

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

غلامرضا هوشمند^۱، مهدی گودرزی^{۲*}، بهاره گودرزی^۲، محمد رضا رشیدی نوش آبادی^۱، عیسی مطهری تبار^۱، نوشین اسد مسجیدی^۱
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: ۹۳/۲/۱۶ پذیرش مقاله: ۹۳/۸/۱۰

*** مقدمه:** زیرالنون یک مایکوتوکسین استروژنیک است که توسط چندین گونه از قارچ‌های فوزاریومی تولید می‌شود 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 نمونه‌های آرد گندم با حلال استخراجی استونیتریل - آب، مرحله خالص سازی سم بر پایه ستون‌های ایمونوآفینیتی انجام گرفت. نمونه‌ها به کمک دستگاه HPLC با استفاده از ستون C18 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 داد که در ۵ درصد از نمونه‌های آرد، سطوح زیرالنون بالاتر از حد مجاز ۲۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم می‌باشد. میانگین غلظت زیرالنون در نمونه‌ها 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 نمونه‌ها پایین تر از ماکزیمم سطح توصیه شده بوسیله کدکس بود، ولی وجود مقادیر زیرالنون در این نمونه‌ها، نیاز بهبود شرایط نگهداری به منظور کاهش سطح آلودگی زیرالنون در گندم را معلوم می‌دارد.

*** واژه‌های کلیدی:** زیرالنون، گندم، ستون ایمونوآفینیتی، 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 میکروارگانسیم‌ها به خصوص قارچها و یا آلوده شدن آرد در انبار و یا محل نگهداری آرد در نانوانی‌ها، مسمومیت مزمن ایجاد می‌کند.

قارچ‌ها میکروارگانسیم‌هایی 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). مایکوتوکسین‌ها به دلیل داشتن تنوع ساختمانی و خصوصیات متفاوت فیزیکی، طیف وسیعی از اثرات بیولوژیک نظیر ژنوتوکسیسیته، جهش‌زایی، سرطان‌زایی، ناقص‌الخلقه‌زایی، اثرات سمی بر کلیه، کبد، پوست، سیستم اعصاب و ... را ایجاد می‌نمایند (۳-۵). زیرالنون یک ماده سمی از گروه مایکوتوکسین‌ها است که اغلب توسط گونه‌هایی از قارچ فوزاریوم، مانند فوزاریوم گرامیناروم^۱ و فوزاریوم کالموروم^۲، 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

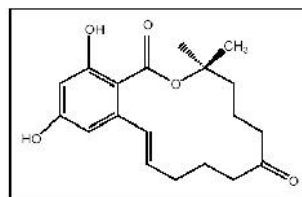
سموم فوزاریومی، بالا بودن مقدار حجم انتشار است، که نشان دهنده توزیع گسترده این سموم در بدن می‌باشد (۷).

بررسی متابولیسم زیرالنون در کبد موش صحرایی نشان داده است که این مایکوتوکسین از دو راه عمده متابولیزه می‌شود. راه اصلی گلوکوروئیداسیون 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 می‌دهد. 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 زیرالنول را پدید آورد. زیرالنون از مایکوتوکسین‌هایی به شمار می‌آید که دارای اثرات زاینبار خونی است. زیرالنون با دوزهای ۵ mg/kg - ۱/۵ در موش صحرایی، باعث کاهش تعداد پلاکت‌ها می‌شود و در دوزهای ۳-۵ mg/kg آن موجب کاهش تعداد گلوبولهای قرمز و میزان هموگلوبولین خون می‌شود (۸،۹).

این مایکوتوکسین باعث افزایش معنی‌دار در فعالیت آنزیم‌های آسپارات آمینوترانسفراز و آلکالین فسفاتاز و کاهش معنی‌داری 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 میتوزن‌ها 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 culmorum*



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 نانوائی‌های شهرستان خرم‌آباد به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) ^۱ مد نظر قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی

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

نمونه گیری

پس از تهیه لیست نانوائی‌های شهرستان خرم‌آباد، با توجه به مطالعات قبلی ۳۰ نانوائی به صورت تصادفی ساده انتخاب شد و از هر نانوائی یک نمونه آرد گرفته شد. نمونه‌ها در طی فصل زمستان ۱۳۹۱، در شرایط مناسب به آزمایشگاه انتقال یافتند و تا زمان انجام آزمایش در شرایط برودتی مناسب نگهداری شدند.

اندازه گیری زیرالنون

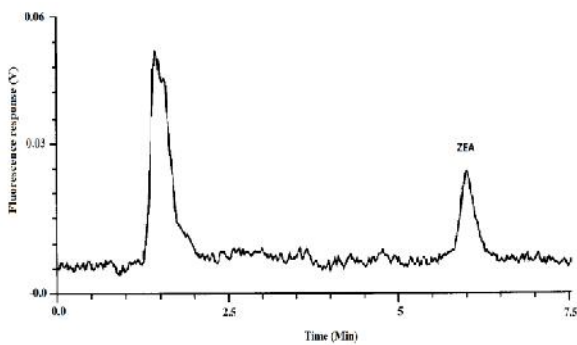
به ۲۰ گرم آرد، ۱۰۰ میلی لیتر حلال استخراج استونیتریل-آب (۹۰ به ۱۰) اضافه گردید. پس از یک ساعت

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 ایمینوآفینیتی 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 C₁₈ 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 ۱ ml/min 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

نمودار ۱، 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 ($P < 0.05$).

1. High Performance Liquid Chromatography



شکل ۳. کروماتوگرام نمونه ای از آرد آلوده به زیرالنون

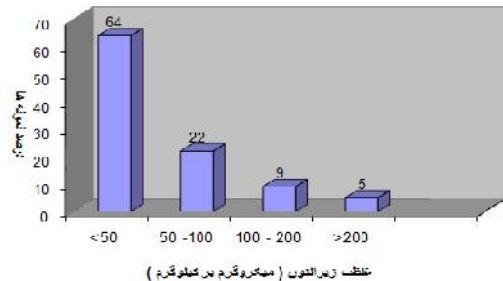
بحث و نتیجه گیری

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، می‌توانند دماهای بالا را که معمولاً برای پخت غذاها لازم است، تحمل کنند، بدون اینکه تغییری در ساختمان و فعالیت بیولوژیکی آنها ایجاد شود (۱۳).

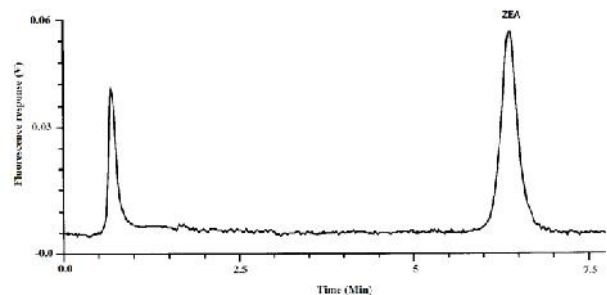
امورتاگ در بررسی که در سال ۲۰۰۸ بر روی پایداری زیرالنون انجام داد به مقاومت بالای آنها در فرایندهای حرارتی، آسیاب کردن، پختن و فراوری‌های صورت گرفته در دمای بالا اشاره کرد (۱۴).

۶۴ درصد از نمونه‌ها 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 نمونه‌های مورد بررسی آلوده به زیرالنون در سطوح تعیین شده

شکل ۲ کروماتوگرام استاندارد زیرالنون با غلظت $100 \mu\text{g/l}$ را نشان می‌دهد. مدت زمان بازداری زیرالنون $6/35$ دقیقه می‌باشد.



شکل ۲. کروماتوگرام استاندارد زیرالنون با غلظت $100 \mu\text{g/l}$

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.

در یک بررسی که توسط مانووا و ملادنووا و همکاران در سال ۲۰۰۹ انجام گرفت، میزان زیرالنون در مرکز غله و حبوبات بلغارستان مورد مطالعه قرار گرفت. میزان زیرالنون در ذرت ۱۴۸ میکروگرم بر کیلوگرم و در گندم ۳۶/۶ میکروگرم بر کیلوگرم بود (۱۹).

مطالعه‌ای که در سال ۲۰۰۲ توسط لیورنز و همکاران به صورت مقایسه آنالیز زیرالنون به دو روش HPLC-Fluorescence و HPLC-Photodiode انجام شد، نشان داد که روش fluorescence حد تشخیصی بهتری برای زیرالنون (۴ ng/g) دارد. در این بررسی جداسازی با ستون ایمنوفینیتی کارایی بالایی داشت (۲۰).

هدایتی با بررسی بر روی میزان مایکوتوکسین زیرالنون در گندم‌های انباری استان مازندران در سال ۱۳۸۱ به این نتیجه رسید که ۸۰/۵ درصد نمونه‌ها به زیرالنون آلوده بودند و ۶۴/۴ درصد نمونه‌ها حاوی بیش از ۲۰۰ میکروگرم بر کیلوگرم زیرالنون بودند (۲۱)، در حالی که در مطالعه حاضر تنها در ۵ درصد نمونه‌ها غلظت زیرالنون بیش از حد مجاز بود. با توجه با اینکه پوسته و سبوس گندم بیشتر در معرض آلودگی قارچی می‌باشد، به نظر می‌رسد این اختلاف در غلظت زیرالنون ناشی از نوع نمونه باشد. اداره استاندارد ایران میزان مجاز زیرالنون در نمونه‌های گندم مصرفی انسان را ۲۰۰ میکروگرم در کیلوگرم اعلام نموده است (۲۲). بر این اساس ۵ درصد نمونه‌ها در مطالعه حاضر بیشتر از حد مجاز آلودگی به زیرالنون را نشان دادند. البته برای مطمئن شدن از عدم وجود این مایکوتوکسین در هر یک از نمونه‌های غذایی لازم است کار بر روی نمونه‌هایی که زمان بیشتری را در انبار مانده‌اند و نیز در محدوده زمانی بیشتری انجام شود. تا نتایج با اطمینان بیشتری گزارش شوند در ضمن با توجه به اینکه وجود همزمان مایکوتوکسین‌ها در مواد غذایی در مقادیر

قارچها برای رشد خود نیاز به یکسری مواد دارند که معمولاً این مواد در فراورده‌های غذایی یافت می‌شود، نیز برای رشد و تولید مایکوتوکسین به میزانی از رطوبت، دما و گذشت زمان نیاز دارند زیرا بیشترین میزان سم، چند روز پس از رشد قارچ تولید می‌شود، در نتیجه معمولاً میزان سم در محصولات انبار شده بیشتر خواهد بود. به همین دلیل، کنترل شرایط ذخیره سازی و فراوری مواد غذایی، برای پیشگیری از تولید سم لازم است (۱۳، ۱۵).

با توجه به اینکه فراوانی دو گونه فوزاریوم یاد شده تحت تأثیر شرایط جغرافیای آب و هوایی قرار دارد، عامل دیگر احتمالاً شرایط نگهداری این گندم‌ها در سیلوهای موجود در کارخانجات است زیرا میزان رطوبت مکان ذخیره با تولید سم ارتباط زیادی دارد.

مطالعه مزس و همکاران، این رابطه را در مورد شرایط نگهداری نشان می‌دهد. در این مطالعه که بر روی ذرت انجام شده بود، وی میزان زیرالنون را در ذرت‌های تازه برداشت شده ۶-۷۹ ppb - اندازه‌گیری نموده است در حالیکه میزان زیرالنون را ذرت‌های انبار شده ppm ۱۱/۸ - ۰/۱ گزارش کرده است (۱۶).

در تحقیقی که بالیوکونین و همکاران بر روی گندم‌های موجود در سه نوع انبار با سایزهای متفاوت، زیرالنون را اندازه‌گیری کرده است و بیشترین مقدار زیرالنون را در انبارهایی که سایر کوچکتر دارند ppm ۵/۰۱ گزارش کرده 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، میانگین میزان این مایکوتوکسین به ترتیب برای گندم و ذرت ۳۵ و ۱۱۲ میکروگرم بر کیلوگرم بود (۱۸).

پائین تر از حد مجاز می تواند اثرات زیانباری داشته باشد باید به وجود دیگر مایکوتوکسین ها نیز توجه کرد.

روش هایی برای پیشگیری از آلودگی مواد غذایی به کپک های مولد زیرالنون وجود دارد. مثلاً رشد میسلیمی، 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 نمونه ها 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 بر کیلوگرم 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 نمی توان 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 می گردد.

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 zearalenone 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. Fumonisin, 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.