



تشخیص پرتودیدگی گوشت مرغ با اندازه‌گیری ارتو-تیروزین با استفاده از تکنیک کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و آشکارسازی فلورسانس

فریدون افلاکی*، علی روزبهانی، مریم صلاحی‌نژاد

پژوهشکده علوم هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران، صندوق پستی: ۱۱۳۶۵-۳۴۸۶، تهران - ایران

چکیده: ارتو-تیروزین به عنوان معیاری برای تشخیص مواد غذایی سرشار از پروتئین پرتودهی شده پیشنهاد شده است. در این کار تحقیقاتی، اندازه‌گیری ارتو-تیروزین با استفاده از تکنیک کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) و آشکارسازی فلورسانس با قابلیت تعیین کمی 0.1ng ارتو-تیروزین انجام شده است. این روش شامل یخ‌زدن و خشک کردن نمونه، هیدرولیز اسیدی و جداسازی از طریق HPLC است. با استفاده از ستون Spherisorb ODS2 امکان جداسازی خط مبنای ارتو-تیروزین از ناخالصی‌ها فراهم گردید. با اندازه‌گیری ارتو-تیروزین در نمونه‌های ران و سینه مرغ نشان داده شد که مقدار تشکیل شده‌ی آن در نمونه‌ها متناسب با دز پرتودهی بوده ولی به دلیل آن که مقدار ارتو-تیروزین اندازه‌گیری شده در نمونه‌های پرتودهی نشده متغیر بود (0.15 تا $0.42\text{ }\mu\text{g/g}$)، این روش می‌تواند تنها برای شناسایی نمونه‌های مرغ پرتودهی شده با 4kGy و بالاتر به کار رود. با توجه به افزایش خطی ارتو-تیروزین تشکیل شده در نمونه‌های پرتودهی شده تا 50kGy ، این روش به خصوص برای شناسایی نمونه‌های پرتودهی شده در دزهای غیرمجاز بالا مناسب است.

واژه‌های کلیدی: ارتو-تیروزین، مواد غذایی پرتودهی شده، تشخیص، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

Discernment of Irradiated Chicken Meat by Determination of O-Tyrosine Using High Performance Liquid Chromatography and Fluorescence Detection

F. Aflaki*, A. Roozbahani, M. Salahinejad

Nuclear Science Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, AEOL, P.O.Box: 11365-3486, Tehran - Iran

Abstract: O-Tyrosine is proposed as a marker for identification of irradiated protein-rich foods. In this study, HPLC/ Fluorescence method that allows accurate quantification of 0.1ng of o-tyrosine has been used. The method involves freeze-drying of sample, acid hydrolysis and fractionation by HPLC. By using Spherisorb ODS2 column, the base-line separation of o-tyrosine from impurities was performed. The yield of o-tyrosine in the irradiated chicken meat was proportional to the irradiation dose. Since the variable levels of o-tyrosine were found in unirradiated chicken meat (0.15 - $0.42\text{ }\mu\text{g/g}$ per wet weight), this method is able to identify the irradiated chicken meat at 4kGy or higher. Because the dose response curve can be extended over 50kGy , the method is suitable for detecting the overdosed samples.

Keywords: O-Tyrosine, Irradiated Food, Detection, High Performance Liquid Chromatography

*email: faflaki@aeoi.org.ir

تاریخ دریافت مقاله: ۸۸/۵/۸ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۹/۲/۲۰



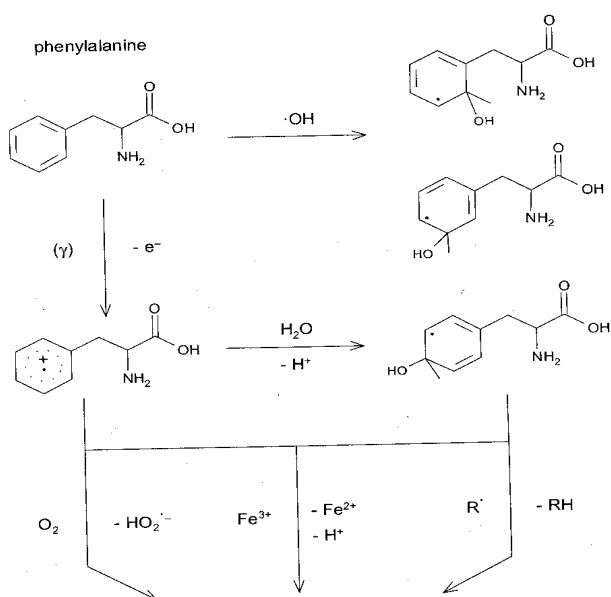
۱- مقدمه

پرتودهی نشده نیز اندازه گیری می شود [۸ و ۱۰]. در حالی که افرادی چون کارام، گروتولد، هاپکینس و مپهارا مدعی مناسب بودن ارتو- تیروزین برای تشخیص پرتو دیدگی مواد غذایی پروتئینی می باشند [۱۱ تا ۱۵]، محققین دیگری چون هارت، میر، ویلموت، چواکی و افرمان گزارش نمودند که ارتو- تیروزین می تواند در مراحل آماده سازی و هیدرولیز نمونه تشکیل شود و عواملی مانند در دسترس بودن اکسیژن هنگام هیدرولیز نمونه ها، دمای محیط پرتو دهی و سرعت دز در تشکیل ارتو- تیروزین مؤثر می باشند. لذا کارآیی این روش برای آشکار سازی پرتو دیدگی مواد غذایی پروتئینی پرتو دهی شده مورد تردید قرار گرفت [۱۰ و ۱۶ تا ۱۹]. تحقیقات نشان داده است که رادیکال های هیدروکسیل می توانند از واکنش های دیگری نیز ایجاد شوند (شکل ۱). برای مثال در سیستم های زیست شناختی به وسیله آنزیم سوپر اکسید- دیسموتاز رادیکال های پروکسید (O_2^-) به H_2O_2 تبدیل شده و با واکنش از نوع فنتون^(۹)، Fe^{+2} با آب اکسیژنه در محیط آبی خنثی منجر به تشکیل ارتو- تیروزین می شود [۹ و ۲۰].

تفاوت عمده ی روش های مختلف ارایه شده برای اندازه گیری ارتو- تیروزین با استفاده از تکنیک کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا (HPLC)^(۱۱) عبارتند از: استفاده از نمونه برداری منجمد اولیه برای انجام هیدرولیز و یا نمونه برداری از نمونه ی خشک شده، استخراج چربی ها در قبل از هیدرولیز با استفاده از حلال های آلی و یا عدم استخراج چربی، هیدرولیز در مجاورت

وجود روش های معتبر تشخیص مواد غذایی پرتو دهی شده، در ایجاد یک سیستم نظارت قانونمند و در تسهیل تجارت آن ها در سطح ملی و بین المللی و هم چنین در افزایش مقبولیت مواد غذایی پرتو دهی شده مؤثر خواهد بود [۱]. به طور کلی اساس روش های تشخیص مواد غذایی پرتو دهی شده بر پایه ی تغییرات فیزیکی، شیمیایی و زیست شناختی ایجاد شده در مواد غذایی در اثر فرایند پرتو دهی استوار بوده و هر کدام از روش های تشخیص برای دسته ای خاص از مواد غذایی کاربرد دارد [۲ و ۳]. در اروپا به واسطه ی فعالیت های کمیته ی اروپایی برای استاندارد سازی (CEN)^(۱) چندین روش تشخیص معتبر برای تعداد زیادی از مواد غذایی مختلف ارایه شده است که عبارتند از: تشدید اسپین الکترون (ESR)^(۲)، ترمولومینسانس (TL)^(۳)، هیدروکربن های فرار (HC)^(۴)، سیکلو بوتانون (CB)^(۵)، سنجش تقسیم دی.ان.ا^(۶) و روش (DEFT/APC)^(۷) [۴].

در دو دهه ی اخیر، کاربرد تابش های یوننده به عنوان وسیله ای برای حفظ و نگهداری طولانی مدت مواد غذایی گوشتی در جهان افزایش یافته است. برای مثال از سال ۱۹۹۷ میلادی اداره ی کل خوراک و داروی آمریکا (FDA)^(۸)، پرتو دهی گوشت تازه و منجمد تا دزهای ۴٫۵ و ۷kGy را مجاز شناخته است [۵]. پرتو دهی گوشت منجر به تشکیل رادیکال های H^+ و e^-_{aq} ، OH° از مولکول های آب موجود در گوشت می شود که این رادیکال ها با مولکول های آلی واکنش های متعددی می دهند. انواع محصولات تشکیل شده به دز جذبی و شرایط پرتو دهی بستگی دارد. تابش یوننده در پروتئین ها واکنش هایی نظیر دی آمینه شدن، کربوکسیله شدن، تسهیم پیوندهای پپتیدی و ... را سبب می شود [۶]. اسید آمینه ی فنیل آلانین موجود در پروتئین ها نسبت به تابش حساسیت زیادی داشته و با رادیکال های OH° واکنش داده و ایزومرهای تیروزین (ارتو، متا و پارا- تیروزین) را به وجود می آورد. چون ارتو- تیروزین به راحتی از طریق کروماتوگرافی از پارا- تیروزین طبیعی جدا می شود، ارتو- تیروزین به عنوان نشانه ای از مواد غذایی پرتو دهی شده انتخاب شده است [۷، ۸ و ۹]. برای یک مدت طولانی تصور می شد که ارتو و متا- تیروزین در پروتئین های طبیعی موجود بوده و تنها در اثر پرتو دهی در مواد غذایی پروتئینی به وجود می آیند. اما امروزه، با افزایش بیش از پیش حساسیت تجزیه ای دستگاه های اندازه گیری، ارتو- تیروزین در مواد غذایی



شکل ۱- واکنش های مؤثر در تشکیل ایزومرهای تیروزین.



در نمونه‌های پرتودهی شده در مدت دو هفته بعد از عمل پرتودهی انجام گردید.

۳-۲ هیدرولیز نمونه‌ها

۱۰ میلی‌لیتر هیدروکلریک اسید ۶ نرمال به ۲۰۰ تا ۳۰۰ میلی‌گرم از نمونه‌های گوشت مرغ همگن شده در لوله‌های هیدرولیز پروتئین ۱۵ میلی‌لیتری افزوده شد. با عبور دادن گاز نیتروژن از درون محلول اسیدی لوله‌های هیدرولیز توسط لوله‌ی تفلونی نازک به مدت ۳ دقیقه، اکسیژن درون لوله‌ها حذف و سپس درب آن‌ها محکم بسته شد. با قرار دادن لوله‌های هیدرولیز به مدت ۲۴ ساعت در درون آون با دمای 110°C هیدرولیز پروتئین موجود در نمونه‌ها انجام شد. پس از هیدرولیز، مقدار مناسبی از محلول‌های هیدرولیز با استفاده از صافی ۰/۴۵ میکرون صاف و ۱۰۰ تا ۳۰۰ میکرولیتر از محلول‌های هیدرولیز صاف شده به درون لوله‌های آزمایش کوچک منتقل و توسط پمپ خلاء خشک شدند و تا هنگام انجام تجزیه توسط دستگاه HPLC، درون یخچال نگهداری شدند [۱۶ و ۱۸]. برای اندازه‌گیری کمی ارتو- تیروزین، هر یک از نمونه‌های خشک شده در ۱۰۰ تا ۳۰۰ میکرولیتر هیدروکلریک اسید ۰/۱N حل و مقدار ۲۰ میکرولیتر از محلول حاصل به ستون تجزیه‌ای دستگاه HPLC تزریق گردید.

۳- نتایج

۳-۱ جداسازی ارتو- تیروزین با HPLC

با تهیه و آزمایش فازهای متحرک مختلفی که در منابع علمی ارائه شده بودند [۱۶، ۱۸ و ۱۹] فاز متحرک و برنامه‌ی کروماتوگرافی زیر برای جداسازی ایزومرهای تیروزین نمونه‌های هیدرولیز شده، توسط HPLC مورد استفاده قرار گرفت:

Eluent A: 0.14 gr of Trilithium Citrate, 0.04gr of citric acid, 10ml of Acetonitrile, 100 μl of concentrated HCl in 1litre of Milli-Q Water, pH=5.6

Eluent B: Acetonitrile: Milli- Q Water, (4: 1)

Gradient: 0-20 Minutes: 100% A

20-35 Minutes: 100% B (برای حذف آلودگی‌های آلی به جا مانده در ستون)

35-50 Minutes: 100% A (برای آماده شدن ستون برای تزریق بعدی)

Flow Rate: 1 ml/min

Detection: Fluorescence: Excitation 275nm, Emission 305

Injection: 20 μl of Diluted Samples with 0.01N HCl

اکسیژن و یا هیدرولیز با حذف اکسیژن محلول، جداسازی و اندازه‌گیری ارتو- تیروزین با انجام مشتق‌سازی آن و یا اندازه‌گیری مستقیم [۱۱ تا ۱۸]. بررسی تحقیقات انجام شده در زمینه‌ی روش مبتنی بر اندازه‌گیری ارتو- تیروزین نشان می‌دهد که دو مشکل در این روش وجود دارد. نخست جدایش ضعیف قله‌ی ارتو- تیروزین در روش HPLC و دیگری تعیین دقیق سطوح زمینه‌ی ارتو- تیروزین. در کار قبلی، پرتودهی محلول‌های آبی فنیل آلانین را مورد مطالعه قرار دادیم [۲۱]. در کار حاضر سعی گردید با استفاده از شرایط کروماتوگرافی مناسب، تفکیک کامل قله‌ی ارتو- تیروزین از سایر ترکیبات روی خط زمینه‌ی کروماتوگرام انجام شود و سپس تأثیر تابش گاما بر روی تشکیل ارتو- تیروزین در گوشت مرغ بررسی گردد.

۲- روش کار

۱-۲ مواد و دستگاه‌ها

ارتو- تیروزین، استونیتریل، سیتریک اسید، تری‌لیتیم سترات و هیدروکلریک اسید از شرکت Merck و یا Fluka تهیه شدند. دستگاه ^{60}Co Gamma cell 220 برای پرتودهی نمونه‌ها و سیستم کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا، مدل Waters Breeze مجهز به آشکارساز فلورسانس برای جداسازی و اندازه‌گیری کمی ایزومرهای تیروزین مورد استفاده قرار گرفت.

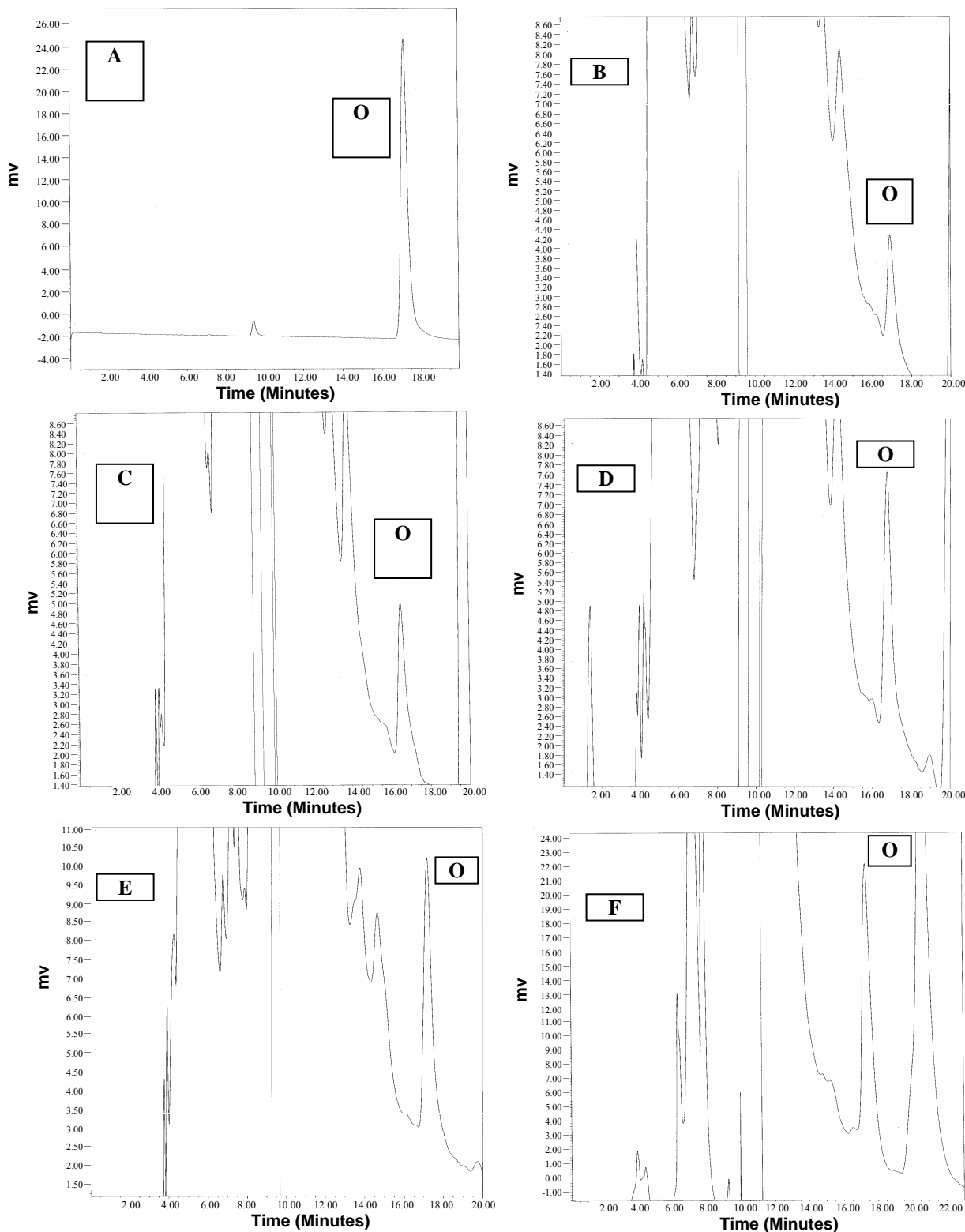
۲-۲ تهیه و پرتودهی نمونه‌ها

با تهیه‌ی نمونه‌های ران و سینه‌ی مرغ با سنین ۶ تا ۱۰ هفته از فروشگاه‌های سطح شهر تهران و انتقال آن‌ها به آزمایشگاه، پوست و بافت چربی نمونه‌ها جدا شده، و حدود بیست گرم از هر نمونه در لوله‌های آزمایش پیرکس قرار داده شدند و پس از بستن درب آن‌ها، در دمای 20°C - نگهداری شدند. نمونه‌ها به صورت منجمد توسط پرتو گامای ^{60}Co با آهنگ دز ۱/۸ kGy/h و در معرض هوا پرتودهی شدند. هنگام پرتودهی برای منجمد نگه‌داشتن نمونه‌ها از یخ خشک استفاده گردید. بعد از پرتودهی، خشک کردن نمونه‌ها به مدت ۷۲ ساعت توسط دستگاه خشک‌کننده- منجمدکننده^(۱۱) انجام و سپس همگن شدند [۱۸ و ۱۹]. نمونه‌های توزین شده در حالت منجمد محتوی مقادیر متفاوتی (۷۳ تا ۷۸ درصد) آب بودند. لذا، خشک کردن نمونه‌ها و سپس توزین آن‌ها ضروری بود. نمونه‌ها تا زمان تجزیه در یخچال نگهداری شدند. اندازه‌گیری کمی ارتو- تیروزین موجود



۱۷ دقیقه بوده و جداسازی کامل ارتو- تیروزین از سایر ترکیبات در کروماتوگرام‌ها مشهود است.

کروماتوگرام‌های حاصل از تزریق ارتو- تیروزین و نمونه‌ی شاهد و تعدادی از نمونه‌های گوشت سینه‌ی مرغ پرتوده‌ی شده در شکل ۲ ارائه شده است. زمان بازداری ارتو- تیروزین حدود



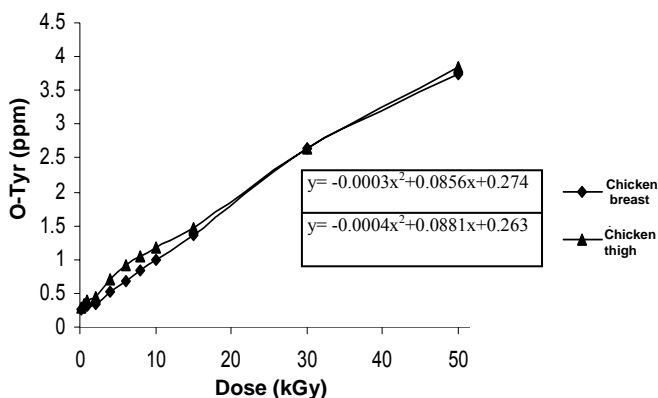
شکل ۲- کروماتوگرام‌های استاندارد ارتو- تیروزین و نمونه‌های گوشت سینه‌ی مرغ پرتوده‌ی شده [A]: ۵۰۰ ppb- ارتو- تیروزین، (B): شاهد، (C): ۲kGy، (D): ۶kGy، (E): ۱۰kGy، (F): ۵۰kGy (قله‌ی ارتو- تیروزین با حرف O نشان داده شده است).



جدول ۱- نتایج حاصل از اندازه گیری کمی ارتو- تیروزین در نمونه‌ی گوشت ران و سینه‌ی مرغ پرتودهی شده و نمونه‌های شاهد (نتایج برحسب میلی گرم ارتو- تیروزین بر گرم وزن اولیه می‌باشد).

دز پرتودهی (kGy)	سینه‌ی مرغ	ران مرغ	نمونه‌های ران مرغ	نمونه‌های سینه‌ی مرغ
شاهد	0.263 ± 0.013	0.274 ± 0.014	0.15	0.18
0.25	0.260 ± 0.016	0.292 ± 0.015	0.21	0.23
0.5	0.283 ± 0.022	0.33 ± 0.009	0.41	0.36
1	0.319 ± 0.017	0.386 ± 0.013	0.36	0.38
2	0.345 ± 0.025	0.454 ± 0.024	0.33	0.37
4	0.536 ± 0.023	0.697 ± 0.015	0.28	0.32
6	0.686 ± 0.016	0.913 ± 0.013	0.31	0.29
8	0.826 ± 0.021	1.05 ± 0.017	0.37	0.42
10	0.982 ± 0.015	1.18 ± 0.019	متوسط = 0.33 ± 0.068	متوسط = 0.32 ± 0.064
15	1.36 ± 0.017	1.66 ± 0.03		
30	2.65 ± 0.018	2.63 ± 0.021		
50	3.74 ± 0.031	3.84 ± 0.036		
50 (6 ماه پس از پرتودهی)	3.67 ± 0.021	3.91 ± 0.027		

۲-۳ نتایج اندازه‌گیری ارتو- تیروزین در نمونه‌های گوشت مرغ به منظور بررسی میزان تأثیر اکسیژن در تشکیل ارتو- تیروزین، یک نمونه‌ی گوشت سینه‌ی مرغ شاهد به دو روش اندازه‌گیری گردید. در روش اول هیدرولیز نمونه در حضور اکسیژن (بدون اکسیژن زدایی) انجام گردید و در روش دوم اکسیژن محلول موجود در محلول هیدرولیز نمونه با عبور دادن گاز نیتروژن از آن حذف گردید. با سه بار اندازه‌گیری، مقدار ارتو- تیروزین در حضور اکسیژن 0.297 ± 0.021 و در نبود اکسیژن 0.263 ± 0.016 تعیین گردید. نتیجه‌ی حاصل نشان‌دهنده‌ی اختلاف ۱۳ درصد بین دو روش بود و به دلیل تأثیر قابل ملاحظه‌ی اکسیژن در تشکیل ارتو- تیروزین، در کلیه‌ی تجزیه‌های بعدی، هیدرولیز نمونه‌ها با حذف اکسیژن انجام گردید. بدین ترتیب روش به کار رفته برای اندازه‌گیری ارتو- تیروزین در نمونه‌های پرتودهی شده عبارت است از: استفاده از نمونه‌ی خشک شده- منجمد شده، هیدرولیز اسیدی نمونه با حذف اکسیژن محیط هیدرولیز، جداسازی و اندازه‌گیری ارتو- تیروزین با استفاده از کروماتوگرافی مایع فاز معکوس.



شکل ۳- منحنی‌های پاسخ دز نمونه‌های ران و سینه‌ی مرغ پرتودهی شده (منحنی‌های غلظت ارتو- تیروزین (mg/gr) برحسب دز پرتودهی (kGy)).

۴- بحث و نتیجه‌گیری

محدودیت جداسازی ایزومرهای تیروزین به مقدار بسیار زیاد تیروزین طبیعی (پارا- تیروزین) مربوط می‌شود. یک محلول ۵۰ میلی‌لیتری حاوی ۱۲۵ میلی‌گرم گوشت با ۲٪ تیروزین (W/W) حاوی تقریباً ۵۰ میلی‌گرم تیروزین در لیتر است در حالی که غلظت‌های ارتو و متا- تیروزین در محدوده‌ی ۱۰ تا ۲۰ $\mu\text{g/l}$ است. بنابراین غلظت تیروزین طبیعی ۱۰۰۰ تا ۱۰۰۰۰ برابر تیروزین‌های معرف پرتوگیری (ارتو و متا- تیروزین) است.

برای بررسی اثر پرتو گاما در تولید ارتو- تیروزین در مواد غذایی و نیز ارزیابی کارآیی روش ارتو- تیروزین در تشخیص مواد غذایی پرتودهی شده، نمونه‌های منجمد شده‌ی گوشت ران و سینه‌ی مرغ تا دز ۵۰ kGy پرتودهی و مقدار ارتو- تیروزین هر نمونه با سه بار اندازه‌گیری تعیین گردید. نتایج کمی اندازه‌گیری ارتو- تیروزین نمونه‌های پرتودهی شده به همراه انحراف معیار اندازه‌گیری‌ها (RSD) در جدول ۱ داده شده است. هم‌چنین منحنی‌های پاسخ دز (منحنی‌های غلظت ارتو- تیروزین (mg/gr) - دز پرتودهی (kGy)) نمونه‌های پرتودهی شده در شکل ۳ ترسیم شده‌اند. این نتایج نشان می‌دهد که مقدار ارتو- تیروزین تشکیل شده در نمونه‌ها متناسب با دز پرتودهی بوده و این وابستگی خطی را می‌توان توسط معادله‌های نشان داده شده در شکل ۳ بیان نمود. با انجام آزمون آماری t در سطح اطمینان ۹۵٪ تفاوت معنی‌داری بین مقادیر ارتو- تیروزین اندازه‌گیری شده در نمونه‌های ران و سینه مرغ مشاهده شد [۲۲]. لذا هنگام نمونه‌برداری از نمونه‌های شاهد و پرتودهی شده باید از گوشت قسمت‌های مشابه اندام‌های جانوری برای بررسی پرتودیدگی احتمالی آن‌ها استفاده نمود.



ارتو- تیروزین موجود در نمونه‌های گوستی به منظور بیان پرتودیدگی آن‌ها ناممکن خواهد بود. مقدار زمینه‌ای متفاوت هر یک از نمونه‌ها نشان می‌دهد که باید تحقیقات بیش تری صورت گیرد تا تأثیر متغیرهای زیست‌شناختی نظیر سن حیوان، شرایط ذخیره، چگونگی تغذیه، معالجه و... در تشکیل ارتو- تیروزین مشخص شود. با انجام آزمون آماری t و در سطح اطمینان ۹۵٪ و با در نظر گرفتن مقادیر زمینه‌ای ارتو- تیروزین اندازه‌گیری شده و مقادیر ارتو- تیروزین تشکیل شده در نمونه‌های پرتودهی شده در دزهای مختلف، تشخیص پرتودیدگی نمونه‌هایی امکان‌پذیر است که در دزهای ۴kGy و بالاتر پرتودهی شده‌اند. با توجه به این که تا دز ۵۰kGy با افزایش دز، مقادیر ارتو- تیروزین تشکیل شده در نمونه‌ها نیز به طور خطی افزایش می‌یابد، اندازه‌گیری ارتو- تیروزین روش مناسبی برای تشخیص نمونه‌هایی است که در دزهای غیرمجاز بالا پرتودهی شده‌اند. اندازه‌گیری ارتو- تیروزین نمونه‌های پرتودهی شده در ۵۰kGy بعد از ۶ ماه نگهداری آن‌ها (به صورت منجمد) تکرار گردید. مقدار ارتو- تیروزین موجود در آن‌ها تغییر معنی‌داری را نشان نداد (جدول ۱). این امر نشان‌دهنده‌ی پایداری ارتو- تیروزین در نمونه‌ها بوده و بدین ترتیب عامل تشخیص پرتودیدگی از پایداری مناسب برخوردار است.

نوع تغییراتی که در اثر فرایند پرتودهی مواد غذایی در ترکیبات شیمیایی موجود در آن‌ها ایجاد می‌شود در درجه‌ی اول به نوع ترکیب شیمیایی موجود در ماده‌ی غذایی چون پروتئین‌ها، چربی‌ها، قندها و... بستگی دارد. علاوه بر آن شرایط پرتودهی نظیر میزان دز، درجه‌ی حرارت محیط پرتودهی، حضور و عدم حضور اکسیژن و... نیز مؤثراند. برهم‌کنش مواد غذایی با تابش یوننده منجر به تشکیل رادیکال‌های آزادی می‌شود که بسیار فعال بوده و منجر به جمعیت زیادی از واکنش‌های ممکن با اجزای موجود در ماده غذایی می‌شود. رادیکال‌های آزاد تنها در فرایند پرتودهی به وجود نمی‌آیند بلکه آن‌ها می‌توانند از طریق گرمادهی، فوتولیز، کاتالیز آنزیمی، کاتالیز یون فلزی، آسیاب کردن و یا در طی ذخیره‌ی محصولات غذایی از راه برهم‌کنش با اکسیژن و پروکسیدها ایجاد شوند. با آگاهی از این موضوع، تعجب برانگیز نخواهد بود که واکنش‌های شیمیایی ناشی از پرتودهی در مواد غذایی منجر به تشکیل گونه‌هایی از ترکیبات

[۱۸]. غلظت‌های کم ارتو و متا- تیروزین نیازمند تزریق زیاد نمونه به ستون کروماتوگرافی است. از طرف دیگر به علت بسیار زیادتر بودن پارا- تیروزین نسبت به دو ایزومر دیگر، قله‌ی مربوط به تیروزین طبیعی با قله‌های ارتو و متاتیروزین هم‌پوشانی کرده و اندازه‌گیری کمی دقیق آن‌ها را با مشکل مواجه می‌سازد زیرا قله‌ی ارتو- تیروزین بر روی دنباله‌ی قله‌ی پارا- تیروزین ظاهر می‌گردد و میزان تفکیک بین این دو قله به میزان زیادی تحت تأثیر شرایط روزانه‌ی ستون و فاز متحرک و آلودگی‌های ناشی از تزریقات متوالی نمونه‌ها قرار می‌گیرد و در نتیجه اندازه‌گیری کمی ارتو- تیروزین از تکرارپذیری مناسبی برخوردار نمی‌باشد. هم‌چنین در ستون‌های با بشقابک نظری^(۱۲) کم اجزای دیگری از نمونه با زمان بازداری نزدیک به ارتو- تیروزین از ستون خارج می‌شوند و سبب عدم تفکیک کامل قله‌ها می‌شوند. در اکثر مقالات ارایه شده در زمینه‌ی روش ارتو- تیروزین زمان بازداری در ستون تجزیه‌ای در حدود ۱۰ تا ۱۲ دقیقه می‌باشد [۱۸ و ۱۹]. در این تحقیق با استفاده از ستون Spherisorb ODS2 (25cm) و برنامه‌ی کروماتوگرافیکی مناسب جداسازی زمان بازداری ارتو- تیروزین در ستون به حدود ۱۷ دقیقه افزایش یافته و میزان جداسازی ارتو- تیروزین در خط مبنای^(۱۳) آن از سایر ترکیبات به میزان زیادی افزایش یافت (شکل ۲). در سیستم حلالی به کار رفته، با استفاده از برنامه‌ی شویش شیب‌دار^(۱۴) مقدار حلال آلی فاز متحرک در مدت زمان ۲۰ دقیقه از یک درصد به هشتاد درصد رسانده شد و بدین ترتیب با ایجاد تأخیر در خروج ارتو- تیروزین از ستون، جداسازی در خط مبنای آن از سایر ترکیبات حاصل گردید.

برای تعیین مقادیر زمینه‌ای ارتو- تیروزین در نمونه‌های مختلف، ران و سینه‌ی هشت مرغ با سن ۶ تا ۱۰ هفته انتخاب و مقدار ارتو- تیروزین موجود در آن‌ها اندازه‌گیری شد که مقدار متوسط آن در نمونه‌های ران مرغ برابر 0.33 ± 0.068 و در نمونه‌های سینه‌ی مرغ برابر 0.32 ± 0.064 تعیین گردید. نتایج حاصل با مقادیر ارتو- تیروزین گزارش شده برای نمونه‌های گوشت مرغ توسط هارت، میاهارا، چواکی و افرمان مطابقت دارد [۱۰، ۱۴ و ۱۸]. این نتایج نشان می‌دهد که مقادیر زمینه‌ای ارتو- تیروزین در نمونه‌های پرتودهی نشده از نمونه‌ای به نمونه دیگر تغییر می‌کند. بدین لحاظ تعیین مقادیر عددی برای

**References:**

1. IAEA-TECDOC-587, "Analytical detection methods for irradiated foods, A review of current literature," Joint FAO/IAEA Division of Nuclear Techniques in Food and Agriculture, Austria, March (1991).
2. C.H. McMurray, "Detection methods for irradiated foods: Current status," Cambridge, UK, Royal Society of Chemistry (1996).
3. H. Delincee, "Analytical methods to identify irradiated food-a review," Radiat. Phys. Chem, 63, 455-458 (2002).
4. The European Parliament and of the Council, "Food and food ingredients treated with ionizing radiation," Off.J. L006, 16-23 (1999).
5. FDA, "Irradiation in the production, processing and handling," Fed. Reg. 62, 64107-64112 (1997).
6. R.A. Molins, "Food irradiation: Principles and applications," Johan Wiley & Sons, New York (2001).
7. M. Miyahara, H. Ito, T. Nagasawa, T. Kamimura, A. Saito, "Determination of o-tyrosine production in aqueous solutions of phenylalanine irradiated with gamma ray, using HPLC with automated pre-column derivatization and LASER fluorometric detection," J. Health. Sci. 46, 192-199 (2000).
8. L.R. Karam, M.G. Simic, "Detecting irradiated foods: Use of hydroxyl radical biomarkers," Anal. Chem. 60, 1117A-1120A (1988).
9. H. Zegota, K. Kolodziejczyk, M. Krol, B. Krol, "O-tyrosine hydroxylation by OH^o Radicals. 2, 3-Dopa and 2, 5-Dopa formation in γ -irradiated aqueous solution," Rad. Phys. Chem. 72. 25-33 (2005).
10. R.J. Hart, J.A. White, W.J. Ried, "Technical note: Occurrence of o-tyrosine in non-irradiated foods," International J. food sci. Tech. 23, 643-647 (2007).
11. L.R. Karam, M.G. Simic, "Formation of o-Tyrosine by radiation and organic solvents in chicken tissue," J. Biol. Chem. 265, 11581-11585 (1990).

شیمیایی شود که از قبل در ماده‌ی غذایی وجود داشته و یا در اثر فرایندهای دیگر ذکر شده در آن ایجاد شده‌اند. بنابراین روش ارتو- تیروزین همانند سایر روش‌های تشخیص مواد غذایی پرتودهی شده اساساً مجبور است به غلظت نسبی گونه‌های شیمیایی مورد بررسی اعتماد کند. با توجه به نتایج حاصل از اندازه‌گیری ارتو- تیروزین در نمونه‌های گوشت ران و سینه‌ی مرغ پرتودهی نشده، به نظر می‌رسد مشکل اصلی این روش مقادیر متغیر ارتو- تیروزین یافت شده در مواد غذایی پروتئینی است که تعیین دز پرتودهی در دزهای پایین را ناممکن می‌سازد و باید آستانه‌ای از ارتو- تیروزین موجود در مواد غذایی تعریف شود تا امکان تشخیص دقیق پرتودیدگی در دزهای پایین مشخص شود.

پی‌نوشت‌ها:

- ۱- CEN: Comite Europeen de Normalisation
- ۲- ESR: Electron Spin Resonance
- ۳- TL: Thermoluminescence
- ۴- HC: Hydrocarbons Hydrocarbons
- ۵- CB: Cyclobutanone
- ۶- DNA Comet Assay
- ۷- DEFT/APC: Direct Epifluorescent Filter Technique/Aerobic Plate Count
- ۸- FDA: Food and Drug Administration
- ۹- Fenton- Type Reaction
- ۱۰- HPLC: High Performance Liquid Chromatography
- ۱۱- Freeze- Dryer
- ۱۲- Theoretical Plate
- ۱۳- Base Line
- ۱۴- Gradient Elution



- 12.M. Grootveld, R. Jain, "Methods for the detection of irradiated food stuffs: Aromatic hydroxylation and degradation of poly unsaturated fatty acids," *Radiat. Phys. Chem.* 34, 925-931 (1989).
- 13.J. Hopkins, L.J. Davis, "Detection of irradiation of meat by o-tyrosine determination," *J. Chromatogr.* 426, 155-161 (1988).
- 14.M. Miyahara, H. Ito, A. Saito, T. Nagasawa, M. Kariya, "Detection of irradiation of meats by HPLC determination for tyrosine using novel LASER Fluorometric detection with automatic pre-column reaction," *J. Health Sci.* 46, 304-309 (2000).
- 15.M. Miyahara, T. Nagasawa, T. Kamimura, H. Ito, M. Toyoda, "Identification of irradiation of boned chicken by determination of o- tyrosine and electron spin resonance spectrometry," *J. Health, sci.* 48, 79-82 (2002).
- 16.W. Meier, R. Burgin, D. Frohlich, "Analysis of o-tyrosine as a method for the identification of irradiated chicken meat," *Beta-Gamma*, 1, 34-38 (1988).
- 17.C. Willemot, R. Couture, J. Makhlof, F. Cheour, "Generation of oxyradicals in biosystems," *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 22, 350-355 (1989).
- 18.N. Chuaqui-Offermans, T. Mcdougall, "An HPLC method to determination o-tyrosine in chicken meat," *J. Agric. Food Chem.* 39, 300-302 (1991).
- 19.F.I. Ibe, R. Grinter, R. Massey, R. Homer, "Detection of o-tyrosine in irradiated chicken by reverse-phase HPLC and fluorescence detection," *Food additive & contamin. Part A*, 8(6), 787-792 (1991).
- 20.L.L. Zwart, J.H.N. Commandeur, N.P.E. Vermeulen, "Biomarkers of free radical damage, application in experimental animals and in humans," *Free Radic. Biol.* 26, 202-206 (1999).
- 21.F. Aflaki, M. Salahinejad, A. Roozbehani, "Formation of tyrosine isomers in aqueous phenylalanine solutions by gamma irradiation," 47, 23-31 (2009).
- 22.J.N. Miller, J.C. Miller, "Statistical and chemometrics for analytical chemistry," Fifth Ed. Pearson Education (2007).