مقایسه روش الکتروفورز موئینه‌ای با آشکارساز جذبی با روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا برای اندازه‌گیری مقدار هیستامین در محیط کشت میکروبی

صفورا پشنگه[۱]، سید شهرام شکرفروش[۲*]، محمود امین‌لاری[۳]، سعید حسین‌زاده[٤]

۱. دانشجوی دکتری تخصصی بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
۲. استاد بخش بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
۳. استاد بخش بیوشیمی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
٤. دانشیار بخش بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران
*نویسنده مسئول مکاتبات: shekar@shirazu.ac.ir
(دریافت مقاله: ۹۵/۱۲/۲٦ پذیرش نهایی :۹٦/۳/۷)

چکیده

حضور هیستامین در مواد غذایی نه تنها می‌تواند موجب مسمومیت مصرف کنندگان شود، بلکه یکی از شاخص‌های مهم فساد باکتریایی محسوب می‌شود. بنابراین شناسایی و اندازه‌گیری مقدار این آمین بیوژن از اهمیت بسزایی برخوردار است. در این تحقیق، برای اندازه‌گیری مقدار هیستامین تولیدی در محیط کشت TSB توسط باکتری‌های مولد هیستامین، *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* TYH1 به‌عنوان سوش استاندارد مولد هیستامین و دو سوش *استافیلوکوکوس کاپیتیس* و *استافیلوکوکوس کارنوسوس* جدا شده از شیر گوسفند و دارای ژن مولد هیستامین، هیستیدین دکربوکسیلاز، از دو روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) به‌عنوان روش مرجع و الکتروفورز موئینه‌ای با آشکارساز جذبی (CZE) استفاده شد و یافته‌های به‌دست آمده از دو روش با هم مقایسه شدند. زمان مهاجرت در روش CZE و زمان بازداری در روش HPLC برای هیستامین به‌ترتیب ٥/٤ و ۱۲/۰ دقیقه و منحنی استاندارد در محدوده µg/ml ۲۰۰– ٦/۲٥ به‌صورت خطی با معادله رگرسیون $y=0.000004x$ ($r^2=0.999$) و $y=0.000004x$ ($r^2=0.999$) به‌دست آمد. مقدار هیستامین تولید شده توسط سه سوش باکتری و اندازه‌گیری شده با دو روش مذکور تفاوت آماری معنی‌داری نداشت ($P=0.39$) و ضریب همبستگی بین یافته‌های به‌دست آمده از دو روش ۰/۹۹ بود. با توجه به یافته‌های مشابه دو روش، روش CZE به‌دلیل عدم نیاز به آماده‌سازی نمونه، سادگی، حساسیت و کم هزینه بودن به‌عنوان روشی مناسب برای اندازه‌گیری مقدار هیستامین در محیط‌های کشت میکروبی پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: هیستامین، الکتروفورزموئینه‌ای، کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا

مقدمه

آمین‌های بیوژن ترکیبات طبیعی در بسیاری از مواد غذایی می‌باشند که در طی فرآوری و نگهداری توسط میکروفلور طبیعی یا کشت میکروبی مورد استفاده، در مقادیر زیاد به‌ویژه در مواد غذایی تخمیر شده که از مواد خام با محتوای پروتئین بالا به‌دست آمده‌اند، تولید می‌شوند (Bover-Cid *et al*., 2001). آمین‌های بیوژن مانند هیستامین، در نتیجه دکربوکسیلاسیون میکروبی اسیدهای آمینه تولید شده و به خاطر اثرات سمی که برای انسان دارند، ترکیبات نامطلوبی محسوب می‌شوند (Sanceda *et al*., 1999). بعضی از آمین‌های بیوژن که به‌طور معمول در انواع مواد غذایی (مانند فرآورده‌های ماهی، پنیر، شراب، آبجو و سوسیس‌های تخمیری) یافت می‌شوند، ترکیبات آروماتیک تک‌آمینی شامل هیستامین، تیرامین، تریپتامین و فنیل‌اتیل‌آمین دارند که خاصیت وازواکتیو (Vasoactive) و روان‌گردانی (Psychoactive) از خود نشان می‌دهند (Brink *et al*., 1990). تولید آمین‌های بیوژن یکی از خصوصیات گروهی از میکروارگانیسم‌ها از جمله انتروباکتریاسه‌ها، میکروکوکاسه‌ها، گونه‌های سودوموناس، انتروکوکوس‌ها، لاکتیک اسید باکتری (Lactic Acid Bacteria: LAB) و *استافیلوکوکوس‌ها* می‌باشد (Halász *et al*., 1994).

هیستامین یکی از مهم‌ترین آمین‌های بیوژن می‌باشد که تولید آن توسط باکتری‌ها در شرایط فقر مواد مغذی افزایش می‌یابد، چرا که در این شرایط دکربوکسیلاسیون هیستیدین یک مسیر اضافی برای تولید انرژی است (Konings *et al*., 1997). این آمین بیوژن موجب مسمومیت هیستامینی می‌شود. متداول‌ترین علائم مسمومیت در انسان شامل تهوع، سختی تنفس، برافروختگی همراه با افزایش دمای بدن، تعریق، تپش قلب، سردرد، بثورات قرمز روشن، سوزش در ناحیه دهان و واکنش‌های شبه آلرژی می‌باشد (Mah *et al*., 2003).

استافیلوکوکوس‌ها شامل انواع باکتری‌های بیماری‌زا، مولد فساد و *استافیلوکوکوس‌های* استارتر در صنعت غذا می‌باشند. این کوکسی‌های گرم مثبت به‌طور طبیعی روی پوست، غدد پوستی و غشاهای مخاطی انسان و حیوانات خونگرم وجود دارند. *استافیلوکوکوس‌ها* هم‌چنین از منابع محیطی شامل آب، خاک، هوا و فرآورده‌های غذایی متعددی نظیر گوشت، پنیر و شیر جدا شده‌اند (Irlinger, 2008). استافیلوکوکوس‌هایی با توانایی تولید هیستامین از ماهی‌های نمک-سود (Hernandez-Herrero *et al*., 1999)، فرآورده‌های گوشتی تخمیر شده (Landeta *et al*., 2007) و فرآورده‌های سویا (Tsai *et al*., 2007) جدا شده‌اند. باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* TYH1، یک باکتری تولید کننده هیستامین است که از خمیر ماهی تخمیر شده جدا شده است. این باکتری قادر به تولید هیستامین تحت شرایط اسیدی در محیط حاوی گلوکز می‌باشد (Yokoi *et al*., 2011).

شناسایی هیستامین در نمونه‌های غذایی به دو دلیل حائز اهمیت می‌باشد: نخست به دلیل سمیت آن‌ها و دوم به دلیل استفاده از آن‌ها به‌عنوان شاخص کیفی غذا. روش‌های گوناگونی برای شناسایی هیستامین در نمونه‌های غذایی پیشنهاد شده است. این روش‌ها شامل

کروماتوگرافی لایه نازک، کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا با آشکارساز جذبی یا فلورسانس همراه با مشتق‌سازی، کروماتوگرافی گازی، کروماتوگرافی تبادل یونی و اسپکترومتری جرمی می‌باشند. در اکثر روش‌های فوق، زمان لازم برای جداسازی هیستامین در محدوده ۱۲-۳ دقیقه و در بعضی موارد بسیار طولانی می‌باشد. پیچیدگی ماتریکس غذایی یکی از دلایل طولانی شدن زمان جداسازی می‌باشد که با تداخل در ظهور پیک‌های شناسایی نمود می‌یابد. بنابراین روش‌هایی برای آماده‌سازی نمونه قبل از آنالیز انجام می‌شود که اثر تداخلی سایر ترکیبات غذایی را کاهش دهد. این امر به‌نوبه خود باعث افزایش هزینه و طولانی‌تر شدن بازه زمانی آنالیز می‌گردد. الکتروفورز - موئینه‌ای (Capillary Electrophoresis) یک روش شناسایی است که قادر به ایجاد شرایط مناسب برای جداسازی ترکیب مورد نظر و کاهش پیک‌های تداخلی ناشی از سایر ترکیبات غذایی می‌باشد که این خود با برطرف کردن نیاز به آماده‌سازی قبل از آنالیز موجب سرعت بخشیدن به فرآیند شناسایی می‌شود (Vitali *et al.*, 2013).

هدف از این مطالعه مقایسه روش الکتروفورز موئینه‌ای منطقه‌ای با آشکارساز جذبی (Capillary Zone Electrophoresis: CZE) با روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (High Performance Liquid Chromatography: HPLC) به‌عنوان روش مرجع، برای اندازه‌گیری مقدار هیستامین تولیدی توسط *استافیلوکوکوس*های تولید کننده هیستامین در محیط کشت باکتریایی می‌باشد.

مواد و روش‌ها

- باکتری‌ها و محیط کشت

در این تحقیق از سه سوش استافیلوکوکوس مولد هیستامین شامل سوش *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* TYH1 اهدایی پروفسور ویکتور نیزت، دانشگاه کالیفرنیا سن‌دیگو و دو سوش *استافیلوکوکوس کاپیتیس* و *استافیلوکوکوس کارنوسوس* که در تحقیقات اخیر نویسندگان مقاله از شیر گوسفند جدا شده و دارا بودن ژن تولید هیستامین، هیستیدین دکربوکسیلاز (Histidine decarboxylase: hdc) در آن‌ها تأیید گردیده است، استفاده شد. باکتری‌های انتخاب شده در محیط TSB (Merck ،Germany) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری و احیا شدند. ۱۰ میکرولیتر از کشت تازه هر باکتری روی محیط کشت جامد بردپارکر آگار (Oxoid, England) به‌صورت خطی کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ۲٤ ساعت تا ظهور کلنی‌های سیاه‌رنگ گرمخانه‌گذاری شدند. تک کلنی حاصل از کشت خطی، به ۵ میلی‌لیتر محیط TSB با غلظت ۰/۵ میلی‌مولار هیستیدین (Sigma, USA) منتقل و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به‌مدت ۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. کنترل منفی و مثبت به‌ترتیب شامل ۵ میلی‌لیتر محیط TSB با غلظت ۰/۵ میلی‌مولار هیستیدین بدون باکتری و ۵ میلی‌لیتر محیط TSB حاوی ۱ میلی‌مولار هیستامین (Sigma, USA) بدون باکتری آماده و گرمخانه‌گذاری شدند. سوپ حاصل از نمونه‌های گرمخانه‌گذاری شده با سانتریفوژ در دور ۱٤۰۰۰ دور در دقیقه (rpm) در دمای ٤ درجه سلسیوس جدا و برای اندازه‌گیری مقدار

هیستامین تولیدی در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

- اندازه‌گیری هیستامین با روش HPLC

محلول‌های استاندارد با استفاده از غلظت‌های ۶/۲۵-۲۰۰µg/ml هیستامین دی‌هیدروکلراید در اسید هیدروکلردریک ۰/۱ مولار تهیه شد. به ۱ میلی‌لیتر از هریک از محلول‌های استاندارد ۰/۲ میلی‌لیتر سود ۲ مولار و ۰/۳ میلی‌لیتر بی‌کربنات اشباع اضافه و مخلوط به ۲ میلی‌لیتر محلول ۱٪ دنسیل‌کلراید (Dansyl Chloride) در استون افزوده شد. در ادامه پس از مخلوط کردن با ورتکس، مخلوط حاصل به‌مدت ٤٥ دقیقه در ٤٠ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری و با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر آمونیاک و ادامه گرمخانه‌گذاری به‌مدت ۳۰ دقیقه حجم محلول با استفاده از استونیتریل به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. محلول حاصل با سرعت ۱۰۰۰۰g به مدت ۵ دقیقه در دمای ٤ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شده و محلول فوقانی پس از فیلتراسیون با فیلتر ۰/٤٥ میکرون به دستگاه HPLC تزریق گردید.

از روش مشابهی جهت آماده‌سازی ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون فیلتر شده کنترل منفی، مثبت و نمونه‌های باکتریایی و تزریق به HPLC استفاده شد.

به منظور آنالیز مقدار هیستامین از دستگاه HPLC مجهز به آشکارگر UV-Visible (طول موج ٢٥٤ نانومتر) و ستون فازمعکوس، فاز C18 (KNAUER, Germany)، استفاده شد. فاز متحرک مخلوطی از نسبت‌های مختلف استونیتریل و آب بود (Lee *et al*., 2015).

- اندازه‌گیری هیستامین با روش CZE

مقدار هیستامین در نمونه‌ها با تغییرات اندکی در روش نومانگولو و همکاران، با دستگاه CZE پرینس، مدل ۱ آسانسوره و سری ٤٥٠، (PrinCE-C 450 Series, Netherlands) اندازه‌گیری شد (Numanoglu *et al*., 2008). این دستگاه مجهز به یک آشکارساز جذبی، طول موج ۲۱۰ نانومتر، یک دستگاه کنترل دمایی، دمای ۲۵ درجه سلسیوس و یک نرم‌افزار آنالیز داده، DAx، می‌باشد. نمونه‌ها و استاندارد به‌صورت هیدرودینامیکی (فشار ۵۰ میلی‌بار به‌مدت ۳ ثانیه) به دستگاه تزریق و تحت شرایط قطبیت و ولتاژ ثابت ۲۰ کیلوولت آنالیز شدند. طول لوله موئین و قطر داخلی آن به ترتیب ۵۲ سانتی‌متر و ۷۵ میکرومتر بود و سطح زیر منحنی برای اندازه‌گیری مقدار هیستامین استفاده شد. بافر جداسازی شامل غلظت ۵۰ میلی‌مولار نمک منوسدیم‌فسفات بود که pH آن با اسیدفسفریک ۱ میلی‌مولار تنظیم گردید (pH =۲/۵).

برای آماده‌سازی، یک لوله موئین جدید با هیدروکسیدسدیم ۱ مولار، آب مقطر و اسیدفسفریک ۱ مولار و قبل از هر بار تزریق نمونه، با اسیدفسفریک ۰/۱ مولار (۸ دقیقه) و بافر جداسازی ۵۰ میلی‌مولار (۱۲ دقیقه) شسته و آبکشی شد.

استوک استاندارد هیستامین (غلظت ۱۰۰۰ µg/ml) با حل کردن ۱۰ میلی‌گرم هیستامین در ۱۰ میلی‌لیتر اسید هیدروکلریک ۰/۱ مولار و سایر غلظت‌های استاندارد (۶/۲۵ -۲۰۰ µg/ml) با رقیق کردن استوک استاندارد با اسید هیدروکلریک ۰/۱ مولار آماده و پس از فیلتراسیون با فیلتر سر سرنگی ۰/٤٥ میکرومتری به دستگاه CZE تزریق شدند (Numanoglu *et al*., 2008).

برای استخراج هیستامین نمونه‌ها، ۱ میلی‌لیتر از

محیط کشت مایع TSB را در یک میکروتیوب ۵ میلی‌لیتری ریخته و ۲ میلی‌لیتر اسید هیدروکلریک ۰/۱ مولار به آن اضافه کرده و با استفاده از ورتکس (۲ دقیقه) محلول حاصل یکنواخت شد. سپس محلول به‌مدت ۵ دقیقه، با دور ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای ۲۵ درجه سلسیوس سانتریفوژ و مایع رویی جدا شد. مایع رویی مجدداً به میکروتیوب ۵ میلی‌لیتری منتقل و تا حجم ٤ میلی‌لیتر با اسید هیدروکلریک ۰/۱ مولار پر شد. محلول حاصل پس از مخلوط و فیلتر شدن آماده تزریق به دستگاه CZE شد (Cinquina *et al.*, 2004; Numanoglu *et al.*, 2008).

یافته‌ها

مقدار هیستامین تولیدی توسط باکتری‌های مولد هیستامین در محیط کشت TSB، با استفاده از روش‌های HPLC و CZE اندازه‌گیری شد. اندازه‌گیری‌ها در سه تکرار انجام شدند. برای رسم منحنی استاندارد، تزریق هر یک از غلظت‌های استاندارد با ۵ تکرار در فواصل زمانی متفاوت و در محدوده µg/ml ۲۰۰ – ٦/۲۵ انجام شد. مقدار هیستامین برآورد شده با روش‌های HPLC و CZE برای هر یک از غلظت‌های استاندارد در جدول (۱) قابل مشاهده است.

جدول (۱)- مقایسه مقدار هیستامین اندازه‌گیری شده با روش‌های کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) و آشکارساز جذبی (CZE)

غلظت استاندارد هیستامین تزریق شده (µg/ml)	مقدار هیستامین برآورد شده با روش HPLC (µg/ml)	مقدار هیستامین برآورد شده با روش CZE (µg/ml)
٦/۲۵	٦/۱۸٦ ± ۰/۵۷۸ [a]	٦/۲۳۰ ± ۰/۰۱۵ [a]
۱۲/۵	۱۲/٤۹۲ ± ۰/۰۲۹ [b]	۱۲/٤٦۸ ± ۰/٤۹۸ [b]
۲۵	۲٤/۹۳۹ ± ۰/۱۱۲ [c]	۲٤/۹٤۱ ± ۰/۱۰۸ [c]
۵۰	٤۹/۹۸۳ ± ۰/۱۰۰ [d]	٤۹/۷۵۹ ± ۰/۱٦٦ [d]
۱۰۰	۹۹/۳٦۸ ± ۱/۰۲۰ [e]	۹۸/۲۵۷ ± ۱/۹۹۹ [e]
۲۰۰	۱۹۸/۹۳۲ ± ۱/۹۲۳ [f]	۱۹۹/۲٦۱ ± ۲/۲۲٦ [f]

حروف غیر مشابه نشانگر تفاوت آماری در سطر می‌باشد ($P < 0.01$).

در روش HPLC، زمان بازداری (Retention time) هیستامین ۱۲ دقیقه و منحنی استاندارد در محدوده استاندارد یکسان به‌صورت خطی با معادله رگرسیون خطی $y=0.000004x$ ($r^2=0.999$) به‌دست آمد. در روش CZE، زمان مهاجرت (Migration time) هیستامین ٥/٤ دقیقه و منحنی استاندارد در محدوده µg/ml ۲۰۰ – ٦/۲۵ به‌صورت خطی با معادله رگرسیون خطی $y=0.000004x$ ($r^2=0.999$) به‌دست آمد. مقدار هیستامین اندازه‌گیری شده با روش‌های HPLC و CZE، در نمونه‌های کنترل منفی، کنترل مثبت و نمونه‌های باکتریایی در جدول (۲) مشاهده می‌شود.

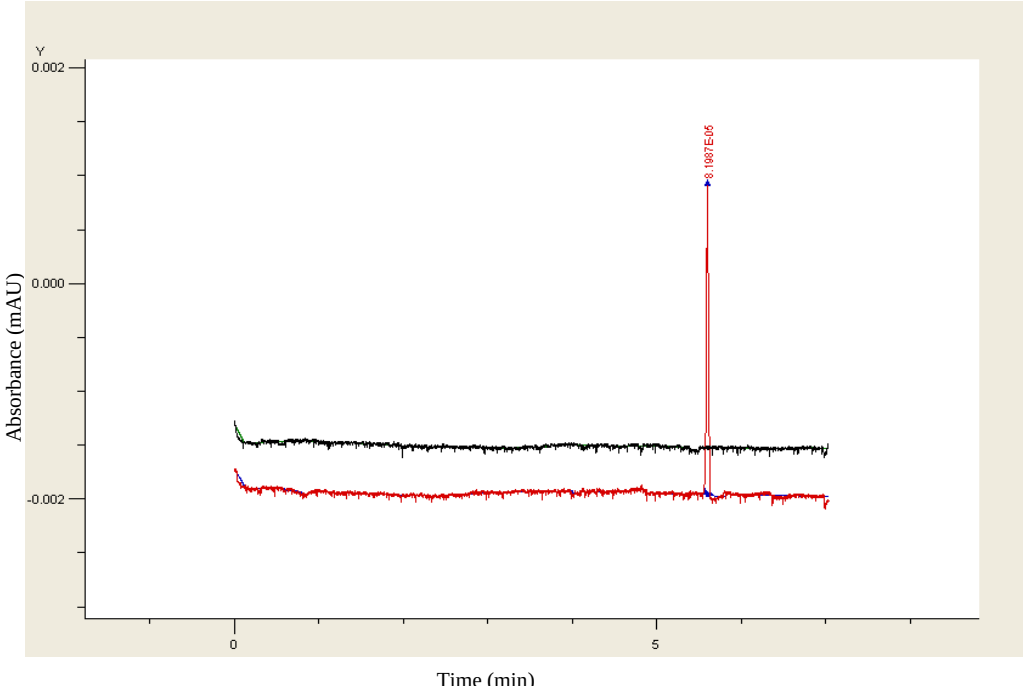
.

جدول (۲)- مقایسه مقدار هیستامین اندازه‌گیری شده با روش‌های کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) آشکارساز جذبی (CZE) در محیط کشت TSB حاوی ۰/۵ میلی مول هیستیدین و سه سوش باکتری استافیلوکوکوس بعد از ۲٤ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس

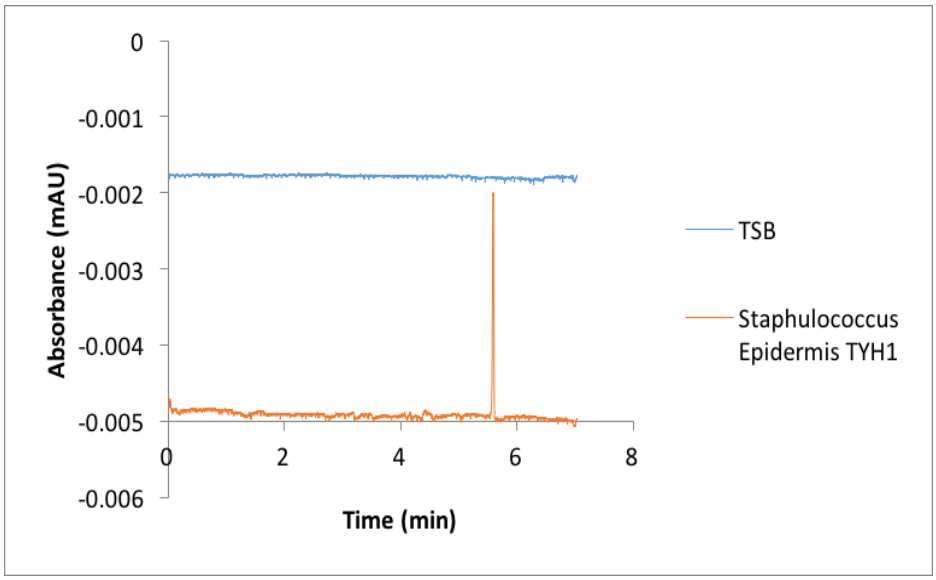
سوش باکتری	مقدار هیستامین برآورد شده با روش HPLC (µg/ml)	مقدار هیستامین برآورد شده با روش CZE (µg/ml)
کنترل منفی	۰ [a]	۰ [a]
کنترل مثبت	۱۷۲/۹۳ ± ۵/۰۳ [b]	۱۷۳/۵۵ ± ٤/٦٨ [b]
استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس TYH1	٤۹/۳۵ ± ۰/۹۸ [c]	٤۹/۹٤ ± ۰/۰٦ [c]
استافیلوکوکوس کاپیتیس	۱۷/٤٦ ± ۰/۸٤ [d]	۱۷/۳٤ ± ۱/۰۲ [d]
استافیلوکوکوس کارنوسوس	۸/۹٦ ± ۱/۰۱ [e]	۹/۱٤ ± ۰/۹۳ [e]

کنترل منفی شامل محیط کشت TSB حاوی ۰/۵ میلی‌مول هیستیدین و کنترل مثبت شامل محیط کشت TSB حاوی ۱ میلی‌مول هیستامین بود. حروف غیرمشابه نشانگر تفاوت آماری در سطر می‌باشد ($P < 0.01$).

در محیط کشت TSB با غلظت ۰/۵ میلی‌مولار هیستیدین بدون باکتری (کنترل منفی)، در روش‌های CZE و HPLC منحنی هیستامین مشاهده نشد و مقدار آن صفر برآورد گردید. در نمودار (۱)، الکتروفروگرام هیستامین در نمونه کنترل مثبت و کنترل منفی در شرایط بهینه آنالیز با روش CZE و در نمودار (۲) الکتروفروگرام کنترل منفی و نمونه حاوی TYH1 قابل مشاهده می‌باشد. در کنترل منفی هیچ پیکی به‌دست نیامد و مقدار هیستامین برآورد شده در سایر نمونه‌ها با هر دو روش CZE و HPLC در محدوده غلظت‌های استاندارد هیستامین شناسایی شدند که ضریب همبستگی دو روش CZE و HPLC در تمامی نمونه ۰/۹۹ می‌باشد. در هر دو روش CZE و HPLC، بیشترین مقدار هیستامین تولید شده مربوط به *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* TYH1 با مقدار µg/ml ۰/۰٦ ± ٤۹/۹٤ می‌باشد. از نظر دقت و حساسیت در تشخیص هیستامین تفاوتی بین روش‌های CZE و HPLC مشاهده نشد.



نمودار (۱)- الکتروفروگرام هیستامین در نمونه کنترل مثبت شامل TSB حاوی ۱ میلی مولار هیستامین (نمودار قرمز رنگ) و کنترل منفی شامل TSB حاوی ۰/۵ میلی مولار هیستیدین (نمودار سیاه رنگ) در شرایط بهینه آنالیز ($NaH_2PO_4.2H_2O$) بافر جداسازی و ولتاژ ۲۰ کیلو ولت) در روش CZE.



نمودار (۲)- الکتروفروگرام هیستامین تولید شده در محیط TSB توسط سوش *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* TYH1 در روش CZE

بحث و نتیجه‌گیری

یافته‌های به‌دست آمده در این تحقیق، در مورد مقایسه دو روش CZE و HPLC برای اندازه‌گیری هیستامین، با یافته‌های سایر تحقیق‌ها همخوانی دارد. هیستامین در روش CZE در کمتر از ٦ دقیقه و در روش HPLC تا ۲۰ دقیقه شناسایی شد. از طرفی در روش HPLC آماده‌سازی نمونه قبل از تزریق بسیار زمان‌بر بوده و ترکیبات مورد استفاده برای آماده‌سازی بسیار حساس به دما و اکسیداسیون هستند و این امر باعث ایجاد خطا در اندازه‌گیری‌ها می‌شود. دنسیل کلراید ترکیب مورد استفاده در روش HPLC با آشکارساز جذبی، ترکیبی بسیار گران قیمت و حساس بوده که متأسفانه ترکیبات مشابه و تقلبی آن در بازار زیاد شده و دسترسی به ترکیب اصلی آن تا حدودی دشوار می‌باشد. در روش CZE با ایجاد شرایط مناسب برای جداسازی ترکیب مورد نظر و کاهش پیک‌های تداخلی ناشی از سایر ترکیبات غذایی، نیاز به آماده-سازی قبل از آنالیز مرتفع می‌گردد که موجب سرعت بخشیدن به فرآیند شناسایی، کاهش هزینه و کاهش خطا در تشخیص ترکیب مورد نظر می‌شود. در مجموع هزینه آنالیز یک نمونه یکسان در روش CZE، به دلیل ارزان قیمت بودن ترکیبات مورد استفاده در این روش، کمتر از نصف هزینه مورد نیاز با روش HPLC می‌باشد. همچنین دستگاه CZE از نظر قیمت تمام شده در مقایسه با دستگاه HPLC، ارزان‌تر بوده و می‌توان گفت که CZE روشی انتخابی برای اندازه‌گیری مقدار هیستامین می‌باشد.

در تحقیقات قبلی مقدار هیستامین در کنسرو ماهی تن (ER *et al*., 2014)، ماهی تن (Vitali *et al*., 2013) و گوجه و سس گوجه (Bolygo *et al*., 2000) با روش CZE اندازه‌گیری شده است. کم‌ترین حد تشخیص هیستامین در تحقیقات انجام شده ۰/۲ µg/ml بود (Bolygo *et al*., 2000). در یافته‌های مطالعه‌ای، روش CZE به‌عنوان روشی سریع و حساس، بدون نیاز به مشتق‌سازی و آماده‌سازی نمونه قبل از آنالیز و تنها با نیاز به رقیق‌سازی، استخراج اسیدی هیستامین و فیلتراسیون برای اندازه‌گیری هیستامین در نمونه‌های غذایی (سالامی، پنیر، شراب و آبجو)، معرفی گردید (Kvasnicka and Voldrich, 2006). در مطالعات دیگری نیز دو روش CZE و HPLC را با هم مقایسه شده‌اند و به این نتیجه رسیدند که آمین‌های بیوژن با روش CZE در کمتر از ۱۰ دقیقه و در روش HPLC در کمتر از ۲۰ دقیقه قابل شناسایی هستند که با یافته‌های به‌دست آمده در این تحقیق هم‌خوانی دارد (Lange *et al*., 2002).

در آنالیز آمین‌های بیوژن در مواد غذایی دو مشکل اساسی وجود دارد. پیچیدگی ماتریکس غذایی و غلظت پایین بعضی از آمین‌های بیوژن در آن. این دو مشکل می‌توانند موجب غیرقابل اندازه‌گیری شدن بعضی از آمین‌های بیوژن شوند. بنابراین روش‌های مشتق‌سازی برای تمیز و قابل‌تشخیص کردن ترکیب مورد نظر ضروری می‌باشد که می‌توان این مرحله را نقطه‌ی بحرانی و در عین حال زمان‌بر روش‌های آنالیزی در نظر گرفت.

تحقیقات زیادی بر روی گونه‌های مختلف باکتریایی

به‌ویژه گونه‌های استافیلوکوکوس برای ارزیابی توانایی آن‌ها در تولید آمین‌های بیوژن و خصوصاً هیستامین انجام شده است. در اکثر این تحقیقات از روش HPLC با آشکارساز جذبی یا فلورسانس همراه با مشتق‌سازی استفاده شده است (Gardini *et al*., 2002; Simonova *et al*., 2006; Mah and Hwang, 2009; Lu *et al*., 2010; Simion *et al*., 2014; Lee *et al*., 2015). مشتق‌سازی نمونه‌ها قبل از تزریق به دستگاه HPLC، بسته به نوع آشکارساز، مستلزم استفاده از ترکیبات دنسیل کلراید و اورتوفتالآلدهید (*o*-phthalaldehyde: OPA) به‌ترتیب برای آشکارسازهای جذبی و فلورسانس می‌باشد که علاوه بر طولانی شدن زمان اندازه‌گیری، ترکیبات مذکور بسیار گران قیمت هستند. در روش CZE با وجود بودن این دو مشکل و بدون نیاز به مشتق‌سازی مقادیر جزئی هیستامین قابل اندازه‌گیری می‌باشد.

این تحقیق نشان داد که روش CZE یک روش ارزان با زمان آنالیز کوتاه و دارای حساسیت و ویژگی لازم برای شناسایی و اندازه‌گیری هیستامین در محیط کشت میکروبی می‌باشد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از آقای شمسایی کارشناس آزمایشگاه مرکزی دانشکده دامپزشکی دانشگاه شیراز به خاطر همکاری در این مطالعه و پروفسور ویکتور نیزت، دانشگاه کالیفرنیا سن‌دیگو، به خاطر تأمین سوش TYH1 باکتری *استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس* تشکر می‌نماییم.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

منابع

- Bolygo, E., Cooper, P.A., Jessop, K.M. and Moffatt, F. (2000). Determination of histamine in tomatoes by capillary electrophoresis. Journal of AOAC International, 83: 89–94.
- Bover-Cid, S., Izquierdo-Pulido, M. and Vidal-Carou, M.C. (2001). Effect of interaction between a low tyramine-producing Lactobacillus and proteolytic staphylococci on biogenic amine production during ripening and storage of dry sausage. International Journal of Food Microbiology, 65: 113–123.
- Brink, B., Damirik, C., Joosten, H.M.L.J. and Huisin't Veld, J.H.J. (1990). Occurrence and formation of biologically active amines in foods. International Journal of Food Microbiology, 11: 73–84.
- 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. Journal of Chromatography A, 1032: 79–85.
- Er, B., Demirhan, B., Bas, S.Y., Yentur, G. and Oktem, A.B. (2014). Determination of histamine level in canned tuna fish. Bulgarian Journal of Agricultural Science, 20 (No. 4): 834–838.
- Gardini, F., Martuscelli, M., Crudele, M.A., Paparella, A. and Suzzi, G. (2002). Use of *Staphylococcus xylosus* as a starter culture in dried sausage: effect on the biogenic amine content. Meat Science, 61: 275–283.

- Halász, A., Bara´th, A., Simon-Sarkadi, L. and Holzapfel, W.H. (1994). Biogenic amines and their production by microorganisms in foods. Trends in Food Science and Technology, 5: 42–49.
- Hernandez-Herrero M.M., Roig-Sague´s A.X., Rodr´ıguez-Jerez J.J. and Mora-Ventura M.T. (1999) Halotolerant and halophilic histamine-forming bacteria isolated during the ripening of salted anchovies (*Engraulis encrasicholus*). Journal of Food Protection, 62: 509–514.
- Irlinger F. (2008). Safety assessment of dairy microorganisms: Coagulase-negative staphylococci. International Journal of Food Microbiology, 126: 302–310.
- Konings, W.N., Lolkema, J.S., Bolhuis, H., Van Veen, H.W., Poolman B. and Driessen, A.J.M. (1997). The role of transport processes in survival of lactic acid bacteria. Antonie van Leeuvenhoek, 71: 117–128.
- Kvasnicka, F., and Voldrich, M. (2006). Determination of biogenic amines by capillary zone electrophoresis with conductometric detection. Journal of Chromatography A, 1103: 145–149.
- Landeta G., De las Rivas B., Carrascosa A.V. and Munoz R. (2007) Screening of biogenic amine production by coagulase-negative staphylococci isolated during industrial Spanish dry-cured ham processes. Meat Science, 77: 556–561.
- Lange, J., Thomas, K. and Wittmann, C. (2002). Comparison of a capillary electrophoresis method with high-performance liquid chromatography for the determination of biogenic amines in various food samples. Journal of Chromatography B: Analytical Technology Biomedical Life Science, 779: 229–239.
- Lee, Y.C., Lin, C.S., Liu, F.L., Huang, T.C. and Tsai, Y.H. (2015). Degradation of histamine by *Bacillus polymyxa* isolated from salted fish products. Journal of Food and Drug Analysis, 15: 1–9.
- Lu, S., Xu, X., Zhou, G., Zhu, Z., Meng, Y. and Sun, Y. (2010). Effect of starter cultures on microbial ecosystem and biogenic amines in fermented sausage. Food Control, 21: 444–449.
- Mah, J.H. and Hwang, H.J. (2009). Inhibition of biogenic amine formation in a salted and fermented anchovy by *Staphylococcus xylosus* as a protective culture. Food Control, 20: 796–801.
- Mah, J.H., Ahn, J.B., Park, J.H., Sung, H.C. and Hwang, H.J. (2003). Characterization of biogenic amine-producing microorganisms isolated from Myeolchi-Jeot., Korean slated and fermented anchovy. Journal of Microbiology and Biotechnology, 13: 362–699.
- Numanoglu, E., Boyaci, I.H. and Topcu, A. (2008). Simple determination of histamine in cheese by capillary electrophoresis with diode array detection. Journal of Food and Drug Analysis, 16 (6): 74–80.
- Sanceda, N.G., Ohashi, S.E. and Kurata, M.T. (1999). Histamine behavior during the fermentation process in the manufacture of fish sauce. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 47: 3596–3600.
- Simion, A.M.C., Vizireanu, C., Alexe, P., Franco, I. and Carballo, J. (2014). Effect of the use of selected starter cultures on some quality, safety and sensorial properties of Dacia sausage, a traditional Romanian dry-sausage variety. Food Control, 35: 123–131.
- Simonova, M., Strompfova, V., Marcinakova, M., Laukova, A., Vesterlund, S., Moratalla, M.L., *et al*. (2006). Characterization of *Staphylococcus carnosus* isolated from Slovak meat products. Meat Science, 73: 559–564.
- Tsai Y.H., Chang S.C. and Kung H.F. (2007) Histamine contents and histamine-forming bacteria in natto products in Taiwan. Food Control, 18: 1026–1030.
- Vitali, L., Valese, A.C., Azevedo, M.S., Gonzaga, L.V., Costa, A.C.O., Piovezan, M., *et al*. (2013). Development of a fast and selective separation method to determine histamine in tuna fish samples using capillary zone electrophoresis. Talanta, 106: 181–185.
- Yokoi K., Harada Y., Shozen K.I., Satomi M., Taketo A. and Kodaira K.I. (2011) Characterization of the histidine decarboxylase gene of *Staphylococcus epidermidis* TYH1 coded on the staphylococcal cassette chromosome. Gene, 477: 32–41.

Comparison of capillary zone electrophoresis and high performance liquid chromatography for the determination of histamine in bacterial culture media

Pashangeh, S.[1], Shekarforoush, S.S.[2]*, Aminlari, M.[3], Hosseinzadeh, S.[2]

1. Ph.D. Graduate of Food Hygiene, Department of Food Hygiene and Public Health, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
2. Department of Food Hygiene and Public Health, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
3. Department of Basic Sciences, School of Veterinary Medicine, Shiraz University, Shiraz, Iran
*Corresponding author: shekar@shirazu.ac.ir
(Received: 2017/3/16 Accepted: 2017/5/28)

Abstract

The presence of histamine in foods, as a chemical indication of food spoilage, can also cause food poisoning. Therefore, monitoring of histamine levels in food and food products is important. This paper has focused on the comparing of a fast and selective separation method, capillary zone electrophoresis (CZE), with HPLC, for the determination of histamine in TSB, inoculated with histamine producing strains including histamine forming gene, histidine decarboxylase-hdc, *Staphylococcus epidermidis* TYH1, isolated from fish miso in Japan, *Staphylococcus capatis* and *staphylococcus carnosus*, isolated from milk of sheep in Iran. The migration time of histamine in the proposed method, CZE and retention time of HPLC, were 5.4 and 12 min, respectively. The calibration graph was linear in a range of 6.25-200 $\mu g\ mL^{-1}$ in CZE and HPLC method with same regression equation, y=0.000004x, and both methods showed a good agreement (r^2=0.999). Determination of histamine produced by these three strains indicated no significant differences by both methods (P=0.39). The results show that the CZE is suitable for the determination of histamine in bacterial culture, as to perform the method, there is no need for initial preparation, simplicity, sensitivity and low cost.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Histamine, Capillary electrophoresis, High performance liquid chromatography