

بررسی وضعیت آلودگی به آفلاتوکسین و نوع و مقدار مانده آفت کش ها در مغز پسته

چکیده:

استان سمنان با مجموع بیش از 19 هزار هکتار باغ پسته به عنوان یکی از مهمترین مناطق پسته کاری کشور محسوب می شود. آفات پسته همواره یکی از عوامل خسارتزا در باغ های پسته بوده که یکی از راه های کنترل آنها استفاده از آفت کش ها می باشد. دلایل متعددی از جمله طغیان آفات پسته، تنوع سموم مصرفی، استفاده بی رویه از آفت کشها و مقاومت آفات به سموم، منجر به استفاده بی رویه باغداران از آفت کش ها و باقیمانده آنها در محصول تولیدی گردیده است. تحقیق حاضر با هدف ارزیابی نوع و میزان آفت کش ها در نمونه های پسته باغ های شهرستان دامغان به عنوان مهمترین منطقه تولید پسته استان سمنان انجام شد. بدین منظور، از چهار منطقه عمده تولید پسته دامغان نمونه هایی از ترمینالها و کارگاه های فرآوری پسته تهیه شده و آنالیز نوع و میزان آفت-کش های باقیمانده با روش کروماتوگرافی گازی- اسپکترومتر جرمی GC-MS و LC/MS/MS انجام شد. همچنین به منظور مطالعه آلودگی احتمالی پسته های نمونه برداری شده به آفلاتوکسین، آلودگی نمونه ها به آفلاتوکسین به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این تحقیق حاکی از وجود باقیمانده 11 نوع آفت کش در نمونه های پسته بوده که در بین آفت کش های ردیابی شده، میزان دو آفت کش استامی پراید و ایمیداکلوپراید و MRL (حداکثر باقیمانده مجاز) آنها به ترتیب به میزان $0/1359 \text{ mg/kg}$ (MRL $0/05 \text{ mg/kg}$) و $0/3448 \text{ mg/kg}$ (MRL $0/07 \text{ mg/kg}$) تعیین گردید که بالاتر از حد استاندارد اتحادیه اروپا بود. به طور کلی، شاخص MRL 9 نمونه ($17/3\%$) آفت کش ها بالا و در بقیه نمونه ها، همه آفت کش ها کمتر از میزان شاخص MRLs بودند. همچنین با ارزیابی مقدار آفلاتوکسین در نمونه های پسته، مشخص گردید که از 52 نمونه مورد آزمایش، 9 نمونه به آفلاتوکسین آلودگی داشتند که آلودگی 8 نمونه کمتر از حد مجاز و آلودگی یک نمونه بالاتر از حد مجاز بود. به عبارت دیگر آلودگی $1/92\%$ نمونه های جمع آوری شده به آفلاتوکسین بیشتر از حد مجاز بود. در 9 نمونه آلوده، 2 نمونه به آفلاتوکسین B_1 ، 3 نمونه به آفلاتوکسین های B_1 و B_2 ، 1 نمونه به آفلاتوکسین های B_1, B_2, G_1 ، 2 نمونه به آفلاتوکسین های B_1, B_2, G_1 و G_2 و 1 نمونه به آفلاتوکسین های B_1 و G_1 آلوده بودند.

واژه های کلیدی: پسته، دامغان، آفت کشها، کروماتوگرافی گازی، آفلاتوکسین، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

مقدمه :

آنالیز باقیمانده آفت کش در مواد غذایی و سایر کالاهای زیست محیطی یک نیاز ضروری برای مصرف کنندگان، تولید کنندگان، ناظران مواد غذایی و مراجع ذی صلاح تعیین استانداردهای ایمنی مواد غذایی است. ایران یکی از بزرگترین تولید کنندگان و صادر کنندگان پسته در جهان است. همچنین پسته یکی از مهمترین مغزهای درختی در سبد غذایی ایرانی هاست. آفت کش ها، ترکیبات شیمیایی هستند که برای ممانعت، نابودی و یا کاهش آفات در محصولات کشاورزی استفاده می گردند. وجود مانده آفت کش ها در محصولات و مولفه های محیطی، دارای اثرات جبران ناپذیر بر سلامتی مصرف کنندگان است. این اثرات به دو دسته حاد و مزمن دسته بندی شده اند. کمبود اطلاعات در زمینه وجود باقیمانده آفت کش ها در خشکبار بر صادرات آنها تاثیر گذار است. از آنجا که آفت کش ها ممکن است در زراعت دانه های پسته استفاده شود، لذا کنترل آن به منظور حفاظت مصرف کنندگان از اثرات مضر آنها ضروری است. این موضوع از نظر مراجع ذی صلاح قانون گذار برای مدیریت مناسب مصرف آفت کش ها و پایش آنها به منظور تعیین حدود مجاز استاندارد و نیز ارزیابی وضعیت بهداشت، سلامت و ایمنی پسته تولیدی و مصرفی لازم است. در زمینه باقیمانده آفت کش ها در پسته پژوهش های اندکی در سراسر جهان انجام گردیده است. در ایران نیز بانک اطلاعاتی در خصوص باقیمانده آفت کش ها در پسته ایران وجود ندارد. با توجه به اینکه توسعه صادرات پسته به عنوان یک محصول

استراتژیک برای کشور اهمیت دارد، لازم است تحقیقات میدانی در خصوص تعیین باقیمانده سموم پسته، با نمونه برداری های گسترده در کشور انجام گیرد.

طغیان آفات پسته، تنوع سموم آفت کش و مقاومت آفات کشاورزی به سموم شیمیایی، منجر به استفاده بی رویه باغداران از آفت-کش ها جهت تولید پسته گردیده است. در حال حاضر آفت کش هایی از قبیل دارتون، اندوسولفان، تیومتوکسام، استامی پراید، اتیون، دیازینون، ارگانوکلرین و مورد استفاده قرار می گیرند. سموم آفت کش با نام های تجاری مختلف از جمله آکتارا، کنفیدور، موسپیلان و غیره که ترکیبات متفاوتی دارند در سطح عرضه وجود دارند، و اکثر باغداران با اطلاعات ناکافی و بدون توجه به ترکیب آفت کش و زمان مناسب مصرف و نیز دوره تجزیه آفت کش، آنها را مورد استفاده قرار می دهند. امکانات آزمایشگاهی اندازه گیری مقدار و آنالیز نوع آفت کش در کشور محدود است و پایش باقیمانده آفت کش نیاز به هزینه زیاد دارد و این امر توسط مدیریت جهاد کشاورزی، سالانه در مناطق پسته خیز، با تعداد نمونه اندک انجام می گیرد. بنابراین آمار و ارقام معتبر و قابل استنادی از باقیمانده آفت کش در پسته تولیدی ایران و نیز استان سمنان در دسترس نمی باشد.

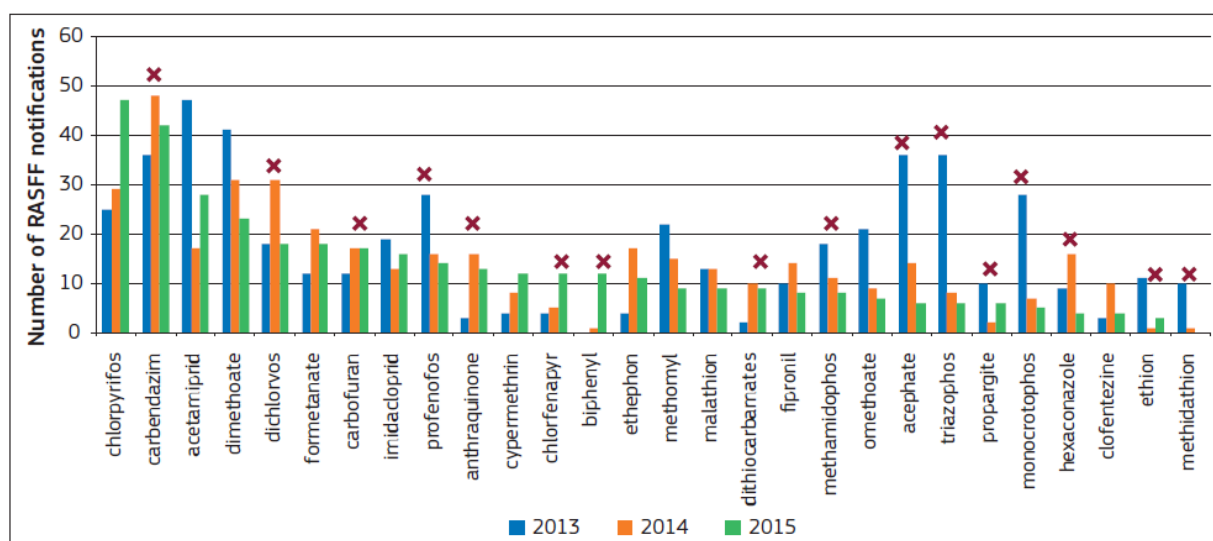
عدم رعایت فاصله زمانی مناسب میان مصرف آفت کش ها تا عرضه پسته به بازار توسط تولید کنندگان پسته و نیز سایر محصولات کشاورزی سبب شده که وجود باقیمانده آفت کش ها در محصولات کشاورزی در سطح عرضه یکی از بحران های ایمنی این مواد غذایی در سطح کشور باشد. اداره استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران برای انواع آفت کش ها حدود مجاز تعیین نموده است. استان سمنان از نظر سطح زیر کشت پسته پس از استان های کرمان، یزد، خراسان رضوی و فارس قرار دارد. از آنجا که اطلاعات جامعی در زمینه باقیمانده آفت کش ها و نیز نوع آنها در پسته تولیدی استان سمنان در دسترس نمی باشد. لذا ضروری است که نمونه های پسته تولیدی این استان در شهرستان دامغان، که اصلی ترین منطقه تولید کننده پسته استان سمنان است، از نظر باقیمانده آفت کش مورد بررسی قرار گیرد.

بررسی منابع:

وجود باقیمانده آفت کش ها در محصولات غذایی همانند وجود پاتوژن ها، رنگ های غیر مجاز، مایکوتوکسین ها، آلرژن ها جزء عوامل بحرانی و به عنوان مخاطره غذایی (Food Hazard) در تضمین ایمنی مواد غذایی در سراسر جهان مطرح می باشد. سیستم اعلام خطر سریع مواد غذایی (RASFF (Rapid Alert System for Food and Feed اروپا سالانه گزارش های زیادی از وجود باقیمانده آفت کش ها در محصولات غذایی که از سطح عرضه در سطح دنیا فراخوانی شده اند (Food recall) ثبت نموده است. برای مثال این سیستم در سال 2016 وجود مانده ایزوفوفوس متیل (0.05 ppm) در تخمه کدو (از کشور چین)، در سال 2015 مانده پروپامامو کارب (0/048 و 0/087) در نوعی غذا و مانده کاربندازیم (0/031) در تخمه چینی (از کشور چک)، در سال 2014 مانده ایپیرودیون (0/07) در بادام (از کشور آمریکا)، مانده کلروپیروفس (0/09) در دانه روغنی (از کشور نیجریه) و مانده مالاتیون (0/049) در تخمه کدو (از کشورهای آلمان، دانمارک و چین) را ثبت نموده است (Gupta, 2004; RASFF, 2016). شکل 2 گزارش های باقیمانده آفت کش در مواد غذایی در سال های 2013، 2014 و 2015 ثبت شده توسط RASFF را نشان می دهد. همانگونه که در شکل مشخص است موارد زیادی از وجود آفت کش های تایید نشده در مواد غذایی ثبت گردیده است. این امر بیانگر آن است که تولید کنندگان مواد غذایی از آفت کش های متنوعی برای مبارزه با آفات بدون توجه به تاییدیه های قانونی مصرف این ترکیبات استفاده می کنند.

مصرف آفت کش ها در جهان در حدود 2 میلیون تن در سال است که 24٪ آن در آمریکا، 45٪ در اروپا و 25٪ در سایر نقاط جهان مصرف می شود. در این میان 47/5٪ آفت کش های مورد استفاده علف کش، 29/5٪ حشره کش، 17/5٪ قارچ کش و 5/5٪ آن سایر موارد مصرف بوده است. یکی از موانع در مسیر مستندسازی و گردآوری اطلاعات جامع در زمینه مصرف آفت-

کش‌ها عدم اطلاعات سیستمیک و قابل اعتماد و در دسترس در زمینه مسمومیت‌ها و بیماری‌های ایجاد شده در اثر مصرف آنهاست (Gupta, 2004).



شکل 1: گزارشات باقیمانده آفت‌کش در مواد غذایی در سال‌های 2013، 2014 و 2015 ثبت شده توسط RASFF. مواردی که با × مشخص شده اند شامل آفت‌کش‌های تایید نشده در اروپا می باشند.

بیش از 800 نوع ترکیب آفت‌کش برای کنترل آفات ناخواسته کشاورزی استفاده می‌شود. مطالعات نشان داده برخی از روش‌های فرآوری مواد غذایی از قبیل حرارت دهی (حرارت‌های بالا) و استفاده از ترکیبات نگهدارنده اثر تجزیه‌کننده بر برخی ترکیبات آفت‌کش دارند اما آنالیز و کنترل باقیمانده آفت‌کش در محصولات کشاورزی که بصورت خام یا با فرآوری اندک استفاده می‌شوند بسیار ضروری است. (López et al., 2009).

بطور کلی برای پایش ترکیبات ناخواسته در مواد غذایی از قبیل مایکوتوکسین‌ها، آفت‌کش‌ها، آنتی بیوتیک‌ها، هورمون‌های گیاهی و داروهای دامی از آنجا که این ترکیبات به دسته‌های متفاوت مواد شیمیایی تعلق دارند می‌بایست از روش‌هایی استفاده شود که بتوانند طیف وسیعی از ترکیبات را شناسایی کنند. برای جداسازی متداول‌ترین روش استفاده از انواع مختلف کروماتوگرافی شامل کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)، کروماتوگرافی مایع با کارکرد عالی (HPLC)، کروماتوگرافی گازی (GC) و الکتروفورز موئینه (CE) می‌باشد. بر اساس ماهیت این آلاینده‌ها برای تشخیص و تعیین مقدار آنها استفاده از TLC و GC به همراه اسپکترومتر جرمی (MS) در سال‌های اخیر بسیار استفاده می‌شود. (Danezis et al., 2016).

باقیمانده آفت‌کش‌ها و نیز ترکیبات باقیمانده حاصل از تجزیه آنها در مواد غذایی خطر آفرین محسوب می‌شود، لذا بکارگیری روش‌هایی که امکان کنترل چندین نوع آفت‌کش (multi - residue) را در یک آنالیز امکان پذیر می‌سازد اساساً اصلی‌ترین استراتژی کاربردی می‌باشند. با استفاده از این روش‌ها می‌توان انواع مختلف آفت‌کش از جمله علف‌کش، قارچ‌کش و حشره‌کش را تشخیص و تعیین مقدار نمود. یکی از متداولترین روشهای multi-residue روش کروماتوگرافی گازی - اسپکترومتر جرمی می‌باشد (Danezis et al., 2016; López et al., 2009).

Pandy و همکاران (2010)، در کشور هند میزان آفت‌کش‌های ارگانوکلره (DDT، اندوسولفان و HCH) در پسته، بادام زمینی، گردو، نارگیل و انجیر را با روش کروماتوگرافی گازی - آشکار ساز احتباس الکترون (ECD) اندازه‌گیری نمودند. نتایج نشان داد مقادیر HCH در دامنه 0/700 - 1/328 و DDT برابر ND - 14/0 و برای اندوسولفان برابر ND - 091/0 میلی گرم بر

کیلوگرم بود. در کشور هند استاندارد برای مقدار باقیمانده آفت کش ها در خشکبار و مغزها وجود ندارد. این پژوهشگران معتقدند مقادیر کم آفت کش ممکن است در اثر آلودگی محیطی باشد تا تماس مستقیم با آفت کش (Pandey *et al.*, 2010). Cortes و همکاران (2008)، با روش کروماتوگرافی گازی-کروماتوگرافی مایع فاز معکوس آنالیز (GC-RPLC) به آنالیز آفت کش ها در مغزهای آجیلی پرداختند. برای استخراج آفت کش از بافت مغزهای خوراکی با توجه آنکه دارای 50 الی 70 درصد چربی می باشند از اتیل استات و سدیم سولفات استفاده نمودند. برای جداسازی باقیمانده آفت کش از سایر ترکیبات از کروماتوگرافی با کارایی بالا استفاده گردید. کاربرد این روش برای آنالیز آفت کش در پسته، بادام زمینی، گردو، فندق و دانه آفتابگردان پیشنهاد شده است (Cortes *et al.*, 2008).

امامی و همکاران (2015)، برای آنالیز باقیمانده آفت کش (12 نوع آفت کش) در پسته یک روش سریع، ساده و ارزان همراه با ایمنی بالا با استفاده از کروماتوگرافی گازی-اسپکترومتر جرمی معرفی و بهینه سازی نمودند. باقیمانده آفت کش های اتیون، کارباریل، فیتروتیون، فنتیون، کلروپیروفس، دیازینون، آلفا-اندوسولفان، بتا-اندوسولفان، پرمترین و فوزالون در پسته انجام شد. میزان بازیافت (81/40-93/08 درصد) و تکرارپذیری این روش برای آفت کش ها منطبق بر محدوده دستورالعمل تدوین شده توسط کمیسیون اتحادیه های اروپا (2006) بود. بنابر این به عنوان یک روش مرجع جهت آنالیز باقیمانده آفت کش در پسته و مغزها مطرح می باشد.

Husain و همکاران (2003)، باقیمانده آفت کش های دیازینون و اتیون را در دانه پسته با استفاده از روش دیسپرسیون فاز جامد به همراه کروماتوگرافی گازی اندازه گیری نمودند. در این بررسی میزان بازیافت برای اتیون 95 درصد و برای دیازینون 94 درصد بدست آمد. بر اساس نتایج، روش مورد استفاده می تواند با دقت بالایی آفت کش موجود در پسته را ردیابی و تعیین مقدار نماید (Husain *et al.*, 2003).

در مطالعه دیگری Nuapia و همکاران (2016)، باقیمانده آفت کش را در 120 نمونه مواد غذایی خام شامل لوبیا، کاهو، گوشت گاو و ماهی نمونه برداری شده از بازار آفریقا با روش GC-MS بررسی گردید. بالاترین باقیمانده آفت کش (DDE) در نمونه گوشت گاو برابر 253/58-4/78 و کمترین باقیمانده (BHC) در لوبیا برابر 38/54-4/88 میکروگرم بر کیلوگرم بدست آمد. همچنین نتایج آنان نشان مقدار آفت کش های ارگانوکلره در تمامی نمونه های جمع آوری شده بالاتر از میزان استاندارد بود. Wanwimolruk و همکاران (2015)، نوع و باقیمانده آفت کش را در 117 نمونه کلم چینی جمع آوری شده از بازار محلی ایالات مختلف کشور تایلند با بکارگیری روش GC-MS-MS ارزیابی نمودند. در 85 درصد نمونه ها 12 نوع نمونه تشخیص داده شد. مانده آفت کش های، کارباریل، ولتامترین، دیازینون، فنوالات و مالاتیون در نمونه ها کمتر از مرز بیشینه مانده آفت-کش ها (MRL) بود و در 34 نمونه باقیمانده آفت کش های کربوفوران، کلروپیروفس، کلروتالونیل، سیپرومترین، دی متوات، متا الاکسیل و پروفنوفوس بیشتر از MRL بود. به طور کلی 29 درصد میزان آفت کش های تعیین مقدار شده بالاتر از MRL بودند که این میزان بیشتر از میزان تعیین شده برای کشورهای توسعه یافته است. این محققین پایش مستمر باقیمانده آفت کش را برای کاهش ریسک خطر سلامت جامعه ضروری می دانند.

Petrarca و همکاران (2016)، در 22 نمونه غذای کودک بر پایه میوه آماده مصرف نمونه برداری شده بصورت تصادفی از پنج فروشگاه مواد غذایی در یکی از شهرهای برزیل، باقیمانده آفت کش های متعلق به دسته های مختلف (Multi class pesticide) با روش GC-MS را اندازه گیری نمودند. 14 نوع آفت کش شناسایی شد که میزان پروسیمدون بیشتر از MRL بود. با توجه به اهمیت نوع ماده غذایی و مصرف کننده (نوزادان) آن پایش آفت کش بسیار با اهمیت است.

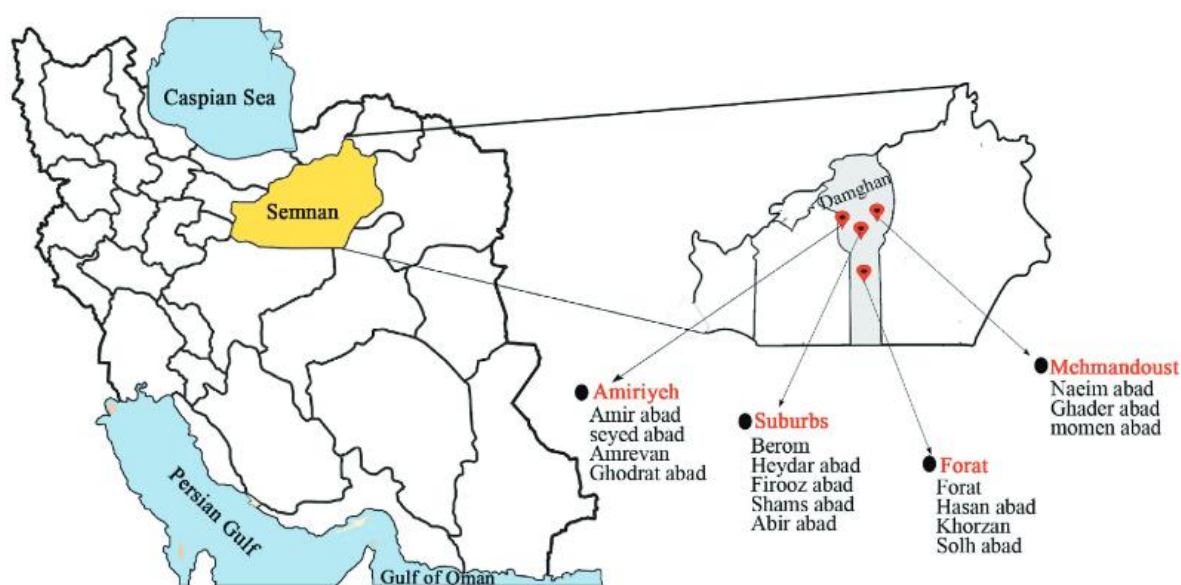
مواد و روش‌ها:

مواد شیمیایی

تمامی حلال‌هایی که در مراحل پاکسازی و استخراج در این تحقیق استفاده شدند، analytical grade بوده و از شرکت مرک (آلمان) تهیه شده بود. استانداردهای آفت کش (خلوص 99٪) نیز از شرکت سیگما (آمریکا) تهیه شد.

نمونه برداری پسته

از چهار منطقه مهم تولید پسته در دامغان یعنی شامل امیریه (از روستاهای امیرآباد، سیدآباد، مروان، قدرت آباد)، مهماندوست (نعیم آباد، قادرآباد و مومن آباد)، حومه دامغان (برم، حیدرآباد، فیروزآباد، شمس آباد و عبیرآباد) و منطقه فرات (فرات، حسن آباد، خورزان و صلح آباد)، 52 نمونه پسته (هر نمونه 3 کیلوگرم) به صورت تصادفی تهیه شد (شکل 2).



شکل 2: چهار منطقه مهم پسته کاری شهرستان دامغان، به عنوان مناطق نمونه برداری پسته

برای نمونه برداری از دستگاه نمونه بردار بامبو استفاده شد. برای هر نمونه، یک برگه مشخصات شامل محل و تاریخ نمونه برداری، مقدار و رقم پسته، منشأ یا باغ تولید پسته، اطلاعاتی در زمینه آفت کش (زمان و نوع مصرف آفت کش) و باغدار و محل باغ، تنظیم و تکمیل گردید. نمونه‌ها از ترمینالها و کارگاه‌های فرآوری پسته، از آخرین مرحله فرآوری، از روی میدان آفتابی تهیه شد. پس از کدگذاری نمونه‌ها جهت آنالیز باقیمانده آفت کش‌ها توسط GC-MS به آزمایشگاه منتقل گردید. پس از انجام آنالیز نمونه‌ها، نتایج حاصل تفسیر و تحلیل آماری گشته و با استانداردهای مربوطه مقایسه شد.

آماده سازی نمونه‌های پسته جهت تعیین باقیمانده آفت کشها:

نمونه‌های پسته برای شناسایی باقیمانده آفت کش‌ها بر طبق استانداردهای موسسه استاندارد ملی ایران (ویژه مواد غذایی با منشأ گیاهی) آماده شدند. استخراج و پاکسازی بر اساس شیوه SPE-QuEChERS انجام شد، 10 گرم مغز پسته آسیاب شده در تیوپ های 50 میلی لیتری سانتریفوژ قرار گرفت و به آن 10 میلی لیتر استونیتریل برای استخراج اضافه شد. سپس، ترکیبی شامل 1 گرم

NaCl، 4 گرم، $MgSO_4$ ، 1 گرم سترات سدیم دهیدرات و 0/5 گرم di-sodium hydrogen citrate sesquihydrate به تیوپ‌ها اضافه شد و نمونه‌ها با استفاده از ورتکس کاملاً مخلوط شدند. سپس نمونه‌ها به مدت 5 دقیقه با سرعت 3000 دور در دقیقه (rpm) سانتریفوژ شده و عصاره به یک فالكون حاوی 150 میلی گرم $MgSO_4$ و 50 میلی گرم جاذب آمینی و 50 میلی گرم C18 اضافه شد. مخلوط درون تیوپ با ورتکس به مدت 1 دقیقه ترکیب شد و دوباره به مدت 5 دقیقه با سرعت 3000 دور در دقیقه و در دما 5- درجه سلسیوس سانتریفوژ شدند. مخلوط با اضافه کردن اسید فرمیک 5٪ در استونیتریل (10 میکرولیتر در هر میلی لیتر عصاره) اسیدی شده و عصاره‌ها به منظور بررسی باقیمانده آفت کش با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی-اسپکترومتر جرمی (GC/MS) و کروماتوگرافی مایع-اسپکترومتر جرمی (LC/MS/MS) آنالیز گردید.

کروماتوگرافی گازی-اسپکترومتر جرمی GC-MS

آنالیز کروماتوگرافی گازی با استفاده از تکنولوژی کمپانی اجیلنت (Agilent) آمریکا، مدل B7890 کوپل شده با طیف سنج جرمی A5977 انجام گرفت. گاز حامل هلیوم با جریان 0/1 ml/min و برنامه دمایی از 70 درجه سانتیگراد شروع و تا دمای نهایی 320 درجه سانتیگراد با سه سطح دمایی تنظیم شده بود.

کروماتوگرافی مایع-اسپکترومتر جرمی (LC/MS/MS).

آنالیز (LC-MS/MS) با استفاده از یک Quattro micro™ میکرو کواترو کوپل شده با طیف سنج جرمی چهارقطبی محصول کمپانی اجیلنت آمریکا، انجام گرفت. ستون UPLC BEH C18 جهت جدا نمودن آنالیز به کار گرفته شد. حلال مورد استفاده، مخلوط متانول/آب با جریان 0/45 ml/min بود. ردیابی آنالیز MS بر طبق دستورالعمل‌های کمیسیون اروپا مورد تاکید قرار گرفت.

کنترل کیفی و اعتبارسنجی شیوه

بر پایه دستورالعمل‌های SANTE، فرآیند پیشنهادی برای آنالیز باقیمانده آفت کش در نمونه‌های پسته ارزیابی شد. نمونه‌های پسته خالی دامنه‌ای از 0/01 تا 0/25 mg/kg داشته و منحنی‌های کالیبراسیون برای هر ترکیب آفت کش رسم شد. محدودیت شناسایی (LOD) و محدودیت کمیت سنجی (LOQ) هر ترکیب تعیین شد. همچنین، بازیابی (بازیافت) هر آفت کش به روش تهیه غلظت‌های متفاوت از محلول‌های آفت کش استاندارد (50، 100، 150 و 200 $\mu\text{g/ml}$) اندازه‌گیری شد.

مطالعه آلودگی پسته‌های نمونه‌برداری شده به آفلاتوکسین به روش HPLC:

به منظور مطالعه آلودگی احتمالی پسته‌های نمونه‌برداری شده به آفلاتوکسین، آلودگی نمونه‌های جمع‌آوری شده به آفلاتوکسین مورد بررسی قرار گرفت. برای تعیین میزان آفلاتوکسین در نمونه‌های پسته، ابتدا نمونه‌های پسته برای خشک شدن در حرارت 60 درجه سانتی‌گراد به مدت 24 ساعت در آون قرار داده شد. پس از خشک شدن و خارج نمودن نمونه‌ها از آون، نمونه‌ها توسط مخلوط‌کن به مدت 2 دقیقه با دور تند آسیاب شد. جهت انجام آزمایش و سنجش میزان آلودگی نمونه‌ها به انواع آفلاتوکسین از روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)، استفاده شد.

آنالیز آفلاتوکسین نمونه‌ها با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) (Waters, USA) طبق روش ذیل انجام گردید. برای آنالیز آفلاتوکسین‌ها (AF) در پسته، ابتدا نمونه‌های پسته با آب به نسبت 1 به 3 با استفاده از دستگاه slurry به مدت 15 دقیقه مخلوط گردید، سپس 30 گرم از نمونه slurry با 90 میلی لیتر متانول خالص مخلوط شده و استخراج با استفاده از دستگاه آسیاب waring به مدت 3 دقیقه انجام گردید. مایع به دست آمده با استفاده از فیلتر صاف گردیده و 8 میلی لیتر از

آن با 42 میلی لیتر بافر فسفات مخلوط شد. برای خالص سازی نمونه از ستون های حاوی آنتی بادی بنام ستون های ایمونوآفینیتی استفاده گردید. ابتدا برای آماده سازی ستون، 20 میلی لیتر بافر فسفات از ستون عبور داده شد، سپس 25 میلی لیتر از عصاره مخلوط شده با بافر فسفات از ستون عبور داده شد و مجدداً ستون با 20 میلی لیتر بافر فسفات شسته شد. پس از خشک کردن ستون 500 میکرولیتر متانول با درجه خلوص کروماتوگرافی مایع از ستون عبور داده شد و پس از 1 دقیقه توقف، مجدداً 750 میکرولیتر از متانول از ستون عبور داده شد. پس از جمع آوری کل فاز متانول، 1750 میکرولیتر آب به آن اضافه گردید و نهایتاً 200 میکرولیتر از آن به دستگاه HPLC تزریق شد. برای آنالیز AF موجود در نمونه، از ترسیم منحنی کالیبراسیون با استفاده از استانداردهای خالص AF استفاده گردید. بدین منظور هفت غلظت مختلف از AFB₁ در محدوده غلظتی 0/4 ng/ml تا 2/7ng/ml تهیه و 200 میکرولیتر از آنها به دستگاه HPLC تزریق گردید و بر مبنای معادله خط به دست آمده، غلظت AF در نمونه ها محاسبه گردید. در مورد دستگاه HPLC فاز متحرک، متانول/آب به میزان 40 به 60 و برای مشتق سازی از برمید پتاسیم، اسید نیتریک و دستگاه کبراسل استفاده گردید. ستون مورد استفاده (partisil 5 ODS3 ساخت آمریکا) ستون کرومولیت (10cm) و قطر داخلی آن 4/6 میلی متر بود. دمای ستون در هنگام آنالیز روی 35 درجه سلسیوس تنظیم شد و سرعت جریان فاز متحرک 2/5 ml/min بود و آشکارساز مورد استفاده آشکارساز فلورسانس و طول موج برانگیختگی و نشر آن به ترتیب برابر 365nm و 435nm بود. (Mohammadi Moghadam *et al.*, 2020).

نتایج:

همانگونه که در جدول 1 نشان داده شده، در کل 11 نوع آفت کش در نمونه های پسته با استفاده از دو روش GC/MS و LC/MS/MS تشخیص داده شد. میزان MRL اتحادیه اروپا برای هر آفت کش شناسایی شده در نمونه ها، در جدول 1 آمده است که برای تفسیر داده های باقیمانده آفت کش به کار رفت. همچنین، LODs و LOQs که نشان دهنده حساسیت شیوه ها هستند برای ارزیابی آفت کش ها حتی در غلظت های بسیار پایین MRL تعیین شده به کار گرفته شدند. ضریب رگرسیون (r^2) برای برآورد شیوه محاسبه شد. بر پایه منحنی های استاندارد به دست آمده، خطی بودن آنها نشان دهنده واقعی بودن نتایج و ارزیابی ها بود (جدول 1). شاخص های بازیافت به عنوان میانگین گزارش شدند و RSD در جدول 1 داده شده است. داده های بازیافت به دست آمده در این مطالعه در یک دامنه مورد قبول از 71/5٪ برای پرمترین تا 94/5٪ برای اتیون بودند. تعیین سطح آلودگی به آفت کش در نمونه های پسته نشان داد که 30/4٪ از آفت کش شناسایی نشدند و 69/6٪ از آفت کش بالای LODs قرار داشتند. میزان 71/4٪ از همه آفت کش های ردیابی شده بالای LOQs قرار داشتند، به جز اندوسولفان آلفا (0/0035 mg/kg)، اندوسولفان بتا (0/0034 mg/kg) و آمیتراز (0/0037 mg/kg) که متوسط باقیمانده کل بالای LOQ بود (0/004 mg/kg).

جدول 1: MRLs تعیین شده توسط اتحادیه اروپا و اعتبارسنجی شیوه GC-MS و LC/MS/MS برای آنالیز باقیمانده آفت کش در نمونه های پسته

Recovery Mean±RSD %	Regression coefficient r ²	LOQ mg/kg	LOD mg/kg	EU MRL mg/kg	گروه شیمیایی	فرمول شیمیایی	ترکیب
89.32 ± 1.80	0.996	0.0040	0.0001	0.01	Organophosphates	C ₉ H ₁₁ Cl ₃ NO ₃ PS	Chlorpyrifos
75.23 ± 2.3	0.996	0.0040	0.0001	0.02	Organophosphates	C ₁₂ H ₂₁ N ₂ O ₃ PS	Diazinon
87.94 ± 1.40	0.995	0.0040	0.0001	0.02	Organophosphates	C ₁₀ H ₁₃ O ₃ PS ₂	Fenthion
94.52 ± 2.80	0.998	0.0040	0.0001	0.02	Organophosphates	C ₉ H ₂₂ O ₄ P ₂ S ₄	Ethion
88.21 ± 1.92	0.999	0.0040	0.0001	0.02	Organophosphates	C ₉ H ₁₂ NO ₅ PS	Fenitrothion
85.56 ± 1.65	0.999	0.0040	0.0001	0.1	Organochlorines	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S	ndosulfan- alpha
88.64 ± 2.69	0.995	0.0040	0.0001	0.1	Organochlorines	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S	Endosulfan- beta
84.89 ± 3.82	0.996	0.0040	0.0001	0.1	Organochlorines	C ₉ H ₆ Cl ₆ O ₃ S	Endosulfan- Total

71.54 ± 3.40	0.998	0.0040	0.0001	0.05	Pyrethroid	C ₂₁ H ₂₀ Cl ₂ O ₃	Permethrin II
80.78 ± 2.60	0.998	0.0040	0.0001	0.05	Pyrethroid	C ₂₁ H ₂₀ Cl ₂ O ₃	Permethrin- Total
81.34 ± 3.51	0.999	0.0020	0.0004	0.07	Chloropyridinylneonicotinoids	C ₁₀ H ₁₁ ClN ₄	Acetamiprid
76.89 ± 1.98	0.997	0.0040	0.0002	0.05	Neonicotinoids	C ₉ H ₁₀ ClN ₂ O ₂	Imidacloprid
81.74 ± 2.47	0.994	0.0010	0.0002	0.02	Neonicotinoids	C ₁₀ H ₉ ClN ₄ S	Thiacloprid
91.22 ± 1.31	0.998	0.0040	0.0001	0.05	Nicotinoids	C ₁₉ H ₂₃ N ₃	Amitraz

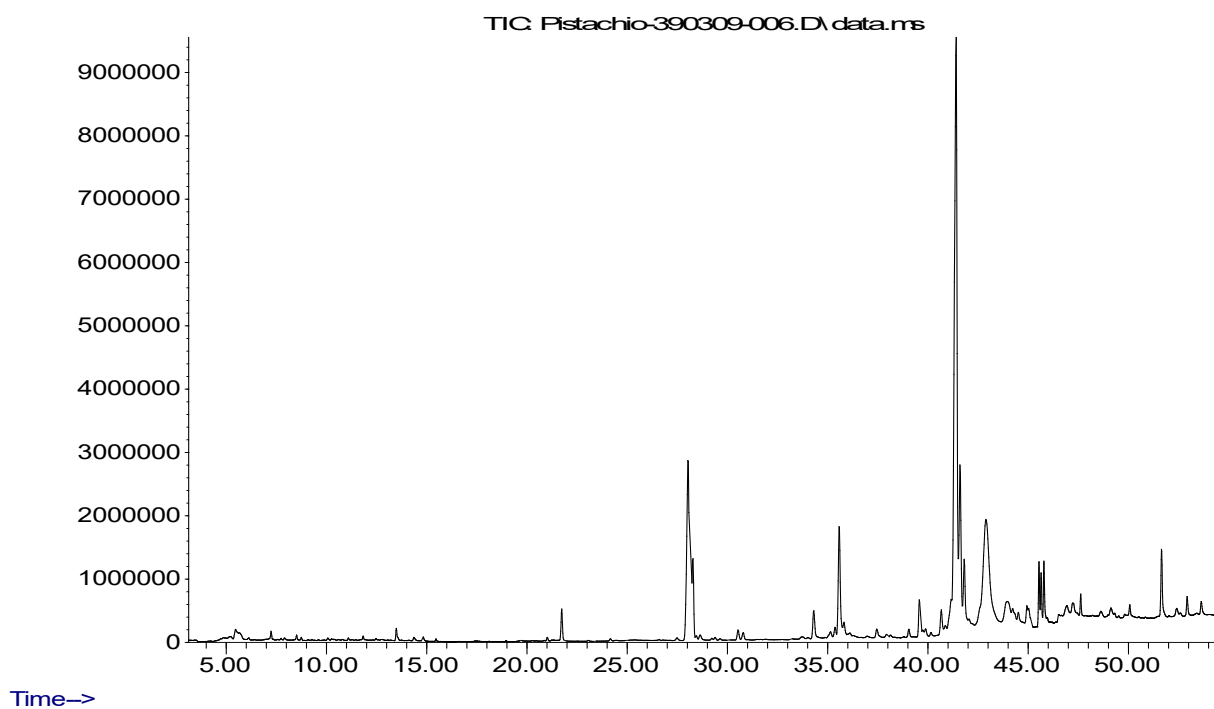
LOD: Limit of Detection (mg/kg) LOQ: Limit of Quantification (mg/kg) RSD: Relative Standard Deviation EU: European Union MRLs: Maximum Residue Limits.

سطوح میانگین باقیمانده آفت کش به دست آمده در نمونه‌های پسته (mg/kg) در مورد انواع آفت کش، $0/0004 \pm 0/007$ برای کلروپیروفوس، $0/0001 \pm 0/005$ برای دیازینون، $0/0001 \pm 0/006$ برای فنتیون، $0/0004 \pm 0/008$ برای اتیون، $0/0003 \pm 0/006$ برای فنیتروتیون، $0/0002 \pm 0/003$ برای اندوسولفان آلفا، $\pm 0/00015$ برای اندوسولفان بتا، $\pm 0/004$ $0/0004$ برای اندوسولفان کل، $0/0009 \pm 0/009$ برای پرمترین II، $0/011 \pm 0/0006$ برای پرمترین کل، $0/0135 \pm 0/135$ برای ایمیداکلوپرید، $0/0004 \pm 0/002$ برای تیاکلوپرید، $0/018 \pm 0/344$ برای استامی پراید و $0/0002 \pm 0/003$ برای آمیتراز بودند.

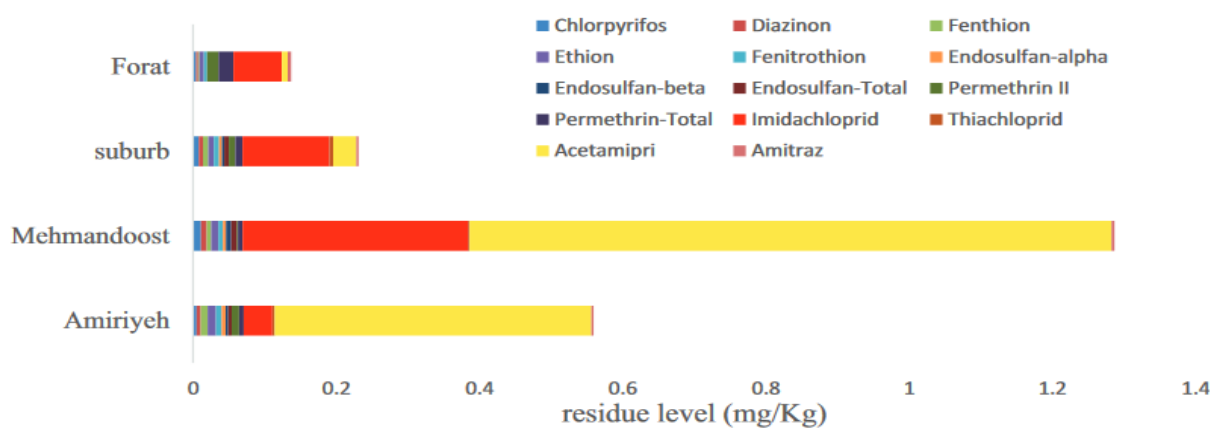
در مورد دو نوع آفت کش شامل، استامی پراید و ایمیداکلوپراید، میزان MRL به ترتیب بالاتر از مقدار مورد پذیرش اتحادیه اروپا به میزان $0/1359 \text{ mg/kg}$ (MRL 0.05 mg/kg) و $0/3448 \text{ mg/kg}$ (MRL 0.07 mg/kg) بود. به طور کلی، در 9 نمونه (17/3٪) آفت کش‌ها بالای MRLs بود و در بقیه نمونه‌ها، همه آفت کش‌ها کمتر از میزان شاخص MRLs بودند.

تفاوت در مناطق تولید پسته بر اساس سطوح باقیمانده آفت کش در شکل 2 اثبات شده است. مشاهده شد که شاخص متوسط باقیمانده آفت کش به طور معنی‌داری در گروه نیکوتینوئیدها (آمیتراز، استامی پراید، ایمیداکلوپراید، تیاکلوپراید) ($p < 0.05$) متفاوت بود که در این میان، منطقه مهماندوست بالاترین میزان باقیمانده ایمیداکلوپراید $0/3150 \text{ mg/kg}$ و استامی پراید $0/8966 \text{ mg/kg}$ را نشان داد که بالاتر از MRL بود. در مورد سموم گروه ارگانوفسفات‌ها (کلروپیریفوس، دیازینون، فنتیون، اتیون و فنیتروتیون) بالاترین میزان باقیمانده برای اتیونات $0/1175 \text{ mg/kg}$ در منطقه امیریه ردیابی شد که پایین تر از شاخص اتحادیه اروپا ($0/02 \text{ mg/kg}$) بود. همچنین، میزان کلروپیریفوس $0/0110 \text{ mg/kg}$ در منطقه مهماندوست بالاتر از دیگر مناطق بود، اما نزدیک شاخص اتحادیه اروپا ($0/01 \text{ mg/kg}$) قرار داشت.

Abundance

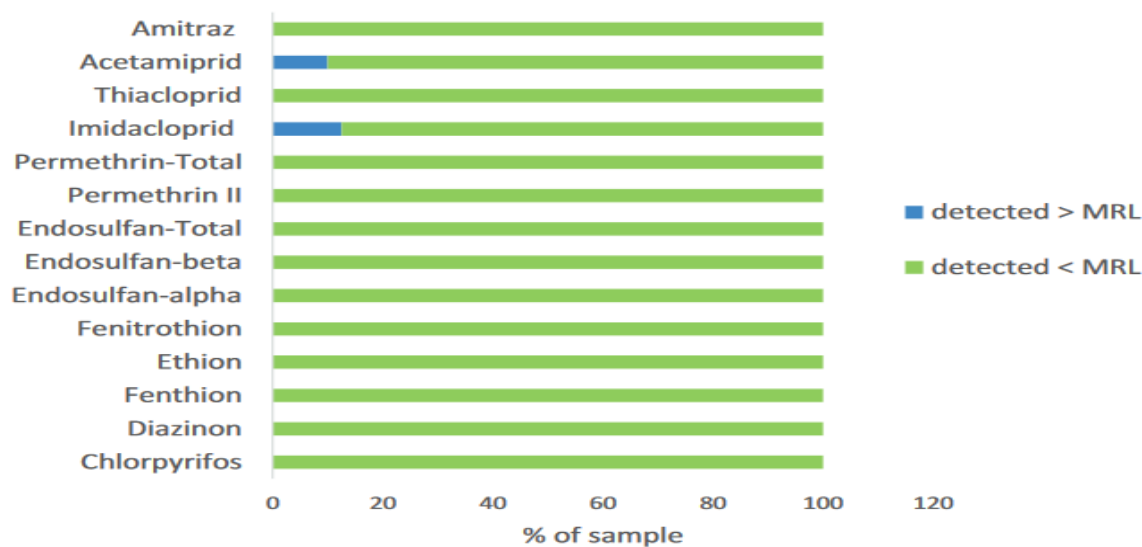


شکل 3: کروماتوگرام یک نمونه پسته که بر اساس فراوانی به زمان بازداری هر جزء نمونه است



(a)

شکل 4: باقیمانده آفت کش ها در نمونه های پسته از مناطق مختلف نمونه برداری شهرستان دامغان



(b)

شکل 5: فراوانی شناسایی آفت کش های ردیابی شده در نمونه ها، که درصد نمونه های با باقیمانده آفت کش < MRL و درصد نمونه های با باقیمانده آفت کش > MRL را نشان میدهد

میزان گروه ارگانوکلرین های آفت کش (اندوسولفان آلفا، اندوسولفان بتا و اندوسولفان کل) در همه نمونه های پسته از مناطق تولید پسته، دامنه کمی از عدم شناسایی (ND) تا 0/0057 (mg/kg) برای اندوسولفان آلفا، عدم شناسایی تا 0/0073 (mg/kg) برای اندوسولفان بتا و عدم شناسایی تا 0/008 (mg/kg) برای اندوسولفان کل بود.

نتایج سنجش آلودگی به آفلاتوکسین در نمونه های پسته با روش HPLC

با ارزیابی مقدار آفلاتوکسین احتمالی در نمونه های پسته با روش HPLC، مشخص گردید که از 52 نمونه مورد آزمایش، 9 نمونه به آفلاتوکسین آلودگی داشتند که آلودگی 8 نمونه کمتر از حد مجاز (آفلاتوکسین کل کمتر از 15 ppb و آفلاتوکسین B₁ کمتر از 4 ppb) و آلودگی یک نمونه بالاتر از حد مجاز بود. به عبارت دیگر آلودگی 1/92٪ نمونه های جمع آوری شده به آفلاتوکسین بیشتر از حد مجاز بود. در 9 نمونه آلوده، 2 نمونه به آفلاتوکسین B₁، 3 نمونه به آفلاتوکسین های B₁ و B₂، 1 نمونه به آفلاتوکسین های B₁، B₂، G₁، 2 نمونه به آفلاتوکسین های B₁، G₁، B₂ و G₂ و 1 نمونه به آفلاتوکسین های B₁ و G₁ آلوده بودند.

جدول 2: میزان آلودگی به انواع آفلاتوکسین (G₂, G₁, B₂, B₁) در نمونه های پسته شهرستان دامغان

کد نمونه	منطقه نمونه برداری	نوع ترمینال	رقم پسته	میزان آلودگی به آفلاتوکسین (ppb)				
				TOTAL	G2	G1	B2	B1
MMA1	مهماندوست	مکانیزه	عباسعلی	NA	ND	ND	ND	ND
MMA2	مهماندوست	مکانیزه	عباسعلی	NA	ND	ND	ND	ND
MMA3	مهماندوست	مکانیزه	عباسعلی	NA	ND	ND	ND	ND

NA	ND	ND	ND	ND	عباسعلی	مکانیزه	مهماندوست	MMA4
NA	ND	ND	ND	ND	عباسعلی	مکانیزه	مهماندوست	MMA5
4.48	ND	1.19	ND	3.29	عباسعلی	مکانیزه	مهماندوست	MMA6
NA	ND	ND	ND	ND	عباسعلی	مکانیزه	مهماندوست	MMA7
NA	ND	ND	ND	ND	عباسعلی	ستی	مهماندوست	MTA8
3.30	ND	ND	0.81	2.49	عباسعلی	ستی	مهماندوست	MTA9
NA	ND	ND	ND	ND	عباسعلی	ستی	مهماندوست	MTA10
4.64	ND	ND	1.02	3.62	عباسعلی	ستی	مهماندوست	MTA11
3.85	ND	1.13	0.61	2.11	عباسعلی	ستی	مهماندوست	MTA12
NA	ND	ND	ND	ND	عباسعلی	مکانیزه	مهماندوست	MMA13
NA	ND	ND	ND	ND	اکبری	مکانیزه	امیریه	AMA14
NA	ND	ND	ND	ND	خنجری	مکانیزه	امیریه	AMK15
NA	ND	ND	ND	ND	خنجری	مکانیزه	امیریه	AMK16
NA	ND	ND	ND	ND	خنجری	مکانیزه	امیریه	AMK17
NA	ND	ND	ND	ND	خنجری	مکانیزه	امیریه	AMK18
NA	ND	ND	ND	ND	خنجری	مکانیزه	امیریه	AMK19
2.34	ND	ND	0.92	1.42	خنجری	ستی	امیریه	ATK20
NA	ND	ND	ND	ND	اکبری	ستی	امیریه	ATA21
NA	ND	ND	ND	ND	اکبری	ستی	امیریه	ATA22
NA	ND	ND	ND	ND	خنجری	ستی	امیریه	ATK23
NA	ND	ND	ND	ND	اکبری	ستی	امیریه	ATA24
NA	ND	ND	ND	ND	اکبری	مکانیزه	امیریه	AMA25
NA	ND	ND	ND	ND	اکبری	مکانیزه	امیریه	AMA26
NA	ND	ND	ND	ND	اکبری	ستی	فرات	FTA27
NA	ND	ND	ND	ND	شاهپسند	مکانیزه	فرات	FMS28
NA	ND	ND	ND	ND	شاهپسند	ستی	فرات	FMS29
NA	ND	ND	ND	ND	خنجری	مکانیزه	فرات	FMK30
NA	ND	ND	ND	ND	خنجری	مکانیزه	فرات	FMK31
NA	ND	ND	ND	ND	خنجری	ستی	فرات	FTK32
NA	ND	ND	ND	ND	شاهپسند	ستی	فرات	FTS33
NA	ND	ND	ND	ND	اکبری	ستی	فرات	FTA34
NA	ND	ND	ND	ND	خنجری	ستی	فرات	FTK35

FTA36	فرات	ستى	اكبرى	ND	ND	ND	ND	NA
FMA37	فرات	مكانيزه	اكبرى	ND	ND	ND	ND	NA
FMA38	فرات	مكانيزه	اكبرى	ND	ND	ND	ND	NA
FTK39	فرات	ستى	خنجرى	ND	ND	ND	ND	NA
SMS40	حومه	مكانيزه	شاه پسند	ND	ND	ND	ND	NA
SMS41	حومه	مكانيزه	شاه پسند	ND	ND	ND	ND	NA
SSS42	حومه	مكانيزه	شاه پسند	ND	ND	ND	ND	NA
SMA43	حومه	مكانيزه	عباسعلى	ND	ND	ND	ND	NA
STA44	حومه	ستى	عباسعلى	ND	ND	ND	ND	NA
STS45	حومه	ستى	شاه پسند	2.87	1.29	1.38	0.27	5.81
STS46	حومه	ستى	شاه پسند	ND	ND	ND	ND	NA
STS47	حومه	ستى	شاه پسند	7.49	ND	ND	ND	4.49
STS48	حومه	ستى	شاه پسند	3.23	1.07	2.14	0.87	7.31
STK49	حومه	ستى	خنجرى	ND	ND	ND	ND	NA
STK50	حومه	ستى	خنجرى	2.07	ND	ND	ND	2.07
STA51	حومه	ستى	اكبرى	ND	ND	ND	ND	NA
STA52	حومه	ستى	اكبرى	ND	ND	ND	ND	NA

ND=NOT Detected

NA=NOT Applicable

بحث:

پسته يکي از اقلام عمده صادرات غيرنفتي ايران مي باشد که در بازارهاي جهاني شناخته شده و معروف است. در بين صادرات غير نفتي، در حال حاضر پسته مقام اول صادرات را به خود اختصاص مي دهد. از مهمترين چالش هاي پيش روي امنيت غذايي و سلامت جامعه انساني، موضوع باقيمانده آفت کشتها در محصولات کشاورزي و وجود مايکوتوکسين ها، به ويژه آفلاتوکسين در محصولات کشاورزي به خصوص خشکبار مي باشد، که باعث وضع قوانين و مقررات سخت گيرانه و هزينه هاي مختلف جهت مديريت آلودگي در سطوح مختلف از توليد تا مصرف مي گردد. (Bennett and Klich, 2003) آلودگي پسته به آفلاتوکسين و موضوع باقيمانده آفت کشتها مي تواند اين منبع درآمد ارزي را تهديد نموده و ما را از رقابت در بازار جهاني باز دارد. بنابر اين با توجه به اهميت موضوع، جنبه هاي مختلف موضوع باقيمانده آفت کشتها و آلودگي پسته به قارچ *A. flavus* و آفلاتوکسين بايد مورد مطالعه قرار گيرد. به اين منظور در اين تحقيق، نوع و مقدار مانده آفت کشتها در پسته با روش کروماتوگرافي گازی- اسپکترومتری جرمی و میزان آلودگي به آفلاتوکسين در پسته در شهرستان دامغان، مورد بررسی قرار گرفت.

مطالعات مشابه روي خشکبار و ديگر مواد غذايي مشخص نمود که توزيع باقيمانده آفت کش در محصولات کشاورزي بسيار متغير است. مروتی و ارجمند کرمانی (1394)، میزان مانده آفت کش های اندوسولفان و فوزالون در میوه پسته (رقم اوحدی) که از

ابتدای اردیبهشت ماه تا زمان رسیدن میوه کامل، در هفت زمان مشخص سم پاشی و در شهریور ماه برداشت شدند را بررسی نمودند. نتایج نشان داد میزان اندوسولفان در سه نمونه از 42 نمونه بیشتر از حد مجاز و میزان فوزالون در 41 نمونه از 42 نمونه بیشتر از حد مجاز بود. از آنجا که دوره کارنس آفت کش فوزالون بیشتر از اندوسولفان است لذا پیشنهاد گردیده در ماه های مرداد و شهریور سم پاشی انجام نگردد تا محصولی عاری از سم داشته باشیم. در پژوهش امیراحمدی و همکاران (2011)، هفده نوع آفت کش در برنج با روش GC-MS به صورت همزمان تعیین مقدار گردید. مانده آفت کش در 23 نمونه برنج نمونه برداری شده از بازار خرده فروشی شهر تهران انجام شد. بر اساس نتایج این تحقیق مقدار مانده آفت کش ها شامل فنتیون (0/05 ppm)، پروپیکونازول (10 ppm)، دیازینون (2/0 ppm)، کارباریل (1 ppm)، فنیتروتیون (1 ppm)، فپرونیل (0/01 ppm)، اکسادیازیون (0/02 ppm)، کلروپیروفوس متیل (0/01 ppm)، ادیفنفس (0/01 ppm)، پیریمیفوس متیل (1 ppm) بود.

در این مطالعه، سطح دو آفت کش متعلق به گروه حشره کش ها، شامل استامی پراید و ایمیداکلوپراید در نمونه های پسته بالاتر از MRL بود. به نظر می رسد این آفت کش ها به طور گسترده در محصول پسته در مناطق مورد ارزیابی مصرف می شود. همچنین نتایج این تحقیق ضرورت بررسی مداوم از طریق آموزش کشاورزان و باغداران برای کاهش مصرف آفت کش ها و سطح باقیمانده آفت کش در پسته را اثبات نمود. دانش و آگاهی در مورد دزهای ایمن و دوره مصرف آفت کش ها در محصول پسته بسیار اهمیت دارد، تا محصولی سالم با سطح باقیمانده پایین آفت کش تولید گردد. تقی زاده و همکاران در تحقیقی در سال 2019، در ارزیابی باقیمانده آفت کش ها در پسته از چهار منطقه تولید پسته ایران شامل دامغان، رفسنجان، فیض آباد و سرخس، سموم دیازینون، اتیون، فنپروکسی میت، فوزالون، گلیفوسیت و متاسیتوکس را گزارش نمودند و بالاترین میزان باقیمانده آفت کش ها در منطقه فیض آباد تشخیص داده شد. همچنین همه مناطق، سطوح مشابهی از سموم استامی پراید و ایمیداکلوپراید داشتند. در مطالعه دیگری در رفسنجان، پژوهشگران مشخص نمودند که آمیتراز و پاراتیون اصلی ترین آفت کش های مورد استفاده در باغ های پسته هستند. همچنین امامی و همکاران در سال 2017 در تحقیقی نشان دادند که فنیتروتیون، کارباریل و دیازینون بالاترین میزان باقیمانده آفت کش را در نمونه های پسته ایران دارند. به طور کلی، این نتایج مشخص نمود که سطح باقیمانده آفت کش ها در پسته ایران با توجه به نوع رقم و مناطق تولید پسته متغیر است. ضمن اینکه در حال حاضر حشره کش های آمیتراز، پاراتیون و کارباریل در باغ های پسته مصرف نمی شود.

پیشنهادهای:

- 1- دوره کارنس حشره کش ها، شامل استامی پراید و ایمیداکلوپراید در باغ های پسته منطقه دامغان رعایت شود.
- 2- در صورت عدم مشخص نبودن دوره کارنس برای این دو حشره کش، حداقل یک ماه قبل از برداشت، از این سموم برای کنترل آفات، به خصوص پسیل پسته استفاده نشود.
- 3- قبل از برداشت از صابون ها حشره کش برای کنترل پسیل پسته استفاده شود.
- 4- مسائل بهداشتی در طول فصل و در زمان فرآوری پسته برای کاهش مقدار آفات توکسین در پسته رعایت شود.

منابع مورد استفاده:

Agriculture Information Administration available from :<http://maj.ir/Portal/Home/Default.aspx/CategoryID:95a8e7d0-e5f0-4f2d-a241-92106c74dcc>.
Amirahmadi, M., H. Yazdanpanah, S. H. Shoeibib, M. Pirali-Hamedani, M. Ostad Gholami, M. Mohseninia and F. Kobarfarde. 2013. Simultaneous Determination of 17 Pesticide Residues in Rice

by GC/MS using a Direct Sample Introduction Procedure and Spiked Calibration Curves. Iranian Journal of Pharmaceutical Research, 12: 295-302.

Cortes, J., R. Toledano, J. Villen and A. Vazquez. 2008. Analysis of Pesticides in Nuts by Online Reversed-Phase Liquid Chromatography-Gas Chromatography Using the Through-Oven Transfer Adsorption/Desorption Interface. J Agric Food Chem, 56: 5544–5549.

Danezis, G.P., C. J. Anagnostopoulos, K. Liapis and M. A. Koupparis. 2016. Multi-residue analysis of pesticides, plant hormones, veterinary drugs and mycotoxins using HILIC chromatography - MS/MS in various food Matrices. Analytica Chimica Acta, 942: 121-138.

Emami, A., H. Rastegar, M. Amirahmadi, S. H. Shoeibi and Z. Mousavi. 2015. Multi-Residue Analysis of Pesticides in Pistachio Using Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC/MS). Iranian Journal of Toxicology, 8: 1174-1182.

Gupta, P.K. 2004. Pesticide exposure- Indian scene. Toxicology; 198: 83–90.

Husain, S.W., V. Kiarostami, M. Morrovati and M. R. Tagebakhsh. 2003. Multi residue determination of Diazinon and Ethion in pistachio nuts by use of matrix solid phase dispersion with a lanthanum silicate Co-Column and Gas chromatography. Acta chromatographica, 13: 208-214.

Iranian National Standardization Organization INSO 13117. 2016. Pesticides –Maximum residue limit of pesticides – Pome, stone & small fruits & nuts. 1st. Revision.

Iranian National Standardization Organization INSO 5060. 2015. Pesticide residues - Terms and definitions.

Iranian National Standardization Organization INSO 17026. 2013. Foods of plant origin Determination of residues using LC-MS/MS following extraction/partitioning and clean up dispersive SPE origin- GC-MS and/or acetonitrile by SPE- QuEChERS-method. 1st Edition.

Iran Pistachio Association (IPA), available from: iranpistachio.org/en-the-industry.

Iranian National Standardization Organization INSO 8366. 2011. Pesticides – Determination of residues in agricultural and veterinary products - Methods sampling.

Iranian National Standardization Organization INSO 13120. 2016. Pesticides –Maximum residue limit of pesticides – Cereals. 1st. Revision.

RASFF - The Rapid Alert System for Food and Feed - 2015 annual report. Available from: URL: http://ec.europa.eu/food/safety/rasff/index_en.htm.

López, B.G., J. F. García-Reyes and A. M. Díaz. 2009. Sample treatment and determination of pesticide residues in fatty vegetable matrices: A review. Talanta, 79: 109-128.

Pandey, P., R. B. Raizada and L.P. Srivastava. 2010. Level of organochlorine pesticide residues in dry fruit nuts. Journal of Environmental Biology, 31: 705-707.

[USDA] United States Department of Agriculture. 2014. Pesticide MRL database.[cited 2014 June 30]. Available from: <http://www.mrlatabase.com>

Morvati, M. and M. Arjomand-kermani .2015. Assessment of Endosulfan and fosalon pesticides residue in pistachio nut. 3rd International Conference on Applied Research in Agriculture Sciences.

Mehrnejad, M. and V. Javanmard. 2011. Iran pistachio guideline document, 550-551.

Mohammadi Moghadam, M., S. Rezaee, A. H. Mohammadi, H. R. Zamanizadeh and M. Moradi. 2020. Relationship between *Aspergillus flavus* growth and aflatoxin B1 and B2 production with phenolic and flavonoid compounds in green hull and kernels of pistachio cultivars. Applied Entomology and Phytopathology: 87(2): 13-23.

Nuapia, Y., L. Chimuka and E. Cukrowska. 2016. Assessment of organochlorine pesticide residues in raw food samples from open markets in two African cities. Chemosphere, 164: 480-487.

Petrarca, M.H., J.O. Fernandes, H.T. Godoy and S. Cunha. 2016. Multiclass pesticide analysis in fruit-based baby food: A comparative study of sample preparation techniques previous to gas chromatography–mass spectrometry. Food Chemistry, 212: 528–536.

Regulation (EC) No 396/2005 of 23 February 2005 on maximum residue levels of pesticides in or on food and feed of plant and animal origin and amending Council Directive 91/414/EEC. OJEU, L70/1, 16/03/2005, Brussels (BE) 1–16.

Wanwimolruk, S., O. Kanchanamayoon, K. Phopin and V. Prac. 2015. Food safety in Thailand 2: Pesticide residues found in Chinese kale (*Brassica oleracea*), a commonly consumed vegetable in Asian countries. Science of the Total Environment, 532: 447–455.

WHO/FSF/FOS/97/7. Guideline for predicting Dietary Intake of pesticides.

Study on aflatoxin contamination and analysis of the type and amount of pesticide residue in pistachio

Abstract:

Semnan province with a total of more than 19 thousand hectares of pistachio orchards is considered as one of the most important pistachio growing areas in the country. Pistachio pests have always been one of the destructive factors in pistachio orchards and pesticides usage is one of the ways to pest control. Several reasons such as outbreak of pistachio pests, variety and high use of pesticides and resistance of pests to them, has led to excessive use of pesticides by producers and their residues in the crop. Since comprehensive information on pesticide residues and their type is not available in pistachios produced in Semnan province, therefore, it is necessary to examine the pistachio samples produced in this province (in Damghan county as the most important pistachio production area of the province) in terms of type and amount of pesticide residue. For this purpose, pistachio nuts were sampled from processing terminals in four pistachio-growing areas of Damghan. The pesticide residues were analyzed using gas chromatography-mass spectrometer GC-MS and LC/MS/MS. Possible contamination of aflatoxin content of samples were also assessed by high performance liquid chromatography (HPLC). The results of this research indicated that in total 11 individual pesticides were determined in pistachio samples using GC/MS and LC/MS/MS. Comparison of the MRL the mean of two type of pesticide including Acetamiprid and Imidacloprid exceeded MRL set by EU were 0.1359 mg/kg (MRL 0.05 mg/kg) and 0.3448 mg/kg (MRL 0.07 mg/kg) respectively. In total, in nine of samples (17.3%) the pesticides detected above MRLs and in rest of samples the all pesticides detected below the MRLs. Also, by evaluating the level of aflatoxin contamination in pistachio nut samples, it was found that out of 52 samples tested, 9 samples were contaminated with aflatoxin. In this case, the contamination of 8 and 1 samples was less and higher than the aflatoxin acceptable level (15 and 4 ng/g for aflatoxin B₁) respectively. In other hand the contamination of % 1.92 of samples was higher than the aflatoxin acceptable level. The results showed that from 9 analyzed samples, 2 samples were contaminated to aflatoxins B₁, 3 samples to aflatoxins B₁ and B₂, 1 sample to aflatoxins B₁, B₂, G₁, 2 samples to aflatoxins B₁, G₁, B₂, and G₂ and 1 sample to aflatoxins B₁ and G₁.

Key words: Pistachio, pesticide, GC-MS, Damghan, Aflatoxin, HPLC