

## 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 (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, and G<sub>2</sub>) 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 (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>), using High-Performance Liquid Chromatography with on-line photochemical derivatization and fluorescence detector (HPLC-FLD). The four Aflatoxins were separated using a C<sub>18</sub> 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 (B<sub>1</sub> Rt=10.867 min, B<sub>2</sub> Rt=9.027 min, G<sub>1</sub> Rt=8.137 min, G<sub>2</sub> 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:** AFB<sub>1</sub>, AFB<sub>2</sub>, AFG<sub>1</sub>, AFG<sub>2</sub>, 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 [17-1]. 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 *Zeraleone* 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 رئيسة هي ( $B_1$ ,  $B_2$ ,  $G_1$ ,  $G_2$ )، وأكثرها انتشاراً وخطورة هو الأفلاتوكسين  $B_1$  على الإنسان والحيوان [18-1]، كما توجد مشتقات أخرى لهذه السموم مثل أفلاتوكسين  $M_1$  و  $M_2$  [4,2].

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، ولكنها 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, CH<sub>3</sub>OH)  $\leq 99.9\%$ ، إنتاج شركة (Lichrosolv-Germany).
3. أسيتونتريل (Acetonitrile, CH<sub>3</sub>CN)  $\leq 99.9\%$ ، 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 (HPLC) (SHIMADZU).
2. حمام مائي يعمل بالأمواج فوق الصوتية (Ultrasonic bath) ماركة Grant.

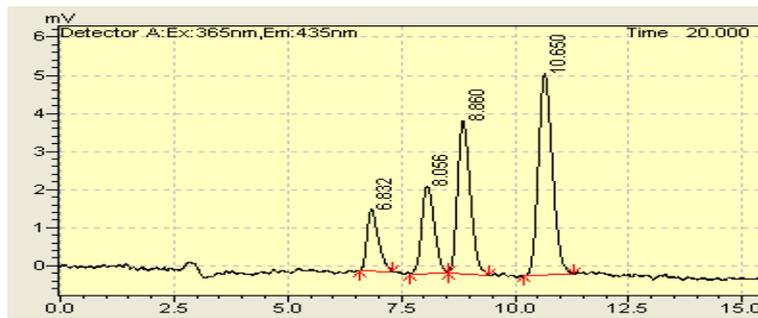
3. خلية الاشتقاق الكيميائية الضوئية Photochemical Derivatization ماركة  
.LCtech

### 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، لُوحظ تباين واضح في متوسط زمن الاحتفاظ، ومتوسط مساحة القمة الكروماتوغرافية لمركبات الأفلاتوكسينات، إذ تُوثر 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

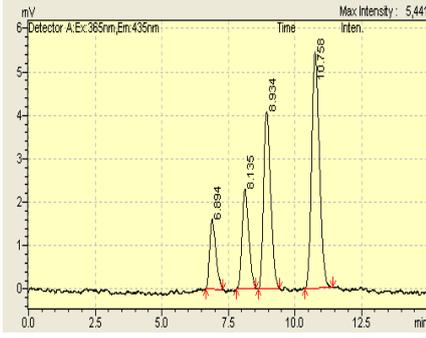
الأفلاتوكسينات ( $B_1, B_2, G_1, G_2$ ) على الترتيب ومتوسط زمن احتفاظها

الطور المتحرك (Mobile phase) (V:V)	W <sub>1</sub> : Me-OH: ACN (60:20:20 V:V:V)			W <sub>2</sub> : Me-OH: ACN (55:15:30 V:V:V)			W <sub>3</sub> : Me-OH: ACN (50:10:40 V:V:V)		
	متوسط مساحة القمة Area ± RSD % <sup>a</sup>	متوسط زمن الاحتفاظ (min) Rt ± RSD % <sup>b</sup>	متوسط انحراف المعياري $CI = \frac{S.D.}{\bar{X}} \times 100$	متوسط مساحة القمة Area ± RSD % <sup>a</sup>	متوسط زمن الاحتفاظ (min) Rt ± RSD % <sup>b</sup>	متوسط انحراف المعياري $CI = \frac{S.D.}{\bar{X}} \times 100$	متوسط مساحة القمة Area ± RSD % <sup>a</sup>	متوسط زمن الاحتفاظ (min) Rt ± RSD % <sup>b</sup>	متوسط انحراف المعياري $CI = \frac{S.D.}{\bar{X}} \times 100$
أفلاتوكسين Aflatoxins									
AF <sub>G1</sub> (0.80 µg/l)	29399.4 ± 1.384	6.949 ± 1.028	25660.6 ± 1.347	4.842 ± 0.537	21865.8 ± 1.274	4.946 ± 0.372	4.946 ± 0.372		
AF <sub>G2</sub> (0.80 µg/l)	29399.4 ± 505.243	6.949 ± 0.089	25660.6 ± 429.150	4.842 ± 0.032	21865.8 ± 345.833	4.946 ± 0.022	4.946 ± 0.022		
AF <sub>B1</sub> (1.60 µg/l)	58838.4 ± 1.176	6.951 ± 0.840	51486.4 ± 0.940	4.841 ± 0.594	43765.6 ± 0.942	4.947 ± 0.358	4.947 ± 0.358		
AF <sub>B2</sub> (1.60 µg/l)	58838.4 ± 859.116	6.951 ± 0.072	51486.4 ± 600.875	4.841 ± 0.034	43765.6 ± 512.065	4.947 ± 0.023	4.947 ± 0.023		
AF <sub>G1</sub> (2.65 µg/l)	43453.4 ± 0.954	8.137 ± 1.180	13325.6 ± 1.208	5.425 ± 0.621	40905.4 ± 0.672	5.509 ± 1.046	5.509 ± 1.046		
AF <sub>G2</sub> (2.65 µg/l)	43453.4 ± 514.882	8.137 ± 0.119	13325.6 ± 199.867	5.425 ± 0.050	40905.4 ± 341.153	5.509 ± 0.072	5.509 ± 0.072		
AF <sub>B1</sub> (5.30 µg/l)	87033.8 ± 0.771	8.136 ± 0.875	26647.8 ± 1.330	5.421 ± 0.553	81821.2 ± 0.607	5.510 ± 1.040	5.510 ± 1.040		
AF <sub>B2</sub> (5.30 µg/l)	87033.8 ± 833.411	8.136 ± 0.088	26647.8 ± 439.972	5.421 ± 0.037	81821.2 ± 616.618	5.510 ± 0.071	5.510 ± 0.071		
AF <sub>B1</sub> (0.825 µg/l)	79760.8 ± 0.867	9.027 ± 0.884	34069.4 ± 1.044	5.696 ± 0.490	41822.2 ± 1.042	6.237 ± 1.110	6.237 ± 1.110		
AF <sub>B2</sub> (0.825 µg/l)	79760.8 ± 853.340	9.027 ± 0.130	34069.4 ± 441.380	5.696 ± 0.035	41822.2 ± 541.120	6.237 ± 0.086	6.237 ± 0.086		
AF <sub>B1</sub> (1.65 µg/l)	159481.6 ± 0.448	9.019 ± 0.894	68144.6 ± 1.943	5.695 ± 0.532	83675.2 ± 0.948	6.237 ± 1.199	6.237 ± 1.199		
AF <sub>B2</sub> (1.65 µg/l)	159481.6 ± 714.124	9.019 ± 0.100	68144.6 ± 797.396	5.695 ± 0.038	83675.2 ± 984.823	6.237 ± 0.093	6.237 ± 0.093		
AF <sub>B1</sub> (2.675 µg/l)	118351.4 ± 0.547	10.856 ± 0.935	76204.8 ± 1.524	6.507 ± 0.464	98804.6 ± 0.706	7.146 ± 0.655	7.146 ± 0.655		
AF <sub>B2</sub> (2.675 µg/l)	118351.4 ± 803.560	10.856 ± 0.126	76204.8 ± 459.446	6.507 ± 0.038	98804.6 ± 865.708	7.146 ± 0.058	7.146 ± 0.058		
AF <sub>B1</sub> (5.35 µg/l)	236560.2 ± 0.381	10.867 ± 0.872	152728.2 ± 0.486	6.512 ± 0.549	197657.8 ± 0.432	7.156 ± 0.672	7.156 ± 0.672		
AF <sub>B2</sub> (5.35 µg/l)	236560.2 ± 824.718	10.867 ± 0.118	152728.2 ± 921.924	6.512 ± 0.044	197657.8 ± 1060.150	7.156 ± 0.090	7.156 ± 0.090		

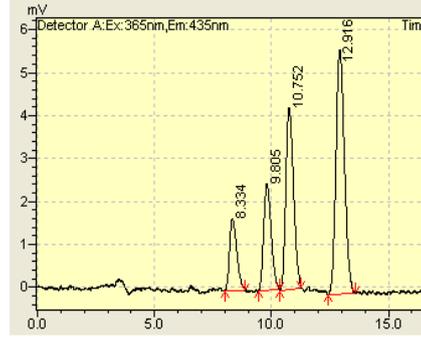
T:40°C, Column (C<sub>18</sub>)<sub>µ</sub>AP = 365mm,  $\lambda_{AP}$  = 435nm, Flow Rate: 1ml/min, Water: Methanol: acetonitrile

\* 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

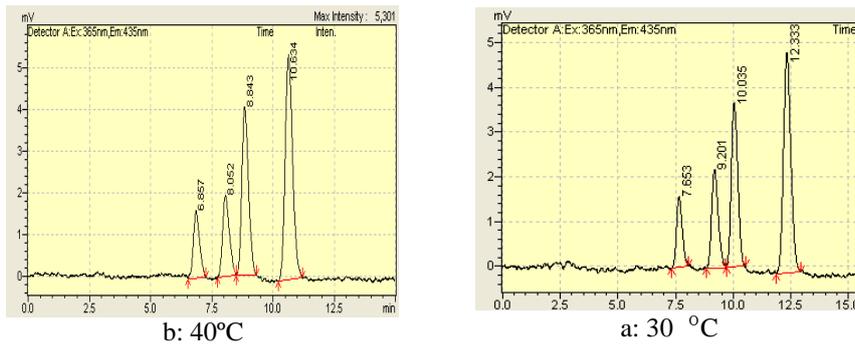
الشكل (2) كروماتوغرام فصل الأفلاتوكسينات (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>)

(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 C<sub>18</sub> 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 °C (35, 30, 25) حيث كان الفصل جيداً وعدم تداخل بين القمم.



الشكل (3) تأثير درجة حرارة فرن العمود في متوسط مساحات قمم مركبات الأفلاتوكسينات (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>) ومتوسط أزمنا الاحتفاظ.

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

##### الإصدار المثلى Optimal Excitation and Emission Wavelengths

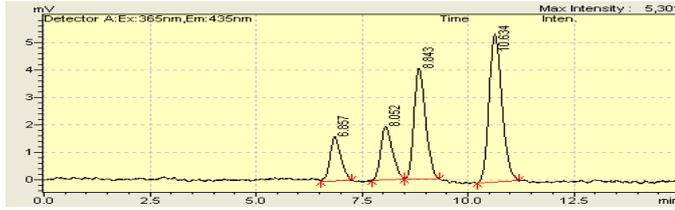
طبقت من أجل تحديد الأطوال الموجية لمكشاف الفلورة من ناحية سرعة تدفق الطور المتحرك في عمود الفصل الكروماتوغرافي C<sub>18</sub> (1 ml/min)، ودرجة حرارة فرن العمود (40°C)، ونسب مزج مذيبات الطور المتحرك H<sub>2</sub>O:CH<sub>3</sub>OH:CH<sub>3</sub>CN (60:20:20 V:V:V) على الترتيب. لوحظ اختلاف استجابة المكشاف 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 (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>) على الترتيب، ومتوسط زمن احتفاظها

تدفق الطور المتحرك (Flow Mobile phase) (ml/min)	0.6 (ml/min)		0.8 (ml/min)		1.0 (ml/min)		1.2 (ml/min)	
	متوسط مساحات القمع Area ± RSD %	متوسط زمن الاحتفاظ (min) Ri ± RSD %	متوسط مساحات القمع Area ± RSD %	متوسط زمن الاحتفاظ (min) Ri ± RSD %	متوسط مساحات القمع Area ± RSD %	متوسط زمن الاحتفاظ (min) Ri ± RSD %	متوسط مساحات القمع Area ± RSD %	متوسط زمن الاحتفاظ (min) Ri ± RSD %
الأفلاتوكسينات Aflatoxins	$^{**}CI = \bar{X} \pm \frac{t.SD}{\sqrt{n}}$							
AFG <sub>1</sub> (0.80 µg/l)	41134.6 ± 559.956	11.080 ± 0.126	32990.4 ± 1.015	8.376 ± 0.270	29399.4 ± 1.384	6.949 ± 0.038	22563.6 ± 1.472	5.858 ± 0.312
AFG <sub>2</sub> (1.60 µg/l)	82352.8 ± 934.949	11.119 ± 0.139	66103.8 ± 1.194	8.378 ± 0.276	58938.4 ± 1.176	6.951 ± 0.840	45162.4 ± 1.328	5.874 ± 0.342
AFG <sub>1</sub> (2.65 µg/l)	67635.4 ± 794.499	13.053 ± 1.081	50881.6 ± 1.122	9.886 ± 0.414	43453.4 ± 0.954	8.137 ± 1.180	33861.2 ± 0.940	6.977 ± 0.176
AFG <sub>2</sub> (5.30 µg/l)	136317.2 ± 0.607	13.054 ± 0.889	101674.8 ± 0.827	9.887 ± 0.414	87033.8 ± 0.771	8.136 ± 0.875	68691.2 ± 0.543	6.936 ± 0.311
AFB <sub>1</sub> (0.815 µg/l)	122216.2 ± 577.560	14.347 ± 0.188	93123.6 ± 0.894	10.881 ± 0.092	79760.8 ± 0.867	9.027 ± 0.130	63072.4 ± 0.844	7.610 ± 0.014
AFB <sub>2</sub> (1.65 µg/l)	244324.2 ± 0.358	14.339 ± 0.984	186163.0 ± 0.408	10.867 ± 0.610	159481.6 ± 0.448	9.019 ± 0.894	124485.2 ± 0.477	7.616 ± 0.139
AFB <sub>1</sub> (2.675 µg/l)	169095.2 ± 0.443	17.312 ± 1.109	136732.8 ± 0.485	13.077 ± 0.709	118351.4 ± 0.547	10.856 ± 0.935	89674.2 ± 0.891	9.185 ± 0.181
AFB <sub>2</sub> (5.35 µg/l)	338295.8 ± 0.254	17.318 ± 1.115	273967.2 ± 0.312	13.057 ± 0.942	236560.2 ± 0.281	10.867 ± 0.872	179447.6 ± 0.438	9.178 ± 0.379
	338295.8 ± 0.609	17.318 ± 0.240	273967.2 ± 1.061	13.057 ± 0.153	236560.2 ± 0.240	10.867 ± 0.118	179447.6 ± 0.762	9.178 ± 0.043
T: 40°C, Column (C <sub>18</sub> ), $\lambda_{exc}$ = 365nm, $\lambda_{em}$ = 435nm, Mobile Phase: (Water: Methanol: Acetonitrile: 60:20:20 V:V:V)								

\* n=5: تكرارية حقن المحلول العياري العائد لمركبات الأفلاتوكسينات (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>).

\*\* : حد الثقة عند مستوى ثقة 95%.



الشكل (4) كروماتوغرام مركبات الأفلاتوكسينات (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>)

المفصولة عند الأطوال الموجية  $\lambda_{ex} = 365 \text{ nm}$ ,  $\lambda_{em} = 435 \text{ nm}$

الجدول (3) تأثير درجة حرارة فرن العمود في متوسط مساحات قمع مركبات الأفلاتوكسينات

(B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>) على الترتيب ، ومتوسط زمن احتفاظها.

درجة حرارة الفرن العمود، T (°C)	25 °C		30 °C		35 °C		40 °C	
	مساحة سطح القمع Area ± RSD %	زمن احتفاظ Retention Time ± RSD %	مساحة سطح القمع Area ± RSD %	زمن احتفاظ Retention Time ± RSD %	مساحة سطح القمع Area ± RSD %	زمن احتفاظ Retention Time ± RSD %	مساحة سطح القمع Area ± RSD %	زمن احتفاظ Retention Time ± RSD %
الافلاتوكسينات Aflatoxins	$CI = \bar{X} \pm \frac{1.0D}{\sqrt{n}}$							
ATC <sub>1</sub> (0.80 µg/l)	25707.4 ± 0.836	8.177 ± 1.003	25925.2 ± 1.116	7.818 ± 1.160	29708.3 ± 1.090	7.607 ± 0.919	29399.4 ± 1.384	6.949 ± 1.028
ATC <sub>2</sub> (2.00 µg/l)	25707.4 ± 0.836	8.177 ± 1.002	25925.3 ± 0.916	7.818 ± 0.113	28708.3 ± 0.316	7.607 ± 0.087	29399.4 ± 0.633	6.949 ± 0.089
ATC <sub>3</sub> (2.65 µg/l)	21648.8 ± 1.004	8.189 ± 1.000	21929.4 ± 1.134	7.824 ± 1.180	27078.6 ± 1.190	7.598 ± 0.926	28083.4 ± 1.176	6.951 ± 0.840
ATC <sub>4</sub> (5.00 µg/l)	21648.8 ± 0.974	8.189 ± 1.110	21929.4 ± 1.129	7.824 ± 0.115	27078.6 ± 0.833	7.598 ± 0.094	28083.4 ± 0.916	6.951 ± 0.072
ATC <sub>5</sub> (5.00 µg/l)	20063.6 ± 1.140	9.967 ± 0.986	20786.4 ± 1.054	9.279 ± 1.051	24928.6 ± 1.074	8.827 ± 1.146	24483.4 ± 0.954	8.137 ± 1.180
ATC <sub>6</sub> (5.00 µg/l)	20063.6 ± 0.849	9.967 ± 0.123	20786.4 ± 0.705	9.279 ± 0.121	24928.6 ± 0.590	8.827 ± 0.127	24483.4 ± 0.482	8.137 ± 0.119
ATC <sub>7</sub> (5.00 µg/l)	76366.2 ± 0.980	9.974 ± 0.956	79651.2 ± 1.000	9.277 ± 0.946	84145.4 ± 0.816	8.824 ± 0.987	87033.0 ± 0.771	8.136 ± 0.875
ATC <sub>8</sub> (0.825 µg/l)	76366.2 ± 0.629	9.974 ± 0.118	79651.2 ± 0.902	9.277 ± 0.109	84145.4 ± 0.822	8.824 ± 0.109	87033.0 ± 0.833	8.136 ± 0.088
ATC <sub>9</sub> (0.825 µg/l)	66636.4 ± 1.017	10.890 ± 1.160	68846.4 ± 1.130	10.495 ± 1.047	77932.4 ± 0.890	9.891 ± 0.649	79760.0 ± 0.867	9.027 ± 0.894
ATC <sub>10</sub> (0.825 µg/l)	66636.4 ± 0.629	10.890 ± 0.157	68846.4 ± 0.653	10.495 ± 0.134	77932.4 ± 0.466	9.891 ± 0.080	79760.0 ± 0.540	9.027 ± 0.120
ATC <sub>11</sub> (1.65 µg/l)	131428.2 ± 0.551	10.891 ± 0.159	137950.8 ± 0.612	10.312 ± 0.146	150135.6 ± 0.640	9.889 ± 0.074	154943.6 ± 0.448	9.019 ± 0.894
ATC <sub>12</sub> (2.675 µg/l)	131428.2 ± 0.895	10.891 ± 0.157	137950.8 ± 0.625	10.312 ± 0.147	150135.6 ± 0.640	9.889 ± 0.089	154943.6 ± 0.447	9.019 ± 0.100
ATC <sub>13</sub> (2.675 µg/l)	92188.4 ± 0.697	13.496 ± 0.795	104813.8 ± 0.691	12.561 ± 0.799	115344.8 ± 0.650	11.838 ± 1.002	118351.4 ± 0.647	10.859 ± 0.935
ATC <sub>14</sub> (2.675 µg/l)	92188.4 ± 0.745	13.496 ± 0.133	104813.8 ± 0.622	12.561 ± 0.122	115344.8 ± 0.553	11.838 ± 0.147	118351.4 ± 0.650	10.859 ± 0.126
ATC <sub>15</sub> (2.675 µg/l)	184253.6 ± 0.404	13.510 ± 0.808	209668.4 ± 0.404	12.348 ± 0.659	240003.6 ± 0.360	11.827 ± 0.948	246680.2 ± 0.281	10.867 ± 0.872
ATC <sub>16</sub> (5.35 µg/l)	184253.6 ± 0.848	13.510 ± 0.136	209668.4 ± 0.645	12.348 ± 0.129	240003.6 ± 0.307	11.827 ± 0.139	246680.2 ± 0.478	10.867 ± 0.118
Flow Rate: 1ml/min, Column (C <sub>18</sub> ), $\lambda_{ex} = 365 \text{ nm}$ , $\lambda_{em} = 435 \text{ nm}$ , Mobile Phase: (Water: Methanol: Acetonitrile: 60:20:20 V/V/V)								

\*n=5 تكرارية حقن المحلول العياري للعائد لمركبات الأفلاتوكسينات (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>).

\*\* حد الثقة عند مستوى ثقة 95%.

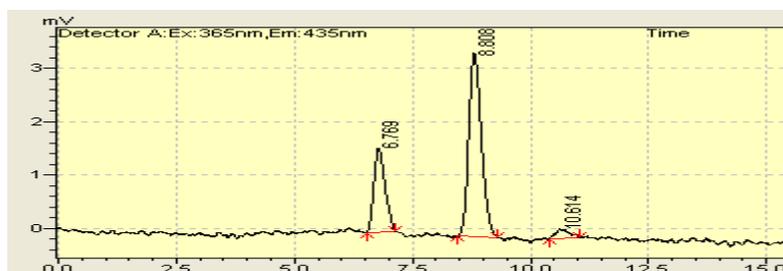
الجدول (4) نتائج متوسط مساحات قمم مركبات الأفلاتوكسينات (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>) على الترتيب عند الأطوال الموجية المختارة.

الجزء تجزئة بوجبة الجدار الامتصاص (nm)	توسط مساحات القمم Area = RSD %	(360 - 425) nm	(360 - 445) nm	(360 - 455) nm	توسط مساحات القمم Area = RSD %	(365 - 425) nm	(365 - 435) nm	(365 - 440) nm	(365 - 445) nm	(365 - 450) nm	توسط مساحات القمم Area = RSD %
الأفلاتوكسينات Aflatoxins	$^{**}CI = \frac{\bar{X} \pm 1.96}{\sqrt{n}}$										
AFC <sub>1</sub> (0.80 µg/l)	15035.6±1093	26812±1383	30171±300.237	33436.4±1070	16095.4±0.966	28999.4±384	31210.4±0.933	34617.4±1.065	34957.2±0.946	34687.2±0.727	
AFC <sub>2</sub> (1.60 µg/l)	15035.6±214.710	33681.2±481.707	30171.2±300.237	33436.4±444.831	16095.4±70.462	29399.4±56.243	31210.4±363.570	34617.4±61.937	34957.2±40.277	34687.2±61.937	
AFC <sub>3</sub> (2.40 µg/l)	31833.4±388.831	57479.6±1110	60843.4±0.726	60833.2±0.931	33354.4±0.979	5823.4±1.76	62389.4±0.952	69254.2±0.927	69433.4±0.980	69433.4±0.980	
AFC <sub>4</sub> (3.20 µg/l)	23689.4±1191	40886.2±1.031	40862.2±0.949	40862.2±0.949	27883.4±0.979	43463.4±0.984	43922.2±0.939	46019.4±0.936	47520.9±1.114	47520.9±1.114	
AFC <sub>5</sub> (4.00 µg/l)	47594.8±1.033	81877.8±0.962	87404.2±0.954	91772.8±0.946	55753.4±1.183	57033.8±0.771	57948.4±0.939	62389.4±0.952	69254.2±0.927	69433.4±0.980	
AFC <sub>6</sub> (4.80 µg/l)	47594.8±0.997	81877.8±0.962	87404.2±0.954	91772.8±0.946	55753.4±1.183	57033.8±0.771	57948.4±0.939	62389.4±0.952	69254.2±0.927	69433.4±0.980	
AFC <sub>7</sub> (5.60 µg/l)	69712.2±0.965	62477.8±0.770	57147.4±0.964	56339.4±1.020	73389.2±0.965	79768.8±0.967	67263.8±0.964	61350.6±0.939	55063.8±1.009	55063.8±1.009	
AFC <sub>8</sub> (6.40 µg/l)	69712.2±0.965	62477.8±0.770	57147.4±0.964	56339.4±1.020	73389.2±0.965	79768.8±0.967	67263.8±0.964	61350.6±0.939	55063.8±1.009	55063.8±1.009	
AFC <sub>9</sub> (7.20 µg/l)	132000.8±0.664	125133.2±0.722	114447.4±0.622	112706.4±0.738	140953.8±0.572	159481.6±0.448	134777.8±0.640	123827.8±0.636	110663.2±0.764	110663.2±0.764	
AFC <sub>10</sub> (8.00 µg/l)	132000.8±0.664	125133.2±0.722	114447.4±0.622	112706.4±0.738	140953.8±0.572	159481.6±0.448	134777.8±0.640	123827.8±0.636	110663.2±0.764	110663.2±0.764	
AFC <sub>11</sub> (8.80 µg/l)	97817.6±0.651	94652.4±0.637	84950.4±0.630	83832.2±0.668	107782.2±0.718	118351.4±0.547	97778.4±0.679	93193.4±0.741	83859.2±0.906	83859.2±0.906	
AFC <sub>12</sub> (9.60 µg/l)	97817.6±0.651	94652.4±0.637	84950.4±0.630	83832.2±0.668	107782.2±0.718	118351.4±0.547	97778.4±0.679	93193.4±0.741	83859.2±0.906	83859.2±0.906	
AFC <sub>13</sub> (10.40 µg/l)	195001.8±0.439	189277.8±0.497	170263.6±0.458	167982.2±0.556	207835.4±0.464	236602.2±0.331	236602.2±0.331	236602.2±0.331	186447.4±1.13535	186447.4±1.13535	
AFC <sub>14</sub> (11.20 µg/l)	195001.8±0.439	189277.8±0.497	170263.6±0.458	167982.2±0.556	207835.4±0.464	236602.2±0.331	236602.2±0.331	236602.2±0.331	186447.4±1.13535	186447.4±1.13535	

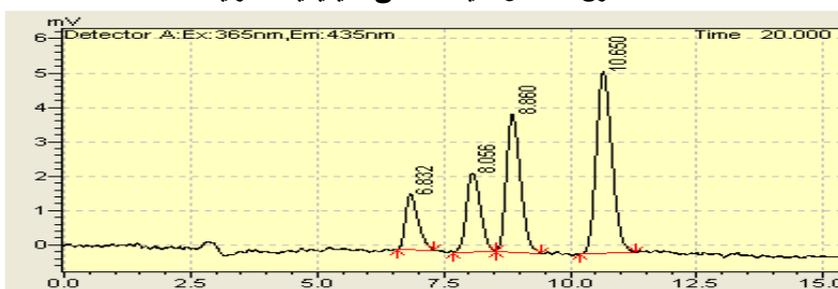
Flow Rate: 1ml/min, T:40°C, Column (C<sub>18</sub>), Mobile Phase: (Water: Methanol: Acetonitrile: 60:20:20 V:V:V)

\* n=5 تكرارية حقن المحلول العياري للعائد لمركبات الأفلاتوكسينات (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>).  
\* حد الثقة عند مستوى ثقة 95%

**5- طريقة الاشتقاق:** تم استخدام الاشتقاق بالخلية الكيمائية 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 B<sub>1</sub> و G<sub>1</sub> ولكن بشكل ضئيل، وفق ما هو واضح بالشكل (5).



b: دون استعمال خلية الاشتقاق الكيمائية الضوئية



a: باستعمال خلية الاشتقاق الكيمائية الضوئية

الشكل (5) كروماتوغرامات فصل الأفلاتوكسينات (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>) باستعمال خلية الاشتقاق الكيمائية الضوئية، أو عدم استعمالها

**6- تكرارية فصل والتعيين المتزامن للأفلاتوكسينات (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>) باستخدام عمود الفصل الكروماتوغرافي C<sub>18</sub> 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 عشرون مكرراً، يوضح الجدول رقم (5) تكرارية فصل مركبات الأفلاتوكسين (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>) وفق الشروط التحليلية المثلى التي تم

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

الجدول (5) تكرارية فصل، والتعيين المتزامن لمركبات الأفلاتوكسينات (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>) بتراكيز C<sub>18</sub> µg/l (0.80, 2.65, 0.825, 2.675) على الترتيب باستخدام عمود الفصل الكروماتوغرافي

وفق تقانة HPLC-FLD باعتماد الشروط المثلى

Peak التراكيز الأمثلة	Mean±SD%	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
AFL G <sub>1</sub> 0.80 µg/l																					
Retention	6.64±1.886	6.93	7.00	6.972	6.991	6.988	7.000	6.997	6.987	6.976	6.976	6.986	6.984	6.976	6.982	6.991	6.986	6.984	6.987	7.001	7.054
Area	1977.15±17.15	1931	1934	1987	1962	1968	1984	1942	1979	1951	1974	1983	1983	1990	1983	1917	1970	1947	1934	1949	1971
Height	186.95±1.631	1897	1772	1759	1695	1640	1685	1671	1687	1718	1659	1665	1687	1665	1689	1743	1673	1678	1674	1714	1698
Width	0.60±1.896	0.69	0.66	0.697	0.683	0.688	0.688	0.688	0.670	0.688	0.681	0.681	0.689	0.686	0.689	0.681	0.683	0.685	0.685	0.689	0.689
AFL G <sub>2</sub> 2.65 µg/l																					
Retention	8.18±1.037	8.149	8.170	8.274	8.189	8.076	8.082	8.108	8.137	8.118	8.141	8.132	8.085	8.122	8.139	8.114	8.090	8.101	8.125	8.135	8.165
Area	4236.89±1.79	4456	4423	4495	4244	4363	4285	4295	4276	4292	4240	4240	4492	4242	4244	4268	4277	4317	4243	4271	4464
Height	232.20±1.862	2391	2353	2361	2335	2297	2293	2270	2322	2290	2337	2317	2304	2259	2304	2284	2260	2259	2279	2270	2398
Width	0.67±1.071	0.69	0.68	0.697	0.685	0.697	0.696	0.697	0.677	0.688	0.695	0.691	0.686	0.683	0.685	0.690	0.693	0.687	0.691	0.692	0.686
AFL B <sub>1</sub> 0.825 µg/l																					
Retention	9.07±1.121	9.039	9.065	9.072	9.109	9.106	9.087	9.104	9.090	9.147	9.102	9.043	9.046	9.031	9.079	9.066	9.046	9.112	9.079	9.138	9.198
Area	1630.65±1.75	1770	1809	1657	1641	1687	1614	1709	1616	1654	1691	1631	1693	1697	1659	1704	1642	1660	1624	1677	1861
Height	410.20±1.815	433	437	432	417	436	406	404	405	401	401	405	397	395	402	402	402	400	409	419	448
Width	0.97±1.091	0.83	0.816	0.813	0.808	0.801	0.805	0.819	0.819	0.815	0.819	0.813	0.805	0.800	0.804	0.818	0.802	0.800	0.814	0.819	0.815
AFL B <sub>2</sub> 2.675 µg/l																					
Retention	10.89±1.097	10.868	10.929	10.828	10.825	10.839	11.007	10.758	10.831	10.734	10.763	10.769	10.775	10.830	10.807	10.818	10.793	10.819	10.809	11.119	11.103
Area	1187.03±1.773	1183	1203	1197	1186	1182	1185	1185	1183	1170	1187	1185	1182	1170	1197	1197	1197	1202	1187	1187	1197
Height	54.00±1.688	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53	53
Width	0.60±1.705	0.55	0.53	0.56	0.55	0.53	0.53	0.53	0.57	0.59	0.57	0.57	0.57	0.57	0.57	0.57	0.57	0.57	0.57	0.57	0.57

\*n=20: تكرارية حقن المحلول العياري للعائد لمركبات الأفلاتوكسينات (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>) 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:

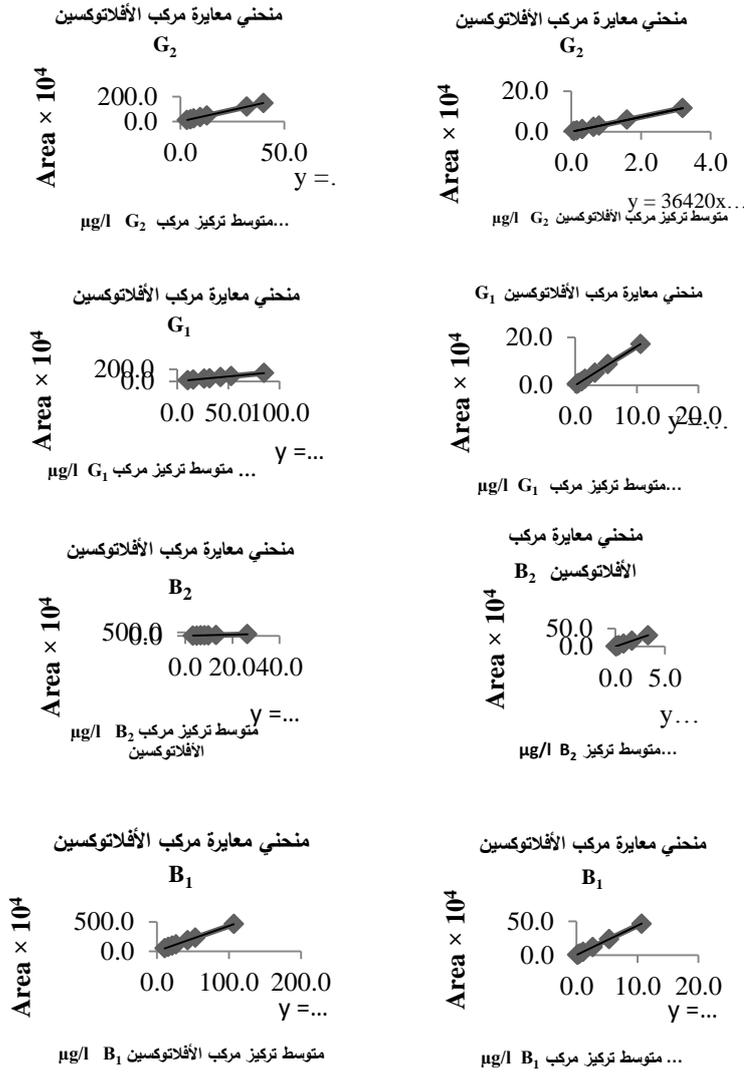
#### 1- إيجاد المجال التحليلي الخطي:

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 (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>) على الترتيب الموافقة لتراكيز مختلفة بتطبيق الشروط المثلى

AFL G <sub>2</sub>	التكرار (µg/l)	0.008	0.016	0.024	0.032	0.040	0.080	0.160	0.320	0.480	0.640	0.800	0.960	1.280	1.600
	متوسط مساحة قمة مركب الأفلاتوكسين G <sub>2</sub> Area × 10 <sup>4</sup>	ND**	ND**	ND**	ND**	0.176	0.324	0.620	1.172	1.786	2.388	2.940	3.520	4.698	5.883
AFL G <sub>1</sub>	التكرار (µg/l)	2.500	3.200	4.800	6.000	8.000	9.600	12.800	16.000	25.600	32.000	40.000	48.000	56.000	64.000
	متوسط مساحة قمة مركب الأفلاتوكسين G <sub>1</sub> Area × 10 <sup>4</sup>	9.410	11.663	17.787	23.892	29.347	35.209	47.550	59.680	95.097	119.779	148.261	164.890	156.536	145.182
AFL B <sub>2</sub>	التكرار (µg/l)	0.026	0.053	0.080	0.011	0.132	0.265	0.530	1.060	1.590	2.120	2.650	3.180	4.240	5.300
	متوسط مساحة قمة مركب الأفلاتوكسين B <sub>2</sub> Area × 10 <sup>4</sup>	ND**	ND**	0.0807	0.130	0.229	0.430	0.850	1.594	2.563	3.312	4.345	5.169	6.812	8.703
AFL B <sub>1</sub>	التكرار (µg/l)	8.480	10.600	15.500	21.200	26.500	31.800	42.400	53.000	84.800	106.000	132.500	159.000	185.500	212.000
	متوسط مساحة قمة مركب الأفلاتوكسين B <sub>1</sub> Area × 10 <sup>4</sup>	13.494	17.201	26.429	35.403	44.122	51.778	70.085	86.782	138.666	148.065	146.098	92.868	65.236	68.400
AFL B <sub>1</sub>	التكرار (µg/l)	0.00825	0.0165	0.02475	0.033	0.04125	0.0825	0.165	0.330	0.495	0.660	0.825	0.990	1.220	1.650
	متوسط مساحة قمة مركب الأفلاتوكسين B <sub>1</sub> Area × 10 <sup>4</sup>	ND**	ND**	0.197	0.321	0.409	0.799	1.580	3.199	4.749	6.389	7.976	9.552	12.719	15.948
AFL B <sub>1</sub>	التكرار (µg/l)	2.640	3.360	4.950	6.000	8.250	9.900	13.200	16.500	26.400	33.000	41.250	49.500	57.750	66.000
	متوسط مساحة قمة مركب الأفلاتوكسين B <sub>1</sub> Area × 10 <sup>4</sup>	25.418	31.436	45.108	61.237	74.998	89.137	120.934	149.333	237.102	280.581	306.180	284.003	237.784	187.612
AFL B <sub>1</sub>	التكرار (µg/l)	0.02675	0.0535	0.08025	0.107	0.13375	0.2675	0.535	1.070	1.605	2.140	2.675	3.210	4.280	5.350
	متوسط مساحة قمة مركب الأفلاتوكسين B <sub>1</sub> Area × 10 <sup>4</sup>	ND**	0.163	0.330	0.418	0.565	1.171	2.339	4.652	7.046	9.399	11.835	14.105	18.841	23.656
AFL B <sub>1</sub>	التكرار (µg/l)	8.560	10.700	16.050	21.400	26.750	32.100	42.800	53.500	85.600	107.000	133.750	160.500	187.250	214.000
	متوسط مساحة قمة مركب الأفلاتوكسين B <sub>1</sub> Area × 10 <sup>4</sup>	37.514	46.584	70.990	93.809	115.398	140.838	187.208	239.684	369.002	459.536	572.505	683.200	702.088	826.644

\* n=5 تكرارية حقن المحلول العياري لمركبات الأفلاتوكسينات (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>).

\*\* 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 <sub>2</sub>	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 <sub>1</sub>	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 B <sub>2</sub>	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 <sub>1</sub>	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 <sub>2</sub>	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 <sub>1</sub>	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 <sub>2</sub>	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 <sub>1</sub>	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 العائد 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 <sub>2</sub>	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 <sub>1</sub>	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 <sub>2</sub>	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 <sub>1</sub>	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 (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>) وفق تقنية HPLC-FLD باستعمال الاشتقاق بالخلية الكيميائية الضوئية

مركب الأفلاتوكسين	G <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>1</sub>
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 (B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>) حتى تراكيز منخفضة تبين أن حدّ الكشف العملي:

مركب الأفلاتوكسين	G <sub>2</sub>	G <sub>1</sub>	B <sub>2</sub>	B <sub>1</sub>
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 $\mu\text{m}$ ) with Guard Column.	عمود الفصل الكروماتوغرافي HPLC Column
20 $\mu\text{l}$	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 B<sub>1</sub> 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 B<sub>1</sub> and M<sub>1</sub> 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 B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> and G<sub>2</sub> 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.