بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه پیام نور

مرکز دلیجان

پایان نامه
برای دریافت مدرک کارشناسی ارشد

رشته شیمی تجزیه
گروه شیمی

تعیین میزان پاتولین موجود در آب سیب با استفاده از روش میکرواستخراج با قطره حلال پخشی به همراه کروماتوگرافی مایع - باکارایی بالا

رویا توکلی

استاد راهنما: دکتر عبدالرضا محمدی
استاد مشاور:دکتر عبدالمحمد عطاران
بهمن ماه ۱۳۹۰

اینجانب رویا توکلی دانشجوی ورودی سال ۱۳۸۹ مقطع کارشناسی ارشد رشته شیمی تجزیه گواهی می‌نمایم چنانچه در پایان‌نامه خود از فکر،ایده ونوشته دیگری بهره گرفته‌ام با نقل قول مستقیم یا غیر مستقیم منبع یا مأخذ آن را نیز در جای مناسب ذکر کرده‌ام. بدیهی است مسئولیت تمامی مطالبی که نقل قول دیگران نباشد بر عهده خویش می‌دانم وجوابگوی آن خواهم بود.

نام ونام خانوادگی دانشجو

تاریخ وامضا

اینجانب رویا توکلی دانشجوی ورودی سال ۱۳۸۹ مقطع کارشناسی ارشد رشته شیمی تجزیه گواهی می‌نمایم چنانچه براساس مطالب پایان نامه خود اقدام انتشار مقاله، کتاب، ... نمایم ضمن مطلع نمودن استاد راهنما، با نظر ایشان نسبت به نشر مقاله، کتاب، ... وبه صورت مشترک وبا ذکر نام استاد راهنما مبادرت نمایم.

نام ونام خانوادگی دانشجو

تاریخ وامضا

کلیه حقوق مادی مترتب از نتایج مطالعات، آزمایشات و نوآوری ناشی از تحقیق موضوع این پایان نامه متعلق به دانشگاه پیام نور می‌باشد.

بهمن ماه ۱۳۹۰

چکیده

پاتولین در سال ۱۹۷۰ توسط آژانس بین المللی تحقیقات سرطان به عنوان یک "ماده سرطانزای احتمالی برای انسان" طبقه بندی شد. این یافته نگرانی وسیعی‌رادر سطح بین المللی درپی‌داشت. پاتولین در میوه‌هایی مثل سیب ، انگور، زردآلو، گوجه و فراورده‌های غذایی حاصل از آن‌ها تشکیل می شود اما در بین این میوه‌ها، سیب وفراوه‌های آن بخصوص آب سیب مهمترین منبع تحقیقات در مورد پاتولین می‌باشد. با توجه به مصرف زیاد آب سیب دردنیا و ایران، هدف‌ازاین تحقیق، بررسی میزان پاتولین در انواع آب سیب‌های موجوددر کشور بااستفاده‌از روش ریز استخراج مایع-مایع پخشی می باشد. دراین پژوهش، از روش میکرو استخراج مایع- مایع پخشی با بکارگیری مایعات یونی برای پیش تغلیظ وجداسازی پاتولین استفاده شده است. در این‌روش مخلوط مناسب مایع یونی ۱-هگزیل ۳-متیل ایمیدازولیوم هگزافلورو فسفات($[HMIM]PF_6$) ، بعنوان حلال استخراجی و متانول (حلال پخش کننده) جهت استخراج پاتولین به کار گرفته شده است. پس از اضافه شدن نمک، مخلوط حلال استخراجی وپخشی به سرعت به وسیله سرنگ به درون محلول تزریق گردید. محلول کدر و ابری شده و استخراج توسط قطرات بسیار ریز مایع یونی انجام شد. در نهایت پس از سانتریفوژ محلول، فاز ته نشین شده حاوی پاتولین به طور کامل به همراه (حلال رقیق کننده) به HPLC تزریق و میزان پاتولین اندازه گیری شد. در این کار پارامترهایی نظیرpH ، مقدار مایع یونی به عنوان حلال استخراجی، مقدار حلال پخش‌کننده واثر نمک بااستفاده‌ازروش آماری سطح پاسخ (RSM) باطرح مکعب مرکزی بهینه شد و کارایی روش پیشنهادی تحت شرایط بهینه با استناد به ارقام شایستگی روش در مقایسه با سایر روش‌های ارائه شده در مقالات مورد ارزیابی‌قرار می‌گیرد.

روش ارائه‌شده‌به‌طورموفقیت آمیزی برای اندازه گیری پاتولین در نمونه های حقیقی به کار گرفته شد.

کلمات کلیدی: پاتولین، آب‌سیب، پیش‌تیمار نمونه، آنزیم، مایع یونی،میکرواستخراج مایع مایع پخشی، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، رویه پاسخ سطح.

فهرست مطالب

عنوان **صفحه**

فصل اول: پاتولین ،معرفی و روش های اندازه‌گیری

۱-۱ پاتولین..... ۲

۱-۱-۱ خواص فیزیکی وشیمیایی..... ۳

۱-۱-۲ منابع پاتولین..... ۳

۱-۱-۳ اهمیت اندازه‌گیری..... ٤

۱-۱-٤ مقادیر مجاز..... ٥

۱-۲ روش‌های استخراجی متداول پاتولین..... ٦

۱-۳ تکنیک‌های اندازه‌گیری پاتولین..... ۸

۱-٤ روش‌های میکرواستخراج پاتولین..... ۹

فصل دوم:مروری بر روش‌های ریز استخراج با حلال و مایعات یونی

۲-۱ مقدمه..... ۱۲

۲-۲روش های ریزاستخراج..... ۱٥

۲-۲-۱ ریز استخراج با فاز جامد (SPME) ۱٦

۲-۲-۱-۱ صورمختلف SPME..... ۲۰

۲-۲-۱-۲ اصول ریزاستخراج با فاز جامد.....۲۲

۲-۲-۱-۳ جنبه های تئوری ریز استخراج با فاز جامد.....۲۳

۲-۲-۱-۳-۱ ترمودینامیک.....۲٤

۲-۲-۲ روش‌های مختلف ریز استخراج با حلال(SME).....۲۷

۲-۲-۲-۱ سیستم قطره در قطره(DDS) ۲۸

۲-۲-۲-۲ ریز استخراج با حلال با استفاده از میله تفلونی.....۳۰

۲-۲-۲-۳ ریز استخراج بر مبنای قطره(SDME).....۳۱

۲-۲-۲-٤ ر یزاستخراج با فاز مایع (LPME).....۳۲

۲-۲-۲-۵ ریز استخراج مایع- مایع- مایع (استخراج با حلال همراه با استخراج برگشتی همزمان (LPME-BE).....۳۳

۲-۲-۲-٦ ریز استخراج با جریان پیوسته(CFME) ۳۵

۲-۲-۲-۷ ریز استخراج با میله حاوی حلال (SBME).....۳٦

۲-۲-۲-۸ ریز استخراج با حلال توسط غشاء فیبر تو خالی(HF-LPME) ۳۷

۲-۲-۲-۹ ریز استخراج با حلال از فضای فوقانی(HS-LPME- HS-SME).....۳۹

۲-۳ میکرو استخراج مایع-مایع پخشی(DLLME) ٤۲

۲-۳-۱ مقدمه..... .....٤۲

۲-۳-۲ اصول میکرو استخراج مایع مایع پخشی.....٤٤

۲-۳-۳ روابط تئوری در DLLME ٤٦
۲-۳-٤ پارامترهای موثر بر راندمان استخراجDLLME..... ٤٩
۲-۳-٤-۱ انتخاب حلال استخراجی..... ٤٩
۲-۳-٤-۲ انتخاب حلال پخش کننده ٥٠
۲-۳-٤-۳ اثر حجم حلال استخراجی ٥٠
۲-۳-٤-٤ اثر حجم حلال پخش‌کننده ٥١
۲-۳-٤-٥ اثر زمان استخراج..... ٥١
۲-۳-٤-٦ اثر افزایش نمک ٥١
۲-۳-٥ کاربردهایDLLME ٥٢
۲-۳-٦ سازگاری این روش با دستگاه‌ها..... ٥٤
۲-۳-۷ مقایسه روش میکرواستخراج مایع- مایع پخشی با روش‌های دیگر..... ٥٤
۲-٤ مایعات یونی..... ٥٦
۲-٤-۱ مقدمه..... ٥٦
۲-٤-۲ تعریف مایعات یونی..... ٥۷
۲-٤-۳ خواص دلخواه مایعات یونی..... ٥٨
۲-٤-٤ ساختار مایعات یونی..... ٥٩
۲-٤-٤-۱ سازنده‌های ساختاری مایعات یونی..... ٥٩
۲-٤-٥ کاربرد مایعات یونی..... ٦١

۲-٤-٥-۱ کاربرد تجزیه‌ای و آنالیز مایعات یونی.....٦٢

۲-٤-٦ انتخاب مایع یونی.....٦٣

۲-٥ کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا HPLC[1].....٦٥

۲-٥-۱ مقدمه.....٦٥

۲-٥-۲ شیوه‌های جداسازی کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا.....٦٧

فصل سوم:بخش تجربی

۳-۱ تهیه‌نمونه‌ها.....۷۰

۳-۲ دستگاهها و مواد شیمیایی مورد استفاده در اجرای تحقیق ۷۰

۳-۳ نحوه اجرای تحقیق.....۷۲

۳-۳-۱تهیه محلول های استاندارد اولیه.....۷۲

۳-۳-۲ آزمایش‌های اولیه و بهینه‌سازی شرایط جداسازی.....۷۲

۳-۳-۳ شرایط دستگاه HPLC.....۷۲

۳-۳-٤ طراحی آزمایش و بهینه‌سازی عوامل موثر بر استخراج به روش پاسخ سطح.....۷۳

۳-۳-٥ آزمون های معتبرسازی روش اندازه گیری HPLC جهت تعیین‌پاتولین.....۷٤

۳-۳-٥-۱ تعیین خطی بودن (رسم منحنی کالیبراسیون).....۷٤

۳-۳-٥-۲ تعیین دقت روش یا تکرارپذیری (Repeatability).....۷٥

۳-۳-٥-۳ تعیین صحت روش یا Recovery.....۷٥

۳-۳-٥-٤ تعیین حد تشخیص یا آشکارسازی.....۷٦

۳-۳-۵-۵ تعیین حد اندازه گیری.....۷۶

۳-۳-۵-۶ تعیین فاکتور تغلیظ.....۷۶

۳-۳-۶ آزمون اندازه گیری پاتولین در نمونه های آب سیب توسط فرآیند ریز استخراج مایع مایع پخشی (DLLME).....۷۸

۳-٤ روشهای آماری و تجزیه و تحلیل داده ها.....۷۹

فصل چهارم:یافته‌ها

٤-۱ نتایج بهینه سازی عوامل موثر بر استخراج با استفاده از رویه پاسخ سطح (RSM).....۸۱

٤-۱-۱ نتایج آنالیز داده های ANOVA مربوط به پاسخ کل ۸۳

٤-۲ نتایج معتبرسازی روش اندازه گیری DLLME جهت تعیین پاتولین.....۹۰

٤-۳ نتایج اندازه گیری غلظت پاتولین در انواع نمونه های آب سیب.....۹۲

فصل پنجم:بحث ونتیجه‌گیری

۵-۱ بهینه‌سازی عوامل موثر بر استخراج با استفاده از رویه پاسخ سطح (RSM).....۹۶

۵-۱-۱آنالیز داده های ANOVA مربوط به پاسخ کل.....۹۶

۵-۲معتبرسازی روش اندازه گیری DLLME جهت تعیین پاتولین درآب‌سیب.....۹۸

۵-۲-۲ مقایسه ارقام شایستگی پیشنهادی با روش‌های دیگر.....۱۰۰

۵-۳ مقدار پاتولین در انواع نمونه های آب سیب.....۱۰۲

٥-٤ نتیجه‌گیری.....۱۰۲

٥-٥ پیشنهادات.....۱۰۳

فهرست شکل‌ها

عنوان **صفحه**

شکل ۱-۱ پاتولین..... ۲

شکل ۲-۱ دسته بندی تکنیکهای استخراجی بر اساس نوع فاز استخراج‌کننده و مکانیسم عمل استخراج..... ۱۳

شکل ۲- ۲ الف طرح یک سرنگ SPME تجاری ساخته شده بر پایه ریز سرنگ های هامیلتون سری ۷۰۰۰ ..... ۱۷

شکل ۲-۲ ب انواع سرنگ‌های SPME با کاربردهای مختلف ۱۸

شکل ۲-۳ اشکال مختلف SPME ۲۰

شکل ۲-٤ تصویر سیستم قطره در قطره..... ۲۹

شکل ۲-۵ نمائی از سیستم ریزاستخراج با میلهٔ تفلونی..... ۳۰

شکل ۲-٦ سیستم ریزاستخراج با قطره ۳۱

شکل ۲-۷ نمایشی از سیستم SME/BE ۳۳

شکل ۲-۸ نمایش سیستم SME/BE برای پیش تغلیظ بداخل یک میکروقطره..... ۳٤

شکل ۲-۹ نمایش سیستم ریز استخراج با جریان پیوسته..... ۳٦

شکل ۲-۱۰ سیستم ریز استخراج با میله ۳۷

شکل ۲-۱۱ نمایی از استخراج به روش HF-LPME ۳۸

شکل ۲-۱۲ طرحی از یک سیستم ریز استخراج فاز مایع ترکیب شده با فیبر توخالی.....۳۹

شکل ۲-۱۳ طرحی از یک سیستم ریز استخراج با حلال در فضای فوقانی.....٤٠

شکل ۲-١٤ نمایی ساده از ظرف بسته مورد استفاده در سیستمHS-LPME ٤١

شکل ۲-۱۵ نمایش HS-SPME همراه با آنالیز GC.....٤٢

شکل ۲-١٦ مراحل استخراج در ریز استخراج مایع- مایع‌پخشی.....٤٦

شکل ۲-۱۷ کاتیون‌های رایج در ساختار مایعات یونی و اثرات تعویض آنیون‌ها بر آب‌دوستی یا آب‌گریزی مایعات یونی.....۵۹

شکل ۲-۱۸ مکانیسم سنتزمایعات یونی ٦٠

شکل ۲-۱۹ مدل فضایی مولکول $[BMIM][PF_6]$ ٦۵

شکل ۲-۲۰ ساختمان مولکولی مایع یونی $[BMIM][PF_6]$ ٦۵

شکل ۲-۲۱ طرحی ساده از سیستم HPLC ٦٦

شکل ۲-۲۲ انتخاب روش HPLC.....٦٨

شکل ۳-۱ دیاگرام شماتیک جداسازی پاتولین در سیستم سه‌فازی محلول نمکی آبی وحلال یونی.....۷۸

شکل ٤-۱- نمودارهای سه بعدی مربوط به اثر تداخلی

(الف) حلال پخشی - حلال استخراجی.....۸۵

(ب) حلال استخراجی – pH.....۸٦

(ج) حلال پخشی – pH.....۸٦

(د) pH – نمک.....۸۷

نمودار ٤-۲- مقادیر پیش بینی شده در برابر مقادیر پاسخ های واقعی.....۸۹

نمودار ٤-۳ مقادیر احتمالی در مقادیر باقیمانده (Residual).....۹۰

شکل ٤-٤ منحنی کالیبراسیون پاتولین.....۹۱

شکل ٤-۵ کروماتوگرام محلول پاتولین استاندارد ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر..... ۹٤

شکل ٤-٦ کروماتوگرام پاتولین در نمونه آب‌سیب..... ۹٤

فهرست جدول‌ها

عنوان **صفحه**

جدول۲-۱- مقایسه تکنیک‌های مختلف آماده‌سازی نمونه..... ۱٤

جدول۲-۲- نمونه‌هایی از کاربرد روش DLLME..... ۵۳

جدول۲-۳- خصوصیات تعدادی از مایعات یونی ایمیدازولی محتوی محتوی PF_6^- و BF_4^-..... ٦۱

جدول۲-٤- کاربرد مایعات یونی قابل انحلال در آب در سنسورهای الکتروشیمیایی..... ٦۲

جدول ۳-۱- مشخصات مواد شیمیایی مورداستفاده‌دراجرای تحقیق..... ۷۰

جدول ۳-۲- مشخصات دستگاههای مورد استفاده در اجرای تحقیق..... ۷۱

جدول ۳-۳- متغیرها و سطوح مورد بررسی حاصل از طرح مرکب مرکزی..... ۷٤

جدول ٤-۱- ماتریکس طراحی آزمایش حاصل از طرح مرکب مرکزی با پاسخ های واقعی کل..... ۸۱

جدول ٤-۲- نتایج آزمون ANOVA بر روی داده های مربوط به تعیین مدل پاسخ سطح..... ۸٤

جدول ٤-۳- ارقام شایستگی روش پیشنهادی..... ۹۱

جدول ٤-٤- محاسبه مقدار پاتولین در نمونه‌های آب‌سیب مختلف..... ۹۲

جدول ٤-۵- تعیین راندمان استخراج روش میکرواستخراج مایع مایع پخشی..... ۹۳

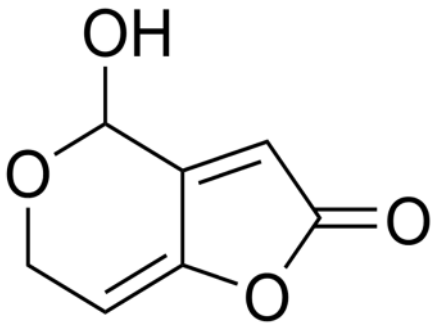
جدول ۵-۱- مقایسه ارقام شایستگی روش پیشنهادی جهت آنالیز پاتولین در آب سیب با روش‌های دیگر..... ۱۰۱

فصل اول:

پاتولین،معرفی و روش‌های‌اندازه‌گیری

۱-۱ پاتولین[1]

پاتولین 4-hydroxy-4h-furo(3,2-c)pyran-2(6h)-on با فرمول ملکولی $C_7H_6O_4$ در حالت خالص به دوصورت بلور کریستالی سفید ودر حالت مایع به صورت شفاف و بی رنگ یافت شده و از خانواده مایکوتوکسین‌ها[2] می‌باشد.(شکل ۱-۱)



شکل۱-۱ ساختمان مولکولی پاتولین

مایکوتوکسین‌ها خطرناکترین سم‌هایی هستند که توسط متابولیت ثانویه بعضی قارچ‌ها از قبیل پنسیلیوم[3]، آسپیرژیلوس[4] وبایسوکلامیس[5] تولید می‌شوند. از میان کپک های تولیدکننده مایکوتوکسین‌ها، پنسیلیوم گسترده‌ترین عامل تولیدکننده پاتولین ومسئول خرابی وپوسیدگی میوه‌ها می‌باشد[۱۱-۱]. خصوصیت سرطانزایی پاتولین در بعضی حیوانات آزمایشگاهی مثل موش مشاهده شده است. مصرف این ماده در انسان باعث اثرات حاد اولیه مثل تشنج، التهاب وزخم های روده‌ای شامل زخم سلول‌های تولید کننده مخاط و استفراغ شدید واثرات ثانویه مصرف پاتولین وتغیرات

[1] Patulin
[2] Mycotoxin
[3] Penicillium
[4] Aspergillus
[5] Byssochlamys

پاتولوژیکی ناشی از آن شامل ادم مغزی، خونریزی شش‌ها وضایعات مویرگی در کبد وطحال وکلیه می‌باشد[۱].

۱-۱-۱ خواص فیزیکی وشیمیایی

پاتولین یک سم مایکوتوکسین همی استال (نا جورحلقه) غیر اشباع لاکتونی با وزن ملکولی ۱۵٤/۱٤ گرم بر مول بوده و دارای نقطه ذوب ۱۱۰ درجه سانتی گراد می‌باشد. ماکزیمم طول موج جذب آن ۲۷٦ نانومتر و ضریب جذب آن ۱٤٤۵۰ است. پاتولین قابل حل در آب بوده و همچنین انحلال‌پذیری قابل قبولی درحلال‌هایی از قبیل دی متیل سولفوکسیدDMSO،متانول، اتانول واتیل استات را نیز دارا می باشد. پاتولین یک سم قارچی مقاوم در برابر گرما بوده که در محیط اسیدی پایدار و در محیط قلیایی ناپایدار می-باشد[۲].

۱-۱-۲ منابع پاتولین

پاتولین در میوه‌هایی مثل سیب، گلابی، به، انگور، زردآلو، هلو، گوجه، پرتقال، گیلاس وغلات مرطوب یافت می‌شود اما در اکثر مطالعات انجام شده منبع اصلی این سم، سیب وفراوردهای غذایی تولید شده از آن می‌باشد[۳]. عوامل متعددی ازقبیل نوع آب‌میوه، PH، جامد های قابل حل در آب-میوه، دما، فعالیت آب، اثر اکسیژن وحضور نگهدارنده‌ها ممکن است تاثیر قوی در رشد کپک وتولید پاتولین در آب سیب داشته باشد.

۱-۱-۳ اهمیت اندازه‌گیری

مصرف پاتولین در انسان باعث اثرات حاد اولیه مثل تشنج، التهاب وزخم های روده‌ای شامل زخم سلول‌های تولید کننده مخاط و استفراغ شدید واثرات ثانویه مصرف پاتولین وتغییرات پاتولوژیکی ناشی از آن شامل ادم مغزی، خونریزی شش‌ها وضایعات مویرگی در کبد وطحال وکلیه می‌باشد[٤].

میزان پاتولین نه تنها یک شاخص مهم برای کیفیت آب‌سیب است بلکه می‌تواند معیاری برای تشخیص میزان استفاده میوه آلوده و آسیب دیده در تولید آب سیب باشد[٥]. پاتولین در اثر آسیب دیدن میوه ها حین چیدن حمل وجمع آوری به وجود می‌آید. پاتولین فقط در قسمت آسیب دیده میوه کپک زده تولید می‌شود و با درصد خرابی میوه رابطه دارد[٦]. اگرچه با حذف کردن بافت آسیب دیده وکپک زده میوه مقدار پاتولین نیز کاهش می یابد با وجود این سم می تواند تا یک سانتی متر از اطراف داخل بافت سالم میوه نفوذ کند بنابراین تنها با زدودن قسمت های کپک زده وخراب میوه نمی توان این آلودگی را از بین برد[٧].

امروزه یکی از مهمترین عوامل که در آب‌میوه بخصوص آب‌سیب باید بررسی شود میزان سم پاتولین است.آزمایش اندازه گیری پاتولین در آب‌سیب پر هزینه است وبیشتر آب‌سیب هایی که از ایران صادر می شود در خارج از کشور اندازه گیری می شود. ارزش غذایی آب‌میوه ها و بررسی آنها از نظر رزیم غذایی مهم می باشد.استفاده از آب‌میوه ها قابلیت بدن انسان را از نظر دریافت ویتامین ث افزایش می دهند. بعد از انگور سیب بیشترین تولید جهان را دارد که سالیانه بیش از ٤٠میلیون تن سیب در جهان تولید می شود که حدود ٥میلیون تن آن به آب‌میوه تبدیل می شود.بررسی در مورد

نحوه کاهش سم پاتولین که بر روی کیفیت آب‌سیب تاثیر دارد و یکی از معایب آن به شمار می رود کاری مهم بوده و نیاز به تحقیقات بیشتر در این زمینه را آشکار می‌سازد[۸].

همچنین با توجه به اینکه یکی از مشکلات مهم بر سر راه صادرات آب‌میوه بخصوص آب سیب میزان پاتولین موجود در آن می‌باشد و با توجه به محدودیت وضع شده توسط سازمان استاندارد جهانی وسازمان بهداشت جهانی(مقدار مجاز پاتولین در فراورده‌های غذایی میوه ۵۰ نانوگرم برگرم می‌باشد)تلاش برای ارائه راهکارهای مفید و مقرون به صرفه برای استخراج و اندازه گیری دقیق مقادیر بسیار کم آن در آب‌میوه و کاهش میزان این سم خطرناک ضروری به نظر می‌رسد و از بعد اقتصادی میتواند کمک شایانی به بهبود اقتصاد کشور در زمینه صادرات غیر نفتی نماید.

از دیرباز تا کنون روش‌های متعددی جهت استخراج پاتولین در آب‌سیب به کار گرفته شده است و مطالعات بسیاری در زمینه اثبات آلودگی پاتولین درآب سیب وراههای کاهش آن در کلیه فراورده‌های تولید شده در کشورهایی مثل برزیل کانادا یونان ایتالیا اسپانیا استرالیا اتریش فرانسه سوئد ترکیه وایران انجام شده است.

۱-۱-٤ مقادیر مجاز

پاتولین اولین بار در سال۱۹۵۵ کشف شد و تعدادی ازکپک‌هایی که این سم راتولید می‌کردند شناسایی شدند و درهمین سال به وسیله کمیته تخصصی فائو[1] FAO\WHO محدودیت مصرف مواد غذایی حاوی پاتولین تصویب شد. بر اساس این مصوبه میزان دریافت روزانه قابل تحمل[2] پاتولین

[1] Joint Food And Organization/World Health Organization Expert Committee on Food Additives (JECFA)
[2] Provisional maximum tolerable daily intake (PMTDI)