

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ



دانشگاه آزاد اسلامی

واحد تهران مرکزی

دانشکده علوم پایه، گروه شیمی

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد (M.Sc)

گرایش: شیمی تجزیه

عنوان:

اندازه گیری آفلاتوکسین در غذای کودک

معتبر سازی به روش کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا با دکتور فلورسانس

استاد راهنما:

دکتر همایون احمد پناهی

استاد مشاور:

دکتر مهشید نیکپورنزهتی

پژوهشگر:

هنگامه خزائی پولی

زمستان ۱۳۹۰

تقدیم به :

همسر مهربان و صبورم "مجید عزیز"

دختر نازنینم "آوا"

خانواده همیشه حامی و پشتیبانم

با سپاس فراوان از:

استاد راهنما " جناب آقای دکتر همایون احمد پناهی "

استاد مشاور " سرکار خانم دکتر مهشید نیکپور "

مدیر عامل شرکت خدماتی، آموزشی و تحقیقاتی مرجعان خاتم " سرکارخانم مهندس مشکانی "

مدیران و کارکنان شرکت خدماتی، آموزشی و تحقیقاتی مرجعان خاتم

## فهرست مطالب

<u>صفحه</u>	<u>عنوان</u>
۲	فصل اول : کلیات طرح
۳	۱-۱ بیان مسئله
۹	۲-۱ اهداف تحقیق
۱۰	۳-۱ اهمیت موضوع تحقیق و انگیزه انتخاب آن
۱۲	۴-۱ سوالات و فرضیه های تحقیق
۱۲	۵-۱ مدل تحقیق
۱۳	۶-۱ متغیرها و واژه های کلیدی
۱۳	۷-۱ روش تحقیق
۱۳	۸-۱ قلمرو تحقیق
۱۴	۹-۱ جامعه و حجم نمونه
۱۴	۱۰-۱ محدودیت ها و مشکلات تحقیق
۱۵	فصل دوم : مطالعات نظری
۱۶	۱-۲ کروماتوگرافی
۱۷	۲-۲ روش های کروماتوگرافی
۱۷	۳-۲ انواع کروماتوگرافی
۱۸	۴-۲ مزیت روش های کروماتوگرافی
۱۸	۵-۲ انتخاب بهترین روش کروماتوگرافی
۳۳	۶-۲ آشکارسازهای کروماتوگرافی
۳۶	۷-۲ کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا

<u>صفحه</u>	<u>عنوان</u>
۳۷	۸-۲ تجهیزات کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا
۴۱	۹-۲ کاربرد کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا
۴۲	۱۰-۲ پیشینه تحقیق
۴۴	فصل سوم : روش شناسی تحقیق ( متدولوژی )
۴۵	۱-۳ اندازه گیری آفلاتوکسین های گروههای B و G به طریق کروماتوگرافی مایع با کارآیی عالی و خالص سازی با ستون ایمونوآفینیتی
۵۴	فصل چهارم : تجزیه و تحلیل یافته های تحقیق
۵۵	۱-۴ مواد مصرفی
۵۶	۲-۴ تهیه محلول ها و واکنشگرها
۵۹	۳-۴ تجهیزات لازم
۶۰	۴-۴ روش اجرای آزمون
۶۴	۵-۴ تضمین کیفیت
۶۸	۶-۴ حد اندازه گیری
۶۸	۷-۴ حد تشخیص
۶۹	فصل پنجم : بحث، نتیجه گیری و پیشنهادات
۷۰	۱-۵ شرایط دستگاه HPLC
۷۰	۲-۵ آزمون بر روی نمونه شاهد و آزمون درصد بازیافت
۷۳	۳-۵ محدوده خطی بودن
۷۳	۴-۵ تکرارپذیری
۸۰	۵-۵ تجدید پذیری
۸۵	۶-۵ حد اندازه گیری
۸۶	۷-۵ حد تشخیص
۸۶	۸-۵ نتیجه گیری

۸۶

۸۷

۹-۵ پیشنهادات

منابع

## فهرست جدول ها

<u>صفحه</u>	<u>عنوان</u>
۵۸	جدول ۴-۱- راهنمای آماده سازی محلول های استاندارد کاری
۶۶	جدول ۴-۲- درصد بازیافت قابل قبول بر حسب سطح آلودگی
۶۸	جدول ۴-۳- انحراف معیار نسبی قابل انتظار در تکرار پذیری و تجدیدپذیری بر حسب غلظت
۷۴	جدول ۵-۱- ارقام بدست آمده در محاسبه تکرار پذیری
۸۰	جدول ۵-۲- ارقام بدست آمده در محاسبه تجدید پذیری



## فهرست شکل ها

صفحه	عنوان
۳۷	شکل ۱-۲: نمایی از دستگاه HPLC
۳۷	شکل ۲-۲: ساختار دستگاه HPLC
۳۸	شکل ۳-۲: نمایی از نحوه آشکارسازی مواد در دستگاه HPLC
۴۶	شکل ۱-۳: نمایی از مراحل اندازه گیری مایکوتوکسین ها
۴۷	شکل ۲-۳: نمونه برداری
۵۰	شکل ۳-۳: مخلوط کن با سرعت بالا
۵۱	شکل ۴-۳: مراحل انجام آزمون اندازه گیری آفلاتوکسین
۵۲	شکل ۵-۳: مراحل تخلیص
۷۱	شکل ۱-۵: کروماتوگرام حاصل از تزریق نمونه بلانک
۷۲	شکل ۲-۵: کروماتوگرام حاصل از تزریق نمونه بلانک اسپایک شده
۷۳	شکل ۳-۵: کروماتوگرام مربوط به منحنی کالیبراسیون
۷۵	شکل ۴-۵: کروماتوگرام حاصل از تزریق اولین نمونه محاسبه تکرارپذیری
۷۶	شکل ۵-۵: کروماتوگرام حاصل از تزریق دومین نمونه محاسبه تکرارپذیری
۷۷	شکل ۶-۵: کروماتوگرام حاصل از تزریق سومین نمونه محاسبه تکرارپذیری
۷۸	شکل ۷-۵: کروماتوگرام حاصل تزریق چهارمین نمونه محاسبه تکرارپذیری
۷۹	شکل ۸-۵: کروماتوگرام حاصل از تزریق پنجمین نمونه محاسبه تکرارپذیری
۸۱	شکل ۹-۵: کروماتوگرام حاصل از تزریق اولین نمونه محاسبه تجدید پذیری
۸۲	شکل ۱۰-۵: کروماتوگرام حاصل تزریق دومین نمونه محاسبه تجدید پذیری
۸۳	شکل ۱۱-۵: کروماتوگرام حاصل تزریق سومین نمونه محاسبه تجدید پذیری
۸۴	شکل ۱۲-۵: کروماتوگرام حاصل تزریق چهارمین نمونه تجدید پذیری
۸۵	شکل ۱۳-۵: کروماتوگرام حاصل تزریق پنجمین نمونه تجدید پذیری

## چکیده:

در این پژوهش، غذای کودک از گروه مواد غذایی از حیث وجود سموم مایکوتوکسین مورد بررسی قرار گرفت. یکی از مهم ترین مایکوتوکسین ها، آفلاتوکسین می باشد که در اینجا به بررسی و مطالعه آفلاتوکسین B1 موجود در غذای کودک پرداخته شد.

اندازه گیری آفلاتوکسین B1 به طریق کروماتوگرافی مایع با کارایی عالی (HPLC) و خالص سازی با ستون ایمونوآفینیتی انجام گردید و پارامترهای معتبرسازی روش از جمله درصد بازیافت و تکرار پذیری و ... مورد بررسی قرار گرفتند.

تحت شرایط تکرارپذیری، نمونه شاهد را در یک سطح مشخصی از آلودگی، غنی سازی نموده و آزمون را حداقل با ۳ تکرار انجام داده و درصد بازیافت را برای هر یک از نمونه ها محاسبه نموده و سپس **RSDr** (انحراف معیار نسبی برای تکرار پذیری) محاسبه گردید.

تحت شرایط تجدید پذیری، نمونه شاهد را در یک سطح مشخصی از آلودگی، غنی سازی نموده حداقل در سه روزکاری متوالی، برای هر سطح از بازیافت اندازه گیری شده ، و سپس **RSD<sub>R</sub>** (انحراف معیار نسبی برای تجدید پذیری) محاسبه گردید.

از آنجا که نتایج قابل قبولی حاصل گردید، در نهایت روش به کار رفته، روش مناسبی جهت بررسی و تعیین مقدار آفلاتوکسین B1 در غذای کودک شناخته شد.

## فصل اول : کلیات طرح

## فصل اول : کلیات طرح

### ۱ + بیان مسئله:

در صنعت غذا ، تمام مواد غذایی از جمله موارد پرمصرف مانند برنج ، گندم ، ذرت ، پسته ، بادام ، سویا ، شیر و فرآورده های آن و .... در معرض آلودگی به سمومی به نام مایکوتوکسین ها می باشند.

واژه مایکوتوکسین از دو لغت یونانی به نام Myco به معنی قارچ و Toxicum به معنی سم گرفته شده است .مایکوتوکسینها ترکیباتی با ساختمان شیمیایی متفاوت و وزن مولکولی کم می باشند که در اثر متابولیسم ثانویه قارچها ایجاد می گردند. [۶و۵]

✓ تاریخچه پیدایش مایکوتوکسین ها :

➤ ۵۰۰۰ سال پیش در چین

➤ ۱۸۶۱، وجود مایکوتوکسین ها در روسیه

➤ ۱۸۹۱، وجود قارچ برنج در ژاپن

➤ ۱۹۴۰، نارسایی کبدی در گاوها در جنوب امریکا

➤ ۱۹۶۰، بیماری ناشناخته‌ای بر اثر مصرف بادام زمینی های وارد شده از برزیل در انگلستان منجر به مرگ صدهزار بوقلمون شد که به اردک و مرغ نیز انتقال پیدا کرد و منجر به کشف سم آفلاتوکسین شد.

✓ انواع مایکوتوکسین ها :

➤ ارگوت الکالوئیدها

➤ آفلاتوکسین ها

➤ اکراتوکسین ها

➤ زیرانون

➤ داکسی نی والنول

➤ فومونیسین ها

➤ توکسین ها T-2

➤ توکسین ها H-2

➤ پاتولین

✓ آفلاتوکسین :

مهم ترین جنس تولید کننده سموم قارچی ، آسپرژیلوس ( تولید کننده سموم آفلاتوکسین ) می باشد. زیرا اولین سموم قارچی شناخته شده هستند و احتمال وقوع طبیعی این سم از سموم دیگر بیشتر است و در بدن دام به متابولیت سمی دیگری تبدیل می شود. تا کنون بیش از ۱۸ نوع آفلاتوکسین شناخته شده است . [۷]

۱. گروهی که حاصل متابولیت ثانویه قارچ می باشند :  $G(G1,G2)$  و  $B(B1,B2)$

-  $B(\text{Blue})$  از خود نور آبی منتشر می کنند.

-  $G(\text{Green})$  از خود نور سبز منتشر می کنند.

۲. گروهی که از متابولیت ثانویه گروه های دیگر آفلاتوکسین ها حاصل می شوند مانند :

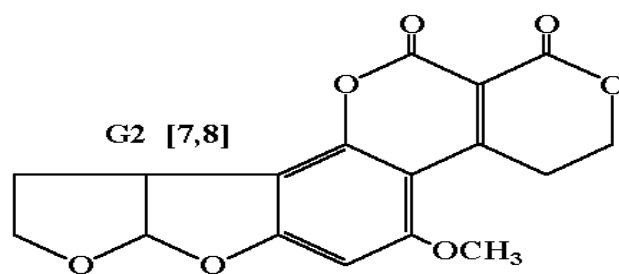
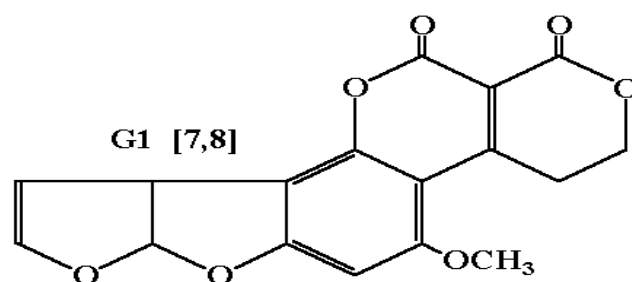
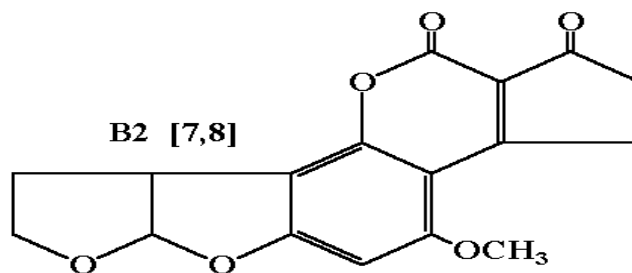
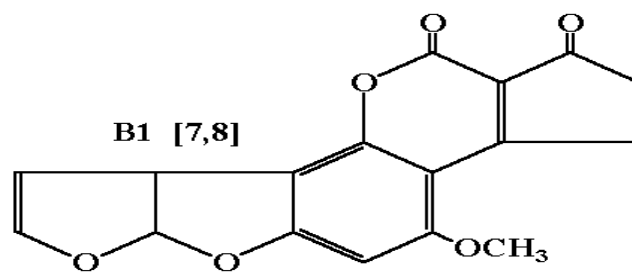
$M1,M2$

✓ نامگذاری آفلاتوکسین :

نامگذاری بر اساس اولین جنس و گونه شناخته شده در تولید سم انجام گرفته است . آ اول حرف

آسپرژیلوس (جنس) و فلا سه حرف اول فلاووس (گونه) است . توکسین نیز به معنی سم است.

ساختار مولکولی آفلاتوکسین :

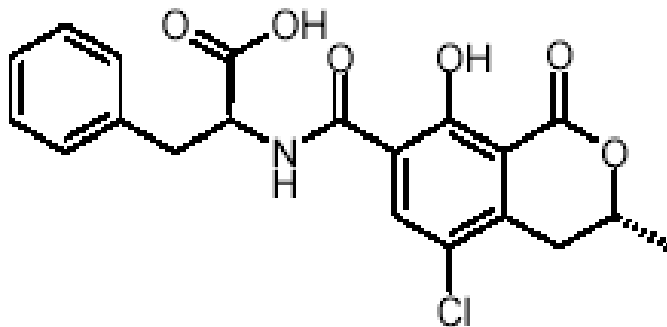


✓ نگاهی کوتاه به انواع دیگر مایکوتوکسین ها:

- اکراتوکسین A:

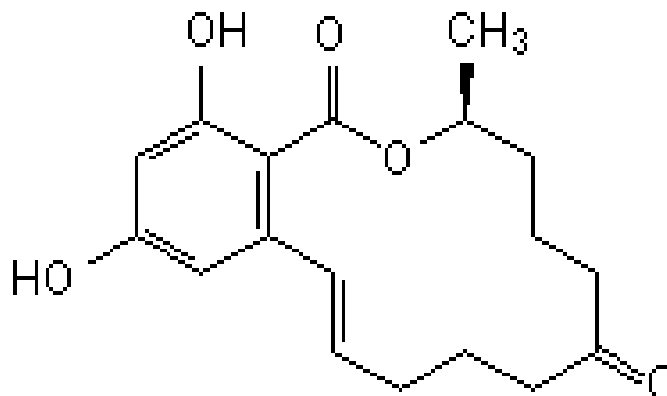
در انواع غلات ، کشمش ، قهوه ، ادویه جات و خوراک دام یافت می شود.

اکراتوکسین A یکی از سموم قارچی که توسط گونه های مختلف پنی سیلیوم و آسپرژیلوس خصوصا گونه **A.Ochraceus** تولید می شود . این سم بر اساس گونه تولید کننده آن (اکراسئوس) بنام اکراتوکسین نامیده شده است.



- زیرالنون:

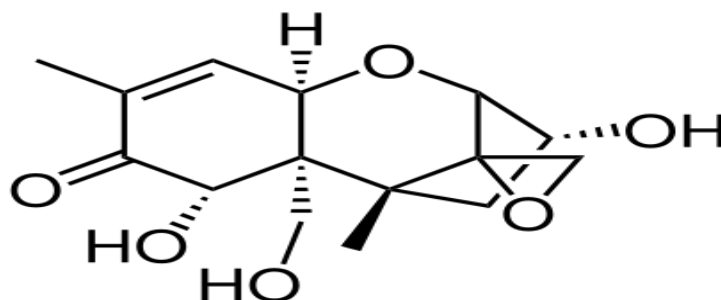
زیرالنون یکی از سموم استروژنیک قارچی است که توسط گونه هایی مختلف فوزاریوم تولید و در انواع غلات و فرآورده های آن یافت می گردد.





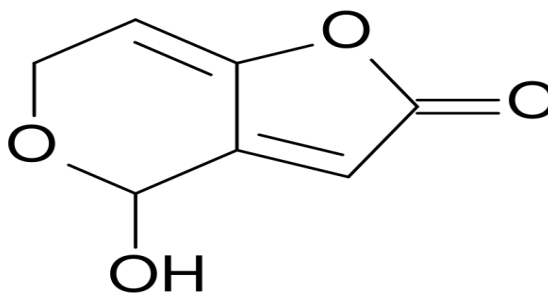
- داکسی نیوالنول:

یا Vomitoxin یکی از سموم استروژنیک قارچی است که عمدتاً توسط گونه هایی از قارچ فوزاریوم گرامیناروم و فوزاریوم کالموروم تولید می گردد در انواع غلات و فرآورده های آن و خوراک دام یافت می شود.



- پاتولین:

توسط قارچهای بایسوکلامیس و پنی سیلیوم تولید می گردد. در سیب و محصولات حاوی سیب یافت می شود.



با توجه به تفاسیر فوق الذکر نیاز به روشی جهت اندازه گیری آفلاتوکسین در انواع مواد غذایی از جمله غذای کودک بسیار حس می شود ، البته تا کنون روشهای مختلفی برای اندازه گیری

آفلاتوکسین در انواع مواد غذایی مورد بررسی قرار گرفته است ، منتها روشی مدون برای اندازه گیری آفلاتوکسین در غذای کودک تهیه نشده است و لزوم وجود آن امری بسیار ضروری است. لذا تلفیقی از روش های تدوین شده مورد استفاده قرار می گیرد و در آن به اعتباربخشی روش می پردازیم، که همانند روش های دیگر اعتباربخشی ، پارامترهای ذیل مورد بررسی قرار می گیرد:

- دقت و صحت

- تکرارپذیری و تجدید پذیری

- LOD & LOQ

- خطی بودن و ....

#### ۱-۴ اهداف تحقیق :

اعتبار بخشی روش اندازه گیری آفلاتوکسین در غذای کودک به روش کروماتوگرافی مایع با استفاده از دکتور فلورسانس و تخلیص به وسیله ستون های ایمونوآفینیتی به منظور اندازه گیری آلودگی های میکوتوکسین موجود در غذای کودک بر پایه غلات می باشد که بسیار در امر سلامت انسانها خصوصا" در دروان طفولیت تاثیرگذار است ، چرا که میکوتوکسینها عامل بسیار مهمی در سرطانها از جمله سرطان کبد می باشند.

بهینه سازی روش مورد اندازه گیری با طراحی روشی بر پایه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا می باشد که در آن نتایج به دست آمده مورد مطالعه و آنالیز قرار گرفته و در نهایت شرایط بهینه ( اپتیمم ) انتخاب می گردد.

این روش در اندازه گیری آفلاتوکسین در غلات و شیر و بسیاری موارد دیگر البته با لحاظ برخی تغییرات به کار گرفته می شده است ، منتها در غذای کودک روش جدیدی است و از لحاظ سلامتی انسانها بسیار حائز اهمیت است.

## ۱ ۴ - اهمیت موضوع تحقیق و انگیزه انتخاب آن :

از آنجائیکه مایکوتوکسین ها از جمله سمومی هستند که در بسیاری از مواد غذایی از مرحله تولید تا مصرف به طور مثال در هنگام درو ، برداشت ، کاشت ، انبارداری و حمل و نقل و ... به وجود می آیند و عامل بسیار مهمی در بروز سرطان ها از جمله سرطان کبد می باشند ، بررسی آنها در صنعت غذا به خصوص غذاهای پرکاربرد در زندگی انسانها و همچنین کودکان امری بسیار لازم و ضروری می باشد ، لذا لازمه طراحی یک روش برای بررسی میزان مایکوتوکسین مخصوصاً از نوع آفلاتوکسین در غذای کودک بسیار مطلوب به نظر می آید.

✓ عوامل موثر بر تولید مایکوتوکسین ها :

■ منطقه جغرافیایی

■ زمان برداشت محصول

■ وارسته

■ آفت زدگی

■ نحوه آبیاری

■ میزان کوددهی

■ سم پاشی

✓ چرا مایکوتوکسین ها مهم هستند:

- قابل دیدن نیستند.
- این سموم طبیعی در انواع غلات (مثل گندم، ذرت) که خوراک عمده انسان و بعنوان ماده خام خوراک دام میتوانند تولید شوند.
- بیماری مزمن ایجاد می کنند
- خسارت اقتصادی ایجاد می کنند . براساس گزارشات سازمان FAO سالیانه ۲۰٪ از محصولات غذایی تولید شده در دنیا توسط سموم قارچی آلوده می شوند
- در کوتاه مدت می توانند ایجاد شوند .
- درحین تولید ، انبار داری ، حمل و نقل توسعه پیدا می کنند.
- نسبت به انواع روش های از بین برنده مقاوم هستند .
- در صورت از بین رفتن ارزش ماده غذایی یا از بین می رود و یا بسیار کم می شود .

✓ بیماریهای ناشی از آفلاتوکسین ها :

■ سرطان کبد

■ کاهش فعالیت سیستم ایمنی

■ ناقص الخلقه زائی

■ نفروز کلیوی