● مجلهٔ دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دورهٔ بیست و یکم، شمارهٔ ۴، ص ۳۳۱-۳۲۱، ۱۳۹۳

مقالهٔ پژوهشی

اندازگیری آفلاتوکسین B_1 , B_2 موجود در شیر خشک به روش اصلاح شده کروماتوگرافی مایع

علی امینی*[1]، داریوش افضلی گروه[2]، محمود چمساز[3]

خلاصه

مقدمه: در این تحقیق، با استفاده از یک روش میکرو استخراج مایع- مایع پخشی برای پیش تغلیظ مقادیر بسیار کم آفلاتوکسین، مقدار آفلاتوکسین B_1,B_2 در شیرخشک تعیین شد. سپس مقدار آفلاتوکسین با استفاده از کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا به همراه آشکارساز فلورسنت تعیین شد.

روش: آفلاتوکسین موجود در نمونه‌ها ابتدا توسط ستون ایمینوافینیتی استخراج شده و سپس توسط میکرو استخراج مایع- مایع پخشی پیش تغلیظ آفلاتوکسین انجام شد. پارامترهای مختلف شامل نوع حلال شستشو، نوع و حجم حلال استخراج و حلال پخشی، زمان استخراج و زمان سانتریفوژ و غیره که بر کارایی مراحل تأثیر می‌گذارد، بهینه شد.

یافته‌ها: تحت شرایط بهینه منحنی کالیبراسیون B_1، B_2 در محدوده ۰/۵-۰/۰۳ و۰/۰۰۶- ۱/۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب با ضریب برآورد (R2) ۰/۹۸ و ۰/۹۹ خطی به‌دست آمد.

بحث و نتیجه‌گیری: نتایج نشان می‌دهد که میکرو استخراج مایع مایع پخشی همراه با کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا روش انتخابی، ساده، حساس و مؤثر برای پیش تغلیظ و تعیین مقادیر بسیار کم آفلاتوکسین B_1,B_2 می‌باشد و این روش برای پیش تغلیظ و تعیین آفلاتوکسین B_1، B_2 در شیر خشک پیشنهاد می‌شود.

واژه‌های کلیدی: آفلاتوکسین، ستون ایمینوافینیتی، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، شیرخشک، میکرو استخراج مایع-مایع پخشی

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد واحد علوم وتحقیقات خراسان رضوی ۲- استادیار شیمی، دانشگاه تحصیلات تکمیلی کرمان ۳- استاد شیمی، دانشکده علوم پایه دانشگاه فردوسی مشهد

* نویسنده مسؤول، آدرس پست الکترونیک: ali.amini.kr@gmail.com

دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۱۱/۱۳ دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۹۲/۱/۳۰ پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۲/۳۱

مقدمه

در سال ۱۹۶۰ بیش از صد هزار بوقلمون جوان در کشور انگلیس در اثر یک بیماری جدید تحت عنوان بیماری Turkey X در عرض چند ماه از بین رفتند. محققین پس از مطالعات و بررسی‌های دقیق دریافتند که بیماری تنها محدود به بوقلمون‌ها نبوده ودر جوجه اردک‌ها و بلدرچین‌های جوان نیز منجر به تلفات سنگینی شده است. همچنین به این نتیجه رسیدند که عامل بیماری از طریق تغذیه با بادام زمینی برزیلی به طیور مزبور منتقل وباعث مرگ و میر آنها شده است. سرانجام بعد از آزمایشات متعدد مشخص گردید که خوراک مورد نظر بر اثر آلودگی با نوعی سم که منشا قارچی نیز دارد سبب ایجاد تلفات در طیور گردیده است. لذا در سال ۱۹۶۱ قارچ تولیدکننده بیماری را *Aspergilus flavus* و سم حاصله را Aflatoxin نامگذاری کردند (۱).

آفلاتوکسین‌ها توسط دو کپک آسپرژیلوس فلاووس و آسپرژیلوس پارازیتیکوس تولید می‌شوند که در طیف وسیعی از مواد غذایی نظیر خوراک دام و طیور، شیر، آرد گندم، آرد سویا، کشمش، پنیر، ماست، سوسیس‌های تخمیری، گوشت‌های عمل آوری شده و غیره مشاهده شده است. سم مذکور انواع مختلفی دارد که شامل آفلاتوکسین B_1, B_2, G_1, G_2, M_1, M_2 و مشتقات آن‌ها می‌باشد. اکثرمحققین بر این عقیده اند که آفلاتوکسین‌ها به‌خصوص نوع B1 که قوی‌ترین و سمی‌ترین نوع نیز هست از طریق اتصال به مولکول‌های DNA سلول و ایجاد جهش‌های نقطه‌ای در آن و اختلال در سنتز DNA اثر خود را بر موجودات می گذارند. درسال ۱۹۸۸ IARC افلاتوکسین B1 را در لیست مواد سرطان‌زای انسانی قرار داد (۲).

در مورد حداکثر مقدار مجاز AFB1 و AFM1 در کشورهای مختلف قوانین متنوعی وجود دارد، اما به طور معمول حداکثر مقدار مجاز AFB1 را در خوراک دام ۲۰-۱۰ppb در نظر می گیرند (۳).

برای جداسازی و تعیین میزان آفلاتوکسین روش‌های متعددی وجود دارد که از آن جمله می‌توان به روش TLC (Thin Layer Chromatography) اشاره نمود که از سال ۱۹۹۰ به‌عنوان یکی از روش‌های متداول جداسازی افلاتوکسین مورد توجه بوده و به منظور تشخیص و تعیین مقادیر کمی افلاتوکسین به کاررفته است. در این روش میزان سم بر حسب نانوگرم بر گرم گزارش می‌شود. همواره لازم است که گونه‌ی شیمیایی مورد نیاز خالص سازی شده سپس برای اهداف نامبرده مورد استفاده قرار گیرد (۴).

از جمله روش‌های دیگر برای تعیین مقدار آفلاتوکسین می‌توان به روش HPLC با فاز معکوس اشاره نمود. در سال ۲۰۱۱، بررا (Brera) و همکاران با استفاده از این روش، توانستند مقادیر آفلاتوکسین و سم Ochratoxin A را به‌طور همزمان در غذای بچه و فلفل قرمز تعیین کنند (۵).

چان (Chan) و همکاران در سال ۲۰۰۴ نیز از روش HPLC خودکار برای تشخیص همزمان آفلاتوکسین و Ochratoxin A استفاده کردند. در این روش از ستون ایمینوافینیتی حاوی آنتی‌بادی‌های اختصاصی AFLA و OCHRA استفاده شد (۶).

در ایران هم آزمایشات زیادی در زمینه افلاتوکسین صورت گرفته که بیشتر در ارتباط با پسته و شیر معمولی بوده است. با توجه به اینکه بدن کودکان در مقابل این سم آسیب‌پذیرتر از دیگر گروه‌های سنی می‌باشد، در تحقیق حاضر با روشی حساس‌تر و دقیق‌تر آزمایش تعیین میزان آفلاتوکسین روی شیرخشک موجود در بازار انجام شد. امید است با اجرای این تحقیق گامی کوچک در زمینه سلامتی افراد جامعه برداشته شود. تکنیک مورد استفاده در این تحقیق روش میکرواستخراج مایع-مایع پخشی می‌باشد. روش مورد استفاده یکی از انواع روش استخراج مایع- مایع می‌باشد. روش استخراج مایع- مایع به‌طور گسترده برای جداسازی و پیش تغلیظ آنالیت‌ها در نمونه‌های آبی برای ترکیبات آلی و معدنی استفاده می‌شود. اولین کاربرد این

روش در زمینه استخراج گونه‌های معدنی در سال ۲۰۰۳ توسط چمساز و همکاران گزارش شده است (۷). با این وجود، این تکنیک دارای نقاط ضعفی از جمله تشکیل امولوسیون، استفاده از حجم زیاد حلال، پر هزینه بودن و دشواری در اجرای روش می‌باشد (۸) تلاش‌های مستمر برای استفاده از روش استخراج مایع- مایع که نیاز به حجم کم استخراج کننده و تعداد مراحل کمتر داشته باشد منجر به ایجاد سه روش میکرو استخراج قطره‌ی تنها (۹)، میکرو استخراج فاز مایع با فیبر تو خالی (۱۰)، میکرو استخراج مایع-مایع پخشی (۱۱) شد.

استخراج مایع -مایع پخشی اولین بار توسط رضایی و همکاران در سال ۲۰۰۶ ارائه شده است (۱۲) که روشی ساده و سریع می‌باشد که در این روش سه بخش فاز استخراج کننده، حلال پخش کننده و فاز آبی مورد استفاده قرار می گیرد (۱۳).

از جمله عوامل مؤثر بر بازده روش استخراج مایع -مایع پخشی، می‌توان به حجم حلال استخراجی، حلال پخش کننده، تأثیر نیروی یونی، حجم نمونه، دمای استخراج و زمان استخراج اشاره نمود.

این روش در آنالیز ترکیبات نیترو آروماتیک درآب با کروماتوگرافی گازی، تعیین آمین‌های آروماتیک در نمونه‌های آبی، تعیین ترکیبات آلی در نمونه‌های آبی (هگزان، تولوئن، آفت کش‌های اورگانو فسفرها، آفت کش‌های اورگانو کلریدها، اتیل بنزن‌ها، بنزن (۱۴،۱۵)، کلروبنزن‌ها، کلروفنول‌ها، فنول‌ها، تری‌هالومتان و هیدروکربن‌های پلی‌سیکلیک در نمونه‌های مایع (۱۲) کاربرد دارد.

از مزایای روش میکرو استخراج مایع- مایع پخشی آسان بودن کار با این روش، زمان سریع استخراج، ارزان بودن، بالا بودن بازیابی روش و بالا بودن فاکتورهای غنی‌سازی می‌باشد.

روش بررسی

وسایل و دستگاه‌های مورد استفاده

- دستگاه کروماتوگرافی مایع(HPLC) مجهز به آشکارساز فلوئورسانس مدل ۴۷۴ ساخت شرکت واترز آمریکا
- دستگاه شیکر
- دستگاه سانتریفیوژ مدل HN-S ساخت کشور آلمان
- سرنگ HPLC صد میکرو لیتری ساخت شرکت هامیلتون سوئیس
- کلیه ظروف شیشه ای از نوع برانـد و دوران، ساخت کشور آلمان
- فالکون ۵۰ میلی لیتری از نوع پلی‌پروپیلن
- ترازوی دیجیتال مدل LIBROR AEU- 210 با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم، ساخت شرکت شیمادزو ژاپن
- ستون‌های ایمینوافینیتی AflaCLEAN^{TM} خریداری شده از شرکت LCTech GmbH
- کاغذ صافی وایتمن
- کاغذ صافی GFA

مواد شیمیایی مورد استفاده

- محلول استاندارد استوک ۱۰۰۰/۰نانوگرم بر میلی‌لیتر افلاتوکسین نسبت به افلاتوکسین B_1 و ۲۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر نسبت به افلاتوکسین B_2 خریداری شده از شرکت مرک آلمان
- نمک سدیم نیترات ۹۹/۵ درصد با وزن مولکولی ۸۵/۴۴ گرم خریداری شده از شرکت مرک آلمان
- کلروفرم و تتراکلرید کربن با درجه خلوص بالاخریداری شده از شرکت مرک آلمان
- متانول،اتانول و استونیتریل گرید HPLC خریداری شده از شرکت مرک آلمان
- نمک سدیم کلرید با درجه خلوص بالا، خریداری شده از شرکت مرک آلمان
- فسفات بافر سیلان (PBS) با pH=۷/۴

تهیه محلول‌های مورد نیاز

الف) محلول استاندارد حدواسط ۱۰۰/۰ و ۲۰/۰ نانو گرم بر میلی‌لیتر افلاتوکسین با استفاده از محلول استوک ساخته شد و سپس به‌وسیله آب -متانول به نسبت ۱ به ۱ در بالن ۵ میلی‌لیتری به حجم رسانده شد .محلول افلاتوکسین حدواسط در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد نگهداری شد.

ب) محلول استاندارد کاری روزانه در غلظت‌های مختلف با استفاده از محلول استاندارد حدواسط ساخته شد و با آب - متانول با نسبت ۱ به ۱ در بالن ۵ میلی لیتری به حجم رسانده شد.

ج) به منظور تهیه فسفات بافر سیلان با pH= ۴/۷ یک بسته سیگما از پودر PBS در یک بالن یک لیتری با آب مقطر به حجم رسانده شد.

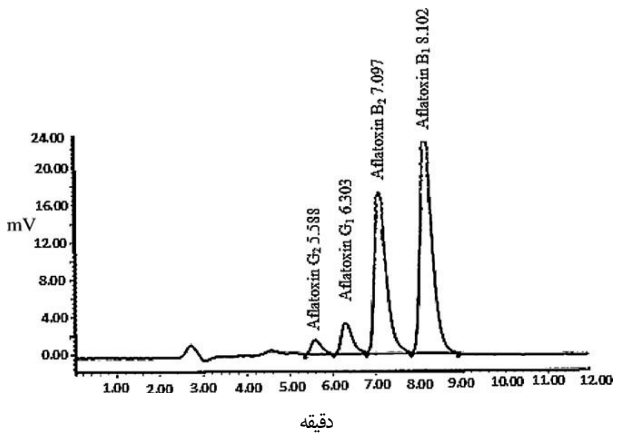
د) محلول سدیم نیترات: مقدار ۱۰ گرم از نمک سدیم نیترات در آب مقطر حل و سپس در بالن حجمی ۱۰۰/۰ میلی لیتری به حجم رسانده شد (محلول ۱۰ در صد وزنی حجمی نسبت به سدیم نیترات بدست آمد).

ه) حلال استخراجی برای استخراج با ستون ایمینوافینیتی : آب-متانول به نسبت ۴۵-۵۵.

آنالیز نمونه‌های حقیقی

در نهایت برای بررسی کارایی و دقت روش در استخراج گونه‌ها از بافت نمونه‌های حقیقی، استخراج از نمونه‌های حقیقی مختلفی انجام شد. همچنین برای بررسی صحت سه بار آزمایش تکرار گردید. این نمونه‌ها شامل شیرخشک‌های مختلف: هامانا، ببلاک ونان بودند.

ابتدا ۲۵/۰۰۰۰ گرم از نمونه توزین و در یک بلندر ریخته شد. به نمونه پنج گرم نمک سدیم کلرید اضافه شد، سپس ۱۰۰ میلی‌لیتر حلال استخراجی (آب -متانول ۸۰٪) اضافه و به مدت ۳ دقیقه هم‌زده شد. سپس محلول حاصل از کاغذ صافی واتمن عبور داده شد، ۲۰ میلی‌لیتر از آن جدا و به آن ۱۳۰ میلی‌لیتر آب اضافه گردید. پس از آن محلول جدید از کاغذ صافی GFA عبور داده شد و ۷۰ میلی‌لیتر از نمونه حاصله را از ستون ایمینوافینیتی عبور داده سپس با عبور ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر ستون شستشو داده شد و سپس با عبور هوا ستون خشک گردید. پس از آن ۱۵۰۰ میکرولیتر متانول – آب گرید HPLC به ستون اضافه گردید و در لوله آزمایش حاوی ۵ میلی‌لیتر فسفات بافر سیلان ، ۵۰۰ میکرولیتر استونیتریل و ۵۰۰ میکرو لیتر نمک سدیم نیترات برای واجذب افلاتوکسین جمع‌آوری گردید ۲۰۰ میکرولیتر کلروفرم با میکرو سرنگ به درون محلول تزریق گردید و در ادامه همانند آزمایش‌های قبلی عملیات استخراج و آنالیز با HPLC ، سه بار برای هر نمونه تکرار شد



شکل ۱. *کروماتوگرام‌های آفلاتوکسین استفاده شده در DLLME – FLD.*

شرایط: مقدار AFB1 ۰/۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر و AFB2 ۰/۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر، حجم حلال ۵ میلی‌لیتر، حلال استخراجی ۲۰۰/۰ میکرولیتر کلروفرم، حلال پخش کننده ۵۰۰ میکرولیتر استونیتریل، NaNO3 10% (w/v) ۰/۵ میلی‌لیتر، pH نمونه ۷/۴ و زمان سانتریفیوژ ۳ دقیقه

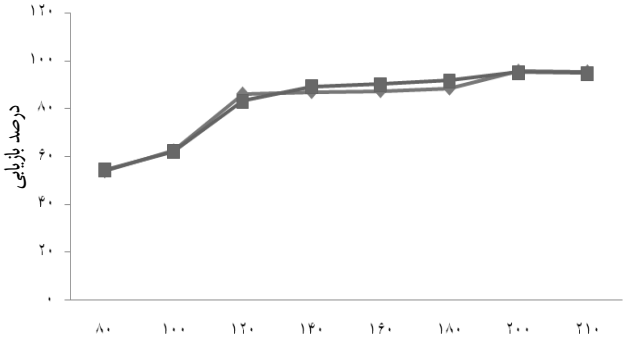
بهینه‌سازی شرایط استخراج

برای دست یابی به بهترین کارایی استخراج، بهینه سازی پارامترهای مؤثر بر فرآیند استخراج الزامی است .در کار تحقیقاتی حاضر از روش میکرو استخراج مایع - مایع پخشی با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا به منظور پیش تغلیظ دو افلاتوکسین B1، B2 استفاده شد .به منظور انتخاب شرایط بهینه اثر پارامترهای مختلفی بر روی کارایی استخراج بررسی شد .از عوامل مؤثر بر میکرو استخراج مایع -

مایع پخشی، نوع و حجم حلال استخراج کننده، نـوع و حجـم حلال پخش کننده، نوع نمک و مقدار نمک، زمان استخراج و زمان سانتریفیوژ بررسی شد .با توجـه بـه اینکـه اسـتخراج افلاتوکسین‌ها در pH= ۷/۴ انجام می گیرد، برای تنظیم pH از فسفات بافر سیلان استفاده شد.

بررسی اثر حجم حلال استخراجی

از مزایای عمده روش میکرو استخراج به حداقل رساندن میزان مصرف حلال‌های آلی است، چون در واقع گونه مورد نظر بایستی با کمترین مقدار حلال اسـتخراج شـود. در ایـن روش، چگالی محلول اسـتخراج بایدبیشـتر از آب باشـد و توانایی استخراج بالا و قابلیت کمی در حـل شـدن در آب داشته باشد. سه محلـول اسـتخراج شـامل CHCL3 و CCL4 مورد بررسی قرار گرفتند که در این میان CHCL3 بهتـرین کارایی استخراج را نشان داد و به عنوان محلول استخراج در نظر گرفته شد. برای بهینه کردن حجم حلال استخراج کننده، از حجـــم‌هـــای ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۰، ۱۴۰، ۱۶۰، ۲۰۰ و ۲۱۰ میکرولیتری از کلروفرم استفاده شد. اثر تغییر حجـم حـلال استخراج کننده بر میزان استخراج در نمودار (۱) ارائه شـده است.



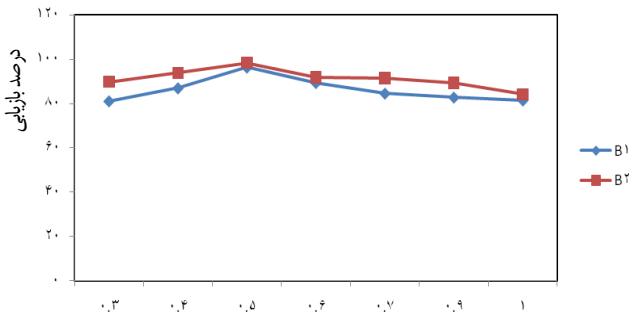
نمودار ۱. *اثر حجم حلال استخراج روی کارایی استخراج*

شرایط مشابه شکل ۱ می‌باشد، به جز حجم حلال استخراجی

همانطور که نمودار نشان می‌دهد ابتـدا بـا افـزایش حجـم کلروفرم تا ۲۰۰ میکرولیتر درصد بازیابی افزایش و سپس با افزایش حجم درصد بازیابی ثابت می‌ماند. بنابراین حجم ۲۰۰ میکرولیتر از کلروفرم برای عمل استخراج مورد استفاده قرار گرفت.

بررسی اثر نوع حلال پخش کننده

نکته مهم در انتخاب حلال پخش کننده قابلیت امتزاج آن با محلول‌های آبی و حلال استخراج کننده می‌باشد. به منظور تعیین اثر نوع حلال پخش کننده، محلول‌هایی ازافلاتوکسین با غلظت ۱/۱ نانوگرم بر میلی‌لیتر نسبت به افلاتوکسین B_1 و ۰/۲۲ نانوگرم بر میلی‌لیتر نسبت به افلاتوکسین B_2 تهیه و مطابق روش گفته شده پیش تغلیظ انجام شد. اثر سه حـلال اتانول، متانول و استونیتریل مورد بررسی قرار گرفت. نتـایج حاصل نشان داد که اتـانول و اسـتونیتریل دارای بیشـترین درصد بازیابی هستند ولی باتوجه به اینکه در انـدازه‌گیـری نمونه‌های حقیقی از پیش ستون‌های ایمینوافینیتی استفاده شد و قدرت واجذب حلال پخش کننده مهم می‌باشد و از آنجایی که قدرت واجـذب اسـتونیتریل بیشتراسـت، اسـتونیتریل به‌عنوان حلال پخش کننده در مطالعات بعدی انتخـاب شـد. برای بررسی اثر حجم حلال شوینده، از حجم‌های مختلف ۰/۳، ۰/۴، ۰/۵، ۰/۶، ۰/۷، ۰/۹ و ۱ میلـی‌لیتـری اسـتونیتریل استفاده شد که نتایج در نمودار (۲) آورده شده است. با توجه به نتایج، حجم ۰/۵ میلی‌لیتر بیشترین درصد بازدهی را داشت. حجم‌های کمتر از ۰/۵میلی‌لیتر به‌خوبی آنالیت‌ها را از روی ستون ایمینوافینیتی شستشـو نمـی‌دهـد و از طـرف دیگـر حجم‌های بالاتر از ۰/۵میلی‌لیتر نیـز بـه دلیـل حـل شـدن استونیتریل در آب باعث افزایش حلالیت آنالیت‌هـا در آب می‌شود. بنابراین ۰/۵ میلی‌لیتر به عنوان حجم بهینه انتخـاب شد.

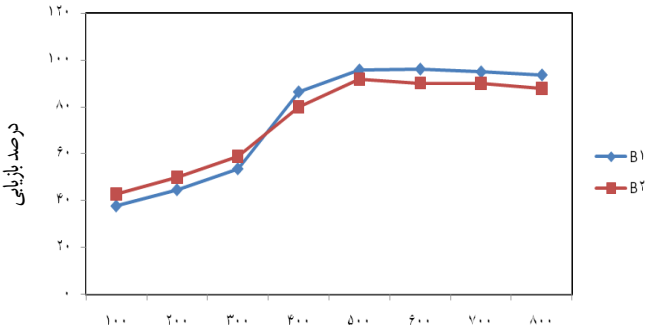


نمودار ۲. *تأثیر حجم حلال پخش کننده بر درصد بازیابی استخراج افلاتوکسین*

شرایط آزمایش مطابق شکل ۱ به جز حلال پخش کننده

بررسی اثر افزودن نمک

افزودن الکترولیت به فاز آبی در نتیجه اثر استخراج با نمک‌زنی منجر به افزایش نسبت توزیع گونه مورد نظر می‌گردد (۱۶). برای این منظور از نمک سدیم نیترات استفاده شد (۱۷) . سپس برای بررسی حجم نمک، محلول‌های یکسان با غلظت‌های مختلف نمک سدیم نیترات، مطابق روش کار مورد بررسی قرارگرفتند و همان‌طور که در نمودار (۳) مشاهده می‌شود، ابتدا با افزایش حجم



نمودار ۳. *تأثیر حجم سدیم نیترات بر درصد بازیابی استخراج افلاتوکسین*

شرایط آزمایش: مطابق شکل ۱ به جز حجم نمک

محلول ۱۰ درصد نمک تا ۵۰۰ میکرولیتر درصد بازیابی افزایش پیدا کرد و در محدوده ۵۰۰ میکرو لیتر به بالا درصد بازیابی تقریباً ثابت بود. بنابراین حجم ۵۰۰ میکرو لیتر محلول سدیم نیترات ۱۰ درصد به‌عنوان حجم بهینه برای آزمایشات بعدی انتخاب شد.

بررسی اثر زمان سانتریفیوژ

به منظور جداسازی بیشتر و سریع تر دو فاز، استفاده از سا نتریفیوژ لازم می‌باشد. برای بررسی اثر مدت زمان سانتریفیوژ، محلول‌های یکسان با غلظت ۲/۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر نسبت به آفلاتوکسین B_1 و ۰/۴ نانوگرم بر میلی‌لیتر نسبت به آفلاتوکسین B_2 مطابق روش کار با مدت زمان‌های متفاوت (۱ تا ۶ دقیقه) با سرعت ۵۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفیوژ شدند. بر اساس نتایج به دست آمده مدت زمان ۳ دقیقه با سرعت ۵۰۰۰ دور بر دقیقه برای جداسازی کامل فازها کافی می‌باشد.

شایستگی روش

روش‌های تجزیه ای باید تکرار پذیر بوده، گستره خطی زیاد و حد تشخیص کم داشته باشد و برای تجزیه نمونه‌های حقیقی قابل استفاده باشند. بدین منظور حد تشخیص، گستره خطی، تکرارپذیری و فاکتور افزایشی روش، مورد ارزیابی قرار گرفت. آنالیز کمی آفلاتوکسین توسط روش HPLC-FLD تحت شرایط طبیعی نشان دهنده کارایی خوب روش مذکور می‌باشد که نتایج در جدول ۱ گزارش شده‌اند. منحنی کالیبراسیون با ضریب برآورد ۰/۹۹۸۵ و ۰/۹۹۰۰ برای AFB_1 و AFB_2 خطی بود.

فاکتور افزایشی روش میکرواستخراج مایع-مایع پخشی به صورت نسبت شیب منحنی درجه‌بندی محلول‌های تغلیظ شده (m_a) به شیب منحنی درجه‌بندی محلول‌های تغلیظ نشده (m_b) تعریف می‌شود (۱۸). محلول‌هایی با غلظت مختلف از افلاتوکسین‌ها در آب-متانول تهیه و به دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا مطابق با شرایط تحقیق

اندازه‌گیری شد. بنابراین فاکتور افزایشی در کار حاضر برای B_1، ۸۸/۹۱ و برای B_2، ۴۹/۶۵ می‌باشد.

ma/mb = فاکتور افزایشی

حد تشخیص به صورت 3sb/m می‌باشد که در آن:

sb = انحراف استاندارد بلنک

m = شیب منحنی کالیبراسیون پس از استخراج

حد تشخیص برای AFB_1 و AFB_2 به‌ترتیب $۸/۰\times۱۰^{-۳}$ و $۱/۴\times۱۰^{-۳}$ نانوگرم بر میلی‌لیتر و انحراف استاندارد نسبی (RSD، n=7) بین ۲/۶ درصد و ۱/۴ درصد بود.

نتایج

آنالیز نمونه‌های حقیقی

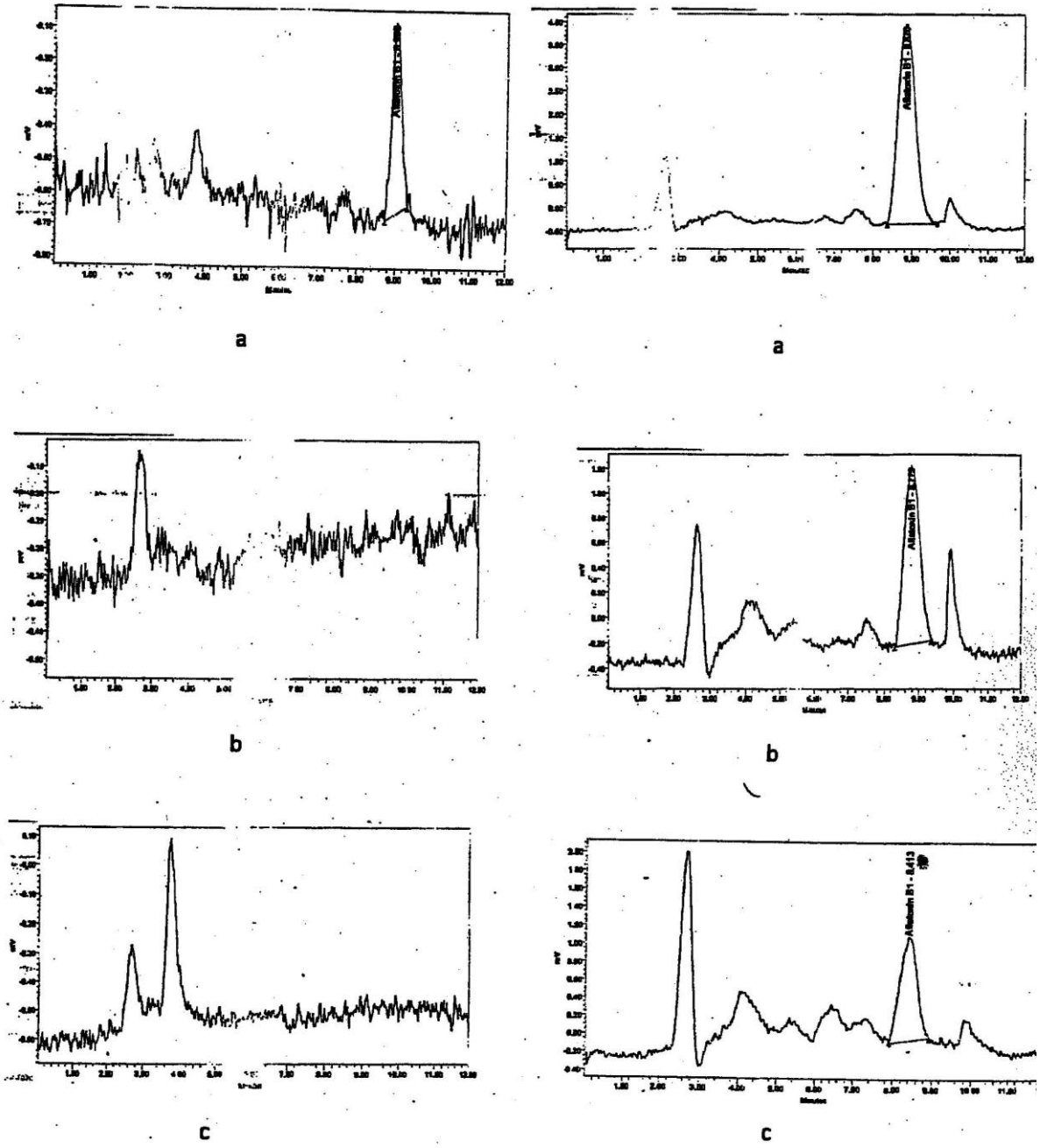
در این پژوهش، سه شیرخشک موجود در بازار ایران مورد ارزیابی قرار گرفتند که پس از سه بار آزمایش میانگین نتایج در جدول ۱گزارش شده است:

جدول ۱. *نتایج حاصل از نمونه‌های حقیقی*

نمونه مورد آزمایش	مقدار B1 (نانو گرم بر گرم)	مقدار B2 (نانو گرم بر گرم)
شیرخشک هامانا	۰/۰۹۲۳±۰/۰۰۱۱	کمتر از حد تعیین مقدار
شیرخشک بیلاک	۰/۰۵۱۷±۰/۰۰۰۵	کمتر از حد تعیین مقدار
شیرخشک نان	۰/۰۴۶۲±۰/۰۰۰۴	کمتر از حد تعیین مقدار

مقایسه روش بهبود یافته با روش‌های استخراج معمولی

امروزه IACs بسته‌بندی شده با آنتی‌بادی‌های اختصاصی به میزان زیادی برای آنالیزهای میکوتوکسینی استفاده می‌شوند. با این حال، محدودیت‌هایی برای استفاده آنها در بعضی ماتریکس‌های پیچیده وجود دارد. مقایسه روش DLLME پیشنهاد شده با روش‌های گزارش شده جهت استخراج و تعیین آفلاتوکسین به‌طور واضح نشان داد که روش پیشنهادی از حساسیت و دقت بالایی برخوردار می‌باشد. به علاوه، روش پیشنهادی با محدوده تشخیص پایین شناسایی شد که روش مطلوبی برای تعیین آفلاتوکسین می‌باشد و غنی‌سازی فاکتور EF روش SPE–DLLME–HPLC در مقایسه با روش SPE معمولی بیش از ۵۰ برابر می‌باشد. روش HPLC توانایی خالص‌سازی بالاتر و حساسیت بیشتری دارد.



شکل ۲. *(a) کرماتوگرام حاصل از آفلاتوکسین موجود در شیرخشک هامانا با روش DLLME - FLD پس از پیش تغلیظ،(b) کرماتوگرام حاصل از آفلاتوکسین موجود در شیرخشک ببلاک با روش DLLME - FLD پس از پیش تغلیظ،(c) کرماتوگرام حاصل از آفلاتوکسین موجود در شیرخشک نان با روش DLLME - FLD پس از پیش تغلیظ*

شکل ۳. *(a) کرماتوگرام حاصل از آفلاتوکسین موجود در شیرخشک هامانا قبل از پیش تغلیظ (b) کرماتوگرام حاصل از آفلاتوکسین موجود در شیرخشک ببلاک قبل از پیش تغلیظ (c) کرماتوگرام حاصل از آفلاتوکسین موجود در شیرخشک نان قبل از پیش تغلیظ*

بحث و نتیجه‌گیری

در این پژوهش یک روش جدید، ساده و حساس DLLME به همراه HPLC – FLD برای پیش تغلیظ و تعیین مقدایر کم آفلاتوکسین به کار گرفته شد. این روش اطلاعات مفیدی در مورد آلودگی محصولات شیرخشک ایران ارائه می‌دهد. مقادیر بالای آفلاتوکسین بر این نکته تأکید دارد که برای حصول یک سیستم امن غذایی به ردیابی منظم و سختگیرانه‌تر برای کنترل آفلاتوکسین در کمترین سطح ممکن نیاز می‌باشد. در مقایسه با روش‌های معمول تعیین مقدار آفلاتوکسین، روش پیشنهادی اثرات مزاحم را حذف می‌کند و حساسیت بسیار بالاتری دارد؛ یعنی یک عامل غنی‌سازی بالا. به‌علاوه، DLLME ترکیب شده با HPLC – FLD به مقادیر کم حلال استخراج سم نیاز دارد. برای اولین بار در این تحقیق DLLME برای پیش تغلیظ و تعیین آفلاتوکسین در شیرخشک به‌کار رفت و نشان داد که این روش از دقت خوب و بازیابی نسبتاً رضایت‌بخشی برخوردار می‌باشد. این تحقیق تصدیق می‌کند که این روش توانایی بالایی در پیش تغلیظ سریع و آنالیز انواع مختلف آفلاتوکسین از نمونه‌های مختلف دارد.

در این تحقیق اندازه‌گیری افلاتوکسین‌های B_1 و B_2 مدنظر بوده و آفلاتوکسین‌های M_1 و M_2 از این دو سم تولید می‌شود که اندازه‌گیری B_1 و B_2 این دو را نیز پوشش می‌دهد.

References

1. Urban DD, Norman D. Aflatoxin formation in peanuts by *Aspergillus Flavus* Alabama agricultural experiment station. Auburn University, 1977; P3.
2. Ehtlich KC, Beverly KK, Cotty PJ. Aflatoxin-producing Aspergillus Species from Thailand. *International Journal of Food Microiology* 2007; 114: 153-9.
3. URL: http://ec.europa-eu/index_en.htm
4. Ulrich S. Solid-phase microextraction in biomedical analysis. *J Chromatogr A* 2000; 902(1): 167–94.
5. Brera C, Debegnach F, De Santis B, Pannunzi E, Berdini C, Prantera E, Gregori E, Miraglia M. Simultaneous determination of aflatoxins and ochratoxin A in baby foods and paprika by HPLC with fluorescence detection: a single-laboratory validation study. *Talanta* 2011; 83(5): 1442-6.
6. Chan D, MacDonald S.J, Boughtflower V, Brereton P. Simultaneous determination of aflatoxins and ochratoxin A in food using a fully automated immunoaffinity column clean-up and liquid chromatography-fluorescence detection. *J Chromatogr A* 2004; 1059(1-2): 13–6.
7. Chamsaz M, Arbab-Zavar M. H, Nazari S. Determination of arsenic by electrothermal atomic absorption spectrometry using headspace liquid phase microextraction after in situ hydride generation. *J Anal At Spectrom* 2003; 18: 1279-82.
8. He Y, Lee H.K. The various electrophoretic systems and detection schemes that have been introduced so far for the CE and CEC of pesticides are discussed. *Electrophoresis* 1997; 18: 2036–41.
9. Sarafraz Yazdi A, Amiri A. Liquid-phase microextraction. *Trends Anal Chem* 2010; 29(1): 1-14.
10. Lee J, Lee H.K, Rasmussen K.E, Pedersen-Bjergaards. Environmental and bioanalytical applications of hollow fiber membrane

liquid-phase microextraction: a review. *Anal Chim Acta* 2008; 624(2): 253-68.

11. Rasmussen K.E, Bjergaard S.P. Liquid-phase microextraction and capillary electrophoresis of citalopram, an antidepressant drug. *J Chromatogr* 2001; 909: 87-93.
12. Rezaee M, Assadi Y, Milani Hosseini M.R, Aghaee E, Ahmadi F, Berijani S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *J Chromatogr* A 2006; 26;1116(1-2):1-9.
13. Kozani R.R, Assadi Y, Shemirani F, Hosseini M.R, Jamali M.R. Part-per-trillion determination of chlorobenzenes in water using dispersive liquid-liquid microextraction combined gas chromatography-electron capture detection. *Talanta* 2007; 72(2): 387-93.
14. Barijani S, Assadi Y, Anbia M, Milani Hosseini M.R, Aghaee E. Dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-flame photometric detection. Very simple, rapid and sensitive method for the determination of organophosphorus pesticides in water. *J Chromatogr A* 2006; 1123(1):1-9.
15. Rahnama Kozani R, Assadi Y, Shemirani F, Milani Hosseini M.R, Jamali M.R. Determination of thrihalomethanes in drinking water by dispersive liquid-liquid microextraction then gas chromatography with electron-capture detection. *Chromatographia* 2007**;** 66 (1/2) 81-6.
16. Khalili Zanjani M.R, Yamini Y, Shariati S, Jonsson J.A. A new liquid-phase microextraction method based on solidification of floating organic drop. *Anal Chim Acta* 2007; 585(2): 286-93.
17. Afzali D, Ghanbarian M, Mostafavi A, Shamspur T, Ghaseminezhad S. A novel method for high preconcentration of ultra trace amounts of B1, B2, G1 and G2 aflatoxins in edible oils by dispersive liquid-liquid microextraction after immunoaffinity column clean-up. *J Chromatogr A* 2012; 1247:35– 41.
18. Vaezzadeh M, Shemirani F, Majidi B. Microextraction technique based on ionic liquid for preconcentration and determination of palladium in food additive, sea water, tea and biological samples. *Food Chem Toxicol* 2010; 48 (6):1455-60.

Determination of Aflatoxins B1 and B2 in Powdered Milk Using Modified Liquid Chromatography Method

Amini A., B.Sc.[1]*, Afzali-Grooh D., Ph.D.[2], Chamsaz M., Ph.D.[3]

1. Master Student of Chemistry, Azad University, Khorasan razavi Science & Research Branch, Neyshabour, Iran
2. Assistant Professor of Chemistry, Kerman Higher Education University, Kerman, Iran
3. Professor of Chemistry, Basic Sciences School, Ferdowsi University, Mashhad, Iran

* Corresponding author; E-mail: ali.amini.kr@gmail.com

(Received: 2 Feb. 2014 Accepted: 21 May 2014)

Abstract

Background & Aims: In this study, using a liquid-liquid microextraction method for pre-concentration trace amounts of aflatoxins, the amount of Aflatoxins B1 and B2 in powdered milk was determined. Determination of aflatoxins was done by using high-performance liquid chromatography coupled with fluorescent detector.

Method: Samples were extracted by immunoaffinity column (IAC) clean-up, and their eluents were used as dispersants of the subsequent DLLME, for further enrichment of aflatoxins. Various parameters (the type of elution solvent, the type and volume of extraction solvent and disperser solvent, extraction time and centrifugation time) that affect the efficiency of two steps were optimized.

Results: Under the optimum conditions, the calibrations for B1 and B2 were found to be linear in the range of 0.03-5.0 and 0.006-1.0 ng ml-1 with 0.98 and 0.99 coefficient of estimation (R2), respectively.

Conclusion: The results showed that dispersive liquid–liquid microextraction combined with HPLC is a selective, simple, sensitive and effective analytical method for the pre-concentration and determination of ultra trace amounts of aflatoxins. The method is suggested for pre-concentration and determination of B1 and B2 aflatoxins in milk powder.

Keywords: Aflatoxins, High pressure liquid chromatography (HPLC), Immunoaffinity cleanup, Powdered Milk, DLLME

Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2014; 21(4): 321-331