معتبرسازی روش کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا در اندازه‌گیری هیستامین در ماست

مریم جاهدی نیا*[۱]، گیتی کریم[۲]، ایرج سهرابی حقدوست[۳]، سید مهدی رضوی روحانی[۴]، محبوبه اسکندری[۵]

۱- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، دانشجوی دکترای تخصصی بهداشت مواد غذایی، تهران، ایران.
۲- استاد گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران.
۳- دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، استاد گروه پاتولوژی دانشکده علوم تخصصی دامپزشکی، تهران، ایران.
۴- استاد گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ارومیه، ارومیه، ایران.
۵- دانشجوی دکترای تخصصی شیمی تجزیه، دانشگاه صنعتی شاهرود، شاهرود، ایران
*نویسنده مسئول مکاتبات: jahedinia@yahoo.com
(دریافت مقاله: ۹۲/۴/۸ پذیرش نهایی: ۹۳/۱/۱۷)

چکیده

آمین‌های بیوژن ترکیبات نیتروژنی آلی باوزن مولکولی پایین هستند که در اثر دکربوکسیلاسیون اسیدهای آمینه آزاد ایجاد می‌شوند. فرآورده‌های شیر از جمله غذاهایی هستند که میزان آمین‌های بیوژن در آنها بالاست. جهت اندازه‌گیری هیستامین و سایر آمین‌های بیوژن در مواد غذایی روش‌های مختلفی مورد استفاده قرار گرفته است که از بین آنها روش‌هایHPLC به عنوان روش مرجع اندازه‌گیری هیستامین در مواد غذایی مطرح می‌باشد. هدف این مطالعه معتبرسازی روشHPLC فاز معکوس جهت اندازه‌گیری هیستامین در ماست بود. فاز متحرک متشکل از استونیتریل و آب به نسبت (۱۸:۸۸ v/v) با سرعت جریان ml/min ۰/۵ به صورت ایزوکراتیک بوده و پیک‌ها با استفاده از دتکتور UV در طول موج ۲۵۴nm ردیابی گردیدند. پس از تزریق غلظت‌های مختلف از استاندارد هیستامین منحنی کالیبراسیون خطی بوده و ضریب تعیین‌کننده (r^2) به میزان ۰/۹۹۸ بدست آمد. بازیافت مناسب در همه سطوح آلودگی مشاهده گردید و میانگین بازیافت۸۴٪ برآورد گردید. در آزمون تکرارپذیری نیز درصد انحراف معیار نسبی (RSD %)۴/۴٪ بدست آمد. حد تشخیص و حد سنجش نیز به ترتیب µ/ml ۰/۱۴ و µ/ml۰/۴۲ بودند. نتایج آزمون معتبرسازی نشان داد که می‌توان از این روش به عنوان یک روش قابل اعتماد و سریع جهت اندازه‌گیری هیستامین در ماست استفاده نمود.

واژه‌های کلیدی: **هیستامین، ماست،کروماتوگرافی مایع با کارکرد بالا، معتبرسازی**

مقدمه

آمین‌های بیوژن ترکیبات نیتروژنی آلی با وزن ملکولی پایین هستند که اساسا در نتیجه دکربوکسیلاسیون اسیدهای آمینه توسط میکروارگانیسم‌ها تشکیل می‌شوند (Bodmer*et al*., 1999; Aliakbarlu*et al*., 2009). آمین‌های بیوژن در صورتی که در مقادیر بالا مصرف شوند می‌توانند باعث اثرات زیان‌آور در انسان شوند (Magwamba, 2010). در میکروبیولوژی مواد غذایی آمین‌های بیوژن گاهی مرتبط با فساد و فرآورده‌های تخمیری هستند. افزایش تقاضای مصرف‌کننده‌ها در جهت بهبود کیفیت و سلامت غذا منجر به افزایش توجه برای مطالعه روی آمین‌های بیوژن شده است (Victório, 2009). هیستامین (Histamine)، پوتریسین(Putrescine)، کاداورین (Cadaverine)، تیرامین (Tyramine)، تریپتامین (Tryptamine)، بتا فنیل اتیل امین (B-Phenylethylamine)، اسپرمین (Spermine) و اسپرمیدین (Spermidine) مهمترین آمین‌های بیوژن موجود در غذاها می‌باشند (Onal, 2007). در بین آمین‌های بیوژن هیستامین تنها آمینی است که حداکثر مجاز 5.0 mg/100g برای آن تعریف شده است (McCabe Sellers *et al*., 2005). فرآورده‌های شیر از جمله غذاهایی هستند که میزان آمین‌های بیوژن در آنها بالاست (Simon-Sarkadai*et al*., 2007). ماست یک فرآورده غذاییمغذی و از محبوب‌ترین فرآورده‌های تخمیری شیر در سرتاسر دنیاست و نزدیک به ۶۰ درصد مصرف سرانه محصولات شیر را در ایران شامل می‌شود (Amakoromo*etal*., 2012; Pourahmad*et al*., 2005). جهت اندازه‌گیری هیستامین و سایر آمین‌های بیوژن در مواد غذایی روش‌های مختلفی منتشر شده است. هم اکنون تکنیک‌های کروماتوگرافی مانند گاز کروماتوگرافی(GC) کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا(HPLC) و کروماتوگرافی لایه نازک با کارایی بالا(HPTLC)، همچنین الکتروفورز مویینه مزیت بزرگی نسبت به سایر روش‌ها دارند و آنالیز همزمان هیستامین و سایر آمین‌های بیوژن را ممکن می‌سازند (Etienne, 2006). از بین این روش‌ها نیز روش‌هایHPLC به عنوان کاراترین، حساس‌ترین و متداول‌ترین روش‌ها مطرحبوده و به عنوان روش رفرانس اندازه‌گیری هیستامین در مواد غذاییمورد استفاده قرار می‌گیرند. با وجود این تکنیک‌هایHPLC به تجهیزات با ارزش، مراقبت دقیق، محلول‌ها و لوازم گران‌قیمت وپرسنل ماهر نیاز دارند (Victório, 2009;Commission Regulation, 2005). معتبرسازی بر طبق SR EN ISO 9000:2001 عبارت است از تایید کردن بوسیله برآورده کردن هدفی که ثابت می‌کند تقاضا برای یک منظور یا کاربرد خاص به طور کامل قابل انجام است. هدف از معتبرسازی این است که اثبات شود که یک سیستم آنالیزی مشخص برای یک ویژگی معین منجر به کسب نتایج دقیق و تجدیدپذیر می‌گردد. بنابراین بررسی پارامترهای مختلف معتبرسازی برحسب نوع آنالیز (کیفی، نیمه کمی، غربالگری و کمی) ضروری به نظر می‌رسد.فاکتورهای مورد ارزیابی جهت معتبرسازی روش اندازه‌گیری بوسیله کروماتوگرافی مایع با کارکرد عالی عبارتند از: خطی بودن، دقت، صحت، ویژگیوحساسیت (حد تشخیص و حد سنجش) (Baston *et al*., 2009). هدف از این مطالعه معتبرسازی یک روش آنالیزی کروماتوگرافی مایع با کارکرد عالی

جهت تشخیص و اندازه‌گیری میزان هیستامین در ماست می‌باشد.

مواد و روش‌ها

۱- مواد شیمیایی

هیستاین هیدروکلراید و دانسیل کلراید از شرکت سیگما خریداری شدند. استونیتریل، آب مقطر با درجه HPLC، بوتانل و اسیدکلریدریک نیزاز شرکت مرک خریداری گردیدند.

۲- تجهیزات

سیستم کروماتوگرافی شامل

column:Eurospher250/4.6 C_{18} Gravity 5 µm with precolumn
Wellchrom HPLC pump, K-1001 (KNAUER Germany)
dynamic mixing chamber
degasser(KNAUER)
UV-detector K-2501 (KNAUER Germany)

۳- شرایط کروماتوگرافی

فاز متحرک متشکل از استونیتریل و آب به نسبت (۱۸:۸۸v/v) با سرعت جریان $0/5mL\ min^{-1}$ بوده و آنالیز به صورت کروماتوگرافی فاز معکوس و ایزوکراتیک انجام گردید. پیک‌ها در طول موج ۲۵۴ nm ردیابی گردیدند و حجم ۲۰µlبه دستگاه HPLC تزریق گردید. تشخیص هیستامین در نمونه‌ها بر اساس زمان بازداری در مقایسه با محلول استاندارد انجام شد و تعیین میزان هیستامین بر اساس محاسبه سطح زیر پیک انجام گردید.

۴- آماده‌سازی محلول استاندارد

مقدار ۵ میلی‌گرم از هیستامین دی هیدروکلراید به طور دقیق وزن شده و به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس با افزودن مقادیر مختلف اسید کلریدریک ۰/۱ مولار به محلول اولیه غلظت‌های مختلف استاندارد بدست آمد.

۵- آماده‌سازی نمونه

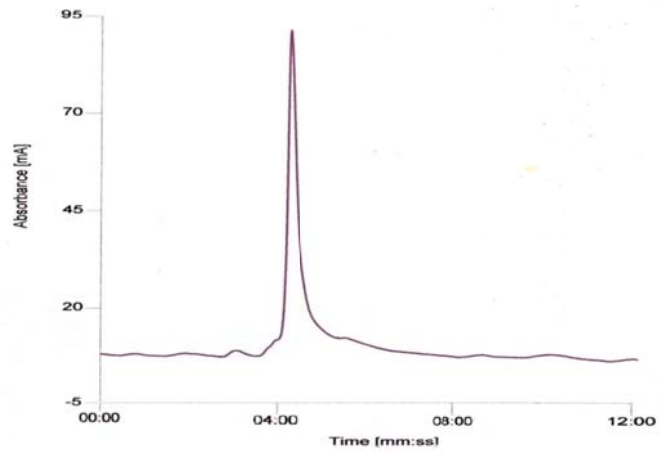
مقدار ۱۰ گرم از نمونه ماست مستقیما داخل یک لوله سانتریفوژ وزن گردید و ۲۰ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۰/۱ مولار به آن اضافه شد. سپس به مدت ۲ دقیقه با استفاده از هموژنایزر یکنواخت گردید. سوسپانسیون حاصل در دور ۱۲۰۰۰ rpmبه مدت ۲۰ دقیقه در ۴ درجه سلسیوس سانتریفوژ گردید. مایع رویی جمع‌آوری و رسوب باقی‌مانده مجددا با همان شرایط سانتریفوژ گردید و مایع رویی حاصل با قبلی مخلوط شد و با اسید۰/۱ مولار به حجم ۵۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس استخراج با حلال آلی (بوتانل) هم انجام گردید. به این صورت که در یک لوله آزمایش ۵ میلی‌لیتر استخراج اسیدی را با ۵ میلی‌لیتر بوتانل مخلوط

کرده و به مدت ۲ دقیقه مخلوط شد. استخراج آلی با نمک اشباع شده و سود به pH۱۱/۵رسانده شد. به منظور مشتق‌سازی نمونه‌ها ۱ میلی‌لیتر استخراج آلی با دو قطره اسید کلریدریک ۱ مولار مخلوط شده و تحت شرایط خلا خشک گردید. سپس ۱ میلی‌لیتر اسید کلریدریک ۱ مولار،۵۰۰ میکرولیتر محلول اشباع بیکربنات سدیم و ۱ میلی‌لیتر محلول دانسیل کلراید ($mlmg^{-1}$ ۵) به آن اضافه شد و به آون منتقل گردید و به مدت ۱ ساعت در دمای ۴۰ درجه سلسیوس نگه‌داری شد. در نهایت پس از خشک کردن تحت شرایط خلا ۲ میلی‌لیتر استونیتریل به آن اضافه گردید. محلول حاصل فیلتر شده و به ستون کروماتوگرافی تزریق گردید.

یافته‌ها

۱- خطی بودن(Linearity)

۴ غلظت مختلف (μmlg^{-1} ۲۰,۳۰,۴۰ و ۱۰) از نمونه استاندارد هیستامین دی هیدروکلراید شده وهر کدام ۳ بار به دستگاه HPLC تزریق شد. پس از محاسبه سطوح زیر هر غلظت منحنی کالیبراسیون رسم گردید و معادله خط به صورت Y=39516x+41067 تعریف شده و ضریب تعیین کننده (r^2) نیز به صورتr^2=۰/۹۹۸ بدست آمد. در نمودارهای حاصل از تزریق غلظت‌های مختلف استاندارد هیستامین به دستگاه، پیک مربوط به استاندارد هیستامین در حدود زمانبازداری (Retention Time) ۴/۷ دقیقه خارج گردید.



شکل ۱- کروماتوگرام حاصل از تزریق استاندارد هیستامین

۲- صحت (Accuracy)

صحت یک روش آنالیز به معنی نزدیکی نتایج آزمون با میزان واقعی است. محاسبه این کمیت در واقع بیانگر میزان خطای عمدی در نتایج می‌باشد (Reddy and Battu, 2009).

صحت روش آنالیز با افزودن مقادیر $mgkg^{-1}$ ۱۵، ۱۰، ۵ از استاندارد هیستامین به نمونه و اندازه‌گیری درصد بازیافت (Recovery) تعیین گردید. میزان بازیافت برای هر سطح از آلودگی با ۳ بار تکراربدست آمدکه مطابق با جدول شماره ۱ می‌باشد.

جدول شماره ۱- نتایج حاصل از بازیافت مقادیر مختلف هیستامین افزوده شده به نمونه ماست

میانگین درصد بازیافت	میانگین میزان بازیافت شده $mg\ kg^{-1}$	میزان هیستامین افزوده $mg\ kg^{-1}$
۸۲/۶	۴/۱۳	۵
۸۴/۳	۸/۴۳	۱۰
۸۴/۹	۱۲/۷۴	۱۵

۳- تکرارپذیری (repeatability)

دقت روش بیانگر میزان پراکندگی نتایج بدست آمده از یک سری آزمون مشابه انجام شده بر روی یک نمونه واحد می‌باشد.

تکرارپذیری یکی از معیارهای تعیین میزان دقت روش آنالیز است (CDER, 1994). میزان تکرار پذیری روش آنالیزبا ۶ بار تکرار یک رقت یکسان ($mg\ kg^{-1}$ ۱۰) بدست آمد و مطابق با جدول شماره ۲ می‌باشد.

جدول ۲- میزان تکرارپذیری روش آنالیز

RSD%	تکرار	غلظت($mg\ kg^{-1}$)
۴/۴	۶	۱۰

۴- حساسیت (Sensitivity)

به منظور محاسبه و نمایش حساسیت روش از دو کمیت حد تشخیص LOD:Limit of detection و حد سنجش LOQ:Limit of quantitation استفاده شد.حد تشخیص و حد سنجش مقدار غلظتی از ماده مورد آزمایش است که نسبت پیک ایجاد شده آن به نوسان‌های خط زمینه به ترتیب ۳ و ۱۰ باشد (FDA, 2000).

این دو کمیت با استفاده از منحنی کالیبراسیون محاسبه گردیدند. برای این منظور شیب خط کالیبراسیون (a) و انحراف معیار جمله مستقل رگرسیون(Sb) مورد نیاز است که آنها را در روابط قرار می‌دهیم LOD=3*Sb/a وLOQ=10*Sb/a. بر این اساس مقادیر حد تشخیص و حد سنجش به ترتیب μmlg^{-1} ۰/۱۴ و μmlg^{-1} ۰/۴۲بدست آمد.

بحث و نتیجه‌گیری

هدف از این مطالعه معتبرسازی یک روشHPLC فاز معکوس جهت اندازه‌گیری میزان هیستامین در ماست بود. فاکتورهایی که جهت معتبرسازی روش مورد بررسی قرار گرفتند شامل خطی بودن، صحت، تکرارپذیری و حساسیت بود. پس از رسم منحنی کالیبراسیون ضریب تعیین‌کننده (r^2) محاسبه گردید که این میزان بالاتر از ۰/۹۹۵بوده و رابطه مناسب بین مقدار و پاسخ را نشان می‌دهد. میانگین بازیافت که جهت بررسی صحت آزمایش اندازه‌گیری گردید. ۸۴٪ بود که در محدوده ۱۲۰-۸۰ درصد قرار دارد (FDA, 2012). جهت بررسی تکرارپذیری و تعیین میزان دقت

آزمایشدرصد RSD محاسبه گردید که اختلاف بین نتایج آنالیز یک نمونه واحد را نشان می‌دهد و در محدوده قابل قبولی قرار دارد. جهت معتبرسازی روش اندازه‌گیری هیستامین در مواد غذایی مطالعات مختلفی انجام گرفته است. در مطالعه‌ای که توسط یونیونگ سوان و کنگ کیاتیکاجورن تحت عنوان بهبود روش استخراج آمین‌های بیوژن از فرآورده‌های تخمیری صورت گرفت، اثر استفاده از امواج صوتی (Sonication) در میزان باز یافت فرآورده‌های تخمیری از جمله ماست بررسی گردید. میانگین و انحراف معیار بازیافت در نمونه‌های ماست در مورد استخراج همراه با استفاده از امواج صوتی ۸ ± ۷۹/۲ و در مورد عدم استفاده از امواج صوتی ۴ ± ۷۷/۸ بدست آمد. در مطالعه‌ای در سال ۲۰۰۴ توسط سینکینا در ایتالیا دو روش HPLC و الکتروفورز مویینه جهت تشخیص هیستامین در کنسرو تن ماهی اعتبارسنجی شدند. در هر دو روش ضریب تعیین‌کننده بالاتر از ۰/۹۹۹ بود. حد تشخیص و حد سنجش نیز به ترتیب برای HPLCmg kg^{-1} ۱و $mg\,kg^{-1}$ ۲ و برای الکتروفورز $mg\ kg^{-1}$ ۰/۵ و $mg\ kg^{-1}$ ۱ بدست آمد. در مورد بازیافت و انحراف معیار نسبی نیز به ترتیب نتایج ۹۲٪ و ۴٪ برای HPLC و ۸۵٪ و ۳٪برای الکتروفورز بدست آمد. در بررسی دیگر که توسط بتسان و همکاران در سال ۲۰۰۸ جهت معتبرسازی روش اندازه‌گیری آمین‌های بیوژن در گوشت مرغ انجام گرفت ضریب تعیین‌کننده بالاتر از ۰/۹۹۶ و میزان بازیافت برای هیستامین ۹۳ ٪بود. حد تشخیص و حد سنجش نیز در مورد هیستامین به ترتیب μmlg^{-1} ۰/۰۳۵ و μmlg^{-1} ۰/۰۷۰ بدست آمد.

با توجه به مقایسه انجام شده، نتایج بدست آمده از این تحقیق با نتایج سایر محققین نیز مشابهت دارد. نتایج حاصل از معتبرسازی روش آنالیز نشان می‌دهد که می‌توان از این روشHPLC فاز معکوس به عنوان یک روش قابل اعتماد و سریع جهت اندازه‌گیری هیستامین در ماست استفاده کرد. زمان بازداری کوتاه هیستامین و ترکیب ساده فاز متحرک از ویژگی‌های این روش می‌باشد که باعث صرفه‌جویی در زمان و به خصوص مصرف مواد شیمیایی می‌گردد.

منابع

- Aliakbarlu, J., Alizadeh, M., Razavi-Rohani, M., Vahabzade, Z., Saei, S. and Agh, A. (2009). Effects of Processing Factors on Biogenic Amines Production in Iranian White Brine Cheese, Research Journal of Biological Sciences, 4(1): 23-28.
- Amakoromo, E.R., Innocent-Adiele, H.C. and Njoku, H.O. (2012). Physico-chemicial Quality of a Yoghurt-Like Product from African Yam Bean, Report and Opinion, 4(4): 58-61.
- Baston, O., Stroia, A.L., Moise, M. and Barna, O. (2008). Validation study of a HPLC method able to measure Biogenic amines in chicken meat, Food Technology, New Series 2(31): 44-50.
- Baston, O., Moise, D., Barna, O. and Pricop, E.(2009). Validation study of a HPLC method for biogenic amines quantification in bananas, Scientific Paper Journal Agronomy Series, 52: 593-602.
- Battu, P.R. and Reddy, M.S. (2009). Development and Validation of RP-HPLC for the Rabeprazole Sodium in Pharmaceutical Formulations and Human Plasma, Asian Journal of Research in Chemistry. 2(1):49-51.
- Bodmer, S., Imark, C. and Kneubuhl, M. (1999).Biogenic amines in foods: Histamin and food processing, Inflammation Research, 48: 296-300.

- Center for Drug Evaluation and Research. (1994). Reviewer Guidance' Validation of Chromatographic Methods – CDERwww.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/UCM134409.pdf.
- Cinquina, A.L., Longo, F., Cali, A., De Santis, L., Baccelliere, R. and Cozzani, R. (2004). Validation and comparison of analytical methods for the determination of histamine in tuna fish samples, 1032: 79-85.
- Commission Regulation (EC) N° 2073. (2005). Microbiological criteria for foodstuffs http://eurlex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:338:0001:0026: EN: PDF.
- Etienne, M. (2006). Methodology for histamine and biogenic amines analysis. http://archimer.ifremer.fr/doc/2006/rapport-6484.pdf.
- Food and Agriculture Organization Q2B. (2000). Validation of Analytical Procedures and Methods Validation- FDA.www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm122858.pdf.
- Food and Drug Administration, ora laboratory procedure. (2012). Methods, method verification and validation, FDAhttp://www.fda.gov/ora/science_ref/lm/default.htm
- Magwamba, C., Matsheka, M.I., Mpuchane, S. and Gashe, B.A. (2010). Detection and Quantification of Biogenic Amines in Fermented Food Products Sold in Botswana, Journal of Food Protection, 73(9):1703-8.
- McCabe Sellers, B.J., Staggs, C.G. and Bogle, M.L. (2005). Assessment of histamine content in foods. Proceedings of 29th National Nutrient Databank Conference. United State, Iowa.
- Onal, A. (2007). A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods, Food Chemistry, 103(4): 1475-1486.
- Pourahmad, R. and Mazaheri Assadi, M. (2005). Yoghurt production by Iranian native starter cultures, Nutrition and Food Science, 35(6): 410-415.
- Simon-Sarkadai, L., elencser, E. and Vida, A. (2003). Immunoassay method for detection of histamine in foods, Acta Aliment Hung, 32(1): 89-93.
- Victorio, H.G. (2009). The development of a Direct Competitive ELISA for the determination of histamine in wine, Instituto Superior de Agromonia.
- Yeunyongsuwan, K., Kongkiattikajorn, J., Improved Procedure for Biogenic Amine Extraction from Fermented Food Products for HPLC Determination, fervaap. kku.a c.th / inter / images / Fervaap2005 / Oral.../FF/P-FF22FP.

Validation of histamine determination Method in yoghurt using High Performance Liquid Chromatography

Jahedinia, M.[1*], Karim, G.[2], Sohrabi Haghdust, I.[3], Razavi Rohani, S.M.[4], Eskandari, M.[5]

1- Ph.D. Student, Department of Food Hygiene, Science & Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
2- Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Tehran, Tehran, Iran.
3- Professor, Department of Pathology, Science & Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran.
4- Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary Medicine, University of Urmia, Urmia, Iran.
5- Ph.D. Student of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, University of Shahrood, Semnan, Iran.
[*]Corresponding author email: jahedinia@yahoo.com
(Received: 2013/6/29 Accepted: 2014/4/6)

Abstract

Biogenic amines are organic, basic nitrogenous compounds of low molecular weight that are mainly generated by the enzymatic decarboxylation of amino acids by microorganisms. Dairy products are among the foods with the highest amine content. A wide variety of methods and procedures for determination of histamine and biogenic amines have been established. Amongst, HPLC method is considered as reference method. The aim of this study was to validate Reversed Phase HPLC method determination of histamine in yoghurt. The mobile phase consisted of acetonitrile/water (18:88 v/v) and the flow rate was set at 0.5 ml/min using isocratic HPLC. Detection was carried out at 254 nm using UV-detector. Calibration curve that was constructed using peak area of standards was linear and value of correlation coefficient (r^2) was estimated at 0.998. Good recoveries were observed for histamine under investigation at all spiking levels and average of recoveries was 84%. The RSD% value from repeatability test was found to be %4.4. Limit of detection and limit of quantitation were 0.14 and 0.42 µ/ml, respectively. The results of validation tests showed that the method is reliable and rapid for quantification of histamine in yoghurt.

Key words: Histamine, Yoghurt, High Performance Liquid Chromatography, Validation