

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

وزارت اطلاعات و آمار علمی ایران
تعمیرات و امور اداری



دانشگاه علوم پزشکی تهران
دانشکده داروسازی

۱۳۸۲ / ۴ / ۲۰

۱۳۸۲ / ۴ / ۲۰

پایان نامه:

جهت دریافت درجه دکترا

موضوع:

اندازه‌گیری کیفی و کمی برخی اسیدهای چرب در خوراک شیرخوار
به روش کروماتوگرافی گازی بدون مشتق‌سازی

استاد راهنما:

جناب آقای دکتر محمدرضا اویسی

استاد مشاور:

جناب آقای دکتر بهروز جنت

جناب آقای دکتر عبدالعظیم بهفر

نگارش:

حمیده سبحانی تهرانی

۴۵۸۱۱

شماره پایان‌نامه: ۴۳۵۴

سال تحصیلی: ۸۲-۱۳۸۱

تقدیم به:

پدر و مادر عزیزم به پاس زحمات بی دریغشان

تقدیم به:

همسر گرامیم به پاس صبوری و همراهی صمیمانه اش
در تمام مراحل راه

تقدیم به:

خواهران عزیزم و خانواده های محترمشان

با تشکر از:

جناب آقای دکتر اویسی که راهنمایی این پایان نامه را بر عهده داشتند.

با تشکر و سپاس از:

جناب آقای دکتر جنت که در انجام این پایان نامه مرا یاری نمودند.

با سپاس فراوان از:

سرکار خانم دکتر حاجی محمودی و جناب آقای دکتر بهفر.

با تشکر از:

هیأت محترم قضات که داوری این پایان نامه را بر عهده داشتند.

پکیده

اسیدهای چرب بعنوان بخش اصلی سازنده لیپیدها در تولید و ذخیره انرژی، شکل گیری غشاهای بیولوژیکی و خواص آنها و جذب ویتامینهای محلول در چربی نقش مهمی دارند. کمبود این ترکیبات در غذای نوزاد باعث بروز صدمات جبران ناپذیر بخصوص در بافت عصبی خواهد شد. آنالیز اسیدهای چرب آزاد شامل مراحل زیر است: صابونی کردن چربی، اسیدی کردن، جدا سازی فاز حاوی اسید چرب آزاد، تزریق به دستگاه و شناسایی کیفی و کمی. در این طرح اسیدهای چرب لوریک، پالمیتیک، استئاریک و لینولئیک مورد بررسی قرار گرفتند. چربی استخراج شده از شیر با اضافه کردن پتاس الکی و حرارت دادن صابونی شد و صابون به دست آمده با افزودن اسید سولفوریک هیدرولیز شد. سپس اسید های چرب آزاد با اضافه کردن فاز آلی هگزان/بوتانل جدا سازی شدند. آنالیز با کمک دستگاه کروماتوگرافی گازی و با استفاده از ستون AT-1000 معادل ستون FFAP و دتکتور FID انجام گرفت. اندازه گیری کیفی اسیدهای چرب مورد نظر با استفاده از مقایسه (RT (retention time) آنها با نمونه های استاندارد صورت گرفت. در اندازه گیری کمی برای هر یک از اسید های چرب منحنی کالیبراسیون ترسیم شد. در این منحنی ها غلظت در برابر سطح زیر منحنی قرار داده شد. برای کاستن خطای کار از استاندارد داخلی قتل استفاده گردید. مزیت این روش این است که پروسه کار سریع است و نیاز به استری کردن اسید چرب ندارد.

فصل اول

۱	مقدمه
۲	۱- تغذیه کودک
۴	۱-۱- فرآورده‌های شیر کودک
۴	۲-۱- انواع خوراک شیرخوار
۵	۱-۲-۱- خوراکیهای معمولی یا غیر رژیمی شیرخوار
۵	۱-۲-۱- الف- خوراک شیرخوار با پایه شیر گاو
۵	۱-۲-۱- ب- خوراک شیرخوار با پایه پروتئین شیر گاو به اضافه پروتئین آب پنیر
۶	۲-۲-۱- خوراکیهای رژیمی شیرخوار
۶	۱-۲-۲- الف- فرمولاسیونهای با پایه پروتئین سویا
۱۰	۱-۲-۲- ب- فرمولاسیونهای با پایه کازئین هیدرولیز شده
۱۱	۱-۲-۲- پ- فرمولاسیونهای با مقدار کم سدیم
۱۲	۱-۲-۲- ت- فرمولاسیونهای با مقدار کم فنیل آلانین
۱۳	۱-۲-۲- ث- فرمولاسیونهای با لوسین، ایزولوسین و والین محدود
۱۴	۱-۲-۲- ج- فرمولاسیونهای با متیونین کم
۱۵	۱-۲-۲- چ- فرمولاسیونهای با مقدار کم فنیل آلانین و تیروزین
۱۵	۱-۲-۲- ح- فرمولاسیونهای برای بچه‌های کم وزن
۱۷	۲- چربیها و ساختار آنها
۱۷	۱-۲- اهمیت و نقش بیولوژی لیپیدها
۱۸	۲-۲- تقسیم بندی لیپیدها بر حسب ساختمان و ترکیبات تشکیل دهنده
۱۸	۳-۲- خواص لیپیدها
۱۸	۴-۲- اسید چرب
۱۹	۱-۴-۲- اسیدهای چرب اشباع
۱۹	۲-۴-۲- اسیدهای چرب غیر اشباع یا اتنوئیدها
۱۹	۱-۲-۴-۲- مونواتنوئیدها
۲۰	۲-۲-۴-۲- پلی اتنوئیدها
۲۰	۲-۲-۴-۲- الف- دی اتنوئیدها
۲۰	۲-۲-۴-۲- ب- تری اتنوئیدها
۲۰	۲-۲-۴-۲- پ- تترا اتنوئیدها
۲۱	۳-۲-۴-۲- اهمیت و کاربرد زیست پزشکی اسیدهای چرب غیر اشباع
۲۱	۳-۴-۲- اسیدهای چرب غیر ضروری

۲۱ ۲-۴-۴- اسیدهای چرب ضروری
۲۳ ۲-۵- خواص اسیدهای چرب
۲۳ ۳- روشهای استخراج و اندازه‌گیری چربی در مواد غذایی (شیر)
۲۳ ۳-۱- روش سوکسله
۲۳ ۳-۲- روش وزنی ورنر-اشمید
۲۴ ۳-۳- روش وزنی رزگوتلیپ و موژونیه
۲۴ ۳-۴- روش حجمی ژربر
۲۴ ۴- کلیاتی درباره کروماتوگرافی و GC
۲۵ ۴-۱- کروماتوگرافی گازی
۲۵ ۴-۱-۱- قسمت‌های مختلف دستگاه GC
۲۵ ۴-۱-۱-۱- فاز متحرک
۲۶ ۴-۱-۱-۲- فاز ساکن (ستون)
۲۶ ۴-۱-۱-۳- انژکتور
۲۶ ۴-۱-۱-۴- دریچه‌های کنترل
۲۷ ۴-۱-۱-۵- دتکتور
۲۷ ۴-۱-۱-۵- الف- آشکارساز یونیزان شعله (FID)
۲۷ ۴-۱-۱-۵- ب- آشکارساز رایش الکترون (ECD)
۲۷ ۴-۱-۱-۵- پ- آشکارساز هدایت حرارتی یا کاتارومتر (TCD)
۲۸ ۴-۱-۱-۵- ت- آشکارساز فتومتری با شعله (FPD)
۲۸ ۵- روشهای آنالیز اسیدهای چرب
۲۸ ۵-۱- کروماتوگرافی گازی (GC)
۳۰ ۵-۲- کروماتوگرافی کاغذی (TLC)
۳۱ ۵-۲-۱- انواع TLC
۳۱ ۵-۲-۱- الف- TLC فاز نرمال
۳۱ ۵-۲-۱- ب- TLC فاز نرمال اصلاح شده
۳۲ ۵-۲-۱- پ- TLC فاز معکوس
۳۲ ۵-۳- کروماتوگرافی مایع با کارایی عالی (HPLC)
۳۳ ۵-۳-۱- کروماتوگرافی جذبی
۳۳ ۵-۳-۲- کروماتوگرافی تقسیمی

- ۳-۳-۵- کروماتوگرافی غربال مولکولی ۳۳
- ۴-۵- اسپکتروفوتومتری مس (Mass Spectrophotometry) و سایر روشها ۳۴

فصل دوم

- مواد و روشها ۳۶
- ۲- مواد و وسایل مورد استفاده ۳۷
- ۱-۲- مواد مصرفی ۳۷
- ۲-۲- وسایل مورد استفاده ۳۷
- ۳-۲- آماده‌سازی دستگاه و بررسی شرایط کالیبراسیون ۳۸
- ۱-۳-۲- انتخاب شرایط دستگاه ۳۸
- ۱-۳-۲- ستون ۳۸
- ۲-۳-۲- گاز حامل ۳۸
- ۳-۳-۲- آشکارساز ۳۸
- ۴-۳-۲- گازهای وارد شده به آشکارساز ۳۹
- ۵-۳-۲- اسپلیت ۳۹
- ۶-۳-۲- دمای انژکتور ۳۹
- ۷-۳-۲- دمای دتکتور ۳۹
- ۸-۳-۲- دمای ستون ۳۹
- ۲-۳-۲- شناسایی محل پیکها ۴۰
- ۳-۳-۲- تهیه محلولهای استاندارد ۴۰
- ۱-۳-۳-۲- محلول استاندارد داخلی ۴۰
- ۲-۳-۳-۲- محلولهای استاندارد اسیدهای چرب ۴۱
- ۴-۲- تهیه نمونه ۴۱
- ۱-۴-۲- استخراج چربی خوراک شیرخوار ۴۱
- ۱-۴-۲- الف- توزین خوراک شیرخوار و تهیه امولسیون آماده شیر ۴۱
- ۱-۴-۲- ب- شکستن امولسیون شیر ۴۲
- ۱-۴-۲- پ- سانتریفوژ کردن شیر و جداسازی فاز جامد از محلول ۴۲
- ۱-۴-۲- ت- دناتوره کردن پروتئینها بوسیله الکل ۴۲
- ۱-۴-۲- ث- استخراج چربی با استفاده از اتردیپترل ۴۲
- ۱-۴-۲- ج- سانتریفوژ مخلوط نهایی ۴۲
- ۲-۴-۲- استخراج اسید چرب آزاد ۴۳

۴۳ - آماده‌سازی محلولها و واکنشگرها

۴۳ - طبقه محاسبه مقدار اسید مورد استفاده جهت هیدرولیز صابون

۴۴ - ۲-۴-۲ الف- صابونی کردن چربی

۴۴ - ۲-۴-۲ ب- هیدرولیز اسیدی صابون

۴۴ - ۲-۴-۲ پ- استخراج اسید چرب آزاد

۴۴ - ۲-۵- انجام کالیبراسیون و محاسبات مربوط به آن

۴۵ - ۲-۶- تعیین تکرار پذیری روش

۴۵ - ۲-۷- تعیین تجدید پذیری روش

۴۵ - ۲-۸- تعیین حد شناسایی و کمترین حد اندازه گیری کمی

فصل سوم

۴۶ نتایج

۴۷ - - کروماتوگرام هر یک از چهار اسید چرب لوریک، پالمیتیک، استئاریک و لینولئیک

۵۰ - کروماتوگرام حاصل از بررسی تداخل پیکها با هم

۵۱ - کروماتوگرام حاصل از استاندارد داخلی

۵۲ - کروماتوگرام استاندارد اسیدهای چرب به همراه استاندارد داخلی

۵۳ - کروماتوگرام حاصل از تزریق نمونه

۵۴ - بررسی محدوده خطی و اختصاصی بودن پاسخ

۵۵ - منحنی کالیبراسیون اسید لوریک

۵۶ - منحنی کالیبراسیون اسید پالمیتیک

۵۷ - منحنی کالیبراسیون اسید استئاریک

۵۸ - منحنی کالیبراسیون اسید لینولئیک

۵۹ - تعیین دقت روش اندازه‌گیری اسیدهای چرب

۵۹ - تعیین صحت روش اندازه‌گیری اسیدهای چرب

۶۰ - تعیین حد شناسایی (Limit of Detection) روش اندازه‌گیری اسیدهای چرب

۶۰ - تعیین حد اندازه‌گیری کمی (Limit of Determination) روش اندازه‌گیری اسیدهای چرب

۶۰ - تعیین حساسیت (Sensitivity) روش اندازه‌گیری اسیدهای چرب

فصل چهارم

۶۸ بحث
۶۹ - بررسی روش بکار رفته برای استخراج چربی از خوراک شیر خوار
۷۰ - مزایای روش استخراج
۷۰ - ارزیابی روش اندازه‌گیری اسیدهای چرب
۷۲ - مقایسه مقدار اسیدهای چرب با استاندارد
۷۳ منابع مورد استفاده

مقدمه

مقدمه

۱- تغذیه کودک

تحقیقات و مطالعات گسترده در مورد شیر مادر که روز به روز بر دامنه این تحقیقات نیز افزوده می‌شود ثابت نموده است که تغذیه انحصاری با شیر مادر همراه با تغذیه تکمیلی تا دو سالگی ضروری است. ضمن اینکه تا یکسالگی ترجیحاً شیر مادر است (در صورتیکه مادر از تغذیه و محیط زیست سالم بر خوردار باشد). مزایای مهم شیر مادر عبارتند از:

۱- ترکیب شیر مادر متناسب با نیازهای غذایی و تکامل دستگاه گوارش شیرخوار است. در نتیجه کلیه مواد مغذی موجود در شیر مادر بهتر هضم و جذب می‌شوند (با توجه به اینکه سیستمهای هضم و جذب و ترشح نوزاد کامل نیست).

۲- به دلیل وجود ایمونوگلوبولینها^{*}، ماکروفاژها، لنفوسیتها و گلبولهای سفید، لیزوزیم، لاکتوفیرین و برخی مواد دیگر موجود در شیر مادر، شیرخوار از ابتلا به بسیاری از بیماریهای دوران نوزادی، شیرخوارگی و کودکی از جمله: انتروکولیت نکرروزان، عفونتهای حاد تنفسی و گوارشی، عفونتهای ادراری و گوش میانی، مننژیت و دیابت دوران کودکی محافظت می‌شود. احتمال ایجاد آلرژی در کودکانیکه با شیر مادر تغذیه می‌شوند بسیار اندک است (شیر گاو بیش از بیست پروتئین دارد که پنج تای آنها ممکن است آلرژن باشند. شیر بز (goat) یا فراوردههایی با پایه پروتئین سویا ممکن است این آلرژنیسته را تشدید کنند).

۳- به علت متناسب بودن شیر مادر کودکان کمتر در معرض چاقی قرار می‌گیرند.

۴- ارتباط عاطفی و روانی حاصل از تغذیه کودک با شیر مادر پایه‌گذار ثبات شخصیتی و بهداشت روان کودک می‌شود.

* در طول بارداری ایمونوگلوبولین G (Ig G) از جفت عبور کرده باعث ایجاد ایمنی غیر فعال در نوزاد می‌شود. عفونتهای گاسترواینتستینال (GI) در مادر باعث تکثیر لنفوسیتهایی می‌شوند که قادر به تولید immune body هستند. این سلولهای ایمنی سپس از راه گردش خون به بافتیهای موکوزال نظیر طحال، غدد تولید شیر، ریه‌ها، دهانه رحم و غدد اشکی می‌رسند. از این بافتها Ig A ترشح می‌شود که عمده ترین پروتئین حفاظتی شیر کامل است. Ig A بدون تغییر در کیفیت وارد سیستم گوارشی نوزاد می‌شود و می‌تواند او را در برابر عفونتهای GI و مجاری تنفسی فوقانی حفظ کند (Kenny 1977, et al., 1967; Orga et al.,

۵- شیر مادر علاوه بر تامین نیازهای جسمی، روانی، معنوی و رشد و تکامل مطلوب کودک در سلامت مادر نیز نقش بسزایی دارد و احتمال ابتلا به سرطانهای پستان، تخمدان، رحم و پوکی استخوان را کاهش می‌دهد و در صورت فراهم بودن شرایطی می‌تواند تا ۹۸٪ از بارداری مجدد مادر جلوگیری کند.

۶- ادعا شده است که چندین هورمون مختلف در شیر کشف شده است. هزاران ماده دیگر نیز موجود است که پی به وجود آنها برده نشده است یا کارایی و عملکرد آنها روشن نیست (خاقانی، ۱۳۶۹).

با توجه به مراتب فوق و قبول این واقعیت که هیچ شیرینی نمی‌تواند جانشین شیر مادر شود شرایط بسیار محدودی را که منجر به محرومیت کودک از شیر مادر می‌شوند را نباید از نظر دور داشت. اگر چه توانایی شیر دادن از مادری به مادر دیگر متفاوت است همه مادران قادرند برای شش ماه اول شیر کافی در اختیار نوزاد بگذارند ولی اغلب نیاز کودک به حدی می‌رسد که از توانایی مادر خارج می‌شود. در اینگونه موارد برای رساندن کودک به مرحله‌ای که بتواند غذا بخورد استفاده از غذای دیگر ضروری بنظر می‌رسد. لذا باید شیری (خوراکی) در دسترس باشد که ترکیب آن حتی الامکان به شیر مادر نزدیک باشد و بازاریابی آن براساس کد بین‌المللی شیرهای ساخته شده و تجارتی (International code of marketing of breast-milk substitutes) باشد. مطابق نظر سازمان استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران بجای واژه شیرخشک باید از عبارت خوراک شیرخوار استفاده کرد. لذا در این پایان نامه خوراک شیرخوار معادل شیرخشک است.

نیاز به افزودنیهای غذایی جهت بهبود وضعیت تغذیه نوزاد خیلی زود شناخته شد بطوریکه عصاره میوه‌جات و سبزیجات، انواع ویتامینها، آهن و اسیدهای چرب ضروری بعنوان مکمل به غذای نوزاد اضافه شدند. هانسن و همکارانش نشان دادند که کمبود چربیهای ضروری هنگامی رخ می‌دهد که مقدار لینولئیک اسید در غذای نوزاد کمتر از یک درصد کل انرژی موجود در غذای کودک باشد و توصیه کردند که مقدار لینولئیک اسید به یک درصد از میزان کل انرژی ماده غذایی کودک افزایش

پیدا کند (Hansen *et al.*, 1962) گفته شده است که ۷-۱۲ درصد چربی شیر انسان لینولئیک اسید است که ۳-۶ درصد کل انرژی شیر را شامل می‌شود.

۱-۱- فرآورده‌های شیر کودک

سه شکل عمده این فرآورده‌ها در بازار دارویی عبارتند از:

۱- مایع تغلیظ شده (Liquid Concentrate)

برای آماده سازی آن جهت مصرف نوزاد باید آنرا با آب جوشیده سرد شده به میزان ۵۰٪ رقیق نمود.

۲- مایع آماده برای مصرف (Liquid Ready to Feed)

این فرآورده احتیاجی به رقیق سازی ندارد. گرم کردن هم لازم نیست فقط باید قبل از مصرف تکان داده شود.

۳- پودر (Powder)

پرمصرف‌ترین شکل فرمولاسیون همین پودرها هستند چرا که براحتی می‌توان در این فرآورده تنوع ایجاد کرد. بیشترین سعی برای نزدیک کردن این فرمولاسیونها به شیر مادر صورت گرفته است. طبق مطالعات متعدد، میزان رشد نوزادی که از شیر مادر تغذیه می‌کند برابر رشد نوزادی است که از خوراک شیرخوار تغذیه می‌کند. این خود برای این فرآورده‌ها مزیتی است. طریقه مصرف آنها، بسته بندی و حمل آن برای سازندگان و مصرف کنندگان راحت است. همچنین چون فرآورده خشک و بصورت پودر است آلودگیهای میکروبی و شیمیایی بعد از تولید به حداقل خواهد رسید (خاقانی، ۱۳۶۹).

۱-۲- انواع خوراک شیرخوار

دو نوع تقسیم بندی برای خوراک شیر خوار عبارتند از: الف) انواع خوراک شیرخوار بر اساس نوع پایه و فرمولاسیون، ب) انواع خوراک شیرخوار بر اساس ترکیب، که خود به دو صورت است:

۱-۲-۱- خوراک غیر رژیمی یا معمولی شیرخوار که خود به دو نوع است (عظیمی،

۱۳۷۷):

۱-۲-۱-الف) خوراک غیر رژیمی شیرخوار با پایه شیر گاو: منبع کربوهیدرات موجود در این شیر همان لاکتوز است. شیر مادر و شیر گاو هر دو حاوی لاکتوز هستند. منبع چربی این شیرها روغنهای گیاهی هستند. این روغنها جذب بهتری دارند و از طرفی مشکلات گوارشی کمتری را در نوزادان ایجاد می‌کنند. بطور مثال روغن سویا، ذرت، آفتابگردان و نارگیل. بجز روغن نارگیل، روغن ذرت، آفتابگردان و سویا حاوی مقادیر بالایی از تری گلیسریدهای بلند زنجیره غیر اشباع می‌باشند. این دسته از شیرها فاقد کلسترولند. بر عکس شیر مادر و شیر گاو که حاوی چربی اشباع و کلسترول هستند (Weinsier *et al.*, 1989). سایر افزودنیهای اینگونه فرآورده‌ها، ویتامینها و املاح معدنی هستند که میزان آنها را FDA تعیین می‌کند. این فرمولاسیونها از نظر میزان آهن به دو دسته آهن دار و بدون آهن تقسیم می‌شوند. این شیرها در نوزادان با اختلالات الکترولیتی و نوزادان نارس (وزن نوزاد در بدو تولد زیر ۱۵۰۰ گرم است) مصرف نمی‌شوند و ممنوعیت دارند. مهمترین مثال این فرمولاسیون در بازار دارویی کشور، شیر NAN ساخت کارخانه Nestle است. هر ۱۰۰ گرم از قوطی ۴۵۰ گرمی شیر نان حاوی ترکیبات زیر است:

۳ گرم آب، ۲۶ گرم چربی، ۳/۳ گرم اسید لینولئیک، ۵۶/۲ گرم کربوهیدرات (عمدتا لاکتوز)، ۴ گرم کازئین (پروتئین شیر گاو)، ۲/۳ گرم مواد معدنی و ویتامینها.

۱-۲-۱-ب) خوراک غیر رژیمی شیرخوار با پایه پروتئین شیر گاو به اضافه پروتئین آب پنیر: در شیر گاو نسبت پروتئین کازئین به پروتئین آب پنیر ۸۰٪ به ۲۰٪ است. این نسبت در شیر مادر ۴۰٪ به ۶۰٪ می‌باشد. در نتیجه اگر به شیر گاو مقادیری پروتئین آب پنیر اضافه شود این فرمولاسیون شباهت بیشتری به شیر مادر پیدا خواهد کرد (عظیمی و همکاران، ۱۳۷۷؛ Weinsier *et al.*, 1989). منبع کربوهیدرات در این شیرها مشابه خوراک شیرخوار با پایه شیر گاو است. پروتئین آب پنیر شامل لاکتالبومین و لاکتالگوبولین است. در این فرمولاسیونها انواعی از آب