

۱۳۴.

دانشگاه تهران

دانشکده بهداشت

پایان نامه

برای دریافت درجه فوق لیسانس بهداشت عمومی (M.P.H)

در رشته بهداشت محیط

موضوع

بررسی تکنیک های جدا کردن ، شناسائی و تعیین مقدار حشره کشهای کلره

THIN-LAYER CHROMATOGRAPHY

بطریقه

براهنمائی

استاد ارجمند جناب آقای دکتر غلامحسین ثنائی

نگارش

دکتر علی اصغر رحیدری محمدآبادی

۱۳۵۲-۵۳

سال تحصیلی



۱۳۴۵

## قدردانی و سپاس

از مقام محترم ریاست ، معاونت و مدیریت گروه  
بهداشت محیط ، دانشکده بهداشت و همچنین  
هیئت محترم داوران ، بخاطر همکاریهای صمیمانه  
بدینوسیله سپاسگزاری می نمایم .  
در ضمن از جناب آقای دکتر ثنائی که در ارائه  
و تنظیم این پایان نامه نهایت سعی و همکاری را  
نمودند بدین طریق قدردانی می نمایم

## "فهرست مطالب"

صفحه	عنوان
۱	علت انتخاب موضوع
۴	مقدمه و تاریخچه
۷	مطالعات انجام شده در زمینه تعیین مقدار باقیمانده آفت کشها
۱۴	توسعه و پیشرفت کروماتوگرافی باختصار
۱۶	اقسام کروماتوگرافی
۲۱	تعیین Rf
۲۳	مراحل تهیه و تدارک جهت (T.L.C)
۳۱	مواد جاذب و محکم کننده
۳۳	واکنش سطوح
۳۵	تهیه و تصفیه عصاره نمونه‌ها
۴۰	اصول ظاهر کردن کروماتوگرام
۴۳	مرئی ساختن حشره کشها
۴۹	ارزشیابی کروماتوگرافها
۵۴	جداکردن آفت کشهای کلره
۶۰	طرز عمل T.L.C باختصار (لوازم کروماتوگرافی ( Shandon
۶۲	آزمایشات تجربی
۸۱	بحث
۸۳	نتایج
۸۵	خلاصه
۹۱	مأخذ

.....

## " علت انتخاب موضوع "

باقی مانده آفت کش دارمواد غذایی - باقی مانده آفت کش ها و بهداشت عمومی

وسعت دامنه مصرف ریز افزون آفت کش ها که در زمینه های گوناگونی بنا ر گرفته میشوند ، مشکلات بی شمار برادر محیط زیست انسانی بوجود آورده است . بسیاری از این ترکیبات شیمیائی نوظهور که در گروه آفت کش ها مورد مصرف قرار گرفته اند ممکن است برای گروه بزرگی از پستانداران و حتی انسان مضر بوده و در مواردی خطرناک و کشنده باشند .

آنچه که بیش از حد امروزه مورد توجه و کاوش قرار گرفته است رابطه پاره ای از بیماری های مختلف با تراکم مواد آفت کش در بافت های انسانی است .

گذشته از این اغلب مواد غذایی انسان دائما با این گونه مواد شیمیائی در حال تماس بوده است و به عبارتی میتوان گفت بعلت مصرف بی رویه اینگونه مواد محیط زیست انسانی در معرض آلودگی بیش از اندازه با اینگونه مواد سمی میباشد (۱۰). در این زمینه نه تنها آب مورد استفاده انسان و مواد غذایی مورد خطر آلودگی با اینگونه مواد می باشند بلکه هوای مورد استنشاق بشر نیز خالی از این مواد مضره نیستند . بدین لحاظ مشاهده میشود که مطالعه این مواد و متدهای اندازه گیری ، جدا نمودن و تعیین مقدار آنها در مواد غذایی و بافتهای حیوانی ، نباتی و انسانی - بچه اندازه در خوراکی و محیط و مطالعه بیشتری است .

از طرف کارخانه های سازنده اینگونه مواد رزبروز ترکیبات جدیدتری به بازار های تجارتي جهان عرضه میشود و تقاضای روز افزون آنها در زمینه های کشاورزی

( دفع آفات ) ، کنترل ناقلین بیماریها و مصارف دیگر این نکته را بیشتر در خسور مطالعه میسازد که چگونه میتوان این مواد مضره را کنترل نمود ؟

این پایان نامه با در نظر گرفتن مطالب و مسائلی که ذکر شد انتخاب گردید و در طول تجربیاتی که انجام شده مسائل متعددی در جهت ارزشیابی تکنیک های Thin-layer chromatography مورد تجزیه و تحلیل واقع گردیده است .

بلاحظه اهمیت که اینگونه مواد در محیط زیست انسانی دارند اقدام به مطالعه تکنیک های قابل ارائه و توصیه آنها جهت تشخیص و جدا کردن و تعیین مقدار آفت کشهای آلی کلره گردیده و در طول آزمایشات مکرر نتایج بدست آمده است که در خور مطالعه و تحقیق بیشتری می باشد .

بطور کلی مضرات اینگونه مواد در ترکیبات غذایی انسان در چند سال اخیر بیشتر مورد توجه قرار گرفته است . مسائلی که هم اکنون در مطالعه اینگونه مواد مطرح است برارذیل میباشند :

اول آنکه مواد آلوده کننده اغذیه انسان کدامند ؟ ، دیگر آنکه سرنوشت غائی و نهائی اینگونه مواد در انسان بچه گونه است ؟ و چه مقدار و به چه نسبت از اینگونه مواد در انسان دیده شده است ؟ ، حیوانات نسبت به این مواد تا چه حد مقاومت دارند ؟

در پاسخ به سئوالات فوق الذکر میتوان گفت آنچه که مسلم شده اینست که اینگونه مواد به روی سلامتی انسان اثر گذاشته و همچنین مصرف بی رویه آنها در محیط زیست ممکن است سبب بروز بیماریهای متعدد نزد انسان ، حیوان و گیاه را بنماید .

در مورد احتمال بروز سرطان ناشی از مصرف باقی مانده آفت کشها در مواد غذایی

آزمایشات متعددی انجام شده است ( ۱۰ ) .

مابین صدها آفت کش شیمیائی که در کشاورزی مورد مصرف قرار گرفته است ، فقط تعداد کمی از آنها نشان داده شده اند که در اثنای تجسسات سم شناسی ( Toxicology ) قادر به ایجا د تومورها در حیوانات تجربی آزمایشگاه می باشند و زمانیکه مقدار دوز ( dose ) زیاد در یک مدت طولانی داده شود این اثر بیشتر محسوس میشود ( ۲ ) .

امروزه محقق شده است که یک ترکیب شیمیائی ممکنست در طول فعالیت فیزیولوژیکی خویش به مواد فعال تری مبدل شود . این عمل توسط سلولهای زنده گیاه ، حشره یا حیوان صورت می گیرد . این موضوع درباره ای از تجسسات که بر روی حشره کشهای فسفره و همچنین آلدترین و هپتا کلران انجام شد دیده شده است ( ۲ ) .

باتکنیک های دقیق میتوان متابولیت های یک جسم شیمیائی را در عصاره های حاصله از گیاهان ، حشرات و یا حیوانات آزمایشگاهی ، اندازه گیری نمود .

این چنین مواد ممکن است توسط حلالهای مناسب در سیستم تعیین مقدار بطریقه کروماتوگرافی اندازه گیری وجد اشوند .

" مقدمه و تاریخچه "

کروماتوگرافی بر روی کاغذ Paper chromatography که نخستین بار توسط Consden و همکارانش در سال ۱۹۴۴ آغاز شده بود نوعی توسعه و تمحیم در زمینه تکنیک کروماتوگرافی تقسیمی Partition chromatography بشمار می آمد که توسط دو دانشمند بنامهای Martin و Synge بسال ۱۹۴۱ ابداع شده بود (۱) .

این تکنیک بسرعت در جهت بکاربردن و تعیین مقدار اجسام شیمیائی توسعه و تکامل یافت .

در همین زمان موفقیت های تحسین آمیزی در جهت بررسی هایی که بر روی آمینو اسید ها و ترکیبات هیدروفیلیک میشد بوجود آمد .

در حین کاوشات و تجسسات بر روی ترکیبات لیپوفیلیک اشکالات بی شماری مشاهده شد .

در سال ۱۹۳۸ متدی توسط Izmailov و Shraiber بکار برده شد که بشرح ذیل است :

این دو دانشمند از پودرهای جاذب بمنوان آدسوربان استفاده نمودند و پودرهای جاذب کننده برای سیستم Thin-layer Chromatography

(کروماتوگرافی بر روی قشرنازک) عبارت بودند از اکسید کلسیم و اکسید منیزیم یا آلومین (۱) .

Crowe's سال ۱۹۴۱ سطوح جاذب کننده ای که حاوی دندانده

هایی از صفحات مخصوص آزمایش لکه گذاری با بوات دیتری مایلی که دارای فرم

سراسیمی خاصی بود مورد استفاده قرار داد . این متد درحقیقت نوعی توسعه و تکامل درجهت جذب مواد مورد آزمایش بشمار آمد .

Mottier و Potterat در سال ۱۹۵۲ صفحاتی از آلومین را برای امتحانات و تجسسات کروماتوگرافی مواد رنگی و روغنی بکار بردند .

متد Thin-layer chromatography که امروزه مورد مصرف قرار گرفته و محقق شده است درحقیقت حاصل مطالعات و دانشمند به اسمـــــــــــــــــی Hall و Meinhard بوده است که آنها نیز به نوبه خود از مطالعات Williams بسال ۱۹۴۶ الهام گرفته و روش او را دنبال نموده اند .

بعد ها نشاسته را بعنوان عامل اتصال دهنده یا باندینگ Banding بمنظور استحکام بخشیدن سلوح جذب کننده بکار بردند .

مورد استعمال این متد برای تهیه Chromatostrips ها یا قطعات شیشه ای به ابعاد معلوم ( ۲۵ / ۵ × ۰ / اینچ ) بعد ها مورد بحث قرار گرفت و توسط Kirchner و همکارانش در سال ۱۹۵۱ جهت تجزیه ترکیبات ترپنئید Terpenoid Compounds بـــــــــــــــــه روش Thin-layer chromatography مورد استفاده قرار گرفت .

Kirchner و Miller در سال ۱۹۵۴ کروماتولیت های راکه توسط Reitsama در مطالعه بروی اسانس ها essential oils بکار برده شده بود و در اندازه های بزرگ ساخته شده بود معرفی نمودند .

از این تاریخ به بعد متد T.I.C در زمینه مطالعات بروی آفت کش ها توصیه شد .



این متد از آنجا شروع شد که Kirchner و همکارانش در سال ۱۹۵۴ بی فنیل biphenyl را در مرکبات تعیین مقدار نمودند .  
روشن شدن متد تصفیه و تجزای بی فنیل روی پلیت های حاوی سیلیکاژل با باند نشاسته سیستم Thin-layer chromatography را در زمینۀ تجسسات بروی باقی مانده آفت کش ها ممکن ساخت . با عمومیت دادن استفاده از سری کاغذ های تهیه شده توسط Stahl سالهای ۵۶-۱۹۵۸ و همچنین ۱۹۵۹ مصرف تکنیک T.L.C بیشتر شد و در سطح وسیعی توسعه و تعمیم یافت .  
فراهم بودن مواد تجارتي و وسایل توضیح داده شده توسط Stahl در سال ۱۹۵۹ در زمینۀ تهیه باند ژپس gypsum-bound و همچنین سطوح سیلیکاژل آلومین و کیسینل گور Kieselguhr فاکتورهای باارزش و بزرگی در جهت پیشرفت و تکامل این تکنیک به حساب آمد ( ۱ ) .  
امروزه متد T.L.C در تمام سطوح شیمی آنالیتیک مورد مصرف قرار می گیرد .  
این متد نه فقط برای تشخیص های فوری ترکیبات شیمیائی بکار برده میشود بلکه برای خلوص نمونه های مورد آزمایش و همچنین برای عمل تصفیه قبل از استفاده از متد های دیگر تجزیه ای نیز بکار برده میشود . عمومیت متد T.L.C سبب شد که در طول دو سال بالغ بر ۵ کتاب مهم و باارزش در این زمینه نوشته شده و به چاپ برسد .  
متد های تجسس باقی مانده آفت کش ها از سال ۱۹۶۰ باین طرف مورد استفاده قرار گرفته است .

مطالعات انجام شده در زمینه تعیین مقدار باقی مانده آفت کشتها  
دریافتهای انسان و حیوانات و گیاهان

---

تجسسات و تحقیقات بیشماری در این زمینه انجام شده است که به اختصار

پاره ای از اهم آنها بشرح زیر مورد بحث قرار می گیرد :

در طول سالهای ۱۹۶۵ و ۱۹۶۷ بالغ بر ۱۰ رساله در مورد تجزیه نمونه‌ها<sup>ی</sup>

چربی انسان بمنظور بررسی باقی مانده آفت کشته تهیه شده است ، بعنوان مثال :

در هندوستان ( Dale و همکارانش در ۱۹۶۵ ) ، اسرائیل Wassermann

و همکارانش ( ۱۹۶۵ ) ، در دانمارک ( Wiehe در ۱۹۶۶ ) ، ( نیوزیلند

Hayes و Brewerton و Mcgrath ۱۹۶۷ ) و در نیواورلئان

و همکارانش ۱۹۶۵ . ( ۵ ) .

کلیه این رسالات گویای این مطلب است که باقی مانده آفت کشته در بدن

انسان وجود دارد و می بایست مورد دقت و توجه قرار گرفته شود .

در بریتانیا ی کبیر ما بین July ۱۹۶۵ و June ۱۹۶۷ مطالعه ای بمنظور

بررسی وجود باقی مانده آفت کشتهای آلی کلره به روی ۲۴۷ نمونه اطفال بالاتراز

سه سال و ۴ کودک مرده بدنیآ آمده و یا زودرس و کودکان کمتر از سه سال انجام شد .

سطح سه حشره کش اصلی : BHC - دیلدین - ددت کمتر از مقداری

بود که در مطالعات سالهای ۱۹۶۳ و ۱۹۶۴ گزارش شده بود .

در این مطالعه مقدار آفت کشته در مورد مردان بالاتراز زنان بود و در ضمن

مقایسه ای بین نتایج حاصل از انگلستان و سایر کشورها انجام گرفت .

امروزه توجه بیش از اندازه به اهمیت اپیدمیولوژیکی واکولوژیکی این گونه مواد  
مبذول شده است و بررسی وجود باقی مانده آفت کشها در ایالات متحده امریکا و انگلیس  
بیشتر از دیگر نقاط مطالعه شده است .

### تجمع ددت در انسان

ددت هرچند که در طول مدت مصرف خود که بالغ بر ۲۵ سال میباشد دارای  
وسعت کاربرد زیادی در محیط زیست گردیده اخیراً به علت پایداری بودن نوعی آلودگی  
مزمین در انسان ایجاد نموده است .

در اکثر کشورهای جهان اندازه گیری ددت و متابولیت های آنها در بافتهای  
مختلف انجام شده است . در ضمن اثرات بیولوژیکی و فیزیولوژیکی و پاتولوژیکی آن نیز  
به کرات مطالعه شده است .

متد کروماتوگرافی گاز مایع G.L.C با دتکتورهای مختلف منجمله electron  
capture برای اندازه گیری تمام حشره کشهای کلره و متابولیت های آنها بکار برده  
شده است .

Campbell و همکارانش در ۱۹۶۵ گزارشی راجع به جذب ۸۹ درصد دوز  
روزانه (daily dose) ددت با غذای انسان را بطور مشروح منتشر نموده اند .  
دوز جذب شده سالیانه این ماده ۰ تا ۴۴/۸ میلی گرم از راه غذا بوده  
است (۵) .

از طرفی ۰/۰۳ میلی گرم از راه هوا - ۰/۰۱ میلی گرم از راه آب و ۵ میلی گرم  
توسط راههای دیگر گزارش شده است .

Edmundson و همکارانش در ۱۹۶۹ گرد و غبار ناشی از خانه را کسه

حاوی حشره کش بوده است عامل مهمی در آلودگی به حساب آورده اند. آنها رابطه بین تجمع دلت در خون را با تجمع دلت در گردن غبارخانه را پیدا نمودند (۵)

### تجمع دلت و متابولیت های آنها در بافت چربی انسان

تجمع دلت و متابولیت های آن در بافت چربی انسان در کشورهای مختلفی آزمایش شده است. بطور کلی میزان متوسط تراکم تعدادی از حشره کشهای کلسره بشرح زیر است:

PPM	۱/۷۵-۳۱	دلت توتال
"	۰/۱۵-۲/۴۳	BHC توتال
"	۰/۰۴۶-۰/۶۸	دیلدزین
"	۰/۰۰۸۵-۰/۱۹	هیپتاکلر اپوکسید

میزان تجمع در کشورهای تروپیکال بالاتر بوده است.

Hayes در سال ۱۹۶۵ در مقاله ای یاد آور شد که تجمع دلت و DDE

در جنس ماده بیش از نر است. Dale و همکارانش در ۱۹۶۵ Wassermann

همکارانش در ۱۹۶۹ مقادیر تجمع بیشتری در نر مردان یافتند تا در نر زنان.

Fiserova و همکارانش در ۱۹۶۷ دریافتند که هیچگونه فرقی در

زمینه جنس وجود ندارد. این تجسس در برنامه مخصوصی که در آمریکا انجام شده

بود محقق شد.

در مطالعه ای که در سالهای ۱۹۶۷-۱۹۶۸ در ایالات متحده آمریکا

انجام شد نشان داده شد که جنس سیاه دارای تجمع بیشتری از باقی مانده ددت میباشد (۵) .

مقدار تجمع ددت با سن افزایشی یابد . مقادیر بیشتر در افراد سن تراز ۴۵ سال مشاهده شده است . ( Wassermann و همکارانش در ۱۹۶۹ و ۱۹۶۵ ) .

بطور کلی عقیده بر اینست که محدودیت مصرف ارگانوکلره ها از تجمع بیش از حد آنها در بافتها جلوگیری میکنند . در آمریکا در سال ۱۹۶۸ Hoffman و همکارانش نشان دادند که مقدار ددت دریافت چربی از سال ۱۹۵۱ تا بحال تغییر محسوسی نداشته است .

در آریزونا در ۱۹۷۰ نتایج مشابهی در یک دوره ۵ ساله توسط Roan و Morgan مشاهده شده است .

#### تجمع ددت در بافتهای مختلف ، خون و ادار :

Fiserova - Bergerova و همکارانش در ۱۹۶۷ دریافتند که تراکم ددت در غدد آندوکرین ، مخز و کلیه ۱۰۰ تا ۱۰۰۰ مرتبه کمتر از بافت چربی است و تقریباً ۱۰ مرتبه کمتر از چربی میباشد .

نسبت بین تجمع ددت در خون به نسبت ۱ دریافت چربی ۳۰۶ و در کبد به نسبت ۲۷ میباشد .

در مطالعه دیگری معین شده که نسبت بین تجمع ددت توتال در خون و بافت

چربی عبارتست از :  $115 \pm 320 : 1$  ، در حالیکه برای DDE نسبت

عبارتست از:  $1.05 \pm 35.0$

متابولیت دیگر ددت که DDA می باشد کمتر از  $0.35/0.20$  PPM در ۲۶ درصد از نمونه های ادرار آزمایش شده یافت شد. متابولیت دیگری DDE اغلب یافت میشود.

دفع ددت توتال از راه ادرار  $0.20/0$  میلی گرم در شخص در طول روز است

( Cueto و همکارانش ۱۹۶۷ )

#### ددت در جنین و شیرانسان :

ددت و متابولیت های آن از سدرحمی عبور کرده و در بافت جنین نگهداری میشود. کلیه حشره کشهای آلی کلره که در مادر دیده شده است در بافتهای جنین نیز یافت میشوند و قادر به متابولیزه شدن در جنین بافتها هستند. این مطالعه توسط Polishuk و همکارانش در ۱۹۷۰ انجام شده است. کودکان شیرخوار توسط شیر مادر که با ددت آلوده شده است تماس می یابند ( ۵ ) .

شیرانسان سیزده برابر بیش از خون دارای ددت توتال است و همچنین ۶ برابر بیش از خون دارای BHC و ۸ برابر بیش از آن دارای دیلدین میباشند.

#### ددت و حاملگی :

Polishuk و همکارانش در ۱۹۷۰ تخمیرات عمده ای از نظر تجمع ارگانو کلره ها و متابولیت های آنها را در بدن مادریه هنگام حاملگی مورد مطالعه قرار دادند. زنان حامله دارای مقدار کمتری ددت و متابولیت های آن میباشند ( ۵ ) .

BHC و دیلدین دریافت چربی آنها کمتر از زنان دیگر است . میتوان پدیده فوق را نتیجهٔ بالا بودن میزان متابولیک این اجسام در جنس ماده به هنگام حاملگی دانست . ( ۵ ) .

این نتایج با نتایجی که از مطالعات Curley و Kimbrough در سال ۱۹۶۹ گرفته شده بود مطابقت دارد . او دریافت که تجمع ارگانوکلره ها در پلاسمای زنان حامله در سطح پائینی واقع شده است ( ۵ ) .

#### پاتولوژی انسان و ددت

دوازده عمل ددت و دیگر ارگانوکلره ها در بدن در طول مدت بیماری و همچنین سایر آفت کشها در توسعه گروهی از بیماریها ، اخیراً مطالعه شده است .

Hoffman و همکارانش در ۱۹۶۷ در مطالعه ای که بر روی ۹۹۴ مورد انجام شد دیدیگونه رابطه ای بین مقدار ارگانوکلره ها دریافت چربی و در گونه تشبیه پاتولوژیکی دیده نشد . این مطالعه روی بیمارانی که از بیماریهای مختلف در چهار بیمارستان شهر شیکاگو رنج می بردند انتخاب و مورد بررسی قرار گرفت .

Rodonski و همکارانش در ۱۹۶۸ نشان دادند که افرادی که

به علل زیر نفوت شده اند :

سیروز پروتال - سرطان اعضای مختلف - فشارخون ، دارای مقدار زیادی از باقی مانده ارگانوکلره ها هستند . افزایش سطح ارگانوکلره ها در یافت بیماران مبتلا به کاشکسی و سرطان یا بیماریهای کبدی توسط Casarett و همکارانش

در سال ۱۹۶۸ مطالعه شد .