

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

صفورا پشنکه^۱، سید شهرام شکر فروش^{۲*}، محمود امین لاری^۳، سعید حسین زاده^۴

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

۴. دانشیار بخش بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران

*نویسنده مسئول مکاتبات: shekar@shirazu.ac.ir

(دریافت مقاله: ۹۵/۱۲/۲۶ پذیرش نهایی: ۹۶/۳/۷)

چکیده

هیستامین یکی از شاخص‌های مهم فساد باکتریایی در مواد غذایی است که می‌تواند موجب مسمومیت در مصرف‌کنندگان شود. بنابراین شناسایی و اندازه‌گیری مقدار هیستامین در مواد غذایی از اهمیت به‌سزایی برخوردار است. در این تحقیق، دو روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) به‌عنوان روش مرجع و الکتروفورز موئینه‌ای با آشکارساز جذبی (CZE) برای اندازه‌گیری مقدار هیستامین تولیدی در محیط کشت TSB با هم مقایسه شدند. برای این منظور محیط کشت با سوش استاندارد مولد هیستامین / استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس TYH1 و دو سوش استافیلوکوکوس کاپیتیس و استافیلوکوکوس کارنوسوس دارای ژن هیستیدین دکربوکسیلاز تلقیح شد. زمان مهاجرت در روش CZE و زمان بازداری در روش HPLC برای هیستامین به ترتیب ۵/۴ و ۱۲/۰ دقیقه به دست آمد. منحنی استاندارد در محدوده ۲۰۰-۶۲۵ $\mu\text{g/ml}$ به صورت خطی با هر دو با معادله رگرسیون $y=0.000004x$ ($r^2=0.999$) به دست آمد. مقدار هیستامین تولید شده توسط سه سوش باکتری و اندازه‌گیری شده با دو روش مذکور تفاوت آماری معنی‌داری نداشت و ضریب همبستگی بین یافته‌های به دست آمده از دو روش ۰/۹۹ بود. با توجه به یافته‌های مشابه دو روش، روش CZE به دلیل عدم نیاز به آماده‌سازی نمونه، سادگی، حساسیت و کم‌هزینه بودن، به‌عنوان روشی مناسب برای اندازه‌گیری مقدار هیستامین در محیط‌های کشت میکروبی پیشنهاد می‌گردد.

واژه‌های کلیدی: هیستامین، الکتروفورز موئینه‌ای، 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 به‌خاطر 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، لاکتیک اسید باکتری‌ها، انتروکوکوس‌ها گونه‌های سودوموناس، 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، بشورات 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 نمک‌سود (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 تولیدکننده هیستامین است که از خمیر ماهی تخمیری 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 به‌دلیل سمیت آن‌ها و دوم به‌دلیل 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

مواد و روش‌ها

- باکتری‌ها و محیط کشت

در این تحقیق از سه سوش استافیلوکوکوس مولد هیستامین شامل سوش استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس TYH1 اهدایی پروفیسور ویکتور نیتز، دانشگاه کالیفرنیا سن دیگو 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 Tryptic soy broth (Merck, Germany) در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری و احیا شدند. مقدار ۱۰ میکرولیتر از کشت تازه هر باکتری روی محیط کشت جامد بردپارکر آگار (Oxid, England) به صورت خطی کشت داده شد و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت تا ظهور پرگنه‌های سیاه‌رنگ گرمخانه‌گذاری شدند. تک پرگنه حاصل از کشت خطی، به ۵ میلی‌لیتر محیط TSB با غلظت ۰/۵ میلی‌مولار هیستیدین (Sigma, USA) منتقل و در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. کنترل منفی و مثبت به ترتیب 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. نمونه‌های گرمخانه‌گذاری شده با سانتریفوژ در دور ۱۴۰۰۰ در دور دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس جدا و برای

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 به نوبه خود باعث افزایش هزینه و طولانی‌تر شدن زمان آزمایش 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 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) به عنوان روش مرجع، برای اندازه‌گیری مقدار هیستامین تولیدی توسط استافیلوکوکوس‌های تولید کننده هیستامین در محیط کشت باکتریایی می‌باشد.

روش قبلی، با دستگاه CZE پرنس، مدل ۱ آسانسوره و سری ۴۵۰، (PrinCE-C 450 Series, Netherlands) اندازه‌گیری شد (Numanoğlu *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 به صورت هیدرودینامیکی (فشار ۵۰ میلی‌بار به مدت 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 منوسدیم فسفات 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 ۰/۴۵ میکرومتری به دستگاه CZE تزریق شدند (Numanoğlu *et al.*, 2008).

برای استخراج هیستامین نمونه‌ها، ۱ میلی‌لیتر از

اندازه‌گیری مقدار هیستامین تولیدی در دمای ۸۰- درجه سلسیوس نگهداری شد.

- اندازه‌گیری هیستامین با روش HPLC

محلول‌های استاندارد با استفاده از غلظت‌های ۶/۲۵-۲۰۰ µg/ml هیستامین دی‌هیدروکلراید در اسید هیدروکلریک 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٪ دنسیل کلراید (Dansyl Chloride) در استون افزوده شد. در ادامه پس از مخلوط کردن با ورتکس، مخلوط حاصل به مدت ۴۵ دقیقه در ۴۰ درجه سلسیوس گرمخانه‌گذاری و با افزودن ۱۰۰ میکرولیتر آمونیاک و ادامه گرمخانه‌گذاری به مدت ۳۰ دقیقه حجم محلول با استفاده از استونیتریل به ۵ میلی‌لیتر رسانده شد. محلول حاصل با سرعت ۱۰۰۰۰g به مدت ۵ دقیقه در دمای ۴ درجه سلسیوس سانتریفیوژ شده و محلول فوقانی پس از فیلتراسیون با فیلتر ۰/۴۵ 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 ۲۵۴ نانومتر) و ستون فاز معکوس، 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

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 ۲۰۰-۶/۲۵ $\mu\text{g/ml}$ صورت گرفت. مقدار هیستامین برآورد شده با روش‌های HPLC و CZE برای هر یک از غلظت‌های استاندارد در جدول (۱) نشان داده شده است.

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 به مدت 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 ۴ 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).

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

| مقدار هیستامین ($\mu\text{g/ml}$) | | غلظت استاندارد |
|-------------------------------------|----------------------------------|-------------------------------|
| CZE | HPLC | هیستامین ($\mu\text{g/ml}$) |
| ۶/۲۳۰ \pm ۰/۰۱۵ ^a | ۶/۱۸۶ \pm ۰/۰۵۷۸ ^a | ۶/۲۵ |
| ۱۲/۴۶۸ \pm ۰/۰۴۹۸ ^b | ۱۲/۴۹۲ \pm ۰/۰۲۹ ^b | ۱۲/۵ |
| ۲۴/۹۴۱ \pm ۰/۱۰۸ ^c | ۲۴/۹۳۹ \pm ۰/۱۱۲ ^c | ۲۵ |
| ۴۹/۷۵۹ \pm ۰/۱۶۶ ^d | ۴۹/۹۸۳ \pm ۰/۱۰۰ ^d | ۵۰ |
| ۹۸/۲۵۷ \pm ۱/۹۹۹ ^e | ۹۹/۳۶۸ \pm ۱/۰۲۰ ^e | ۱۰۰ |
| ۱۹۹/۲۶۱ \pm ۲/۲۲۶ ^f | ۱۹۸/۹۳۲ \pm ۱/۹۲۳ ^f | ۲۰۰ |

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 به صورت خطی با معادله رگرسیون خطی $y=0.000004x$ ($r^2=0.999$) به دست آمد. مقدار هیستامین اندازه‌گیری شده با روش‌های HPLC و CZE در نمونه‌های کنترل منفی و مثبت و نمونه‌های باکتریایی در جدول (۲) نشان داده شده است.

در روش HPLC، زمان بازداری (Retention time) هیستامین ۱۲ دقیقه و منحنی استاندارد در محدوده استاندارد یکسان به صورت خطی با معادله رگرسیون خطی $y=0.000004x$ ($r^2=0.999$) به دست آمد. در روش CZE، زمان مهاجرت (Migration time) هیستامین ۵/۴ دقیقه و منحنی استاندارد در محدوده

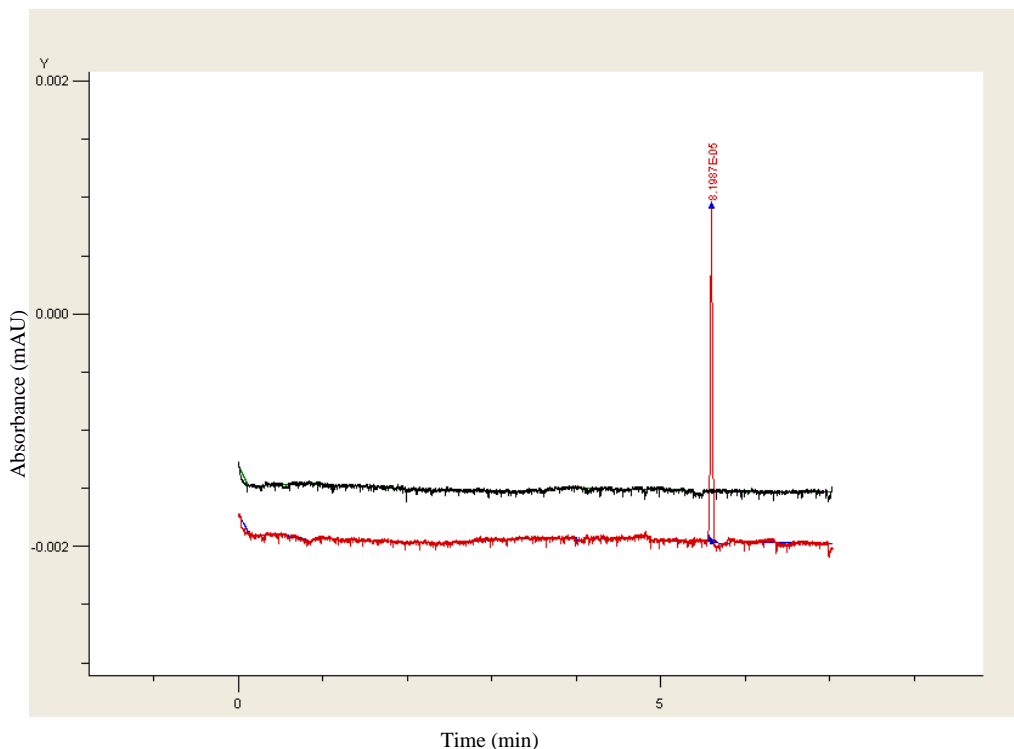
جدول (۲) - مقایسه مقدار هیستامین اندازه‌گیری شده با روش‌های کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) و آشکارساز جذبی (CZE) در محیط کشت TSB حاوی ۰/۵ میلی مول هیستیدین و سه سوش باکتری استافیلوکوکوس بعد از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس

| مقدار هیستامین (µg/ml) | | سوش باکتری |
|----------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| CZE | HPLC | |
| a | a | کنترل منفی |
| ۱۷۳/۵۵ ± ۴/۶۸ ^b | ۱۷۲/۹۳ ± ۵/۰۳ ^b | کنترل مثبت |
| ۴۹/۹۴ ± ۰/۰۶ ^c | ۴۹/۳۵ ± ۰/۹۸ ^c | استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس TYH1 |
| ۱۷/۳۴ ± ۱/۰۲ ^d | ۱۷/۴۶ ± ۰/۸۴ ^d | استافیلوکوکوس کاپیتیس |
| ۹/۱۴ ± ۰/۹۳ ^e | ۸/۹۶ ± ۱/۰۱ ^e | استافیلوکوکوس کارنوسوس |

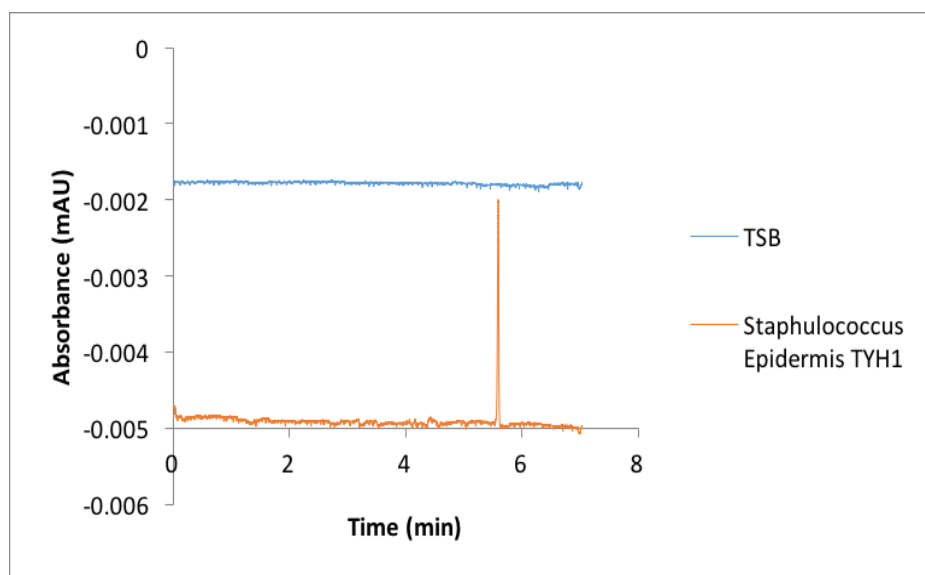
کنترل منفی: محیط TSB حاوی ۰/۵ میلی مول هیستیدین؛ کنترل مثبت: محیط TSB حاوی ۱ میلی مول هیستامین بود. حروف غیرمشابه نشانگر تفاوت آماری معنی‌دار ($p < 0.01$) در سطر می‌باشد.

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 ۴۹/۹۴ ± ۰/۰۶ می‌باشد. از نظر دقت و حساسیت در تشخیص هیستامین تفاوتی بین روش‌های CZE و HPLC مشاهده نشد.

در محیط کشت TSB با غلظت ۰/۵ میلی مولار 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 به دست نیامد و مقدار هیستامین برآورد شده در سایر نمونه‌ها با



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 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 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 ۶ 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 (Dansyl chloride) 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 آماده‌سازی 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 روش CZE روشی انتخابی برای اندازه‌گیری مقدار هیستامین می‌باشد.

در تحقیقات قبلی مقدار هیستامین در کنسرو ماهی تن (Vitali et al., 2013)، ماهی تن (ER et al., 2014)، ماهی تن (Bolygo et al., 2000) با روش CZE اندازه‌گیری شده است. کم‌ترین حد تشخیص هیستامین در تحقیقات انجام شده $0.2 \mu\text{g/ml}$ 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 نقطه بحرانی و در عین حال زمان‌بر روش‌های آنالیزی در نظر گرفت. تحقیقات زیادی بر روی گونه‌های مختلف باکتریایی به‌ویژه گونه‌های استافیلوکوکوس برای ارزیابی توانایی

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 به‌خاطر همکاری در این مطالعه و پروفیسور ویکتور نیتز، دانشگاه کالیفرنیا سن‌دیگو به‌خاطر تأمین سوش TYH1 باکتری استافیلوکوکوس /پیدرمیدیس تشکر می‌گردد.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافی برای اعلام ندارند.

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

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 Huis in'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 (4): 834–838.
- Gardini, F., Martuscelli, M., Crudele, M.A., Paparella, A. and Suzzi, G. (2002). Use of *Staphylococcus xylosum* 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-Sagué's A.X., Rodríguez-Jerez J.J. and Mora-Ventura M.T. (1999)

- Halotolerant and halophilic histamine-forming bacteria isolated during the ripening of salted anchovies (*Engraulis encrasicolus*). *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 Leeuwenhoek*, 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 xylosum* 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 salted and fermented anchovy. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 13: 362–699.
 - Numanoğlu, E., Boyacı, 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., Stropfova, 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 is an important indicator of food spoilage and can also cause food poisoning in consumers. Therefore, monitoring of histamine level in food is important. This paper has focused on the comparing of capillary zone electrophoresis (CZE) with HPLC for the determination of histamine in tryptic soy broth. For this reason, the culture media was inoculated with a standard strain of histamine-producing *Staphylococcus epidermidis* TYH1, as well as *S. capitis* and *S. carnosus* strains harboring histidine decarboxylase-hdc. The migration time of histamine in CZE assay and retention time of HPLC were found 5.4 and 12 min, respectively. The calibration graph was linear ranged 6.25 to 200 µg/ml which was estimated using the regression equation of $y=0.000004x$ ($r^2=0.999$) for both methods. Determination of histamine produced by these three strains indicated no significant differences using CZE with HPLC methods. The results show that the CZE is suitable for the determination of histamine in bacterial culture, since, 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