

Extraction and Determination of Phthalate Esters (PAEs) in Doogh

Amin Kouhpayeh¹,
Mojtaba Moazzen²,
Gholam Reza Jahed Khaniki³,
Sina Dobaradaran⁴,
Nabi Shariatifar⁵,
Mahsa Ahmadloo⁶,
Ali Azari⁷,
Shahrokh Nazmara⁷,
Amin Kiani⁸,
Mehdi Salari⁹

¹ Assistant Professor, Department of Pharmacology, Faculty of Medicine, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Iran

² MSc in Food Safety And Hygiene, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

³ Professor, Department of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁴ Associate Professor, Department of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran

⁵ Assistant Professor, Department of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁶ MSc Student in Food Safety And Hygiene, School of Public Health, Qazvin University of Medical Sciences, Qazvin, Iran

⁷ PhD Student in Environmental Health Engineering, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

⁸ Instructor, Department of Public Health, School of Public Health, Fasa University of Medical Sciences, Fasa, Iran

⁹ PhD Student in Environmental Health Engineering, Faculty of Public Health, Hamadan University of Medical Sciences, Hamadan, Iran

(Received August 30, 2016 Accepted Jan 1, 2017)

Abstract

Background and purpose: Today, due to improvement and progress of human knowledge in food industry, plastic coatings such as PET (polyethylene terephthalate) that has unique characteristics are widely used for food and beverage packaging such as water and doogh. Phthalate esters are used in order to improve flexibility, efficiency and sustainability of materials. Chronic exposure with such materials play a role in incidence of many diseases and cancer in human. The aim of this study was to investigate the presence and concentration of phthalates in different brands of doogh.

Materials and methods: In this study, we synthesized multi-walled magnetic carbon nanotubes using iron oxide. Then, the synthesized magnetic nanotubes were used for absorption and extraction of phthalate esters from doogh matrix. After sample preparation, the concentration of each phthalate esters was measured by GC-MS.

Results: Concentration of phthalate esters in all samples were found to be lower than the standard levels but DEHP had the highest concentration. Statistical analysis showed no significant differences between the concentration of phthalate esters in different brands and storage time of doogh.

Conclusion: According to these findings and low concentration of each phthalate ester compared with standard levels in different types of doogh, it has no health effect on consumers.

Keywords: phthalate esters, doogh, PET bottle, multi walled carbon nanotube, magnetic

استخراج و اندازه گیری استرهای فتالات (PAEs) در دوغ

امین کوهپایه^۱
مجتبی موزن^۲
غلامرضا جاهد خانیکی^۳
سینا دوبرادران^۴
نبی شریعتی فر^۵
مهسا احمدلو^۶
علی آذری^۷
شاهرخ نظم آرا^۸
امین کیانی^۹
مهدی سالاری^۹

چکیده

سابقه و هدف: امروزه با گسترش دانش بشری و پیشرفت در زمینه صنعت غذایی، پوشش‌های پلاستیکی از جمله PET (پلیمر پلی اتیلن ترفتالات) به دلیل ویژگی‌های منحصر به فرد، به طور گسترده جهت بسته‌بندی مواد غذایی مختلف نظیر آب و دوغ مورد استفاده قرار می‌گیرد. استرهای فتالات به منظور بهبود انعطاف پذیری، کارایی و پایداری در این مواد کاربرد دارند. تماس طولانی مدت با مواد ذکر شده، در بروز انواع مختلف بیماری و سرطان در انسان نقش دارند. هدف از این مطالعه، بررسی حضور و میزان استرهای فتالات در انواع مختلف دوغ می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش ابتدا نانو تیوب‌های کربنی چند جداره مغناطیسی با استفاده از اکسید آهن سنتز گردید و سپس نانو تیوب‌های مغناطیسی سنتز شده جهت جذب و استخراج استرهای فتالات از ماتریکس دوغ مورد استفاده قرار گرفت. پس از آماده‌سازی نمونه، غلظت هر کدام از استر فتالات‌ها از طریق دستگاه GC-MS اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: نتایج این پژوهش نشان داد که در تمامی نمونه‌ها، میزان استر فتالات‌ها پایین‌تر از محدوده استاندارد بود و بیش‌ترین غلظت نیز مربوط به DEHP بود. آنالیز آماری نیز نشان داد اختلاف معنی‌داری میان غلظت استرهای فتالات با توجه به برندهای مختلف و زمان‌های مختلف نگه‌داری دوغ وجود ندارد.

استنتاج: بر اساس یافته‌های این پژوهش و با توجه به غلظت پایین‌تر هر کدام از استر فتالات‌ها نسبت به مقادیر استاندارد در انواع مختلف دوغ، می‌توان نتیجه گرفت که خطری از این جهت مصرف‌کننده‌ها را تهدید نمی‌کند.

واژه‌های کلیدی: استرهای فتالات، انواع دوغ، بطری PET (نانو تیوب‌های کربنی) چند جداره، استخراج مغناطیسی

مقدمه

دوغ یک محصول لبنی تخمیری است که از مصرف سرانه، تولید صنعتی و صادرات آن در سال‌های مقبولیت و مصرف بالا در ایران برخوردار است و میزان اخیر رشد قابل توجه داشته است. مقبولیت دوغ نه فقط

E-mail: amin.k2010@yahoo.com

مؤلف مسئول: امین کیانی - شیراز؛ فسا، دانشگاه علوم پزشکی فسا

۱. استادیار، گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فسا، ایران
 ۲. کارشناس ارشد بهداشت و ایمنی مواد غذایی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
 ۳. استاد، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
 ۴. دانشیار، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران
 ۵. استادیار، گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
 ۶. دانشجوی کارشناسی ارشد بهداشت و ایمنی مواد غذایی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی قزوین، قزوین، ایران
 ۷. دانشجوی دکتری مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
 ۸. مربی، گروه بهداشت عمومی، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی فسا، فسا، ایران
 ۹. دانشجوی دکتری مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی همدان، همدان، ایران
- تاریخ دریافت: ۱۳۹۵/۶/۹ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۵/۶/۱۳ تاریخ تصویب: ۱۳۹۵/۱۰/۱۲

به عنوان فرآورده‌ای با ویژگی‌های حسی مطلوب، بلکه به عنوان نوشیدنی تخمیری سالم و سلامت بخش با مقدار تولید ۸۰۰،۰۰۰ تن در سال ۹۱، سبب شده است که به عنوان نوشیدنی ملی ایران پذیرفته شود (۱-۳). از این رو ایمنی و سلامت این فرآورده بسیار حائز اهمیت است. این محصول در ایران به شکل‌های گوناگونی هم‌چون بطری‌های شیشه‌ای، کیسه‌های پلاستیکی و نیز بطری‌های پلاستیکی بسته بندی و روانه ی بازار می‌شود. در این بین، بطری‌های پلاستیکی از جنس پلی‌اتیلن ترفتالات که ساختاری متشکل از استرهای فتالات دارند، دارای رواج بیش‌تری هستند (۴). استرهای فتالات (PAEs) استفاده‌های گوناگونی در بهبود انعطاف‌پذیری، کارایی و پایداری مواد پلی‌مری دارند، هم‌چنین این مواد در محصولاتی مانند رنگ‌ها، چسب‌ها، جوهرها و لوازم آرایشی نیز یافت می‌شوند. استفاده این مواد در صنایع غذایی معمولاً در ظروف پلاستیکی، فیلم‌ها، لوله‌ها، آسترها یا در درزگیری درب بطری‌ها، آستر تانک‌های ذخیره و مواد سازنده تسمه‌های منتقل‌کننده است (۱۵-۴). استرهای فتالات که شامل دی‌متیل فتالات، دی‌اتیل فتالات، دی‌ان بوتیل فتالات، بوتیل بنزیل فتالات، دی‌اتیل هگزیل فتالات و دی‌ان اکتیل فتالات هستند، از راه‌های مختلفی مانند پوست، تنفس و گوارش می‌توانند وارد بدن انسان شوند که در این میان، بیش‌ترین میزان مواجهه از طریق بسته‌بندی مواد غذایی صورت می‌گیرد (۲۰-۱۶).

با گسترش روزافزون دانش بشری و پیشرفت در صنعت پلاستیک‌سازی، امروزه پوشش PET (پلیمر پلی‌اتیلن ترفتالیک اسید) به دلیل ویژگی‌های منحصر به فردی که در زمینه عدم نفوذ گازها و سایر عوامل محیطی به داخل بسته‌بندی دارند، به‌طور گسترده جهت بسته‌بندی مواد غذایی مختلف به خصوص آب و سایر نوشیدنی‌ها مانند دوغ مورد استفاده قرار می‌گیرد (۱۵، ۲۱، ۲۲). بطری‌های PET از پلیمریزاسیون منومرهای اسید ترفتالیک و اتیلن گلیکول با کاتالیست‌های آنتیموان-تیتانیوم یا ژرمانیوم

تولید می‌شوند و در ترکیب خود دارای کبالت نیز می‌باشند (۲۱). در ظروف PET، ترکیباتی که دارای پتانسیل مهاجرت به داخل ماده غذایی می‌باشند شامل ترکیبات اولیه (منومر ترفتالیک اسید، دی‌متیل ترفتالات و اتیلن گلیکول)، محصولات جانبی واکنش و محصولات تخریبی پلیمری (استالدهید) و اولیگومرهای با وزن مولکولی کم (حلقوی و از دی‌مر تا پنتامر) به‌طور یافت می‌شوند. نتایج تحقیقات نشان می‌دهد که ۸۱ درصد میزان مهاجرت از PET مربوط به تریمرهای حلقوی ترفتالات و سایر اولیگومرها با وزن مولکولی کم و خطی می‌باشند (۲۱، ۴). زمانی که فتالات‌ها به عنوان پلاستی سایزر استفاده می‌شوند، پیوندی برگشت‌پذیر با زنجیره پلیمرها (غیر کوالانسی) برقرار می‌کند که تحت شرایط و استرس‌های فیزیکی از ساختار پلیمر جدا شده و به داخل محتویات بسته‌بندی مهاجرت کرده و باعث ایجاد مخاطراتی برای سلامت انسان‌ها و محیط‌زیست می‌شود. از سوی دیگر، استرهای فتالات جزء دسته‌ی مختل‌کننده غدد درون‌ریز می‌باشند که برخورد مزمن با این مواد در بروز انواع سرطان از جمله سرطان پستان در بانوان و سرطان پروستات در آقایان (۲۳)، اختلال در سنتز و فعالیت هورمون‌های داخلی (آنتی‌آندروژنیک)، اثر روی عملکرد غده‌ی تیروئید، عقیم‌شدن، فعالیت تراژونیک و موتاژنیک (۲۴)، بروز هایپراکتیویتی در کودکان، چاقی، آسیب به کبد، ازدیاد پروکسی زوم، آلرژی زایی و... نقش دارند (۴، ۶، ۷، ۱۱، ۱۴، ۲۵، ۲۶). آژانس حفاظت از محیط زیست آمریکا (EPA) حداکثر مجاز DEHP در آب‌های آشامیدنی را ۶ ppb تعیین کرده است. از سوی دیگر در انگلستان، میزان TDI برای DEHP و DBP مقدار ۰/۵ mg/kg در روز به میزان وزن بدن، BBP مقدار ۰/۱ mg/kg وزن بدن در روز و برای DEP مقدار ۰/۲ mg/kg وزن بدن در روز تعیین شده است (۷، ۱۷، ۲۰، ۲۱). مواد اولیه PET از کارخانجات متفاوت با کیفیت‌های مختلف و در برخی مواقع از مواد بازیافتی تهیه می‌گردد که این مسئله لزوم بررسی

اندازه گیری استرهای فتالات از خود نشان دهد. با این توصیف، از آنجایی که تاکنون مطالعه‌ی جامع و درخور توجه‌ای برای اندازه گیری این ماده‌ی خطرناک در انواع مختلف دوغ‌های ایرانی با برندهای مختلف و در بازه‌های زمانی مختلف در ایران صورت نگرفته است، در این مطالعه سعی خواهد شد انواع مختلف دوغ رایج در ایران با استفاده از جاذب مذکور بررسی شود و میزان انواع گوناگون فتالات در آن‌ها مورد سنجش قرار گیرد.

مواد و روش‌ها

مواد و وسایل موردنیاز

استانداردهای ۶ نوع از استرهای فتالات (DMP, DEP, DBP, BBP, DEHP, DnOP)، کلرید آهن (III) ۶ آب (FeCl₃.6H₂O)، نانو تیوب‌های کربنی چند جداره (MWCNT)، اتانول (C₂H₅OH)، اسید کلریدریک (HCl) و سدیم هیدروکسید (NaOH)، سدیم کلراید، بنزوئیل بنزوات، هگزان. کلیه مواد مورد استفاده در این مطالعه از شرکت Sigma Aldrich و Merck با درجه خلوص آنالیتیکال تهیه شد. برای تعیین غلظت‌های استرهای فتالات از GC-MS استفاده شد.

مراحل آماده سازی و آزمایش

جاذب مورد استفاده به روش هم ترسیبی مطابق مطالعه موزن و همکاران در سال ۲۰۱۳ آماده سازی شد (۳۱،۲۹،۴). میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) مدل Hitachi:S 4160 به منظور بررسی مورفولوژی سطحی جاذب مورد استفاده قرار گرفت. اندازه و شکل جاذب سنتز شده توسط آنالیز میکروسکوپ الکترونی انتقالی (TEM) مدل PHILIPS, EM۲۰۸ تعیین شد و ساختار کریستالی جاذب توسط الگوی پراکنش اشعه ایکس (XRD) (Rigaku D/MAX-2400 X-) (XRD) ایکس (ray diffractometer with Ni-filtered Cu Ka radiation) ترسیم گردید. در مراحل آماده سازی استانداردها، اولین قدم برای اندازه گیری طراحی متدی مناسب و دقیق برای

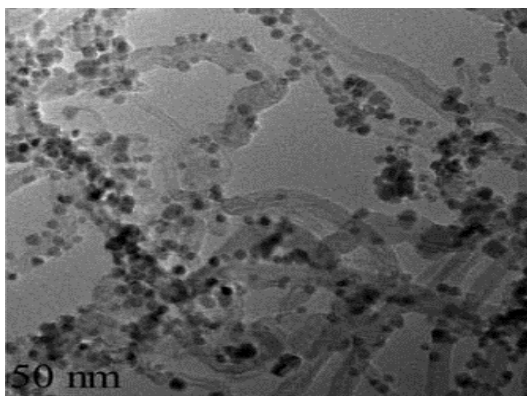
مهاجرت استرهای فتالات را از ساختار بطری‌های PET دو چندان کرده است. همان گونه که اشاره شد، از جمله مواد غذایی که درون بطری‌های پلاستیکی نوع PET بسته‌بندی می‌شوند، دوغ‌ها می‌باشند که با اندازه‌ها و برندهای مختلف و در دو نوع گاز دار و بدون گاز تولید و در نهایت مورد استفاده قرار می‌گیرند. به دلیل خاصیت اسیدی دوغ‌ها، احتمال ورود فتالات‌ها به درون این نوشیدنی پر مصرف افزایش می‌یابد (۲۷،۳-۱). با توجه به آن چه پیش تر بیان شد، اندازه گیری خانواده فتالات‌ها در این دوغ به عنوان نوشیدنی پر مصرف ملی، امری ساده نمی‌باشد. فرایند استخراج به وسیله جامدات از روش‌هایی است که اخیراً برای اندازه گیری غلظت‌های کم آلاینده‌ها مورد توجه بسیاری از محققان واقع شده است. به این منظور تاکنون جاذب‌های مختلفی مانند کربن فعال گرانوله، کیتوزان و کربن فعال مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۳۳-۲۸،۱۱). راندمان جذب و واجذب پایین، جداسازی مشکل، زمان طولانی جذب و هزینه‌های بالا، از چالش‌های بزرگ استفاده از جاذب‌های فوق الذکر می‌باشد. به منظور استخراج مناسب و داشتن توانایی جذب و واجذب مناسب، در مطالعه حاضر از نانو تیوب‌های کربنی چند جداره که جاذبی شناخته شده، دارای تخلخل و سطح بالا و قیمتی نسبتاً ارزان است، استفاده شد. این در حالی است که کماکان جداسازی این ماده به دلیل اندازه کوچک آن، هم چنان به عنوان معضل باقی است. برای حل این مشکل از نانو ذرات اکسید آهن (Fe₃O₄) برای مغناطیسی کردن نانو تیوب‌های کربنی استفاده شد. نانو ذرات اکسید آهن به کار رفته در نانو تیوب‌های کربنی علاوه بر القای خاصیت مغناطیسی به جاذب، با ایجاد پیوند شیمیایی شکننده‌ای، توانایی جذب استرهای فتالات را دارا می‌باشند که سبب افزایش راندمان جذب و واجذب این آلاینده می‌شود (۳۶-۳۴،۳۱،۳۰،۴). انتظار می‌رود نانو تیوب‌های کربنی چند جداره بهینه شده با نانو ذرات اکسید آهن، سرعت و توانایی بالایی در جذب و

آنالیز نمونه‌ها می‌باشد. در این تحقیق از دستگاه GC-MS (مدل GC Agilent 7890 and Mass 5975) به عنوان وسیله آنالیز استفاده شد. در روش‌های دستگاهی به علت تغییرات احتمالی در شرایط آزمایش مانند تغییر در کارایی ستون، خطا در حجم تزریق، متغیر بودن یا کامل نبودن فرایند استخراج و غیره ممکن است تعیین مقدار همراه با خطا باشد، بنابراین از استاندارد داخلی استفاده می‌گردد که این خطاها برطرف شود. بدین منظور مقدار مشخصی از استاندارد داخلی به نمونه یا محلول استاندارد افزوده و تمام مراحل نمونه‌سازی روی آن انجام می‌شود. از محلول‌های استاندارد هر یک از استرهای فتالات، غلظت ۵ ppm برای رسم منحنی کالیبراسیون آماده‌سازی شد. با استفاده از محلول‌های استوک تهیه شده از محلول‌های استاندارد استرهای فتالات، منحنی کالیبراسیون در غلظت‌های مختلف (۰/۰۰۱، ۰/۱، ۰/۵، ۱۰ و ۱۰۰ $\mu\text{g/L}$) از هر ۶ ترکیب (DMP, DEP, DBP, BBP, BEP, DnOP) رسم شد. محلولی از بنزیل بنزوات با غلظت ۳ $\text{ng}/\mu\text{l}$ به عنوان استاندارد داخلی تهیه گردید و بعد از انجام مراحل استخراج به دستگاه GC-MS تزریق شدند. تمامی مراحل ۳ مرتبه برای هر غلظت تکرار شد. تعیین مقدار بر اساس سطح پیک نمونه به سطح پیک استاندارد داخلی محاسبه گشت. منحنی کالیبراسیون با تزریق محلول‌هایی با غلظت‌های متفاوت از استوک‌های ساخته شده که حاوی مقدار مشخصی استاندارد داخلی هستند، به دست آمد. از ویژگی‌های مهم انتخاب استانداردهای داخلی، تشابه ساختمانی نزدیک آن با نمونه مورد بررسی (خانواده فتالات‌ها) می‌باشد. ترکیب بنزیل بنزوات به دلیل خواص مناسب و زمان بازداری مناسب، به عنوان استاندارد داخلی انتخاب گردید. بعد از انجام تزریقات متعدد به دستگاه GC-MS و با توجه به نتایج به دست آمده، بهترین برنامه دمایی و نحوه استخراج آنالیت‌ها از ماتریکس آب به دست آمد. از میان برندهای تجاری موجود در بازار بر اساس میزان استفاده و فراوانی

در بازار، ۵ برند پر مصرف که به طور مداوم در تمام فصول سال نیز موجود هستند، انتخاب شدند. با توجه به انتخاب ۵ برند و وجود ۳ بازه زمانی (زمان تولید، ماه اول و ماه دوم)، در مجموع ۱۵ نمونه انتخاب می‌شود. نمونه‌های مورد نیاز جهت کالیبراسیون ۵ نمونه تعیین شد. از نرم‌افزار آماری SPSS ورژن ۲۰ با احتساب خطای ۰/۰۵ جهت آنالیز داده‌ها استفاده شد. برای مقایسه استرهای فتالات DMP, DEP, DBP, BBP, BEP, DnOP در صورت نرمال بودن توزیع آن‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و در صورت نرمال نبودن توزیع آن‌ها از آزمون کروسکال والیس استفاده شد. هم‌چنین با توجه نرمایستی مشاهدات، جهت مقایسه میانگین DMP, DEP, DBP, BBP, BEP, DnOP در سه نقطه (هفته اول، ماه اول و ماه دوم)، DMP, DEP, DBP, BBP, BEP, DnOP از آزمون آماری Repeated measure ANOVA و Friedman استفاده شد. در مرحله آماده‌سازی نمونه از هر یک از بطری‌های دوغ ۱۰ ml نمونه برداشته و داخل ویال بزرگ ریخته شد. در ادامه به هر یک از ویال‌ها ۱۰۰ μl استاندارد بنزویل بنزوات اضافه و مخلوط شد. در گام بعدی به هر کدام از ویال‌ها ۰/۵ g سدیم کلرید اضافه کرده و مجدداً چند ثانیه هم می‌زنیم. در پایان در هر ویال ۱۰ mg نانو تیوب‌های کربنی آماده شده اضافه و به مدت ۱۰ دقیقه شیک می‌نماییم. بعد از اختلاط، نانو تیوب‌های کربنی به کمک آهن‌ربا خارجی از نمونه جدا گشت و عمل واجذب با اضافه کردن ۱ ml هگزان به آن در اختلاط شدید انجام شد. بعد از عمل واجذب، نانو تیوب‌های کربنی به کمک آهن‌ربا خارج و سایر محتویات به درون ویال کوچک انتقال یافت و برای انجام آنالیز توسط GC-MS ذخیره شد.

یافته‌ها

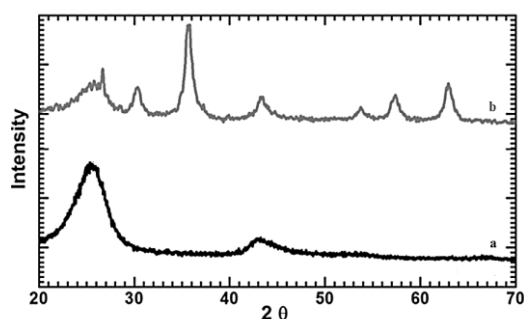
بررسی مورفولوژی نانو تیوب‌های کربنی سنتز شده آنالیز میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) در تصویر شماره ۱، تصویر مربوط به آنالیز



تصویر شماره ۲: آنالیز میکروسکوپ الکترونی انتقالی (TEM) برای نانو تیوب کربنی بهینه شده با Fe_3O_4

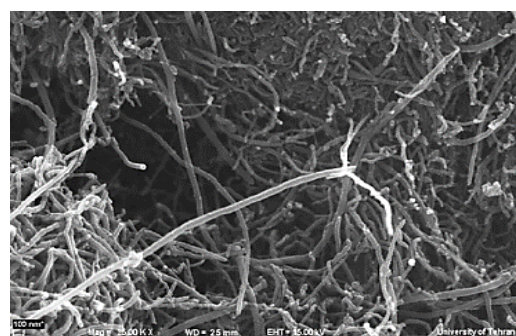
الگوی پراکنش اشعه ایکس (XRD)

الگوی پراکنش اشعه ایکس (XRD) برای جاذب مورد مطالعه در محدوده زاویه $2\theta = 20^\circ - 70^\circ$ با استفاده از تابش $\text{Cu K}\alpha$ در دمای 25°C در تصویر شماره ۳ ارائه شده است. براساس این آنالیز، پیک‌های ایجاد شده در زوایای 26° و 43.5° درجه نشان‌دهنده حضور نانو تیوب‌های کربنی چند جداره می‌باشد (شکل a). در شکل b، علاوه بر پیک‌های مربوط به کربن نانو لوله چند جداره، پیک‌های ایجاد شده در 32.8° ، 35.4° ، 44° ، 56.94° ، 58.25° و 63.8° درجه، نشان‌دهنده حضور اکسید آهن می‌باشد. لذا این آنالیز تایید می‌کند که نانو تیوب‌های کربنی چند جداره (MWCNTs) مغناطیسی شده با اکسید آهن Fe_3O_4 با موفقیت سنتز شده است.



تصویر شماره ۳: الگوی پراکنش اشعه ایکس (XRD) برای (a) نانو تیوب کربنی و (b) نانو تیوب کربنی بهینه شده با Fe_3O_4

میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) برای نانو تیوب‌های کربنی چند جداره (MWCNTs) بهینه شده با نانو ذره اکسید آهن Fe_3O_4 نمایش داده شده است. این آنالیز به منظور بررسی مورفولوژی و ویژگی سطحی نانو ذره اکسید آهن نشاندهنده بر روی نانو تیوب‌های کربنی چند جداره در 10 kV انجام شد. در این تصویر مشاهده می‌شود که نانو تیوب‌های کربنی چند جداره دارای ساختاری لوله‌ای شکل و در هم تنیده بوده و شکل ساختار یافته‌ای ندارد. همچنین ذرات براق و سفید رنگ، نشان‌دهنده حضور نانو ذره اکسید آهن Fe_3O_4 در ساختار کامپوزیت می‌باشد.



تصویر شماره ۱: میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) برای نانو تیوب کربنی بهینه شده با Fe_3O_4

میکروسکوپ الکترونی انتقالی (TEM)

در تصویر شماره ۲، ساختار و اندازه نانو تیوب‌های کربنی چند جداره (MWCNTs) بهینه شده با نانو ذره اکسید آهن Fe_3O_4 به وسیله میکروسکوپ الکترونی انتقالی (TEM) در 90 KeV مطالعه شد. این تصویر نیز مشابه آنالیز SEM ساختاری غیریکنواخت و درهم تنیده را برای نانو تیوب‌های کربنی چند جداره نشان می‌دهد. ذرات دایره‌ای شکل که به صورت حجیم (دارای دانسیته بیش‌تر (سیاه‌تر) نسبت به MWCNT می‌باشند، موید حضور نانو ذرات اکسید آهن در ساختار جاذب سنتز شده‌اند. میانگین اندازه این ذرات در آنالیز مذکور در محدوده‌ای بین $80 - 30\text{ nm}$ می‌باشد.

بررسی غلظت استرهای فتالات در نوشابه‌های کربناته بطری شده در بطری های PET

اطلاعات به دست آمده از شاخص‌های مرکزی و پراکندگی مربوط به متغیرهای مورد پژوهش (در حالت کلی) در جدول شماره ۱ آمده است. به منظور بررسی نرمال بودن مشاهدات از آزمون کولموگروف-اسمیرنف استفاده شد. نتایج این آزمون در جدول شماره ۲ قابل مشاهده است.

جدول شماره ۱: شاخص‌های توصیفی متغیرهای پژوهش (ng/l)

متغیر	میانگین	میانه	انحراف استاندارد	مینیمم	ماکزیمم
DMP	۵/۰	۵/۰	---	۵/۰	۵/۰
DEP	۵/۰	۵/۰	---	۵/۰	۵/۰
DBP	۴۵/۰۷	۳۰/۵	۵۸/۰۵	۵/۰	۱۶۷
BBP	۱۰/۳۷	۵/۰	۱۵/۰۶	۵/۰	۹۸
BEP	۲۲۸۶/۵۲	۱۸۵۶/۰	۱۵۵۳/۵۸	۲۸۹	۵۷۶۶
DnOP	۲۱۷/۶۴	۹۴/۰	۲۳۸/۵۲	۱۴	۱۰۰۸
Total	۲۵۶۹/۶	۲۲۸۵/۳	۱۷۴۸/۵۵	۳۹۸	۶۱۰۰

DMP (Di methyl phthalate), DEP (Di ethyl phthalate),
DBP (Di butyl phthalate), BBP (Butyl benzyl phthalate),
BEP (Bis (2-ethyl hexyl) phthalate), DnOP (Di-n-octyl phthalate)

جدول شماره ۲: بررسی نرمال بودن مشاهدات

متغیر	مقدار آماره (Z)	سطح معنی داری	نتیجه
DMP	---	---	---
DEP	---	---	---
DBP	*۱/۸۸	۰/۰۰۱	عدم نرمال
BBP	*۴/۱۶	<۰/۰۰۱	عدم نرمال
BEP	۱/۵۱	۰/۰۹	نرمال
DnOP	**۲/۲۲	<۰/۰۰۱	عدم نرمال
Total	۱/۳۴	۰/۱۲	نرمال

DMP (Di methyl phthalate), DEP (Di ethyl phthalate),
DBP (Di butyl phthalate), BBP (Butyl benzyl phthalate),
BEP (Bis (2-ethyl hexyl) phthalate), DnOP (Di-n-octyl phthalate)

* معنی دار در سطح خطای یک درصد

مقایسه اثر برندهای مختلف در غلظت استرهای فتالات از آنجایی که استرهای فتالات DBP, DEP و DnOP از توزیع نرمالی برخوردار نبودند، بنابراین به

جدول شماره ۳: مقایسه غلظت‌های استرهای فتالات بین برندهای مختلف (ng/l)

متغیر	تعداد	DBP			BBP			DnOP		
		میانگین	میانه	انحراف معیار	میانگین	میانه	انحراف معیار	میانگین	میانه	انحراف معیار
برند A	۳	۲۳/۲۱	۵	۳۲/۲۱	۱۲	۵	۲۳/۳	۲۶۳/۸۳	۲۳۷	۲۶۱/۸۴
برند B	۳	۳۹/۵۲	۵	۵۹/۶۳	۲۰/۱۳	۵	۱۲/۸۴	۱۳۵/۵۸	۱۲۵	۲۵۹/۵۶
برند C	۳	۵۳/۴۳	۳۷	۴۴/۴۱	۲۱/۵	۵	۲۱/۸۲	۲۴۲/۰۶	۵۴/۵	۱۲۳/۷۳
برند D	۳	۵۲/۹۲	۸۱/۵۲	۵۱/۲۵	۲۲/۱۷	۵	۳۴/۷۳	۱۷۷	۷۴/۵	۲۷۴/۶۲
برند E	۳	۴۵/۹۴	۲۱	۳۱/۴۳	۵/۰	۵	---	۳۶۲/۵۳	۵۴/۵۳	۴۱۹/۶۱
سطح معنی داری		۰/۲۷			۰/۷۱			۰/۶۲		

منظور مقایسه غلظت آن‌ها بین برندهای مختلف از آزمون ناپارامتری کروسکال والیس استفاده شد (جدول شماره ۳). جهت مقایسه سایر مقادیر استرها، آنالیز واریانس یکطرفه با بررسی شرط همگنی واریانس‌های بین گروهی استفاده شد (جدول شماره ۴).

مقایسه اثر زمان‌های مختلف در غلظت استرهای فتالات با توجه به این موضوع که با گذشت زمان، احتمال رهایی و ورود استرهای فتالات به داخل نمونه‌ها افزایش می‌یافت، در ادامه به بررسی تاثیر زمان ماند بر غلظت فتالات‌ها در نمونه‌ها پرداخته شد. از آنجایی که استرهای فتالات DBP, DEP و DnOP از توزیع نرمالی برخوردار نبودند، بنابراین به منظور مقایسه غلظت آن‌ها بین سه زمان مختلف، از آزمون ناپارامتری کروسکال والیس استفاده شد. هم‌چنین به منظور مقایسه غلظت متغیرهای BEP و Total بین سه زمان مختلف از آزمون آنالیز واریانس یکطرفه با بررسی شرط همگنی واریانس‌ها استفاده گردید (جدول شماره ۵).

بحث

بررسی ساخت جاذب

عکس‌های گرفته شده توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی و انتقالی ساخت جاذب کربن نانو تیوب‌های کربنی چند جداره مغناطیسی شده با نانو ذره اکسید آهن MWCNTs-Fe₃O₄ را اثبات می‌نماید.

بررسی غلظت استرهای فتالات در انواع مختلف دوغ‌های ایرانی

در ابتدای بحث لازم می‌باشد اشاره شود که تاکنون

جدول شماره ۴: مقایسه غلظت های استرهای فتالات بین برندهای مختلف (ng/l)

متغیر	تعداد	BEP			Total		
		میانگین	میان	انحراف معیار	میانگین	میان	انحراف معیار
برند A	۳	۲۲۵۰/۷۷	۲۱۲۹/۵۲	۱۲۳۵/۴۴	۲۵۱۴/۵۵	۲۴۳۱/۵	۱۶۵۵/۷۵
برند B	۳	۳۰۸۳/۴۷	۲۳۸۷	۲۱۲۹/۳۹	۲۸۰۷/۶۳	۲۴۲۸/۵۲	۲۴۳۹/۴۲
برند C	۳	۲۱۷۵/۲۱	۱۵۰۳/۵۱	۱۵۹۹/۴۱	۲۳۴۳/۶۷	۲۶۵۳/۵۱	۱۶۵۴/۵۱
برند D	۳	۲۴۱۶/۳۸	۲۱۷۵/۱۵	۱۲۳۸/۶۳	۲۱۱۰/۶۵	۲۳۲۴	۲۰۳۱/۶۳
برند E	۳	۳۰۷۸/۱۲	۱۷۹۲	۱۵۹۷/۵۲	۳۴۱۲/۱۹	۲۶۲۱/۵۱	۱۹۱۸/۷۱
سطح معنی داری		۰/۹۱			۰/۹۱		

جدول شماره ۵: مقایسه غلظت های استرهای فتالات بین زمان ای مختلف (ng/l)

متغیر	هفته اول	میانگین	میان	انحراف معیار	ماه دوم			سطح معنی داری
					میانگین	میان	انحراف معیار	
DBP	۳۱	۴۸/۷۵	۵۱/۳۵	۵۳/۳	۳۱/۵	۵۲/۷۹	۳۳/۹۵	۰/۳۸
BBP	۵	۱۳/۵۲	۱۹/۴۹	۵	۵	۱۳/۶	۲۴/۰۲	۰/۲۱
BEP	۱۶۶۶/۱۵	۲۳۱۹/۸۵	۱۵۶۶/۱۲	۲۵۴۲/۱۵	۲۳۲۸	۲۶۵۶/۳۵	۱۹۹۸/۵	۰/۸۵
DnOP	۹۱/۵	۲۵۴/۹	۲۹۱/۷۲	۱۷۸/۹۵	۹۱	۱۲۳/۸۵	۲۵۴/۱۵	۰/۸۴
Total	۱۹۹۸۵	۲۴۳/۵	۱۵۴۸/۸۵	۲۷۱۶/۴	۲۲۱۷	۱۶۳۴/۴۶	۳۰۱۱/۵	۰/۸۶

DBP (Di butyl phthalate),

BBP (Butyl benzyl phthalate),

BEP (Bis (2-ethyl hexyl) phthalate),

DnOP (Di-n-octyl phthalate)

بالاتر از حدود استاندارد بود که به احتمال زیاد به دلیل بالاتر بودن pH نوشابه نسبت به دوغ و بالاتر بودن زمان نگه داری نوشابه می باشد (۲۲). تحقیق مشابه دیگر که توسط Wu و همکاران روی نوشابه نوع کولا انجام گرفت، برای تمامی نمونه ها میزان BEP و DMP زیر استاندارد گزارش شد (۱۵).

در مطالعه موذن و همکاران که بر روی میزان استرهای فتالات در نوشیدنی کربناته (نوشابه) انجام شد، فقط در یک نمونه، میزان DEHP بالاتر از حدود استاندارد بوده است (۴). در مطالعه دیگری که توسط زارع جدی و همکاران در سال ۲۰۱۴ روی زمان نگه داری و نیز شرایط مختلف نگه داری در آب های معدنی انجام گرفت، نتایج مشابهی به دست آمد، به طوری که بالاترین میزان، مربوط به BEP بود، ولی در مجموع میزان استرهای فتالات در تمامی نمونه ها کم تر از حدود استاندارد بودند (۲۱). Bošnjir و همکاران نیز در سال ۲۰۰۷ اثر مهاجرت استرهای فتالات را در نوشیدنی های غیر الکلی و آب معدنی بررسی نمودند که نتایج این تحقیق نشان داد که دی متیل فتالات بیشترین مهاجرت را به نوشیدنی های غیر الکلی داشت و دی بوتیل فتالات و دی اتیل هگزیل فتالات نیز بیشترین مهاجرت را به آب های معدنی داشته است (۳۷).

مطالعه جامع و در خور توجهی برای اندازه گیری استرهای فتالات در دوغ انجام نگرفته است، بنابراین مقایسه های این پژوهش بیش تر براساس سایر نوشیدنی ها همچون آب معدنی و نوشیدنی های غیر الکلی که مشابهت ساختاری نسبی با دوغ دارند، صورت گرفته است. بر اساس قوانین EPA، در مورد دی اتیل هگزیل فتالات، حداکثر غلظت مجاز هدف (MCLG) برابر با صفر می باشد و حداکثر سطح مجاز دی اتیل هگزیل فتالات در آب های نوشیدنی ۶ میکروگرم در لیتر تعیین شده است. WHO و EU سقف مجاز ۸ $\mu\text{g/l}$ را در آب های نوشیدنی تعیین کرده اند (۲۱،۴). بر اساس این مطالعه، DMP و DEP در تمامی نمونه ها پایین تر از حد استاندارد و حتی پایین تر از حد تشخیص دستگاه بوده اند و نیز سه ترکیب DBP، BBP و DnOP نیز دارای غلظت پایین تر از استاندارد بوده اند. بالاترین غلظت مربوط به DEHP یا BEP با میزان ۵۷۶۶ ng/l است که این ترکیب دارای بالاترین میانگین غلظت در بین سایر استرهای فتالات نیز بوده است و نکته امیدوارکننده این است که در تمامی موارد از حد استاندارد EPA، WHO و EU در آب های آشامیدنی، کم تر بوده است.

در مطالعه مشابهی که Luo و همکاران بر روی دو نوع نوشیدنی کربناته انجام دادند، میزان BEP و DMP

در این پژوهش ۵ برند دوغ ایرانی مورد پژوهش قرار گرفت که بالاترین میانگین غلظت مربوط به برند E بوده است و بالاترین میانگین غلظت DEHP یا BEP که ترکیب بسیار خطرناک و سرطان‌زایی آن نیز به اثبات رسیده است، مربوط به برند B می‌باشد و ترکیبی که دارای میانگین غلظت بالا پس از DEHP بود، DnOP است که آن نیز در برند E بالاترین بوده است. در مجموع نتایج حاصل از آزمون‌های آماری حاکی از آن بود که غلظت‌های مختلف استرهای فتالات بین برندهای مختلف از اختلاف معناداری برخوردار نبودند.

از آنجایی که دوغ یک ماده‌ی غذایی اسیدی می‌باشد، بنابراین با افزایش زمان و مدت اثر بیش‌تر اسید دوغ روی بطری‌های PET، احتمال مهاجرت بیش‌تر و آلودگی محصول با استرهای فتالات افزایش می‌یابد. در این پژوهش، دوغ‌ها در سه دوره زمانی (هفته اول تولید، ماه اول تولید و ماه دوم تولید) بررسی شدند و این اطلاعات به دست آمد که DEHP یا BEP و نیز غلظت

فتالات کل (Total) در طول زمان ماند افزایش می‌یابد و دو ترکیب DnOP و BBP که دارای غلظت کم‌تری از فتالات بوده‌اند، در طول نگه‌داری در طی ماه اول، مقداری کاهش نشان داده‌اند و سپس میزان آن‌ها افزایش یافته است که می‌تواند ناشی از مقدار بسیار پایین آن‌ها و یا به دلایلی چون آلودگی ستون و یا آلودگی اولیه‌ی نمونه بوده باشد و از آنجایی که از حدود استاندارد بسیار کم‌تر می‌باشند، به‌طور کلی قابل اغماض هستند. این مطالعه نشان داد که غلظت‌های مختلف استرهای فتالات بین سه زمان مورد مطالعه از اختلاف معناداری برخوردار نبودند.

سپاسگزاری

مقاله حاضر بخشی از طرح پژوهشی دانشکده بهداشت دانشگاه علوم پزشکی فسا به شماره ۹۴۰۸۰ است که بدین وسیله از حمایت مالی دانشگاه مربوطه تشکر می‌شود.

References

1. Mahmoudi R, Zare P, Hassanzadeh P, Nosratpour S. Effect of Teucrium polium essential oil on the physicochemical and sensory properties of probiotic yoghurt. J Food Process Preserv 2014; 38(3): 880-888.
2. Shin Y, Lee KS, Lee JS, Lee CH. Preparation of yogurt with Aloe vera and its quality characteristics. J Korean Soc Food Sci Nutr 1995; 24(2): 254-260.
3. Mahmoudi R, Mahmoodzadeh F, Hassanzadeh M, Nadari MRA. Quality of yogurt blended with Thymus Kotschyanus essential oil. Malaysian Journal of Science 2014; 33(2): 176-182.
4. Moazzen M, Rastkari N, Alimohammadi M, Shariatifar N, Ahmadkhaniha R, Nazmara S, et al. Assessment of Phthalate Esters in A Variety of Carbonated Beverages Bottled in PET. Journal of Environmental Health Engineering 2014; 2(1): 7-18 (Persian).
5. Amiridou D, Voutsas D. Alkylphenols and phthalates in bottled waters. J Hazard Mater 2011; 185(1): 281-286.
6. Balafas D, Shaw K, Whitfield F. Phthalate and adipate esters in Australian packaging materials. Food Chem 1999; 65(3): 279-287.
7. Calafat AM, Needham LL, Silva MJ, Lambert G. Exposure to di-(2-ethylhexyl) phthalate among premature neonates in a neonatal intensive care unit. Pediatrics 2004; 113(5): e429-e434.
8. Cao XL. Phthalate esters in foods: sources, occurrence, and analytical methods. Compr Rev Food Sci Food Saf 2010; 9(1): 21-43.

9. Chang MS, Shen JY, Yang SH, Wu GJ. Subcritical water extraction for the remediation of phthalate ester-contaminated soil. *J Hazard Mater* 2011; 192(3): 1203-1209.
10. Farahani H, Ganjali MR, Dinarvand R, Norouzi P. Screening method for phthalate esters in water using liquid-phase microextraction based on the solidification of a floating organic microdrop combined with gas chromatography-mass spectrometry. *Talanta* 2008; 76(4): 718-723.
11. Jiao Y, Fu S, Ding L, Gong Q, Zhu S, Wang L, et al. Determination of trace leaching phthalate esters in water by magnetic solid phase extraction based on magnetic multi-walled carbon nanotubes followed by GC-MS/MS. *Analytical Methods* 2012; 4(9): 2729-2734.
12. Keresztes S, Tatár E, Czégény Z, Záray G, Mihucz VG. Study on the leaching of phthalates from polyethylene terephthalate bottles into mineral water. *Sci Total Environ* 2013; 458-460: 451-458.
13. Li J, Cai Y, Shi Y, Mou S, Jiang G. Analysis of phthalates via HPLC-UV in environmental water samples after concentration by solid-phase extraction using ionic liquid mixed hemimicelles. *Talanta* 2008; 74(4): 498-504.
14. Matsumoto M, Hirata-Koizumi M, Ema M. Potential adverse effects of phthalic acid esters on human health: a review of recent studies on reproduction. *Regul Toxicol Pharmacol* 2008; 50(1): 37-49.
15. Wu Q, Liu M, Ma X, Wang W, Wang C, Zang X, et al. Extraction of phthalate esters from water and beverages using a graphene-based magnetic nanocomposite prior to their determination by HPLC. *Microchimica Acta* 2012; 177(1-2): 23-30.
16. Sablayrolles C, Montrejeaud-Vignoles M, Benanou D, Patria L, Treilhou M. Development and validation of methods for the trace determination of phthalates in sludge and vegetables. *J Chromatogr A* 2005; 1072(2): 233-242.
17. Sathyanarayana S. Phthalates and children's health. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care* 2008; 38(2): 34-49.
18. Ye C-W, Gao J, Yang C, Liu X-J, Li X-J, Pan S-Y. Development and application of an SPME/GC method for the determination of trace phthalates in beer using a calix [6] arene fiber. *Anal Chim Acta* 2009; 641(1): 64-74.
19. Li X, Zeng Z, Chen Y, Xu Y. Determination of phthalate acid esters plasticizers in plastic by ultrasonic solvent extraction combined with solid-phase micro extraction using calixarene fiber. *Talanta* 2004; 63(4): 1013-1019.
20. Zhao J, Xue M, Huang Y, Shen J. Hydrogenation of dioctyl phthalate over supported Ni catalysts. *Catal Commun* 2011; 16(1): 30-34.
21. Jeddi MZ, Ahmadkhaniha R, Yunesian M, Rastkari N. Magnetic solid-phase extraction based on modified magnetic nanoparticles for the determination of phthalate diesters in water samples. *J Chromatogr Sci* 2015; 53(2): 385-391.
22. Luo Y-B, Yu Q-W, Yuan B-F, Feng Y-Q. Fast microextraction of phthalate acid esters from beverage, environmental water and perfume samples by magnetic multi-walled carbon nanotubes. *Talanta* 2012; 90: 123-131.
23. Harris SM. Incorporating Kinetic and Dynamic Factors in an In Vitro Model of Male Reproductive Toxicity .2016. Available at: <https://digital.lib.washington.edu/researchworks/handle/1773/35193>. Accessed December 20, 2016.

24. LaFleur AD, Schug KA. A review of separation methods for the determination of estrogens and plastics-derived estrogen mimics from aqueous systems. *Anal Chim Acta* 2011; 696(1-2): 6-26.
25. Farahani H, Norouzi P, Dinarvand R, Ganjali MR. Development of dispersive liquid-liquid microextraction combined with gas chromatography-mass spectrometry as a simple, rapid and highly sensitive method for the determination of phthalate esters in water samples. *J Chromatogr A* 2007; 1172(2): 105-112.
26. Liang P, Xu J, Li Q. Application of dispersive liquid-liquid microextraction and high-performance liquid chromatography for the determination of three phthalate esters in water samples. *Anal Chim Acta* 2008; 609(1): 53-58.
27. Hashemi SMB, Shahidi F, Mortazavi SA, Milani E, Eshaghi Z. Effect of *Lactobacillus plantarum* LS5 on oxidative stability and lipid modifications of Doogh. *Int J Dairy Technol* 2016; 69(4): 550-558.
28. Ahn CK, Park D, Woo SH, Park JM. Removal of cationic heavy metal from aqueous solution by activated carbon impregnated with anionic surfactants. *J Hazard Mater* 2009; 164(2): 1130-1136.
29. Gorji MEh, Ahmadkhaniha R, Moazzen M, Yunesian M, Azari A, Rastkari N. Polycyclic aromatic hydrocarbons in Iranian Kebabs. *Food Control* 2016; 60: 57-63.
30. Kakavandi B, Jafari AJ, Kalantary RR, Nasserli S, Ameri A, Esrafiy A. Synthesis and properties of Fe₃O₄-activated carbon magnetic nanoparticles for removal of aniline from aqueous solution: equilibrium, kinetic and thermodynamic studies. *Iran J Environ Health Sci Eng* 2013; 10(1): 10-19 (Persian).
31. Moazzen M, Ahmadkhaniha R, Gorji MEh, Yunesian M, Rastkari N. Magnetic solid-phase extraction based on magnetic multi-walled carbon nanotubes for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in grilled meat samples. *Talanta* 2013; 115: 957-965.
32. Dobaradaran S, Lutze H, Mahvi AH, Schmidt TC. Transformation efficiency and formation of transformation products during photochemical degradation of TCE and PCE at micromolar concentrations. *J Environ Health Sci Eng* 2014; 12: 16 (Persian).
33. Beheshti H, Irani M, Hosseini L, Rahimi A, Aliabadi M. Removal of Cr (VI) from aqueous solutions using chitosan/MWCNT/Fe₃O₄ composite nanofibers-batch and column studies. *Chem Eng J* 2016; 284: 557-564.
34. Tucek J, Kemp KC, Kim KS, Zboril R. Iron-oxide-supported nanocarbon in lithium-ion batteries, medical, catalytic, and environmental applications. *ACS Nano* 2014; 8(8): 7571-7612.
35. Vidick D, Herlitschke M, Poleunis C, Delcorte A, Hermann RP, Devillers M, et al. Comparison of functionalized carbon nanofibers and multi-walled carbon nanotubes as supports for Fe-Co nanoparticles. *J Mater Chem A* 2013; 1(6): 2050-2063.
36. Yılmaz E, Soylak M. Preparation and characterization of magnetic carboxylated nanodiamonds for vortex-assisted magnetic solid-phase extraction of ziram in food and water samples. *Talanta* 2016; 158: 152-158.
37. Bošnjir J, Puntarić D, Galić A, Škes I, Dijanić T, Klarić M, et al. Migration of phthalates from plastic containers into soft drinks and mineral water. *Food Technol Biotechnol* 2007; 45(1): 91-95.