

شناسایی و تجزیه تحلیل مهاجرت آمین‌های آروماتیک نوع اول از بسته‌بندی‌های انعطاف‌پذیر مواد غذایی با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

مرتضی شهرستانی^۱، محمد صابرتهرانی^۲، شهرام شعبی^۳، پرویز آبرومند آذر^۴، سید واقف حسین^۵

- ۱- دانشجوی ph.D شیمی تجزیه - دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات تهران، ایران
- ۲- نویسنده مسئول: استادیار گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات تهران، ایران. پست الکترونیکی: drmsabertehrani@yahoo.com
- ۳- دانشیار مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران
- ۴- دانشیار گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات تهران، ایران
- ۵- استاد گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم تحقیقات تهران، ایران

تاریخ دریافت: ۹۷/۳/۱۷

تاریخ پذیرش: ۹۷/۷/۴

چکیده

سابقه و هدف: آمین‌های آروماتیک نوع اول (PAAs)، آلایندگی‌هایی هستند که می‌توانند از بسته‌بندی انعطاف‌پذیر مواد غذایی مهاجرت نمایند. منشاء اصلی این ترکیبات، چسب‌های پلی اورتانی هستند که در فرایند لامیناسیون فیلم‌های چند لایه استفاده می‌شوند. دی ایزوسیانات‌های آروماتیک باقی مانده از واکنش پلیمریزاسیون چسب، به مواد غذایی مهاجرت نموده و توسط رطوبت مواد غذایی به PAAs هیدرولیز می‌شوند. ایزومرهای تولوئن دی آمین (TDA) یا متیلن دی آمین (MDA) ممکن است از فیلم‌های چند لایه لامینیت مهاجرت کنند. در این مطالعه، مهاجرت TDAs و MDAs در ۲۴ نمونه از چند لایه فیلم با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) معتبرسازی شده، مورد شناسایی و تجزیه تحلیل قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: آزمون مهاجرت توسط اسید استیک ۳٪ بر روی نمونه فیلم‌های چندلایه اعمال شد. مواد مهاجرت نموده با استفاده از کارتریج‌های استخراج فاز جامد (SPE) پیش تغلیظ و مقادیر PAAs توسط دستگاه HPLC-DAD اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: از ۲۴ نمونه فیلم چندلایه لامینیت ارزیابی شده، تعداد ۱۵ نمونه قابل قبول و تعداد ۱۰ نمونه دارای مقادیر PAAs بالاتر از حد مجاز $10 \mu\text{g/kg}$ بودند. در ۱ نمونه فیلم چندلایه مجموع مقادیر 2,4-TDA و 2,6-TDA و در ۹ نمونه فیلم چندلایه مقادیر 2,4'-MDA و 2,2'-MDA بالا بود.

نتیجه‌گیری: با روش HPLC می‌توان پنج آمین آروماتیک نوع اول مهاجرت نموده از فیلم‌های چندلایه لامینیت را شناسایی و تجزیه تحلیل نمود. همچنین می‌توان ایمی‌نی این نوع فیلم‌ها، نقاط ضعف فرایند لامیناسیون، ساختار چسب و بهداشتی بودن آن را بررسی نمود.

واژگان کلیدی: آمین‌های آروماتیک نوع اول، چسب پلی اورتان، مهاجرت، متیلن دی آنیلین، تولوئن دی آمین، فیلم چندلایه

• مقدمه

امروزه بسته‌بندی‌های انعطاف‌پذیر در صنایع غذایی به دلیل توزیع کارآمد، محافظت‌کنندگی مناسب و اقتصادی بودن توسعه یافته است. بسته‌بندی قابل انعطاف‌پذیر در اصل فیلم‌های چند لایه ای هستند که با یا بدون چسب به یکدیگر متصل یا لامینیت شده‌اند. این لایه‌ها شامل ولفین، پلی استر، فویل آلومینیوم، کاغذ، فیلم‌های پلیمری با پوشش آلومینیوم (متالایز) و ... که به یکدیگر متصل شده‌اند. یکی از سیستم‌های لامیناسیون، استفاده از چسب‌های پلی اورتان PU است که باعث ایجاد انعطاف‌پذیری بالا، خواص مکانیکی و چسبندگی مناسب و مقاومت در برابر هوای فشرده در بسته‌بندی می‌شود (۱). چسب‌های پلی اورتان نقش مهمی در کاربرد بسته‌بندی انعطاف‌پذیر بازی می‌کنند و به دو دسته بدون حلال (Solvent free) و حلالی (Solvent base) تقسیم می‌شوند (۲). ساختار چسب پلی اورتان شامل پلی اول‌ها (اتری یا استری)، ایزوسیانات‌ها (ایزوسیانات الیفاتیکی و ایزوسیانات آروماتیک) و عوامل اتصال دهنده عرضی (مانند ۴

امروزه بسته‌بندی‌های انعطاف‌پذیر در صنایع غذایی به دلیل توزیع کارآمد، محافظت‌کنندگی مناسب و اقتصادی بودن توسعه یافته است. بسته‌بندی قابل انعطاف‌پذیر در اصل فیلم‌های چند لایه ای هستند که با یا بدون چسب به یکدیگر متصل یا لامینیت شده‌اند. این لایه‌ها شامل ولفین، پلی استر، فویل آلومینیوم، کاغذ، فیلم‌های پلیمری با پوشش آلومینیوم (متالایز) و ... که به یکدیگر متصل شده‌اند. یکی از سیستم‌های لامیناسیون، استفاده از چسب‌های پلی اورتان PU است که باعث ایجاد انعطاف‌پذیری بالا، خواص مکانیکی و چسبندگی مناسب و مقاومت در برابر هوای فشرده در بسته‌بندی می‌شود (۱). چسب‌های پلی اورتان نقش مهمی در کاربرد بسته‌بندی انعطاف‌پذیر بازی می‌کنند و به دو دسته بدون حلال (Solvent free) و حلالی (Solvent base) تقسیم می‌شوند (۲). ساختار چسب پلی اورتان شامل پلی اول‌ها (اتری یا استری)، ایزوسیانات‌ها (ایزوسیانات الیفاتیکی و ایزوسیانات آروماتیک) و عوامل اتصال دهنده عرضی (مانند ۴

۱- بوتان دی اول) است. با توجه به الزامات بهداشتی، تعداد محدودی از ایزوسیانات‌ها قابل استفاده در فرمولاسیون چسب‌های پلی اورتان می‌باشد. دو نوع کلی ایزوسیانات‌ها شامل ایزوسیانات الیفاتیک و ایزوسیانات آروماتیک هستند. ایزوسیانات‌های آلیفاتیک مانند ایزو فورون دی ایزوسیانات IPDI (Isophorone diisocyanate) و هگزامتیلن دی ایزوسیانات HDI (Hexamethylene diisocyanate) سرعت واکنش کمتری نسبت به ایزوسیانات‌های آروماتیک داشته و بسیار گرانتر هستند، ولی در مقابل ایمن‌تر هستند و در بسته‌بندی‌هایی با کاربرد در دمای بالا استفاده می‌شود. ایزوسیانات آروماتیک مورد استفاده شامل ۲،۴-تولوئن دی ایزوسیانات (TDI) و ۴،۴'-متیلن دی فنیل ایزوسیانات (MDI) می‌باشند (۳).

عملکرد چسب‌های پلی اورتان بصورت یک فرآیند دو مرحله ای است، مرحله اول تولید یک پیش پلیمر (Prepolymer) است. مرحله دوم واکنش با پلی اول‌ها و عوامل اتصال دهنده عرضی (مانند ۱،۴-بوتان دی اول) که در مرحله لامیناسیون لایه‌ها و در دمای کنترل شده ۶۰-۷۰ درجه فارنهایت انجام می‌شود (۴، ۵). برخی از فیلم‌های چند لایه، پس از تولید نیاز به زمان گیرایش یا زمان پخت (Curing time) جهت تکمیل شدن واکنش‌های دی ایزوسیانات‌های آروماتیک دارند. ایزوسیانات‌های آروماتیک شرکت نکرده در واکنش چسب، مابین لایه‌ها باقیمانده و هنگامی که در تماس با مواد غذایی قرار گیرد، از لایه در تماس با غذا به محتوا مهاجرت نموده و توسط رطوبت موجود، هیدرولیز شده و به PAAs تبدیل می‌گردد (۲).

تولوئن دی ایزوسیانات (TDI) دارای دو ایزومر تجاری ۲،۴-تولوئن دی ایزوسیانات و ۲،۶-تولوئن دی ایزوسیانات و متیلن دی فنیل ایزوسیانات (MDI) دارای سه ایزومر ۴،۴'-متیلن دی فنیل ایزوسیانات، ۲،۴'-متیلن دی فنیل ایزوسیانات و ۲،۲'-متیلن دی فنیل ایزوسیانات است (۶). با توجه به مقررات اتحادیه اروپا به شماره ۱۰/۲۰۱۱ میزان PAAs نباید از بسته‌بندی به مواد غذایی یا مشابه غذایی در حد قابل تشخیص، آزاد شوند. بنابراین، حد تشخیص این ترکیبات ۰/۰۱ میلی گرم بر کیلوگرم غذا و یا مشابه غذایی می‌باشد (۷).

در قوانین سازمان غذا و دارو آمریکا (Food & Drug Administration) سال ۲۰۰۰ چسب‌های پلی اورتان بر پایه ایزوسیانات‌های آروماتیک ممنوع و به جای آن استفاده از سیستم‌های بر پایه ایزوسیانات‌های آلیفاتیک توصیه شده است. پلیمریزه شدن واحدهای سازنده در چسب‌های پلی

اورتان به صورت خطی و یا اتصالات عرضی می‌باشد، FDA و اداره ایمنی مواد غذایی اروپا (EFSA European Food Safety Authority) قوانینی جهت کنترل خطرات مرتبط با مهاجرت آمین‌های آروماتیک نوع اول از چسب‌های پلی اورتان به مواد غذایی، که ممکن است برای سلامت مصرف کنندگان زیان آور باشد، وضع نموده اند. خطر بالقوه مرتبط با PAAs ناشی از سرطان‌زایی در بعضی از آنها می‌باشد که می‌تواند بر سلامتی انسان تأثیر داشته باشد و توسط آژانس بین المللی تحقیقات سرطان به عنوان مواد سرطانزا معرفی شده است (۱). نکته مهم در میزان مهاجرت PAAs، مدت زمان مورد نیاز جهت کامل شدن واکنش ایزوسیانات‌ها و گیرایش کامل چسب اعمال شده می‌باشد، یعنی به زمان وابسته است. میزان مهاجرت آمین‌های آروماتیک نوع اول به نوع لایه (فیلم پلاستیکی، کاغذ)، نوع چسب، فرمول چسب، نسبت مخلوط کردن اجزای چسب، زمان پخت یا گیرایش و نوع غذا (خشک، مایع، اسیدی) بستگی دارد (۸). اگر قبل از گیرایش کامل فیلم‌های چندلایه لامینیت شده، مواد غذایی در آنها بسته‌بندی شود، ایزوسیانات‌های باقیمانده به راحتی از لایه در تماس با غذا مهاجرت نموده و پس از هیدرولیز شدن در حضور رطوبت، تبدیل به PAAs می‌شوند (۹).

روش متداول اندازه گیری آمین‌های آروماتیک نوع اول در فیلم‌های چند لایه لامینیت، استفاده از روش رنگ سنجی با دستگاه اسپکتروفوتومتر می‌باشد که در آن آمین‌های آروماتیک نوع اول با عامل جفت کننده ان- (۱-نفتیل) اتیلن ۲-دی آمین دی هیدروکلرید واکنش داده و ترکیب بنفش رنگ حاصل شده که بر حسب آنیلینیوم هیدروکلرید تعیین مقدار می‌شوند. روش فوق با وجود حد تشخیص مناسب، دارای تخمین بالاتری در تعیین میزان آمین‌های آروماتیک نوع اول حاصل از چسب می‌باشد. این تخمین بالاتر، ناشی از ناخالصی‌های محتمل در عامل جفت کننده ان- (۱-نفتیل) اتیلن ۲-دی آمین دی هیدروکلرید و وجود آمین‌های آروماتیک در فرمولاسیون جوهر و مرکب چاپ می‌باشند. در روش رنگ سنجی علاوه بر نقص مربوط به برآورد بالاتر آمین‌های آروماتیک نوع اول، امکان تشخیص نوع ایزوسیانات و نوع چسب وجود نخواهد داشت.

در سال ۲۰۰۳، Brede و همکارانش مهاجرت آمین‌های آروماتیک نوع اول از بسته‌بندی‌های انعطاف‌پذیر به مشابه غذایی آب را اندازه‌گیری نمودند. در این تحقیق تعداد ۸ آمین آروماتیک نوع اول با انیدرید فلوئورو استیک مشتق سازی و سپس توسط دستگاه GC-MS تعیین مقدار شدند. نتایج در محدوده تشخیص ۰/۴ - ۰/۱ میکروگرم بر کیلوگرم بود (۱۰).

تهیه اسیداستیک ۳٪ وزنی / حجمی: مقدار ۳۰ گرم از اسیداستیک گلاسیال را داخل ۵۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل نموده و پس از انتقال به بالن ژوژه یک لیتری، توسط آب مقطر به حجم رسانده شد.

تهیه محلول تری سدیم سیترات ۰/۱ مولار: مقدار ۲۹/۴ گرم نمک سدیم سیترات دی هیدرات را داخل ۲۰۰ میلی لیتر آب مقطر حل نموده و پس از انتقال به بالن ژوژه یک لیتری، توسط آب مقطر به حجم رسانده شد.

تهیه محلول شویش (متانول) سدیم سیترات ۰/۱ مولار (۷۵/۲۵): یک لیتر محلول تری سدیم سیترات ۰/۱ مولار و متانول به نسبت ۷۵ به ۲۵ تهیه شد.

تهیه محلول آمونیوم استات ۱۰ میلی مولار: مقدار ۱/۵۴ گرم نمک آمونیوم استات را داخل ۲۰۰ میلی لیتر آب دیونیزه حل نموده و پس از انتقال به بالن ژوژه یک لیتری، توسط آب دیونیزه به حجم رسانده شد و توسط کاغذ فیلتر، میلی پور گردید (فاز متحرک).

تهیه محلول استاندارد مادر ppm ۱۰۰: مقدار ۵ میلی گرم از هر کدامیک از استانداردهای ۲،۴-تولون دی آمین، ۲،۶-تولون دی آمین، ۴،۴-متیلن دی آنیلین، ۲،۴-متیلن دی آنیلین و ۲،۲-متیلن دی آنیلین را توزین و در داخل بالن ژوژه‌های ۵۰ میلی لیتری توسط متانول به حجم رسانده شد.

تهیه محلول استاندارد مخلوط ppm ۱۰: مقدار ۵ میلی لیتر از هر کدام از پنج آمین آروماتیک نوع اول در داخل بالن ژوژه‌های ۵۰ میلی لیتری ریخته شده و توسط متانول به حجم رسانده شد.

تهیه محلول‌های استاندارد مخلوط ثانویه: مقادیر ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰، ۸۰۰ میکرولیتر از استاندارد مخلوط ppm ۱۰ را به بالن ژوژه‌های ۱۰ میلی لیتری منتقل نموده و با محلول شویش به حجم رسانده شد. غلظت استانداردهای مخلوط به ترتیب ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۴۰۰ و ۸۰۰ ng/ml گردید.

تهیه محلول‌های اسیداستیک ۳٪ نشاندارشده (Spiked): مقدار ۲۵۰، ۳۷۵، ۷۵۰ و ۱۵۰۰ میکرولیتر از استاندارد مخلوط ppm ۱۰ را به بالن ژوژه‌های ۵۰۰ میلی لیتری منتقل نموده و با اسیداستیک ۳٪ به حجم رسانده شد. غلظت استاندارد مخلوط به ترتیب ۵، ۷/۵، ۱۵ و ۳۰ ng/ml گردید.

نمونه برداری: تعداد ۲۴ نمونه فیلم چندلایه از ۴ واحد تولید کننده فیلم‌های بسته‌بندی جمع آوری و مورد ارزیابی قرار گرفت.

در سال ۲۰۱۲، Zhong و همکاران تعداد ۲۸ آمین آروماتیک نوع اول مهاجرت یافته به مشابه‌های غذایی را با استفاده از دستگاه LC-MS/MS اندازه‌گیری نمودند و مقادیر آن در محدوده ۱ - ۰/۱ میکروگرم بر کیلوگرم گزارش شد (۱۱).

در سال ۲۰۰۹، Nerin و همکاران آمین آروماتیک نوع اول مهاجرت یافته از فیلم‌های چندلایه به مشابه غذایی اسید استیک ۳ درصد را به کمک استخراج با فاز جامد (SPE) کاتیونی و توسط دستگاه LC-MS اندازه‌گیری نمودند. نتایج در محدوده تشخیص ۷۵ - ۰/۰۳ میکروگرم بر کیلوگرم گزارش شد (۱۲).

در سال ۲۰۰۵، Trier و همکاران تعداد ۲۰ نوع آمین آروماتیک نوع اول مهاجرت یافته از ظروف آشپزخانه و فیلم‌های چندلایه به مشابه‌های غذایی با استفاده از دستگاه LC-MS/MS و بدون هیچگونه آماده سازی اولیه اندازه گیری نمودند. نتایج در محدوده تشخیص ۳ - ۰/۲۷ میکروگرم بر کیلوگرم گزارش شد (۱۳).

در سال ۲۰۱۳، Mattarozzi و همکاران اقدام به معتبرسازی روش اندازه‌گیری ۲۲ آمین آروماتیک نوع اول مهاجرت یافته از فیلم‌های چندلایه توسط دستگاه LC-MS/MS نمود. نتایج در محدوده تشخیص ۰/۷ - ۰/۰۶ میکروگرم بر کیلوگرم گزارش شد (۱۴).

در سال ۲۰۱۴، Ouyang و همکاران اقدام به معتبرسازی روش اندازه‌گیری ۵ آمین آروماتیک نوع اول مهاجرت یافته از کیسه‌های بسته‌بندی مواد غذایی دریایی نمودند. نتایج در محدوده تشخیص ۰/۰۸ - ۰/۰۱۵ میکروگرم بر کیلوگرم گزارش شد (۱۵).

در این مطالعه از روش کروماتوگرافی جهت اندازه‌گیری دقیق آمین‌های آروماتیک نوع اول استفاده شد که شامل مراحل مهاجرت، استخراج یا پیش تغلیظ نمونه و تجزیه تحلیل توسط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با آشکارساز دیود اری می‌باشد.

• مواد و روش‌ها

مواد و استانداردها

مواد شیمیایی: استیک اسید (۱۰۰٪)، تری سدیم سیترات ۲ آبه، آمونیوم استات، متانول با درجه کروماتوگرافی مایع از شرکت Merck آلمان، استاندارد ۴،۴'-MDA و ۲،۶-TDA و ۲،۴-TDA با خلوص ۹۷٪ از شرکت Sigma-Aldrich آمریکا و ۲،۴'-MDA و ۲،۲'-MDA با خلوص بالای ۹۵٪ از شرکت Angene انگلستان گردید.

آماده سازی نمونه فیلم‌های چندلایه لایمینیت و اعمال شرایط مهاجرت:

بر اساس استاندارد EN 13130:1، سخت‌ترین شرایط برای اعمال مهاجرت PAAs (اسید استیک ۳ درصد) انتخاب گردید (۱۶) استفاده از دیگر مشابه غذایی مانند محلول الکل اتیلیک با درصدهای مختلف مناسب نیست، چون دی ایزوسیانات آروماتیک مهاجرت نموده مستعد شرکت در واکنش‌های نوکلئوفیلی بوده و با گروه عاملی هیدروکسیل اتانول واکنش داده شد و آمین آروماتیک تشکیل نخواهد شد (۱۷، ۱۸).

با استفاده از شابلون با ابعاد 10×20 سانتی متر و کاتر نمونه فیلم‌های چندلایه لایمینیت را با ۳ تکرار برش داده و توسط دستگاه دوخت حرارتی، کیسه‌هایی با ابعاد 10×10 سانتی متر گردید. مقدار ۱۰۰ میلی‌لیتر از محلول مشابه غذایی اسید استیک ۳ درصد به داخل کیسه‌ها منتقل و درب کیسه‌ها، دوخت حرارتی شد. کیسه‌های پر شده را به مدت ۲ ساعت داخل آون با دمای ۷۰ درجه سلسیوس قرار گرفت. سپس محلول‌ها را از کیسه‌ها خارج و داخل ظروف شیشه‌ای منتقل نموده تا سرد شود.

پیش تغلیظ سازی نمونه‌های مهاجرت یافته با کارتریج‌های SPE: آماده سازی کارتریج‌های SPE توسط عبور دادن دومرتبه با ۳ ml متانول و پس از آن دومرتبه با ۳ ml محلول اسیداستیک ۳ درصد انجام شد. سپس مقدار ۵۰ میلی لیتر محلول خارج شده از کیسه‌ها را از کارتریج‌ها عبور داده شد تا آمین‌های آروماتیک مهاجرت یافته، جذب کارتریج‌ها گردند. در نهایت محلول شوی را از کارتریج‌ها عبور داده و داخل بالن ژوژه ۵ ml جمع آوری گردید.

مشخصات دستگاهی: تشخیص و تعیین مقدار آمین‌های آروماتیک نوع اول با دستگاه HPLC مدل Agilent مجهز به یک پمپ مدل Quaternary pump Agilent G1311A و آشکار ساز Diode Array Detector (DAD) Agilent G1315A با طول موج ۲۳۵ نانومتر و ستون ACE 5 C18 به طول ۲۵۰ mm و قطر داخلی ۴/۶ mm با اندازه ذرات ۵ μm صورت گرفت.

شرایط دستگاه HPLC-DAD محلول‌های استاندارد و نمونه‌ها با برنامه گرادیان شامل فاز متحرک (متانول : آمونیوم استات ۱۰ میلی مولار) به نسبت ۱۵ : ۸۵ تا دقیقه ۲ و

نسبت ۵۵ : ۴۵ تا ۲۵ دقیقه و نسبت ۹۵ : ۵ تا ۲۸ دقیقه و نسبت ۱۵ : ۸۵ تا ۳۲ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، با شدت جریان ۱ میلی لیتر در دقیقه و حجم ۱۰۰ میکرولیتر تزریق شد

صحت: صحت روش از طریق میزان بازیابی PAAs محاسبه می‌شود. در سه روز متوالی مقادیر ۵۰ میلی لیتر از محلول‌های اسیداستیک ۳٪ نشاندار شده به غلظت‌های ۷/۵، ۱۵ و ۳۰ میکروگرم در لیتر را با ۳ تکرار (جمعاً ۹ نمونه)، مطابق نمونه‌ها از کارتریج SPE عبور داده و به دستگاه HPLC-DAD تزریق شد.

دقت: دقت روش به وسیله معیار تکرار پذیری در یک روز و در سه روز متوالی انجام شد. به منظور بررسی دقت در یک روز، ۵۰ میلی لیتر از محلول‌های اسیداستیک ۳٪ نشاندار شده در سه سطح غلظتی ۷/۵، ۱۵ و ۳۰ میکروگرم بر لیتر را مطابق نمونه‌ها از کارتریج SPE عبور داده و در سه نوبت در یک روز و همچنین در سه روز متوالی به دستگاه HPLC-DAD تزریق شد.

حساسیت: برای تعیین LOD و LOQ روش، ۵۰ میلی لیتر از محلول‌های اسیداستیک ۳٪ نشاندار شده به غلظت ۵ میکروگرم بر لیتر را مطابق نمونه‌ها از کارتریج SPE عبور داده و در ۶ نوبت به دستگاه HPLC-DAD تزریق شد. با توجه به انحراف معیار نسبی و شیب معادله خط هر کدام از آمین‌های آروماتیک نوع اول و معادلات ۱ و ۲، مقادیر LOD و LOQ بدست آمد.

$$LOQ = \frac{10S}{Slope} \quad LOD = \frac{3.3S}{Slope}$$

معادله ۲ معادله ۱

• یافته‌ها

برای اندازه‌گیری میزان مهاجرت PAAs از فیلم‌های چندلایه لایمینیت، از روش معتبرسازی شده، استفاده گردید. نتایج مربوط به معادله منحنی استانداردها، ضریب همبستگی آنالیت‌ها و مقادیر LOD و LOQ روش در جدول ۱ و ۲ درج شده است. نتایج صحت روش با میانگین بازیابی ۹۲ درصد و با انحراف معیار $0.1 - 0.4$ و نتایج دقت بین روز با انحراف معیار $0.1 - 0.273$ و دقت در روز با انحراف معیار $0.1 - 0.404$ بدست آمد.

جدول ۱. معادله خط استاندارد و ضریب همبستگی آمین‌های آروماتیک

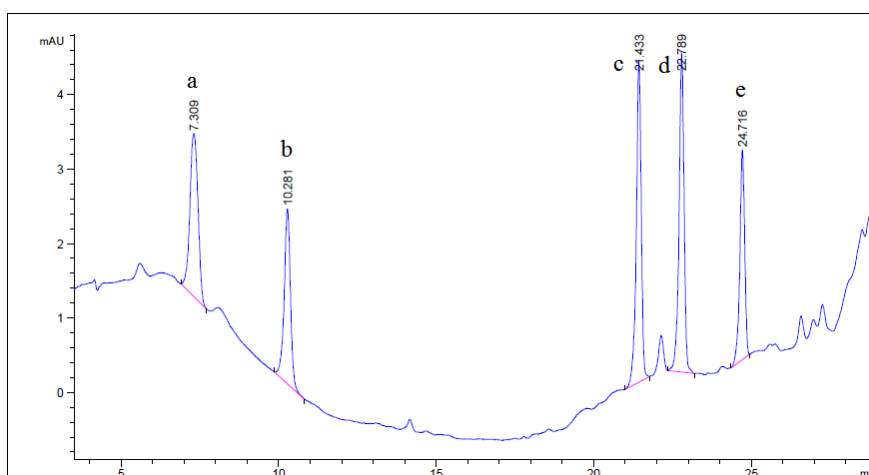
ضریب همبستگی (R^2)	معادله خط استاندارد	زمان ماند (min)	آمین آروماتیک
۰/۹۹۹۶	$y = ۰/۴۳۸x - ۲/۱۵۲$	۷/۳	2, 6-TDA
۰/۹۹۸۷	$y = ۰/۳۵۵x + ۲/۶۴۵$	۱۰/۳	2, 4-TDA
۰/۹۹۹۸	$y = ۰/۵۱۰x - ۶/۰۳۳$	۲۱/۴	4, 4'-MDA
۰/۹۹۹۹	$y = ۰/۴۸۶x - ۴/۲۳۴$	۲۲/۸	2, 4'-MDA
۰/۹۹۹۹	$y = ۰/۳۷۳x - ۲/۳۴۵$	۲۴/۷	2, 2'-MDA

جدول ۲. ارزیابی حساسیت

2,2'-MDA	2,4'-MDA	4,4'-MDA	2,4-TDA	2,6-TDA	PAAAs
Spiked 5ppb					
۱۷/۸	۲۱/۳	۲۱	۱۹/۵	۲۱	۱
۱۷/۴	۲۱/۷	۲۰/۷	۱۸/۹	۲۱/۲	۲
۱۷	۲۱/۳	۲۱/۳	۱۹	۲۰/۸	۳
۱۷/۵	۲۱/۵	۲۰/۸	۱۹/۵	۲۱	۴
۱۷/۲	۲۱/۵	۲۱/۱	۱۹/۳	۲۰/۶	۵
۱۷/۳	۲۱/۱	۲۱/۲	۱۹/۲	۲۱/۳	۶
۰/۱۸۷۰	۰/۲۰۹۷	۰/۲۳۱۶	۰/۲۵۰۳	۰/۲۵۶۲	STDEV
۰/۰۷۷	۰/۰۸۶	۰/۰۹۵	۰/۱۰۲	۰/۱۰۵	$S' = S/n^{1/2}$
۰/۶۸	۰/۵۸	۰/۶۱	۰/۹۵	۰/۷۹	LOD
۲/۰۵	۱/۷۷	۱/۸۶	۲/۹	۲/۴	LOQ

سازی شده نشان داده شده است. از ۲۴ نمونه فیلم چندلایه ارزیابی شده، تعداد ۱۵ نمونه قابل قبول و تعداد ۱۰ نمونه دارای مقادیر PAAAs بالاتر از حد مجاز بودند (جدول ۳).

در شکل ۱ کروماتوگرام محلول استاندارد مخلوط ۵ آمین آروماتیک نوع اول با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر و در شکل ۲ کروماتوگرام نمونه چندلایه شماره ۱۰ پیش تغلیظ



شکل ۱. کروماتوگرام محلول استاندارد ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر، پیک‌های شناسایی شامل: a: 2, 6-TDA, b: 2, 4-TDA, c: 4, 4'-MDA, d: 2, 4'-MDA, e: 2, 2'-MDA.

جدول ۳. نتایج کلی میزان آمین‌های آروماتیک نوع اول (میکروگرم بر کیلوگرم) مهاجرت یافته از نمونه فیلم‌های چند لایه

کارخانه	نمونه	2,6-TDA	2,4-TDA	4,4'-MDA	2,4'-MDA	2,2'-MDA	PAAs (µg/kg)
A	۱				۲/۳۱		۲/۳۱
A	۲			۲/۷۰	۴/۹۱	۳/۷۸	۱۱/۳۹
A	۳				۱۲/۶۳	۴/۷۳	۱۷/۳۶
A	۴			۲/۴۸	۵/۴۰	۲/۷۷	۱۰/۶۵
A	۵						N.D
A	۶				۱۱/۹۱	۷/۷۸	۱۹/۶۹
B	۷				۲/۲۲		۲/۲۲
B	۸	۴/۱۱	۴/۸۳	۳/۹۱	۶/۶۳	۴/۰۰	۲۳/۴۸
B	۹	۶/۲۹	۱۱/۱۰	۷/۷۱	۱۳/۵۰	۸/۱۹	۴۶/۷۹
B	۱۰	۱۱/۷۶	۲۷/۷۵	۳۱/۸۵	۳۴/۰۰	۳۰/۵۱	۱۳۵/۹۱
B	۱۱	۲/۱۲	۷/۰۳	۳/۳۲	۲/۰۲	۱/۵۹	۱۶/۰۸
B	۱۲	۱۶/۲۱	۲۵/۲۶	۳۲/۳۲	۳۵/۲۵	۲۰/۵۴	۱۲۹/۵۸
C	۱۳		۲/۲۶				۲/۲۶
C	۱۴	۶/۰۴	۵/۴۶				۱۱/۵
C	۱۵	۲/۴۳	۱/۴۱				۳/۸۴
C	۱۶	۲/۶۷					۲/۶۸
C	۱۷	۲/۵۰	۲/۰۷				۴/۵۷
C	۱۸	۲/۲۸					۲/۲۸
D	۱۹	۲/۹۲					۲/۹۲
D	۲۰	۲/۳۳					۲/۳۳
D	۲۱	۲/۲۸	۱/۴۴				۳/۷۲
D	۲۲	۲/۰۴					۲/۰۴
D	۲۳	۳/۲۱					۳/۲۱
D	۲۴	۲/۷۵					۲/۷۵

در تمام ۶ نمونه فیلم چندلایه نمونه برداری شده شرکت D مقادیر PAAs در حد مجاز می‌باشد.

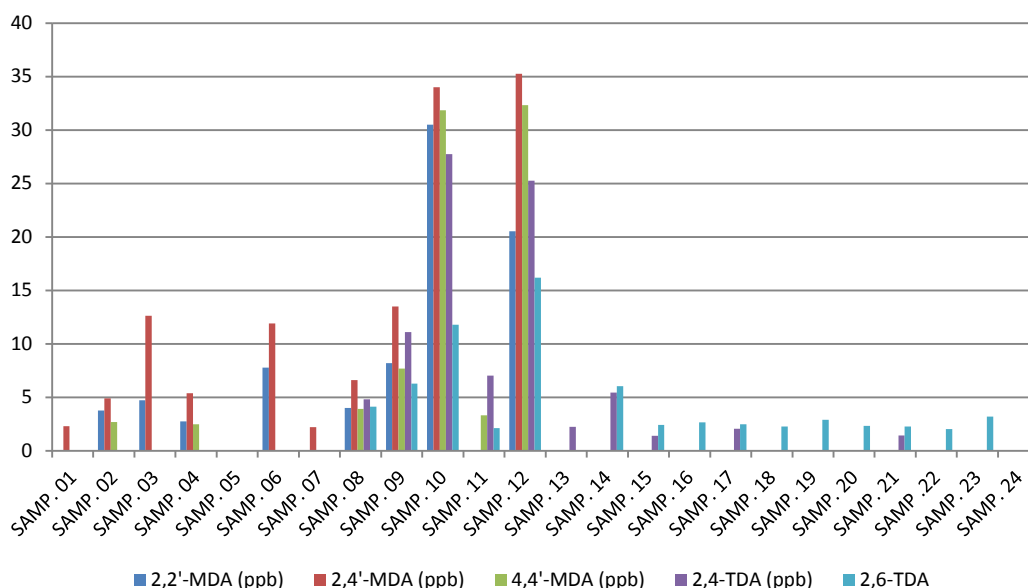
• بحث

در روش رنگ سنجی با وجود حد تشخیص مناسب، مقدار کل آمین‌های آروماتیک نوع اول اندازه‌گیری می‌شود و نتایج آن، بیشتر از مقدار واقعی می‌باشد که می‌تواند ناشی از ناخالصی‌های محتمل در عامل جفت کننده ان- (۱-نفتیل) اتیلن ۱ و ۲-دی آمین دی هیدروکلرید و نیز وجود آمین‌های آروماتیک در فرمولاسیون جوهر و مرکب چاپ باشد. در روش HPLC- DAD، امکان شناسایی و تجزیه تحلیل نوع آمین آروماتیک و به دنبال آن نوع ایزوسیانات و نوع چسب از نظر بهداشتی بودن وجود دارد.

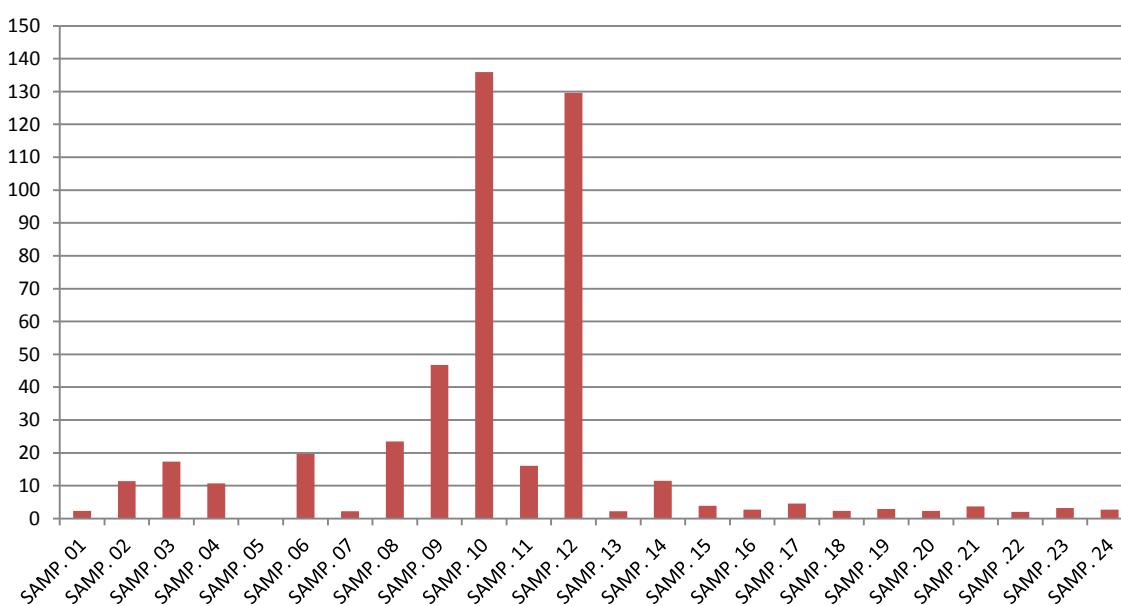
مطابق با جدول ۳ و شکل ۳ و ۴، در ۴ نمونه از ۶ نمونه فیلم چندلایه نمونه برداری شده شرکت A مقادیر 2, 4'-MDA و 2,2'-MDA بالاتر از حد مجاز بوده که نشان دهنده استفاده از چسب صنعتی (غیربهداشتی) می‌باشد.

در ۵ نمونه از ۶ نمونه فیلم چندلایه نمونه برداری شده شرکت B هر پنج ایزومر MDA و TDA شناسایی شد و دارای مقادیر بالاتر از حد مجاز بوده که نشان دهنده استفاده از چسب صنعتی (غیربهداشتی) و با ساختار مخلوط هر دو ایزوسیانات TDI و MDI می‌باشد.

در ۱ نمونه از ۶ نمونه فیلم چندلایه نمونه برداری شده شرکت C مجموع مقادیر 2,4-TDA و 2,6-TDA بالاتر از حد مجاز بوده که نشان دهنده استفاده از چسب صنعتی (غیربهداشتی) و یا عدم گیرایش کامل چسب می‌باشد.



شکل ۳. میزان ایزومرهای تولوئن دی آمین و متیلن دی آنیلین مهاجرت کرده از ۲۴ فیلم چندلایه لاینینیت (میکروگرم بر کیلوگرم)



شکل ۴. میزان مجموع آمین‌های آروماتیک نوع اول مهاجرت کرده از ۲۴ فیلم چندلایه لاینینیت (میکروگرم بر کیلوگرم)

چسب در لاینیناسیون (نسبت ایزوسیانات / هیدروکسیل) و کامل نشدن گیرایش چسب بعد از فرایند لاینیناسیون دارد. رعایت مدت زمان گیرایش (Curing time) منجر به کامل شدن واکنش ایزوسیانات‌های آروماتیک و گیرایش چسب اعمال شده مابین لایه‌های فیلم چندلایه و در نتیجه کاهش مقادیر آمین‌های آروماتیک نوع اول می‌شود. گیرایش چسب از نظر زمانی باید قبل از قرار گرفتن مواد غذایی درون فیلم‌های چندلایه، صورت پذیرد (۱).

شناسایی ترکیبات 4-TDA و 4'-MDA و 4 در محلول‌های مهاجرت یافته از فیلم‌های چندلایه لاینینیت قابل پیش بینی می‌باشد، چون چسب‌های مورد استفاده بر پایه 2,4-TDI یا 4,4-MDI بوده و ایزوسیانات‌های شرکت نکرده در واکنش عامل ایجاد این ترکیبات هستند. افزایش مقدار مهاجرت 4-TDA و 4'-MDA و 4 بستگی به فرمولاسیون چسب پلی اورتان، عدم رعایت عملکرد تولید خوب (GMP) در تولید چسب و فرایند لاینیناسیون، اختلاط نامناسب دو جزء

چند لایه بسته‌بندی مواد غذایی بر پایه ۲،۴-تولون دی ایزوسیانات و ۴،۴'-متیلن دی فنیل ایزوسیانات باشد.

نتیجه گیری

در ۲۴ نمونه مورد آزمایش تعداد ۱۰ نمونه دارای مقادیر آمین‌های آروماتیک نوع اول بالاتر از حد مجاز (۱۰ میکروگرم بر کیلوگرم مشابه غذایی) می‌باشد. با استفاده از روش کروماتوگرافی می‌توان به راحتی آمین‌های آروماتیک نوع اول مهاجرت کننده از فیلم‌های چندلایه لایمیت را شناسایی و تجزیه و تحلیل نمود. همچنین با شناسایی و تعیین مقدار ایزومرهای تولون دی آمین و متیلن دی آنیلین می‌توان مشخصات مربوط به چسب مورد ساختار یا پایه چسب (فرمولاسیون) و درجه چسب (صنعتی بودن) و موارد مربوط به رعایت اصول فنی در تولید فیلم‌های چندلایه لایمیت از قبیل نسبت اختلاط دو جزء چسب، زمان گیرایش و ... دریافت نمود.

سپاسگزاری: از کلیه مسئولان و همکاران محترم آزمایشگاه‌های مرجع کنترل غذا و دارو که ما را در انجام این پژوهش یاری رساندند سپاسگزارم.

چسب‌های پلی اورتان با پایه تولون دی ایزوسیانات مورد استفاده در بسته‌بندی مواد غذایی حاوی مونومرهای 2,4-TDI می‌باشد که می‌تواند تا ۲۰ درصد دارای ایزومر 2,6-TDI باشد. در صورت وجود مقدار بالایی از ترکیب 2,6-TDA نشان دهنده بیشتر بودن ناخالصی 2,6-TDI است. همچنین در چسب‌های پلی اورتان با پایه متیلن دی فنیل دی ایزوسیانات، ایزوسیانات اصلی از نوع 4,4'-MDI می‌باشد که حداکثر ناخالصی‌های 2,4'-MDI و 2,6'-MDI در آن در حدود ۳ درصد باشد. تشخیص سطح بالایی از 2,4'-MDA و 2,6'-MDA بیانگر وجود ناخالصی بیشتر از ایزومرهای فوق است (۲۱، ۲۰، ۱۹).

استفاده از چسب‌هایی با ناخالصی‌هایی از ایزومرهای دیگر، ممکن است مدت زمان لازم جهت گیرایش کامل چسب را به چندین هفته برساند. این در حالی است که احتمال قرار گرفتن مواد غذایی در داخل فیلم‌های چند لایه و بسته‌بندی شدن آنها، قبل از گیرایش کامل صورت می‌گیرد. لذا ایزوسیانات‌های آروماتیک باقیمانده پس از مهاجرت به مواد غذایی، به آمین‌های آروماتیک نوع اول هیدرولیز خواهند شد. بنابراین برای حفظ سلامت مصرف کننده و ایمنی مواد غذایی، می‌بایست ساختار چسب‌های مورد استفاده در تولید فیلم‌های

References

- Campanella G, Ghaani M, Quetti G, Farris S, Trends in Food Science & Technology, Commentary On the origin of primary aromatic amines in food packaging materials, 2015; 46: 137-143
- Engels H.W, Pirkel H.G, Albers R, W. Albach R, Jens Krause, et al, Chem. Int. Ed., Polyurethanes: Versatile Materials and Sustainable Problem Solvers for Today's Challenges, 2013; 52: 2 – 22
- Jopko L, Flexible Packaging Adhesives – The Basics, Rohm and Haas Company, 2003; 1- 4
- Szycher M, handbook of Polyurethanes Second edition, CRC Press Taylor & Francis Group, International Standard Book Number-13, 2013, 978-1-4398-6313-8
- Mihail Ionescu, Chemistry and Technology of Polyols for Polyurethanes, 2nd Edition, Volume 2, 2005, Rapra Technology Limited, ISBN: 1-85957-491-2
- Christensen F, Nilsson N. H, Jeppesen C. N, Clausen A. J, Survey of certain isocyanates (MDI and TDI), The Danish Environmental Protection Agency, Danish Ministry of the Environment, 2014, Environmental Project No. 1537.
- Mutsuga M, Yamaguchi M, Kawamura Y, Food Science & Nutrition, Quantification of isocyanates and amines in polyurethane foams and coated products by liquid chromatography tandem mass spectrometry, 2014; 2(2): 156– 163
- FPE Flexible Packaging Europe, Guideline on Use of Isocyanate-based Adhesives in Packaging Laminates, 2009; 1-3, Email: spengler@flexpack-europe.org
- Lambertini F, Di Lallo V, Catellani D, Mattarozzi M, Careri M, Suman M, J. Mass Spectrom., Reliable liquid chromatography-mass spectrometry method for investigation of primary aromatic amines migration from food packaging and during industrial curing of multilayer plastic laminates, 2014; 49: 870–877
- Brede C, Skjevrak I, Herikstad H, Journal of Chromatography A, Determination of primary aromatic amines in water food simulant using solid-phase analytical derivatization followed by gas chromatography coupled with mass spectrometry, 2003; 983: 35–42
- Quan-zhong L, Ming-hui Y, Chinese Journal of Analytical Chemistry, Determination of migration of 28 Primary Aromatic Amines in Food Contact Materials by Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry, 2013; DOI: 10. 3724 / SP. J. 1096.

12. Aznar M, Canellas E, Nerín C, Journal of Chromatography A, Quantitative determination of 22 primary aromatic amines by cation-exchange solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry, 2009; 1216: 5176–5181.
13. Mortensen S. K, Trier X. T, Journal of Chromatography A, Specific determination of 20 primary aromatic amines in aqueous food simulants by liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry, 2005; 1091: 40-50.
14. Mattarozzi M, Lambertini F, Journal of Chromatography A, Liquid chromatography-full scan-high resolution mass spectrometry-based method towards the comprehensive analysis of migration of primary aromatic amines from food packaging, 2013; 1320: 96– 102.
15. OuYang X. K, Luo Y. Y, Wang Y. G, Yang L.Y, Food Additives & Contaminants: Part A, Validation a solid-phase extraction-HPLC method for determining the migration behavior of five aromatic amines from packaging bags into seafood simulants, 2014; 31(9):1598–1604.
16. EN 13130-1:2004, Materials and articles in contact with foodstuffs. Plastics substances subject to limitation. Guide to test methods for the specific migration of substances from plastics to foods and food simulants and the determination of substances in plastics and the selection of conditions of exposure to food simulants.
17. Kollbach G., Technical Director, Henkel Corporation, Flexible Packaging Adhesives, 2008; 2-4, E-mail: guido.kollbach@us.henkel.com, www.henkelna.com/lofol
18. Allport D C., Gilbert D S., Outterside S M., MDI and TDI: Safety, Health and the Environment: A Source Book and Practical Guide. 2003, 11p.
19. Sennbro C, H. Lindh J, Tinnerberg H, Gustavsson C, Littorin M, Development, validation and characterization of an analytical method for the quantification of hydrolysable urinary metabolites and plasma protein adducts of 2,4- and 2,6-toluene diisocyanate, 1,5-naphthalene diisocyanate and 4,4'-methylenediphenyl diisocyanate, 2003; 8: 204–217.
20. Jeppesen C. N, Clausen A. J, 2014, Survey of certain isocyanates (MDI and TDI), The Danish Environmental Protection Agency, Danish Ministry of the Environment, ISBN: 978-97-93026-91-9
21. Verhoeven V. W. A, Padsalgikar, A. D, Ganzeveld, K. J, Janssen, L. P. B. M, Journal of Applied Polymer Science, A kinetic investigation of polyurethane polymerization for reactive extrusion purposes, 2006; 101(1): 370-382.

Identification and Analysis of the Migration of Primary Aromatic Amines from Flexible Food Packaging by High-performance Liquid Chromatography (HPLC)

Shahrestani M¹, Saber Tehrani M^{*2}, Shoeibi Sh³, Aberoomand Azar P⁴ Husain W⁵

1-Ph D. Student of Analytical Chemistry, Faculty of Science, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2-*Corresponding author: Associate prof., Department of Chemistry, Basic Sciences Faculty, Sciences and Researches Branch, Poonak-Hesarak, Azad University, Tehran, Iran. Email: drmsabertehrani@yahoo.com

3-Assistant Prof. in Food Chemistry, Food and Drug Laboratories Research Center (FDLRC), Iran Food and Drug Administration (IFDA), MOH.

4-Assistant Prof., Department of Chemistry, Basic Sciences Faculty, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

5-Full Prof, Department of Chemistry, Basic Sciences Faculty, Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Received 6 Jun, 2016

Accepted 25 Sept, 2016

Background and Objectives: Primary Aromatic Amines (PAAs) are contaminants that can migrate from food flexible packaging. The main origin of these compounds is polyurethane adhesives used in the laminating process of multilayer films. Residual aromatic di-isocyanates of the reaction of adhesive polymerization migrate into the food, and are hydrolyzed to PAAs by the moisture of food. 2,4- and 2,6-Toluene diamine (TDA) isomers or 4,4'-, 2,4'- and 2,2'-methylene diamine (MDA) may migrate from laminated multilayer films. In this study, the migration of TDAs and MDAs was identified and analyzed in 24 samples of multilayer film by validated High Performance Liquid Chromatography (HPLC).

Materials and Methods: Migration test was applied by 3% acetic acid on a sample of laminated films. Migrants was pre-concentrated using solid phase extraction cartridges (SPE). PAA values were measured by HPLC-DAD instrument.

Results: Of 24 laminated multilayer samples, 15 samples were acceptable and 10 samples had PAAs higher than 10 µg / kg. In the one sample of multilayer film, the total amount of 2,4-TDA and 2,6-TDA, and in the nine samples, the values of 2,4'-MDA and 2,2'-MDA were more than 10 µg/kg.

Conclusion: We can detect and analyze the five primary aromatic amines from laminated multilayer films with HPLC method. Also we can check the safety of these films, defects of lamination process, the structure of adhesive base and its sanitary/insanitary status.

Keywords: Methylenedianiline, Migration, Multilayer film, Polyurethane adhesive, Primary aromatic amines, Toluenediamine