

● مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دوره بیست و یکم، شماره ۴، ص ۳۳۱-۳۲۱، ۱۳۹۳

مقاله پژوهشی

## انداز گیری آفلاتوکسین B<sub>1</sub> , B<sub>2</sub> موجود در شیر خشک به روش اصلاح شده کروماتوگرافی مایع

علی امینی<sup>۱\*</sup>، داریوش افضلی گروه<sup>۲</sup>، محمود چمساز<sup>۳</sup>

### 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<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> 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 ایمینوآفینیتی 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<sub>1</sub>، B<sub>2</sub> در محدوده ۵/۰-۰/۰۳ و ۰/۰۰۶-۱/۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر به ترتیب با ضریب برآورد (R<sup>2</sup>) ۰/۹۸ و ۰/۹۹ خطی به دست 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<sub>1</sub>, B<sub>2</sub> می‌باشد و این روش برای پیش تغلیظ و تعیین آفلاتوکسین B<sub>1</sub>، B<sub>2</sub> در شیر خشک پیشنهاد می‌شود.

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

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد واحد علوم و تحقیقات 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

پذیرش مقاله: ۱۳۹۳/۲/۳۱

دریافت مقاله اصلاح شده: ۱۳۹۲/۱/۳۰

دریافت مقاله: ۱۳۹۱/۱۱/۱۳

## 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 و در 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 و باعث 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 *Aspergillus 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<sub>1</sub>، B<sub>2</sub>، G<sub>1</sub>، G<sub>2</sub>، M<sub>1</sub>، M<sub>2</sub> و مشتقات آن‌ها می‌باشد. اکثر محققین بر این عقیده اند که آفلاتوکسین‌ها به خصوص نوع B<sub>1</sub> 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 می‌گذارند. در سال ۱۹۸۸ IARC آفلاتوکسین B<sub>1</sub> را در لیست مواد سرطان‌زای انسانی قرار داد (۲).

در مورد حداکثر مقدار مجاز AFB<sub>1</sub> و AFM<sub>1</sub> در کشورهای مختلف قوانین متنوعی وجود دارد، اما به طور معمول حداکثر مقدار مجاز AFB<sub>1</sub> را در خوراک دام ۲۰-۱۰ ppb در نظر می‌گیرند (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 آفلاتوکسین مورد توجه بوده و به منظور تشخیص و تعیین مقادیر کمی آفلاتوکسین 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 لفل 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 ایمینوآفینیتی حاوی آنتی‌بادی‌های اختصاصی AFLA و OCHRA استفاده شد (۶).

در ایران هم آزمایشات زیادی در زمینه آفلاتوکسین 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 شیر خشک 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 پیش‌تغلیظ آنالیت‌ها در نمونه‌های آبی برای ترکیبات آلی و معدنی استفاده می‌شود. اولین کاربرد این

## روش بررسی

## وسایل و دستگاه‌های مورد استفاده

- دستگاه کروماتوگرافی مایع (HPLC) مجهز به آشکارساز فلئورسانس مدل ۴۷۴ ساخت شرکت واترز آمریکا
  - دستگاه شیکر
  - دستگاه سانتریفیوژ مدل HN-S ساخت کشور آلمان
  - سرنگ HPLC صد میکرو لیتری ساخت شرکت هامپلتون سوئیس
  - کلیه ظروف شیشه‌ای از نوع براند و دوران، ساخت کشور آلمان
  - فالکون ۵۰ میلی لیتری از نوع پلی پروپیلن
  - ترازوی دیجیتال مدل LIBROR AEU- 210 با دقت ۰/۰۰۱ گرم، ساخت شرکت شیمادزو ژاپن
  - ستون‌های ایمینوآفینیتی AflaCLEAN™ خریداری شده از شرکت LCTech GmbH
  - کاغذ صافی وایتمن
  - کاغذ صافی GFA
- مواد شیمیایی مورد استفاده
- محلول استاندارد استوک ۱۰۰۰/۰ نانوگرم بر میلی لیتر افلاتو کسین نسبت به افلاتو کسین B<sub>1</sub> و ۲۰۰ نانوگرم بر میلی لیتر نسبت به افلاتو کسین B<sub>2</sub> خریداری شده از شرکت مرک آلمان
  - نمک سدیم نیترات ۹۹/۵ درصد با وزن مولکولی ۸۵/۴۴ گرم خریداری شده از شرکت مرک آلمان
  - کلروفورم و تتراکلرید کربن با درجه خلوص بالا خریداری شده از شرکت مرک آلمان
  - متانول، اتانول و استونیتریل 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

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 امولسیون، استفاده از حجم زیاد حلال، پرهزینه 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 قطره‌ای 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 می‌گیرد (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 در آب 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.

### تهیه محلول‌های مورد نیاز

الف) محلول استاندارد حدواسط ۱۰۰۰/۰ و ۲۰/۰ نانو گرم بر میلی لیتر افلاتوکسین با استفاده از محلول استوک ساخته شد و سپس به وسیله آب-متانول به نسبت ۱ به ۱ در بالن ۵ میلی لیتری 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).

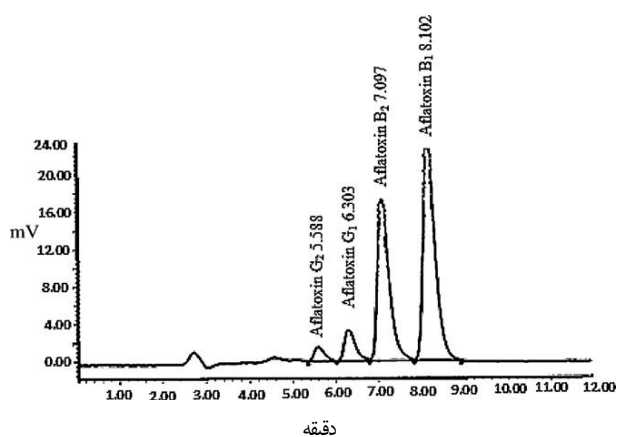
ه) حلال استخراجی برای استخراج با ستون ایمینوآفینیتی: آب-متانول به نسبت ۴۵-۵۵.

### 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 شیر خشک‌های مختلف: هامانا، بیلاک و نان 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 میلی لیتر حلال استخراجی (آب-متانول ۸۰٪) اضافه و به مدت ۳ دقیقه هم‌زده شد. سپس محلول حاصل از کاغذ صافی واتمن عبور داده شد، ۲۰ میلی لیتر از آن جدا و به آن ۱۳۰ میلی لیتر آب اضافه گردید. پس از آن محلول جدید از کاغذ صافی GFA عبور داده شد و ۷۰ میلی لیتر از نمونه

حاصله را از ستون ایمینوآفینیتی عبور داده سپس با عبور ۱۰ میلی لیتر آب مقطر ستون شستشو داده شد و سپس با عبور هوا ستون خشک گردید. پس از آن ۱۵۰۰ میکرو لیتر متانول - آب گرید HPLC به ستون اضافه گردید و در لوله آزمایش حاوی ۵ میلی لیتر فسفات بافر سیلان، ۵۰۰ میکرو لیتر استونیتریل و ۵۰۰ میکرو لیتر نمک سدیم نیترات برای واجذب افلاتوکسین جمع آوری گردید ۲۰۰ میکرو لیتر 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 میلی لیتر و AFB2 ۰/۱ نانوگرم بر میلی لیتر، حجم حلال ۵ میلی لیتر، حلال استخراجی ۲۰۰/۰ میکرو لیتر کلروفرم، حلال پخش کننده ۵۰۰ میکرو لیتر استونیتریل، ۱۰٪ NaNO3 ۰/۵ میلی لیتر، pH نمونه ۷/۴ و زمان ساترفیوژ 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 پخش 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 -

افزایش حجم درصد بازیابی ثابت می ماند. بنابراین حجم ۲۰۰ میکرولیتر از کلروفورم برای عمل استخراج مورد استفاده قرار گرفت.

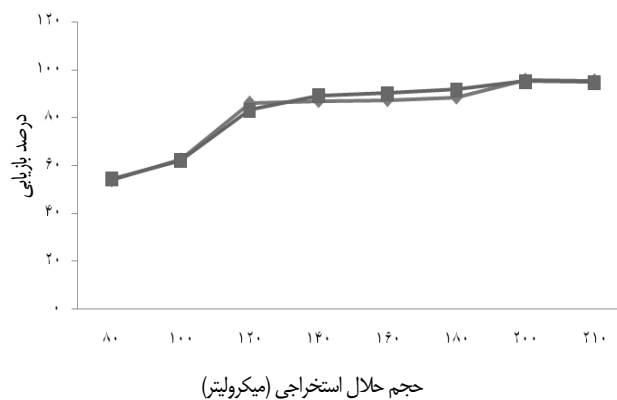
#### بررسی اثر نوع حلال پخش کننده

نکته مهم در انتخاب حلال پخش کننده قابلیت امتزاج آن با محلول های آبی و حلال استخراج کننده می باشد. به منظور تعیین اثر نوع حلال پخش کننده، محلول هایی از افلاتو کسین با غلظت ۱/۱ نانو گرم بر میلی لیتر نسبت به افلاتو کسین B<sub>1</sub> و ۰/۲۲ نانو گرم بر میلی لیتر نسبت به افلاتو کسین B<sub>2</sub> تهیه و مطابق روش گفته شده پیش تغلیظ انجام شد. اثر سه حلال اتانول، متانول و استونیتریل مورد بررسی قرار گرفت. نتایج حاصل نشان داد که اتانول و استونیتریل دارای بیشترین درصد بازیابی هستند ولی با توجه به اینکه در اندازه گیری نمونه های حقیقی از پیش ستون های ایمینوآفینیتی استفاده شد و قدرت واجذب حلال پخش کننده مهم می باشد و از آنجایی که قدرت واجذب استونیتریل بیشتر است، استونیتریل به عنوان حلال پخش کننده در مطالعات بعدی انتخاب شد. برای بررسی اثر حجم حلال شوینده، از حجم های مختلف ۰/۳، ۰/۴، ۰/۵، ۰/۶، ۰/۷، ۰/۹ و ۱ میلی لیتری استونیتریل استفاده شد که نتایج در نمودار (۲) آورده شده است. با توجه به نتایج، حجم ۰/۵ میلی لیتر بیشترین درصد بازدهی را داشت. حجم های کمتر از ۰/۵ میلی لیتر به خوبی آنالیت ها را از روی ستون ایمینوآفینیتی شستشو نمی دهد و از طرف دیگر حجم های بالاتر از ۰/۵ میلی لیتر نیز به دلیل حل شدن استونیتریل در آب باعث افزایش حلالیت آنالیت ها در آب می شود. بنابراین ۰/۵ میلی لیتر به عنوان حجم بهینه انتخاب شد.

مایع پخشی، نوع و حجم حلال استخراج کننده، نوع و حجم حلال پخش کننده، نوع نمک و مقدار نمک، زمان استخراج و زمان سانتریفیوژ بررسی شد. با توجه به اینکه استخراج افلاتو کسین ها 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 حلال های آلی است، چون در واقع گونه مورد نظر بایستی با کمترین مقدار حلال استخراج شود. در این روش، چگالی محلول استخراج باید بیشتر از آب باشد و توانایی استخراج بالا و قابلیت کمی در حل شدن در آب داشته باشد. سه محلول استخراج شامل CHCL<sub>3</sub> و CCL<sub>4</sub> مورد بررسی قرار گرفتند که در این میان CHCL<sub>3</sub> بهترین کارایی استخراج را نشان داد و به عنوان محلول استخراج در نظر گرفته شد. برای بهینه کردن حجم حلال استخراج کننده، از حجم های ۸۰، ۱۰۰، ۱۲۰، ۱۴۰، ۱۶۰، ۱۸۰ و ۲۰۰ میکرولیتری از کلروفورم استفاده شد. اثر تغییر حجم حلال استخراج کننده بر میزان استخراج در نمودار (۱) ارائه شده است.



نمودار ۱. اثر حجم حلال استخراج روی کارایی استخراج

شرایط مشابه شکل ۱ می باشد، به جز حجم حلال استخراجی

همانطور که نمودار نشان می دهد ابتدا با افزایش حجم کلروفورم تا ۲۰۰ میکرولیتر درصد بازیابی افزایش و سپس با

محلول ۱۰ درصد نمک تا ۵۰۰ میکرو لیتر 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 به عنوان حجم بهینه برای آزمایشات بعدی انتخاب شد.

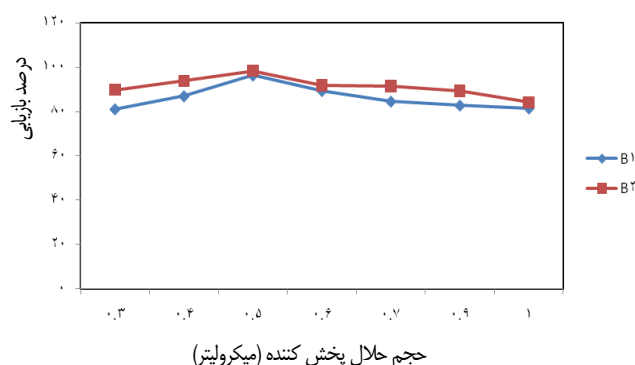
#### بررسی اثر زمان سانتریفیوژ

به منظور جداسازی بیشتر و سریع تر دو فاز، استفاده از سانتریفیوژ لازم می‌باشد. برای بررسی اثر مدت زمان سانتریفیوژ، محلول‌های یکسان با غلظت ۲/۰ نانوگرم بر میلی لیتر نسبت به آفلاتوکسین B<sub>1</sub> و ۰/۴ نانوگرم بر میلی لیتر نسبت به آفلاتوکسین B<sub>2</sub> 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، تکرار پذیری 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<sub>1</sub> و AFB<sub>2</sub> خطی بود.

فاکتور افزایشی روش میکرواستخراج مایع-مایع پخشی به صورت نسبت شیب منحنی درجه بندی محلول‌های تغلیظ شده (m<sub>1</sub>) به شیب منحنی درجه بندی محلول‌های تغلیظ نشده (m<sub>0</sub>) تعریف می‌شود (۱۸). محلول‌هایی با غلظت مختلف از آفلاتوکسین‌ها در آب-متانول تهیه و به دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا مطابق با شرایط تحقیق



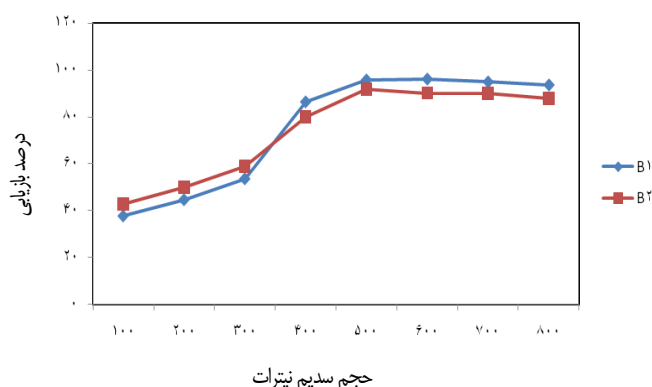
#### نمودار ۲. تأثیر حجم حلال پخش کننده بر درصد بازیابی

استخراج آفلاتوکسین

شرایط آزمایش مطابق شکل ۱ به جز حلال پخش کننده

#### بررسی اثر افزودن نمک

افزودن الکترو لیت به فاز آبی در نتیجه اثر استخراج با نمک زنی 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 قرار گرفتند و همان‌طور که در نمودار (۳) مشاهده می‌شود، ابتدا با افزایش حجم



#### نمودار ۳. تأثیر حجم سدیم نیترات بر درصد بازیابی استخراج

آفلاتوکسین

شرایط آزمایش مطابق شکل ۱ به جز حجم نمک

اندازه گیری شد. بنابراین فاکتور افزایشی در کار حاضر برای  $B_1$ ،  $88/91$  و برای  $B_2$ ،  $49/65$  می باشد.

$$\text{فاکتور افزایشی} = ma/mb$$

حد تشخیص به صورت  $3sb/m$  می باشد که در آن:

$sb$  = انحراف استاندارد بلنک

$m$  = شیب منحنی کالیبراسیون پس از استخراج

حد تشخیص برای  $AFB_1$  و  $AFB_2$  به ترتیب  $8/0 \times 10^{-3}$  و  $1/4 \times 10^{-3}$  نانوگرم بر میلی لیتر و انحراف استاندارد نسبی  $(n=7, RSD)$  بین  $2/6$  درصد و  $1/4$  درصد بود.

### نتایج

#### آنالیز نمونه های حقیقی

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

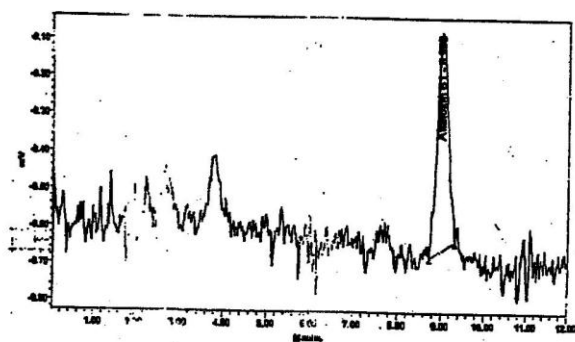
جدول ۱. نتایج حاصل از نمونه های حقیقی

نمونه مورد آزمایش	مقدار $B_1$ (نانوگرم بر گرم)	مقدار $B_2$ (نانوگرم بر گرم)
شیرخشک هامانا	$0/923 \pm 0/011$	کمتر از حد تعیین مقدار
شیرخشک بیلاک	$0/517 \pm 0/005$	کمتر از حد تعیین مقدار
شیرخشک نان	$0/462 \pm 0/004$	کمتر از حد تعیین مقدار

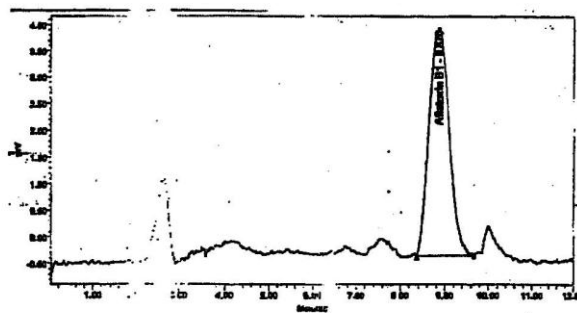
مقایسه روش بهبود یافته با روش های استخراج معمولی

امروزه IACs بسته بندی شده با آنتی بادی های اختصاصی به میزان زیادی برای آنالیزهای میکروتوکسینی استفاده می شوند. با این حال، محدودیت هایی برای استفاده آنها در بعضی ماتریکس های پیچیده وجود دارد. مقایسه روش DLLME پیشنهاد شده با روش های گزارش شده جهت استخراج و تعیین آفلاتوکسین به طور واضح نشان داد که

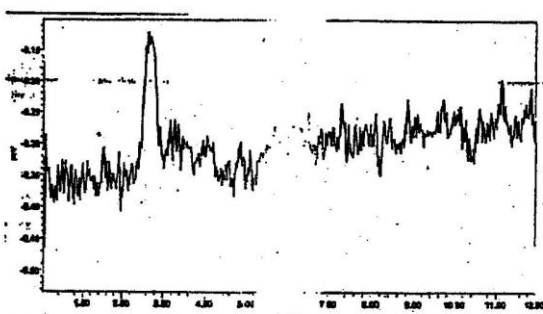
روش پیشنهادی از حساسیت و دقت بالایی برخوردار می باشد. به علاوه، روش پیشنهادی با محدوده تشخیص پایین شناسایی شد که روش مطلوبی برای تعیین آفلاتوکسین می باشد و غنی سازی فاکتور EF روش SPE-DLLME-HPLC در مقایسه با روش SPE معمولی بیش از ۵۰ برابر می باشد. روش HPLC توانایی خالص سازی بالاتر و حساسیت بیشتری دارد.



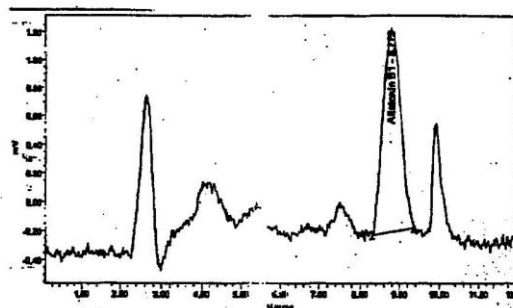
a



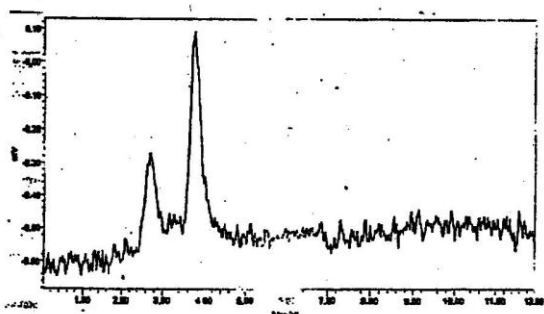
a



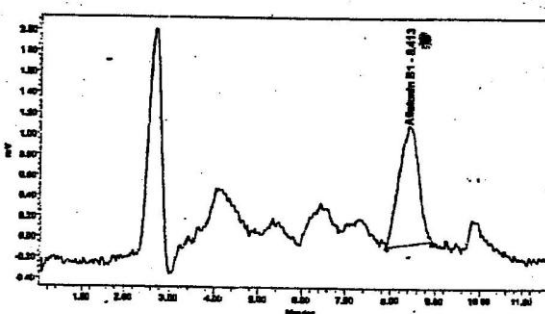
b



b



c



c

شکل ۳. (a) کروماتوگرام حاصل از آفلاتوکسین موجود در شیر خشک هامانا قبل از پیش تغلیظ (b) کروماتوگرام حاصل از آفلاتوکسین موجود در شیر خشک ببلاک قبل از پیش تغلیظ (c) کروماتوگرام حاصل از آفلاتوکسین موجود در شیر خشک نان قبل از پیش تغلیظ

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



## بحث و نتیجه‌گیری

در این پژوهش یک روش جدید، ساده و حساس DLLME به همراه HPLC – FLD برای پیش‌تغلیظ و تعیین مقادیر 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. به علاوه، DLLME ترکیب شده با HPLC – FLD به مقادیر کم حلال استخراج سم نیاز

دارد. برای اولین بار در این تحقیق DLLME برای پیش‌تغلیظ و تعیین آفلاتوکسین در شیرخشک به کار 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 پیش‌تغلیظ سریع و آنالیز انواع مختلف آفلاتوکسین از نمونه‌های مختلف دارد.

در این تحقیق اندازه‌گیری آفلاتوکسین‌های  $B_1$  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

- Urban DD, Norman D. Aflatoxin formation in peanuts by *Aspergillus Flavus* Alabama agricultural experiment station. Auburn University, 1977; P3.
- Ehtlich KC, Beverly KK, Cotty PJ. Aflatoxin-producing *Aspergillus* Species from Thailand. *International Journal of Food Microbiology* 2007; 114: 153-9.
- URL: [http://ec.europa-eu/index\\_en.htm](http://ec.europa-eu/index_en.htm)
- Ulrich S. Solid-phase microextraction in biomedical analysis. *J Chromatogr A* 2000; 902(1): 167-94.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Sarafraz Yazdi A, Amiri A. Liquid-phase microextraction. *Trends Anal Chem* 2010; 29(1): 1-14.
- 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 trihalomethanes 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.<sup>1\*</sup>, Afzali-Grooh D., Ph.D.<sup>2</sup>, Chamsaz M., Ph.D.<sup>3</sup>

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<sup>-1</sup> with 0.98 and 0.99 coefficient of estimation (R<sup>2</sup>), 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