چنین فعالیت‌های متابولیکی در جریان رشد قارچها در روی گندم، با ترشح آنزیم‌ها و ترکیباتی تحت عنوان مایکوتوکسین همراه می‌باشد. مایکوتوکسین‌ها (سموم قارچی) ترکیباتی با وزن مولکولی پایین هستند که متابولیت ثانویه قارچی محسوب می‌شوند (۱،۲). مایکوتوکسن‌ها به دلیل داشتن تنوع ساختمانی و خصوصیات متفاوت فیزیکی، طیف وسیعی از اثرات بیولوژیک نظیر ژنوتوکسیسیتی، جهش‌زایی، سرطانزایی، ناقص‌الخلقه‌زایی، اثرات سمی بر کلیه، کبد، پوست، سیستم اعصاب و ... را ایجاد می‌نمایند (۵-۳). زیرالنون یک ماده سمی از گروه مایکوتوکسین‌ها است که اغلب توسط گونه‌هایی از قارچ فوزاریوم، مانند فوزاریوم گرامینارم[1] و فوزاریوم کالموروم[2]، تولید می‌شود (۶). زیرالنون به دلیل داشتن خواص لیپوفیلیک و غیر یونیزه بودن در PH فیزیولوژیک غشا، از طریق انتشار غیر فعال از غشاهای بیولوژیکی عبور می‌کند. مطالعات نشان می‌دهد که زیرالنون پس از تجویز خوراکی، نسبتاً به سرعت جذب می‌شود و ممکن است در خلال جذبش، بوسیله بافت روده در خوکها و احتمالاً در انسان متابولیزه شود. یکی از مشخصات زیرالنون و سایر سموم فوزاریومی، بالا بودن مقدار حجم انتشار است، که نشان دهنده توزیع گسترده این سموم در بدن می‌باشد (۷).

بررسی متابولیسم زیرالنون در کبد موش صحرایی نشان داده است که این مایکوتوکسین از دو راه عمده متابولیزه می‌شود. راه اصلی گلوکورونیداسیون و راه کم اهمیت‌تر، احیا شدن به یکی از ایزومرهای زیرالنون است. این مایکوتوکسین، در حالت اصلی و زمانی که به متابولیت‌هایش تبدیل می‌شود خواص سمی از خود نشان می دهد. در حالت اصلی به دلیل تمایلی که به گیرنده‌های استروژنی دارد، به آنها متصل می‌شود و سبب بیان ژن‌های مربوطه می‌شود اما متابولیسم این سم، می‌تواند $\alpha$ و $\beta$ زیرالنول را پدید آورد. زیرالنون از مایکوتوکسین‌هایی به شمار می‌آید که دارای اثرات زیانبار خونی است. زیرالنون با دوزهای mg/kg ۵- ۱/۵ در موش صحرایی، باعث کاهش تعداد پلاکت‌ها می‌شود و در دوزهای mg/kg ۵-۳ آن موجب کاهش تعداد گلوبولهای قرمز و میزان هموگلوبولین خون می‌شود (۸،۹).

این مایکوتوکسین باعث افزایش معنی‌دار در فعالیت آنزیمهای آسپارتات آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز و کاهش معنی داری در فعالیت آنزیم گاما-گلوتامیل ترانس پپتیداز می‌شود. زیرالنون به همراه زیرالنول باعث آتروفی تیموس و فعال سازی ماکروفاژها شده و همانند ترکیبات مشابه خود می‌تواند تکثیر لنفوسیتی در برابر میتوژن‌ها را مهار کند. مهمترین اثر سمی زیرالنون، اثر استروژنیک، مانند اختلالات غدد درون‌ریز آن است. ساختمان شیمیایی زیرالنون (شکل ۱) و مشتقات آن شباهت زیادی به ۱۷- بتا استرادیول دارد. ۱۷- بتا استرادیول گیرنده سیتوزولی استروژن می‌باشد و نقش مهمی را در سیستم تولید مثل دارد (۱۰،۱۱).

1. Fusarium graminearum
2. Fusarium culumorum



شکل ۱. ساختمان زیرالنون

باتوجه به اهمیت زیرالنون در به خطر انداختن سلامتی انسان و با در نظر گرفتن این موضوع که گندم به عنوان پرمصرف‌ترین غله در سطح کشور می‌باشد، در این تحقیق میزان مایکوتوکسین زیرالنون در آرد نانوایی‌های شهرستان خرم‌آباد به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)[1] مد نظر قرارگرفت.

## مواد و روش‌ها

### مواد شیمیایی

مواد شیمیایی مورد استفاده در این تحقیق از شرکت Merck تهیه شد. استاندارد سم زیرالنون از شرکت Sigma و ستون های ایمینوافینیتی زیرالنون از شرکت VICAM (ZiraTest® Vicam ) تهیه گردید.

### نمونه گیری

پس از تهیه لیست نانوایی‌های شهرستان خرم‌آباد، با توجه به مطالعات قبلی ۳۰ نانوایی به صورت تصادفی ساده انتخاب شد و از هر نانوایی یک نمونه آرد گرفته شد. نمونه‌ها در طی فصل زمستان۱۳۹۱، در شرایط مناسب به آزمایشگاه انتقال یافتند و تا زمان انجام آزمایش در شرایط برودتی مناسب نگهداری شدند.

### اندازه گیری زیرالنون

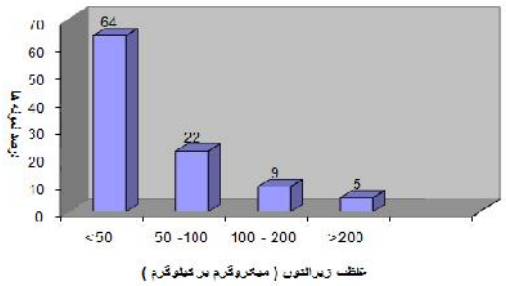
به ۲۰ گرم آرد، ۱۰۰ میلی لیتر حلال استخراج استونیتریل– آب (۹۰ به ۱۰) اضافه گردید. پس از یک ساعت شیکر، با فیلتر معمولی صاف شده و ۱۵ میلی لیتر از عصاره صاف شده به ۸۵ میلی لیتر بافر فسفات اضافه و با ورتکس مخلوط شد. سپس با فیلتر فایبرگلاس صاف و ۵۰ میلی لیتر از عصاره حاصل جدا گردید. برای آماده‌سازی ستون ایمینوافینیتی زیرالنون، آن را بر روی دستگاه خلاء منیفولد متصل و ۱۵ میلی لیتر محلول بافر فسفات از آن عبور داده شد.۵۰ میلی لیتر عصاره از ستون آماده شده عبور داده شد و سپس ستون با ۲۰ میلی لیتر آب دیونیزه شسته شد. ستون تحت خلأ خشک و سپس ۱/۵ میلی لیتر استونیتریل از ستون عبور داده شد و به آن ۳ میلی لیتر آب دیونیزه اضافه و ۲۰ میکرولیتر از آن به دستگاه HPLC (مدل شیماتزو) مجهز به ستون C۱۸ با ابعاد ۲۵۰×۴/۶ mm و اندازه ذره‌ای ۵ میکرون و شناساگر فلورسانس با طول موج برانگیختگی ۲۷۵ و طول موج نشر ۴۵۰ نانومتر تزریق شد (۱۲). فاز متحرک شامل مخلوط استونیتریل و آب (۳ به ۲) با سرعت جریان ml/min ۱ بود. برای رسم منحنی کالیبراسیون از استانداردهای زیرالنون با غلظت‌های ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم در لیتر استفاده گردید. حلال مورد استفاده جهت استاندارد سازی، فاز متحرک می‌باشد.

## یافته‌ها

نمودار۱، طیف آلودگی نمونه‌ها به زیرالنون را نشان می‌دهد. نتایج مطالعه نشان داد که در ۵ درصد از نمونه‌های آرد، سطوح زیرالنون بالاتر از حد مجاز ۲۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم بود. میانگین غلظت زیرالنون در نمونه‌ها ۵۴ میکروگرم بر کیلوگرم بود. میانگین غلظت زیرالنون در نمونه‌های مورد بررسی به طور معنی‌داری به لحاظ آماری از حد مجاز تعیین شده توسط سازمان استاندارد ایران پایین تر بود ($P < ۰/۰۵$).

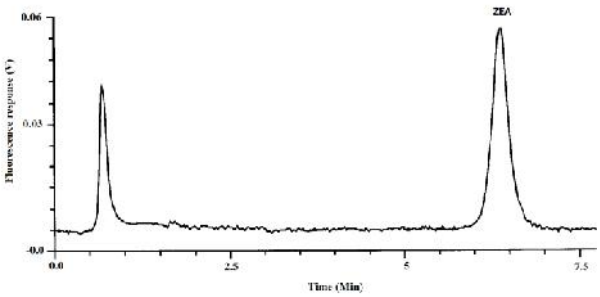
1. High Performance Liquid Chromatography

۶۴ درصد از نمونه ها دارای میزان زیرالنون کمتر از ۵۰ میکروگرم بر کیلوگرم بود.حد تشخیص و حد کمی بودن برای زیرالنون توسط این روش به ترتیب ۳/۵ و ۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم بود.




**نمودار ۱. درصد فراوانی نمونه های مورد بررسی آلوده به زیرالنون در سطوح تعیین شده**

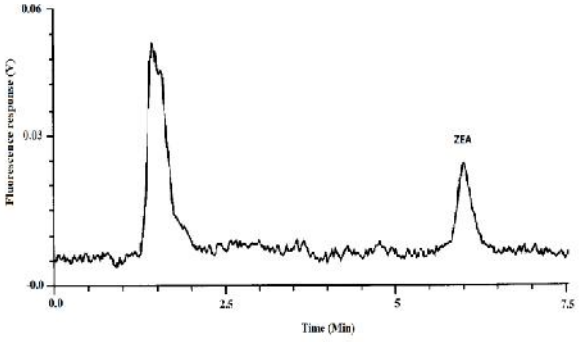
شکل ۲ کروماتوگرام استاندارد زیرالنون با غلظت ۱۰۰µg/l را نشان می‌دهد. مدت زمان بازداری زیرالنون ۶/۳۵ دقیقه می‌باشد.




**شکل ۲. کروماتوگرام استاندارد زیرالنون با غلظت۱۰۰ µg/l**

**شکل ۳. کروماتوگرام نمونه‌ای از آرد آلوده به زیرالنون را نشان می‌دهد.**

شناسایی پیک زیرالنون نمونه‌ها با مقایسه زمان بازداری استاندارد سم انجام شد. غلظت زیرالنون در نمونه‌ها با استفاده از سطح زیر منحنی پیک و استفاده از رسم خط کالیبراسیون بدست آمد.




**شکل ۳. کروماتوگرام نمونه ای از آرد آلوده به زیرالنون**

## بحث و نتیجه گیری

گندم به دلیل داشتن مواد مغذی زیاد در تأمین امنیت غذایی کشور نقشی مهم ایفا می‌کند. تولید آن در ایران قدمت زیادی دارد و مهم ترین غله از نظر سطح زیر کشت و تولید می‌باشد. خود کفایی در تأمین گندم مورد نیاز کشور ثمره سیاست گذاری سال‌های اخیر کشور و اقدامات بخش کشاورزی در راستای تأمین امنیت غذایی جامعه بوده است. حال که رشد تولیدات کشاورزی متناسب با نیازهای داخلی آغاز گردیده است، ضروری است که همزمان با آن، کیفیت نیز به عنوان یک نیاز و یک پشوانه مورد توجه قرار گیرد.

یکی از مهمترین ویژگیهای سموم قارچی، پایداری حرارتی آنهاست که بر این اساس، می توانند دماهای بالا را که معمولاً برای پخت غذاها لازم است، تحمل کنند، بدون اینکه تغییری در ساختمان و فعالیت بیولوژیکی آنها ایجاد شود (۱۳).

امورتاگ در بررسی که در سال ۲۰۰۸ بر روی پایداری زیرالنون انجام داد به مقاومت بالای آنها در فرایندهای حرارتی، آسیاب کردن، پختن و فراوری‌های صورت گرفته در دمای بالا اشاره کرد (۱۴).

قارچها برای رشد خود نیاز بـه یکـسری مـواد دارنـد کـه معمولاً این مواد در فراورده‌های غذایی یافت می‌شود، نیز بـرای رشد و تولید مایکوتوکسین به میزانی از رطوبت، دما و گذشـت زمان نیاز دارند زیرا بیشترین میزان سم، چند روز پس از رشد قارچ تولید می شود، در نتیجه معمولاً میزان سم در محصولات انبار شده بیشتر خواهد بود. به همـین دلیـل، کنتـرل شـرایط ذخیره سازی و فراوری مواد غذایی، بـرای پیـشگیری از تولیـد سم لازم است (۱۳،۱۵).

با توجه به اینکه فراوانی دو گونه فوزاریوم یاد شده تحـت تأثیر شـرایط جغرافیـای آب و هـوایی قـرار دارد، عامـل دیگـر احتمالاً شرایط نگهداری این گندم ها در سـیلوهای موجـود در کارخانجات است زیرا میزان رطوبت مکان ذخیره با تولید سـم ارتباط زیادی دارد.

مطالعه مزس و همکاران، این رابطـه را در مـورد شـرایط نگهداری نشان می دهد. در این مطالعه که بر روی ذرت انجـام شده بود، وی میزان زیرالنون را در ذرت‌های تازه برداشت شده ۶ -۷۹ppb انـدازه‌گیـری نمـوده اسـت در حالیکـه میـزان زیرالنون را ذرتهای انبار شده ppm ۱۱/۸- ۰/۰۱گزارش کرده است (۱۶).

در تحقیقی که بالیوکونین و همکاران بر روی گندم‌هـای موجود در سـه نـوع انبـار بـا سـایزهای متفـاوت، زیرالنـون را انـدازه‌گیـری کـرده اسـت و بیـشترین مقـدار زیرالنـون را در انبارهایی که سایر کـوچکتر دارنـد ppb ۵/۰۱ گـزارش کـرده است (۱۷).

در بررسی که پالارونی و ون هولست در سال ۲۰۰۳ برای تعیین زیرالنون در گندم و ذرت به روش کروماتوگرافی مایع و طیف سنج توده‌ای در هلند انجام دادند، میـانگین میـزان ایـن مایکوتوکـسین بـه ترتیـب بـرای گنـدم و ذرت ۳۵ و۱۱۲ میکروگرم برکیلوگرم بود (۱۸).

در یک بررسی که توسط مانووا و ملادنووا و همکـاران در سـال ۲۰۰۹ انجـام گرفـت، میـزان زیرالنـون در مرکـز غلـه و حبوبات بلغارستان مورد مطالعه قرارگرفت. میزان زیرالنـون در ذرت ۱۴۸ میکروگرم برکیلـوگرم و در گنـدم ۳۶/۶ میکروگـرم برکیلوگرم بود (۱۹).

مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۲ توسط لیورنز و همکاران بـه صـورت مقایـسه آنـالیز زیرالنـون بـه دو روش HPLC-Fluorescence و HPLC-Photodiode، انجـام شـد، نشان داد کـه روش fluorescence حـد تشخیـصی بهتـری برای زیرالنـون (۴ng/g) دارد. در ایـن بررسـی جداسـازی بـا ستون ایمنوافینیتی کارایی بالایی داشت (۲۰).

هدایتی با بررسی بر روی میزان مایکوتوکـسین زیرالنـون در گندم‌های انباری استان مازنـدران در سـال ۱۳۸۱ بـه ایـن نتیجه رسید که ۸۰/۵ درصد نمونه ها به زیرالنون آلوده بودنـد و ۶۴/۴ درصـد نمونـه هـا حـاوی بـیش از ۲۰۰ میکروگـرم برگیلوگرم زیرالنون بودند (۲۱)، در حالی که در مطالعه حاضـر تنها در ۵ درصد نمونه ها غلظت زیرالنون بـیش از حـد مجـاز بود. با توجه با اینکه پوسته و سبوس گندم بیـشتر در معـرض آلودگی قارچی می باشد، بـه نظـر مـی رسـد ایـن اخـتلاف در غلظت زیرالنون ناشی از نوع نمونه باشد. اداره اسـتاندارد ایـران میزان مجاز زیرالنون در نمونه هـای گنـدم مـصرفی انـسان را ۲۰۰ میکروگرم در کیلوگرم اعلام نمـوده اسـت (۲۲). بـر ایـن اساس ۵ درصد نمونه ها در مطالعه حاضر بیشتر از حـد مجـاز آلودگی به زیرالنون را نشان دادند. البته برای مطمئن شـدن از عدم وجود این مایکوتوکسین در هر یک از نمونـه‌هـای غـذایی لازم است کار بر روی نمونه‌هایی که زمان بیـشتری را در انبـار مانده‌اند و نیز در محدوده زمانی بیشتری انجام شود. تـا نتـایج با اطمینان بیشتری گزارش شوند در ضمن با توجـه بـه اینکـه وجود همزمـان مایکوتوکـسین‌هـا در مـواد غـذایی در مقـادیر

پائین‌تر از حد مجاز می‌تواند اثرات زیانباری داشته باشد باید به وجود دیگر مایکوتوکسین‌ها نیز توجه کرد.

روش‌هایی برای پیشگیری از آلودگی مواد غذایی به کپک‌های مولد زیرالنون وجود دارد. مثلاً رشد میسلیومی، فوزاریوم گرامیناروم در نمونه های دارای رطوبت ۱۵ تا ۱۸ درصد نگهداری شده در دمای ۷ درجه سانتیگراد یا کمتر، به مدت ۶ ماه متوقف خواهد شد. اما به نظر می رسد نمونه ها تنها زمانی از آلودگی مصون خواهند بود که در مرحله انبارداری رطوبتی برابر ۱۴ درصد یا کمتر داشته باشند (۲).

تمیز کردن ساده نمونه‌ها باعث بر طرف کردن فیزیکی آلودگی زیرالنون از غلات می شود. همچنین گزارش شده که اگر بخش خارجی پوسته غلات جدا شود میزان آلودگی ۴۰ تا ۱۰۰ درصد کاهش پیدا می کند و نیز استفاده از آب و شستشوی ساده نمونه های جو و ذرت در برخی موارد باعث رفع آلودگی به میزان ۲ تا ۶۱ درصد می شود (۲).

استفاده از مواد شیمیایی مانند فرمالدئید، کلسیم هیدروکسی منو متیل آمین یا هیدروکسید کلسیم باعث کاهش آلودگی غلات از زیرالنون می شود (۴).

علیرغم اینکه میانگین مقدار زیرالنون آزمایش شده ۵۴ میکروگرم برکیلوگرم و کمتر از حد مجاز تعیین شده توسط استاندارد ملی ایران است ولی تا هنگامی که اطلاع دقیقی از میزان گندم در سبد غذایی وجود نداشته باشد نمی‌توان ریسک و خطر سمیت زیرالنون را مورد بررسی قرار داد.

## تشکر و قدردانی

بدینوسیله از زحمات همکار گرامی و ارجمند جناب آقای فریدون کوشکی، کارشناس آزمایشگاه کنترل کیفیت مواد غذایی معاونت غذا و دارو لرستان صمیمانه سپاسگزاری می‌گردد.

## References


1. Krogh P. Mycotoxins in food: Academic Press Ltd.; 1987.
2. Allameh A, Razzaghi M (editors). Mycotoxins.Tehran: Imam Hossein University Pub, 2001. (In Persian)
3. Prelusky D, Rotter B, Rotter R, Miller J, Trenholm H. Toxicology of mycotoxins. Mycotoxins in grain: compounds other than aflatoxin. 1994:359-403.
4. Helferich W, Winter CK. Food toxicology: CRC Press; 2010.
5. Fung F, Clark RF. Health effects of mycotoxins: a toxicological overview. Clinical Toxicology. 2004;42(2):217-234.
6. Mirocha C, Pathre S, Christensen C. Zearalenone. Mycotoxins in Human and Animal Health. 1977;345.
7. Shin BS, Hong SH, Bulitta JB, Hwang SW, Kim HJ, Lee JB, et al. Disposition, oral bioavailability, and tissue distribution of zearalenone in rats at various dose levels. Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A. 2009;72(21-22):1406-1411.
8. Kiessling KH, Pettersson H. Metabolism of zearalenone in rat liver. Acta pharmacologica et toxicologica. 1978;43(4):285-290.
9. Zinedine A, Soriano JM, Molto JC, Manes J. Review on the toxicity, occurrence, metabolism, detoxification, regulations and intake of zearalenone: an oestrogenic mycotoxin. Food and Chemical Toxicology. 2007;45(1):1-18.
10. Jiang S, Yang Z, Yang W, Wang S, Liu F, Johnston L, et al. Effect of purified zearalenone with or without modified montmorillonite on nutrient availability, genital organs and serum hormones in post-weaning piglets. Livestock Science. 2011.
11. Hagler Jr WM, Towers NR, Mirocha CJ, Eppley RM, Bryden WL, editors. Zearalenone: mycotoxin or mycoestrogen. Fursarium: Paul E Nelson Memorial Symposium APS Press, St Paul, Minnesota; 2001.
12. ISIRI 9239 (Institute of Standard and Industrial Research of I.R. Iran), 2002. Foodstuffs- Cereal and cereals products - Determination of zearalenon by HPLC method and immunoaffinity column clean up-Test method. National Standard, pp: 9239.
13. Varga J, Tóth B. Novel strategies to control mycotoxins in feeds: A review. Acta Veterinaria Hungarica. 2005;53(2):189-203.
14. Omurtag GZ. Fumonisins, trichothecenes and zearalenone in cereals. International Journal of Molecular Sciences. 2008;9(11):2062-2090.
15. Zaki MM, El-Midany S, Shaheen H, Rizzi L. Mycotoxins in animals: Occurrence, effects, prevention and management. J Toxicol Environ Health. 2012;4:13-28.
16. Mézes M, Balogh K, Tóth K. Preventive and therapeutic methods against the toxic effects of mycotoxins-A review. Acta Veterinaria Hungarica. 2010;58(1):1-17.
17. Baliukoniene V, Bakutis B, Stankevicius H. Mycological and mycotoxicological evaluation of grain. Annals of Agricultural and Environmental Medicine. 2003;10(2):223-227.

18. Pallaroni L, von Holst C. Determination of zearalenone from wheat and corn by pressurized liquid extraction and liquid chromatography–electrospray mass spectrometry. Journal of Chromatography. 2003;993(1):39-45.
19. Manova R, Mladenova R. Incidence of zearalenone and fumonisins in Bulgarian cereal production. Food Control. 2009;20(4):362-365.
20. Liorens A, Mateo R, Mateo J, Jiménez M. Comparison of extraction and clean-up procedures for analysis of zearalenone in corn, rice and wheat grains by high-performance liquid chromatography with photodiode array and fluorescence detection. Food Additives & Contaminants. 2002;19(3):272-281.
21. Hedayati M. A Survey on wheat samples for mycotoxin zearalenone from Mazandaran Province 2002. Journal of Mazandaran University of Medical Sciences. 2005; 49(15):93-98. (In Persian)
22. ISIRI 5925 (Institute of Standard and Industrial Research of I.R. Iran), 2002. Maximum Tolerated Limits of Mycotoxins in Foods and Feeds. National Standard, pp: 5925.