J. of Nuclear Sci. and Tech.
No. 47, pp. 23-31, 2009
Archive of SID

مجله علوم و فنون هسته‌ای
شماره ۴۷، صفحات ۳۱-۲۳، ۱۳۸۸

تشکیل ایزومرهای تیروزین در محلول‌های آبی فنیل‌آلانین پرتودهی شده با تابش گاما

فریدون افلاکی*، مریم صلاحی نژاد، علی روزبهانی
پژوهشکده علوم هسته‌ای، پژوهشگاه علوم و فنون هسته‌ای، سازمان انرژی اتمی ایران، صندوق پستی: ۸۴۸۶-۱۱۳۶۵، تهران ـ ایران

چکیده: روش آشکارسازی ارتو تیروزین را می‌توان برای آشکارسازی پرتودیدگی مواد غذایی سرشار از پروتئین بکار برد. به منظور اطلاع از اساس این روش، ایزومرهای تیروزین تشکیل شده در محلول‌های آبی‌فنیل‌آلانین پرتودهی شده با پرتو گاما در گستره وسیعی از دز تابش (۰/۱-۵۰kGy) مورد بررسی قرار گرفته است. اندازه‌گیری ایزومرهای تیروزین در محلول‌های آبی فنیل‌آلانین با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و آشکارسازی فلورسانس انجام گرفت. حد آشکارسازی ارتوتیروزین ppm ۰/۰۱ و گستره خطی بودن پاسخ دستگاه برابر ۰/۰۱ تا ۵۰ppm و انحراف استاندارد نسبی اندازه‌گیری‌ها بین ۱۳-۴٪ بود. در محلول‌های آبی فنیل‌آلانین (mg/ml ۱)، تا دز kGy ۱۰ مقادیر ایزومرهای تیروزین تشکیل شده متناسب با افزایش سطح دز پرتودهی افزایش یافت اما پس از آن، افزایش بیشتر دز پرتودهی بر افزایش تشکیل ایزومرهای تیروزین تأثیر قابل ملاحظه‌ای نداشت. در یک دز ثابت، مقدار ایزومرهای تیروزین تشکیل شده در ابتدا با افزایش غلظت فنیل‌آلانین افزایش می‌یابد اما افزایش بیشتر غلظت فنیل‌آلانین تأثیری در افزایش تشکیل ایزومرهای تیروزین ندارد. با دز کلی ۱۰kGy، استفاده از سرعت‌های دز kGy/h ۲/۳ و kGy/h ۱/۲ تغییر قابل ملاحظه‌ای در مقدار ایزومرهای تیروزین تشکیل شده ایجاد نکرد. نتایج نشان داد در پرتودهی محلول‌های آبی فنیل‌آلانین، تشکیل ایزومرهای تیروزین تحت تأثیر دما، pH و اکسیژن محیط قرار می‌گیرد.

واژه‌های کلیدی: محلول آبی‌فنیل‌آلانین، ارتو تیروزین، تابش گاما، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

Formation of Tyrosine Isomers in Aqueous Phenylalanine Solutions by Gamma Irradiation

F. Aflaki*, M. Salahinejad, A. Roozbehani
Nuclear Science Research School, Nuclear Science and Technology Research Institute, AEOI, P.O. Box: 11365-8486, Tehran – Iran

Abstract: Ortho- tyrosine detection method can be used for detection of irradiated protein rich foods. Tyrosine isomers produced by gamma radiation of aqueous phenylalanine solutions at wide dose levels (0.1-50kGy) were examined to obtain basic information for o-tyrosine detection method of irradiated foods. Determination of tyrosines produced in aqueous phenylalanine solutions were carried out by high performance liquid chromatography and fluorescence detection. The detection limit of o-tyrosine was 0.01ppm and the linear range of calibration and the relative standard deviation of analysis was 50 ng and 4-13%, respectively. The amounts of the tyrosines increased with the irradiation level up to 10kGy and no further tyrosine formation was observed when the dose level was increased. At a constant dose level, the yield of tyrosines initially increased with the phenylalanine concentration, while with further increase of phenylalanine concentration no effect on increase of tyrosine yield was observed. When the dose rate was varying from 2.3kGy/h to 1.2kGy/h with a total amount of 10kGy in each case, there was no significant effect on tyrosine isomers formation was observed. Also the results showed that tyrosine yield was affected by temperature, pH and the presence of oxygen.

Keywords: ***Aqueous Phenylalanine Solution, O-Tyrosine, Gamma Irradiation, HPLC***

*email: Faflaki@aeoi.org.ir
تاریخ دریافت مقاله: ۸۶/۵/۲۳ تاریخ پذیرش مقاله: ۸۷/۴/۲

www.SID.ir

Archive of SID

۱- مقدمه

نظر به اینکه پرتودهی مواد غذایی عملاً تغییری در ظاهر، طعم یا دمای مواد غذایی ایجاد نمی‌کند، شناسایی مواد غذایی پرتودهی شده و همچنین تعیین میزان دز به کار رفته در پرتودهی مواد غذایی مشکل خواهد بود. روش‌های آشکارسازی پرتودیدگی مواد غذایی را می‌توان به عنوان روش‌های کنترل‌کننده مقررات پرتودهی مواد غذایی در نظر گرفت و در نتیجه به مصرف‌کنندگان کمک می‌نماید تا مطمئن شوند که پرتودهندگان و توزیع کنندگان تحت نظارت قرار دارند. تاکنون روش‌های کافی برای آشکارسازی موادغذایی پرتودهی شده توسعه نیافته‌اند و اکثر روش‌های موجود نیز با محدودیت دامنه کاربرد و تکرارپذیری ضعیف مواجه‌اند [۱ و ۲]. خلاصه‌ای از مشخصات مهمترین روش‌های ارایه شده برای آشکارسازی موادغذایی پرتودهی شده در جدول ۱ ارایه شده است [۳، ۴ و ۵].

جدول ۱- مشخصات روشهای ارایه شده برای آشکارسازی مواد غذایی پرتودهی شده.

Method	Basis	Suitable materials	Suitable foods	Equipment	Advantage	disadvantage
ESR(۱)	free radical or paramagnetic spices trapped in dry, rigid matrices	Bone, shell, seeds, nuts	Meats (bone in, or bone fragments available) shellfish, some fruits and seeds	X-band ESR spectrometer	A unique, stable signal after irradiation with reasonable dose dependence	Expensive equipment, specialized training for staff
Lumines-cence	The release by heating or pulsed infra-red light of trapped energy in dry crystalline materials	attached dusts, silicate minerals and soils, absorbed or filtered sands and grit in gut contamination	Herbs & spices, shellfish & fitter feeders, some fruits & vegetables exposed to soil contamination	Modern TL& PSL reader, radiation source thermo luminescence	Equipment moderate cost& simple to use, PSL can work on food itself	Signal decrease with time and very variable with mineral composition,
Lipid volatiles	The production of lipid products (1& 2 carbon atoms less than parent compounds)	Lipids& fatty acids	Meats and fish flesh, other lipid containing foods, some spices	Fat extraction equipments, GC or GC- MS instruments	Common equipment for food laboratories	Requires knowledge of un irradiated composition
2- alkyl cyclobut-anes	Re- arrangement of lipids rather than loss of carbon atoms after irradiation to give special radiolytic product	Lipids& fatty acids	Meats& fish flesh, other lipid containing foods, some spices	Fat extraction equipments, GC or GC-MS	Common equipment for food laboratories, products appears to be not found in un irradiated foods	Some variability in the results depending on type and source of parent lipids
DNA alterati-ons	DNA fragmentation and purine/pyridine base changes	DNA	Any food from which DNA can be extracted	Micro gel electrophoresis, several other methods for estimating DNA length	Potentially applicable to all foods	Measurement methods and food handling can all provide DNA changes similar to radiation
DEFT/APC(۲)	Relative changes in micro flora due to differential sensitivity of micro-organism, detected by DEFT/ APC	Bacteria etc.	Foods with a natural micro flora (herbs, spices, meats)	Simple microbiological lab equipment	simple	Changes not radiation specific, need some knowledge of original micro flora
o-Tyrosine	Hydroxylation of phenylalanine	Food containing proteins	Meats, fish,	Equipments for amino acids analysis such GC or HPLC	Common equipment for food laboratories	Changes not radiation specific
Aromatic compou-nds	Hydroxylation of phenols and phenolic acids	Plant containing aromatic compounds	Onions, fruits, vegetables	GC or HPLC	Common equipment for food laboratories	results depending on type and source of plants

www.SID.ir

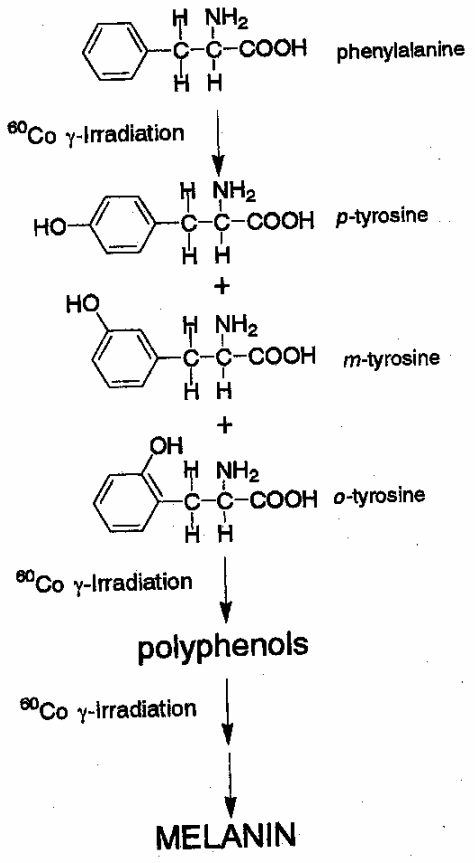
Archive of SID

هنگامی که تابش یون‌ساز از درون ترکیبات شیمیایی موجود در مواد غذایی عبور می‌کند انرژی از دست می‌دهد. به بیان دیگر، این انرژی توسط ماده غذایی جذب می‌شود و این انرژی یا دز جذب شده، منجر به یونیزه شدن و برانگیختگی اتم‌ها و مولکول‌های ماده می‌شود که در نهایت به تغییرات شیمیایی مواد غذایی منجر می‌گردد [۶]. تغییرات شیمیایی ایجاد شده در اثر پرتودهی موادغذایی ممکن است ناشی از اثر مستقیم یا غیرمستقیم باشد. در اثر مستقیم، یک ترکیب شیمیایی مستقیماً به وسیله یک ذره یا اشعه تخریب می‌شود. در اثر غیرمستقیم، تغییرات موادغذایی اکثراً به وسیله محصولات رادیولیزی آب ایجاد می‌شوند. محصولات رادیولیزی آب به طور طبیعی ناپایدار بوده و در کسری از ثانیه (10^{10}–10^{11} $m^{-1}s^{-1}$) به وسیله واکنش با یکدیگر و یا با دیگر اجزای موادغذایی ناپدید می‌شوند. وقتی آب خالص پرتودهی می‌شود ترکیبات بسیار واکنش‌پذیری را ایجاد می‌نماید که مهمترین آنها طبق واکنش زیر عبارتند از: رادیکال هیدروکسید، اتم هیدروژن و الکترون آبی[۳].

$$H_2O \rightarrow {}^{\cdot}OH + e^-_{aq} + {}^{\cdot}H$$

رادیکال هیدروکسیل ($^{\cdot}OH$) یک واکنشگر اکسیدکننده قوی است در حالی‌که الکترون آبی (e^-_{aq}) و اتم هیدروژن (H) واکنشگر کاهنده هستند. بنابراین به نظر می‌رسد که در طی پرتودهی، تمام مواد غذایی (حاوی آب) متحمل هر دو نوع واکنش‌های اکسایش و کاهش گردند [۷].

در محلول‌های آبی حاوی اسید آمینه فنیل‌آلانین، هیدروکسیله شدن حلقه آروماتیکی، واکنش اصلی انجام شده بوسیله رادیکال‌های هیدروکسیل است. رادیکال‌های هیدروکسیل به واسطه طبیعت الکتروفیلی خود به نقاط سرشار از الکترون حلقه آروماتیک اضافه می‌شوند و محصولات ایزومری ۲-، ۳-، ۴- هیدروکسی فنیل‌آلانین (پارا، متا، ارتو-تیروزین) را به وجود می‌آورند (شکل ۱). متعاقباً اکسایش بیشتر ایزومرهای تیروزین به تشکیل پلی‌فنول‌ها و ترکیبات ملانینی منجر می‌شود [۸ و ۹]. مطالعات زیادی درباره اکسایش فنیل‌آلانین صورت گرفته است که مکانیسم تشکیل ایزومرهای تیروزین را به خوبی نشان می‌دهند [۱۰ تا ۱۳]. Simic، Miyahara، krajnik تأثیر شرایط پرتودهی بر ایزومرهای تیروزین تشکیل شده در محدوده معینی از دزهای پرتودهی را نشان داده‌اند [۹، ۱۴ و ۱۵].



شکل ۱- محصولات رادیولیزی حاصل از اسید آمینه فنیل‌آلانین.

وابستگی مقدار ارتوتیروزین موجود در مواد غذایی سرشار از پروتئین به مقدار دز تابش جذب شده ممکن است وسایل شناسایی مواد غذایی پروتئینی پرتودهی شده را فراهم آورد [۱۶تا۲۰]. در ابتدای معرفی این روش در سال ۱۹۸۳ میلادی توسط Karam و Simic تصور می‌شد که ارتوتیروزین تنها در مواد غذایی پرتودهی شده وجود دارد [۲۱]. امروزه در اثر افزایش حساسیت تکنیک‌های تجزیه‌ای، نه تنها ارتوتیروزین در مواد غذایی پرتودهی نشده اندازه‌گیری شده است بلکه نتایج متفاوتی از مقدار ارتوتیروزین موجود در مواد غذایی گزارش شده است. بر اساس نتایج جدید، ارتوتیروزین ممکن است در طی مراحل آماده‌سازی و تجزیه نمونه تشکیل شود و پارامترهایی نظیر در دسترس بودن اکسیژن، دمای محیط پرتودهی و سرعت دز[۴] می‌تواند در تشکیل ارتوتیروزین مؤثر باشند [۲۲ و ۲۳].

در این مقاله ابتدا روش جداسازی و اندازه‌گیری ایزومرهای تیروزین با استفاده از کروماتوگرافی مایع ارایه شده، سپس تأثیر شرایط پرتودهی با اشعه گاما (نظیر حضور اکسیژن، pH، غلظت

www.SID.ir

Archive of SID

و دما) در تشکیل ایزومرهای تیروزین در محدوده وسیعی از دز تابشی (۰/۱-۵۰kGy) بررسی شده است تا امتیازها و محدودیت‌های روش ارتوتیروزین برای آشکارسازی پرتودیدگی مواد غذایی تعیین شود.

۲- روش کار

۲-۱ مواد و دستگاهها

اسید آمینه فنیل‌آلانین و ایزومرهای تیروزین از شرکت Fluka، استونیتریل از شرکت Merck و بقیه مواد شیمیایی مورد نیاز با درجه خلوص مورد نظر از منابع تجارتی قابل دسترس تهیه شدند. دستگاه Gamma cell 220 (^{60}Co) جهت پرتودهی نمونه‌ها و دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مجهز به آشکارساز فلورسانس برای جداسازی و اندازه‌گیری کمّی ایزومرهای تیروزین مورد استفاده قرار گرفتند.

۲-۲ روش پرتودهی

۵ میلی‌لیتر از محلول‌های آبی فنیل‌آلانین در لوله‌های پیرکس دربدار با سرعت دز ۲/۳ kGy/h پرتودهی شدند و تا زمان آنالیز در یخچال نگهداری شدند.

۲-۳ اندازه‌گیری کمّی ایزومرهای تیروزین به وسیله HPLC

شرایط بهینه جداسازی ایزومرهای تیروزین به وسیله سیستم کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا عبارتند از:

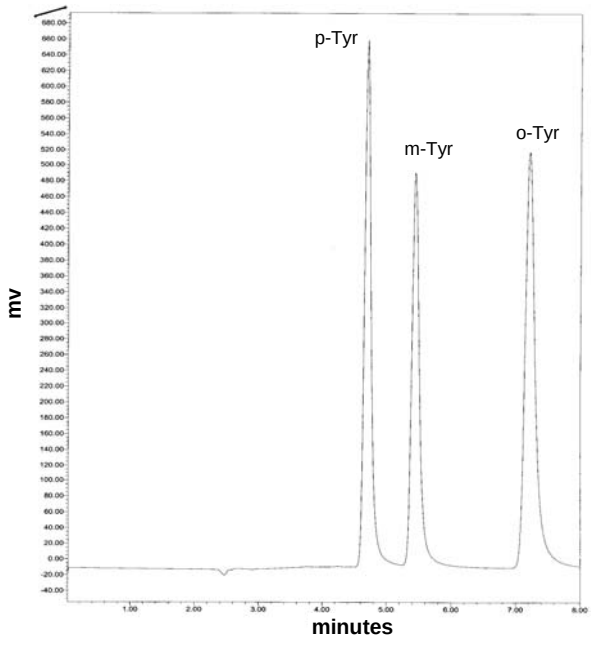
Column:	Waters NOVA Pak C_{18}, 150×4.6 mm
Column oven:	25 °c
Eluents:	A)1% acetonitrile,1% sodium chloride, water B) 50% acetonitrile,0.5% sodium chloride,Water C) 60% acetonitrile,40% water (بعد از پایان کار برای نگهداری ستون)
Gradient:	0-7 minutes: 100% A 7-12 minutes: 100% B (برای حذف آلودگی‌های آلی به جا مانده در ستون) 12-17 minutes: 100% A (به منظور آماده شدن ستون برای تزریق بعدی)
Flow rate:	1 ml/min
Detection:	Fluorescence: Excitation 275 nm, Emission 305
Injection:	20µl of 1µg/ml of tyrosines in 0.01N HCl

شکل ۲ کروماتوگرام حاصل از جداسازی ایزومرهای تیروزین با استفاده از شرایط فوق می‌باشد. برای اندازه‌گیری کمّی مقدار ایزومرهای تیروزین تشکیل شده در فرایند پرتودهی، هر نمونه سه بار به دستگاه تزریق شده است. حد آشکارسازی ایزومرهای تیروزین حدود ۰/۰۱ppm و گستره خطی بودن پاسخ آشکارساز ۰/۰۱-۵۰ppm و انحراف استاندارد نسبی اندازه‌گیری‌ها ۱۳-۴٪ بود. این شرایط کروماتوگرافی، برای اندازه‌گیری ایزومرهای تیروزین تشکیل شده در فرایند پرتودهی محلول‌های آبی فنیل‌آلانین مورد استفاده قرار گرفت.

۳- تأثیر شرایط پرتودهی بر تشکیل ایزومرهای تیروزین

۳-۱ تأثیر دز

تأثیر دز در محدوده دزهای کم (۱۰-۱۰۰Gy) و دزهای متوسط تا زیاد (۰/۲۵ -۵۰kGy) مورد بررسی قرار گرفت (شکل‌های ۳ و ۴). محلول‌های آبی‌فنیل‌آلانین (۱mg/ml) در دمای اتاق و با سرعت دز ۲/۳kGy/h پرتودهی شده‌اند. نتایج حاصل با نتایج گزارش شده توسط Miyahara در محدوده ۱-۱۰kGy و نتایج گزارش شده توسط Simic در محدوده ۲۰-۵۰kGy متناسب است[۹ و ۱۴]. شکل ۳ نشان می‌دهد در دز کم ۱۰Gy مقدار ایزومرهای تشکیل شده تیروزین در حدود



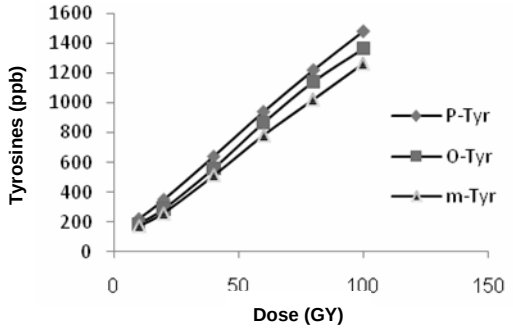
شکل ۲- کروماتوگرام حاصل از جداسازی ایزومرهای تیروزین با استفاده از ستون NOVA-Pak C_{18}.

www.SID.ir

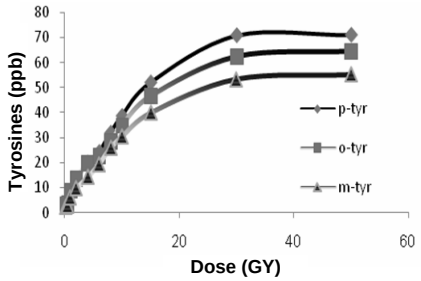
Archive of SID

(µg/l) ۲۰۰ppb می‌باشد. در محدوده دزهای کم، بین دز پرتودهی و میزان ایزومرهای تشکیل شده تیروزین نسبت خطی وجود دارد که نشان می‌دهد در دزهای کم، با افزایش رادیکال‌های هیدروکسیل، میزان تشکیل ایزومرها نیز افزایش می‌یابد و ایزومرهای تیروزین بوجود آمده پایدارند و با فنیل‌آلانین برای تشکیل محصول ثانوی وارد واکنش نمی‌شوند.

نمودار شکل ۴ نشان می‌دهد بین تشکیل ایزومرهای تیروزین و افزایش دز تا حدود ۱۵ kGy نسبت خطی ادامه دارد. با افزایش بیشتر دز، افزایشی در تشکیل ایزومرهای تیروزین مشاهده نمی‌شود. در چنین دزهایی غلظت ایزومرهای تیروزین به قدر کافی افزایش یافته است تا در رقابت با فنیل‌آلانین برای واکنش با رادیکال‌های هیدروکسیل شرکت کنند. لذا در دزهای بالای ۱۵kGy، در اثر واکنش ایزومرهای تیروزین تشکیل شده با رادیکال‌های هیدروکسیل، مقدار ایزومرهای تیروزین تشکیل شده به قدر کافی افزایش نخواهند یافت تا رابطه افزایش خطی بین دز- غلظت ایزومرهای تیروزین حفظ شود.



شکل ۳- اثر مقدار دز تابش در تشکیل ایزومرهای تیروزین (۱۰۰Gy-۱۰) شرایط پرتودهی) دما: محیط؛ pH: خنثی؛ غلظت فنیل‌آلانین: ۱mg/ml. سرعت دز: ۲/۳ kGy/h.



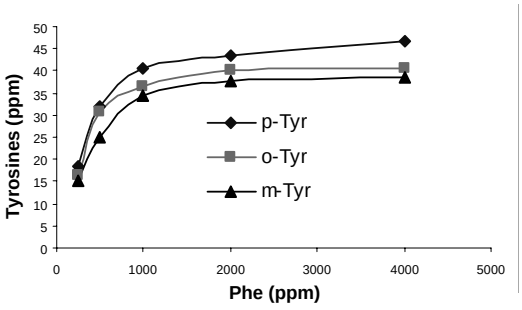
شکل ۴- اثر مقدار دز تابش در تشکیل ایزومرهای تیروزین (۵۰kGy-۰/۲۵) شرایط پرتودهی) دما: محیط؛ pH: خنثی؛ غلظت فنیل‌آلانین: ۱mg/ml. سرعت دز: ۲/۳ kGy/h.

۳-۲ اثر غلظت فنیل آلانین

اثر غلظت فنیل‌آلانین در تشکیل ایزومرهای تیروزین در شکل ۵ نشان داده شده است. محلول‌های آبی‌فنیل‌آلانین (۴ mg/ml- ۰/۲۵) در دمای اتاق و با دز ۱۰kGy پرتودهی شده‌اند. افزایش میزان تشکیل ایزومرهای تیروزین با افزایش غلظت فنیل‌آلانین تا ۱mg/ml خطی بوده و بعد از آن، این افزایش غلظت در افزایش ایزومرهای تیروزین تشکیل شده تأثیر عمده‌ای ندارد [۹]. این امر ممکن است به این دلیل باشد که در غلظت‌های فنیل‌آلانین بالاتر از ۱mg/ml، غلظت محصولات رادیولیزی حاصل از پرتودهی به مقداری باشند که با مولکول‌های فنیل‌آلانین جهت واکنش با رادیکال‌های هیدروکسیل به وجود آمده از یونیزاسیون آب رقابت کنند. به عبارت دیگر مقداری از رادیکال‌های هیدروکسیل به جای واکنش با فنیل‌آلانین، با ایزومرهای تیروزین تشکیل شده برای تشکیل دادن محصولات ثانوی وارد واکنش می‌شوند.

۳-۳ اثر pH

اثر pH محلول فنیل‌آلانین بر میزان تشکیل ایزومرهای تیروزین در دزهای ۴ و ۱۰kGy مورد مطالعه قرار گرفته است (شکل‌های ۶ و ۷). این شکل‌ها نشان می‌دهند که pH محلول‌ها بر میزان تشکیل ایزومرهای تیروزین اثر می‌گذارد. این نتایج با نتایج گزارش شده توسط Miyhara و Procter درباره تأثیر pH در تولید ایزمرهای تیروزین هماهنگ می‌باشند [۹ و ۲۴]. محلول آبی پرتودهی شده در شرایط اسیدی خاصیت احیاءکنندگی، و در شرایط بازی خاصیت اکسیدکنندگی دارد، بنابراین



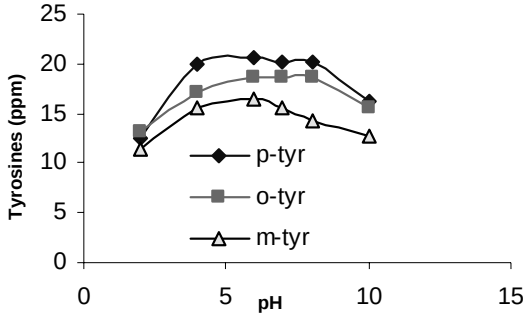
شکل ۵- تأثیر غلظت فنیل‌آلانین در تشکیل ایزومرهای تیروزین در دز ۱۰kGy شرایط پرتودهی) دما: محیط؛ سرعت دز: ۲/۳ kGy/h؛ pH: خنثی.

www.SID.ir

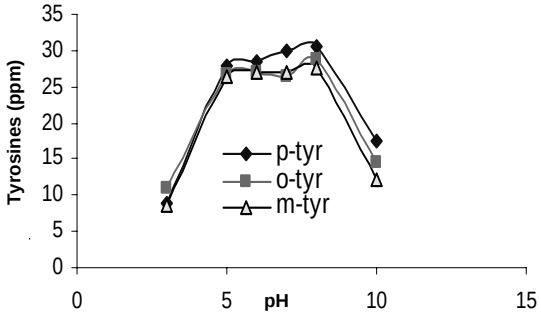
Archive of SID

محصولات اولیه رادیولیز آب: الکترون‌های آب پوشیده، رادیکال‌های هیدروژن، رادیکال‌های هیدروکسیل و ... ممکن است به وسیله pH تحت تأثیر قرار گیرند. برای مثال، در شرایط قلیایی رادیکال‌های هیدروژن به سهولت با اکسیژن موجود در محلول واکنش داده و رادیکال‌های هیدروکسیل را ایجاد می‌نمایند که در نتیجه مقدار بیشتری از ایزومرهای تیروزین تشکیل خواهد شد. از طرف دیگر همچنان که در موارد قبلی اشاره شد با افزایش غلظت ایزومرهای تشکیل شده، آنها می‌توانند در واکنش‌های هیدروکسیله شدن شرکت کنند و بدین ترتیب از افزایش غلظت ایزومرهای تیروزین جلوگیری نمایند [۶].

پیش‌بینی می‌شد در pH=۱۰ مقدار ایزومرهای تیروزین تشکیل شده بیشتر شده و نمودارهای ۶ و ۷ در این pH سیر صعودی داشته باشد اما بدین دلیل که در این pH ایزومرهای تیروزین تشکیل شده ناپایدار بوده و به میزان زیادی تخریب می‌شوند و مقدار ایزومرهای تیروزین اندازه‌گیری شده کاهش یافته است.



شکل ۶- تأثیر pH در تشکیل ایزومرهای تیروزین در ۴kGy شرایط پرتودهی) دما: محیط؛ سرعت دز: ۲/۳ kGy/h؛ غلظت فنیل‌آلانین: ۱mg/ml.



شکل ۷- تأثیر pH در تشکیل ایزومرهای تیروزین در ۱۰kGy پرتودهی) دما: محیط؛ سرعت دز: ۲/۳ kGy/h، غلظت فنیل‌آلانین: ۱mg/ml.

۳-۴ اثر دما

برای بررسی اثر دما، محلول آبی ۱mg/ml فنیل‌آلانین و حالت یخ‌زده آن در دز ۰/۲۵kGy پرتودهی شدند (جدول ۲). هر چند نتایج وابستگی تشکیل ایزومرهای تیروزین به دما را نشان می‌دهد اما در حالت یخ‌زده نیز مقدار ایزومرهای تیروزین تشکیل شده قابل توجه می‌باشد (اختلاف نتایج دو حالت کمتر از ۱۰٪ است). این امر نشان‌دهنده آن است که از روش ارتوتیروزین می‌توان جهت آشکارسازی پرتودیدگی مواد غذایی یخ‌زده نیز استفاده کرد. این نتایج با نتایج گزارش شده توسط Krajnik که مشاهده کرد تفاوتی بین نتایج حاصل از پرتودهی محلول آبی فنیل‌آلانین در ۰/۰ و ۲۰ $^{\circ}C$ وجود ندارد، همسان می‌باشد [۹ و ۱۵].

۳-۵ اثر سرعت دز

ایزومرهای تیروزین حاصل از پرتودهی محلول آبی فنیل‌آلانین (۱mg/ml) با سرعت دز ۱/۲kGy/h و تا دز کلی ۱۰kGy در جدول ۳ ارایه شده است. در این جدول همچنین مقدار ایزومرهای تیروزین حاصل از پرتودهی محلول فنیل‌آلانین با سرعت دز ۲/۳kGy/h نشان داده شده است (در این تحقیق از دو دستگاه Gamma Cell که دارای سرعت‌های دز متفاوت بودند برای پرتودهی نمونه‌ها با سرعت‌های دز مختلف استفاده شد). مقایسه ایزومرهای تیروزین تشکیل شده با سرعت‌های دز متفاوت نشان می‌دهد که تفاوت قابل ملاحظه‌ای در تشکیل ایزومرهای تیروزین مشاهده نمی‌شود [۶].

۳-۶ اثر اکسیژن

برای بررسی اثر حضور یا عدم حضور اکسیژن در تشکیل ایزومرهای تیروزین ناشی از پرتودهی محلول‌های آبی فنیل‌آلانین، ۵ میلی‌لیتر از محلول فنیل‌آلانین (۱ mg/ml) در لوله

جدول ۲- تأثیر دما در تشکیل ایزومرهای تیروزین در ۰/۲۵kGy شرایط پرتودهی) سرعت دز: ۲/۳kGy/h؛ pH: خنثی؛ غلظت فنیل‌آلانین: ۱mg/ml.

نمونه	p-Tyr (ppm)	m-Tyr (ppm)	o-Tyr (ppm)
محلول آبی	۲/۸۴	۲/۶۳	۲/۵۸
حالت یخ زده	۲/۶۱	۲/۴۶	۲/۳۴

www.SID.ir

Archive of SID

پیرکس‌درب‌دار قرار داده شد و با عبور دادن گاز نیتروژن از درون محلول و حذف اکسیژن محلول و اکسیژن موجود در هوای درون لوله پیرکس، دهانه آن محکم بسته شد. مقدار ایزومرهای تیروزین حاصل از پرتودهی این نمونه با سرعت دز ۲/۳ kGy/h و تا دز کلی ۱۰kGy در جدول ۳ نشان داده شده است. مقایسه این نتایج با پرتودهی محلول آبی فنیل‌آلانین در شرایط پرتودهی یکسان و با حضور اکسیژن درون لوله پیرکس (جدول ۳) بیانگر حدود ۳۰٪ کاهش در تشکیل ایزومرهای تیروزین با حذف اکسیژن موجود در لوله‌های پیرکس حاوی محلول فنیل‌آلانین می‌باشد. رادیکال هیدروپروکسیل[۵] ($\cdot HO_2$) ممکن است در اثر کاهش اکسیژن به وسیله اتم‌های هیدروژن تشکیل شود:

$$\cdot H + O_2 \rightarrow \cdot HO_2$$

رادیکال هیدروپروکسیل در تعادل با رادیکال آنیون پروکسید ($\cdot O^-_2$) می‌باشد:

$$\cdot HO_2 \leftrightarrow H^+ + \cdot O_2$$

همچنین رادیکال آنیون سوپراکسید[۶] می‌تواند به وسیله واکنش الکترون‌های آبی با اکسیژن تشکیل شود:

$$e^-_{aq} + O_2 \rightarrow \cdot O_2$$

رادیکال هیدروپروکسیل و رادیکال سوپراکسید هر دو واکنشگرهای اکسیدکننده می‌باشند. این رادیکال‌ها ممکن است پروکسید هیدروژن تولید کنند:

$$\cdot O^-_2 + \cdot HO_2 \,(\text{in presence of } H^+) \rightarrow H_2O_2 + O_2$$
$$2\cdot HO_2 \rightarrow H_2O_2 + O_2$$

جدول ۳- تأثیر سرعت دز و حضور و عدم حضور اکسیژن در محیط پرتودهی در ۱۰kGy. شرایط پرتودهی) pH: خنثی؛ غلظت فنیل‌آلانین: ۱ mg/ml.

شرایط پرتودهی	p-Tyr	m-Tyr	o-Tyr
پرتودهی با سرعت دز ۲/۳ kGy/h	۴۰/۴	۳۴/۲۶	۳۶/۱۷
پرتودهی با سرعت دز ۱/۲ kGy/h	۳۸/۷۶	۳۲/۸۲	۳۴/۴۶
پرتودهی با حذف اکسیژن (سرعت دز ۲/۳ kGy/h)	۲۸/۹۳	۲۵/۱۶	۲۴/۳۲

که در نهایت پروکسید هیدروژن رادیکال هیدروکسیل را تولید نماید:

$$H_2O_2 + e^-_{aq} \rightarrow \cdot OH + OH^-$$

بدین‌ترتیب حضور اکسیژن اکسایش فنیل‌آلانین را کاتالیز می‌نماید و با حذف اکسیژن از محیط پرتودهی، ایزومرهای تیروزین کمتری تشکیل خواهد شد [۶].

۳-۷ پایداری ایزومرهای تیروزین

یکی از معیارهای روش ایده‌آل برای آشکارسازی مواد غذایی پرتودهی شده، پایداری عامل آشکارسازی است تا در هنگام ذخیره مواد غذایی پرتودهی شده، از بین نرود [۲]. برای بررسی میزان پایداری ایزومرهای تیروزین تشکیل شده در اثر پرتودهی محلول‌های آبی فنیل‌آلانین، محلول‌های فنیل‌آلانین (۱ mg/ml) که در pHهای مختلف با دز ۱۰kGy پرتودهی شده بودند (شکل ۷) به مدت شش ماه درون یخچال به صورت محلول و فریزر به صورت یخزده نگهداری شدند، سپس مقدار ایزومرهای تیروزین آنها دوباره اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل برحسب درصد تخریب ایزمرهای تیروزین در جدول ۴ ارائه شده است (اعداد بین پرانتزها مقادیر مربوط به حالت یخزده نمونه‌ها می‌باشند). این نتایج بیانگر پایداری زیاد ایزومرهای تیروزین در محیط‌های آبی با pHهای پایین می‌باشد. همچنین نتایج نشان می‌دهند که نگهداری محلول‌های فنیل‌آلانین پرتودهی شده به صورت یخزده، مقدار تخریب ایزومرهای تیروزین را به مقدار قابل توجهی کاهش می‌دهد.

جدول ۴- درصد تخریب ایزومرهای تیروزین موجود در محلولهای آبی فنیل‌آلانین (۱mg/ml) پرتودهی شده با دز ۱۰kGy که به مدت شش ماه در یخچال و فریزر نگهداری شده بودند.

pH	p-tyr	m-tyr	o-tyr
۲	۰/۷۴ (۰/۲۳)	۰/۹۷ (۰/۳۷)	۰/۸۷ (۰/۷۴)
۴	۵/۲۸ (۰/۴۳)	۷/۲۱(۰/۷۸)	۶/۵۲ (۱/۲۶)
۶	۶/۳۶ (۱/۱۷)	۸/۵ (۱/۸۴)	۷/۲۶ (۲/۱۶)
۷	۶/۳۲ (۱/۳۷)	۸/۴۴ (۲/۱۳)	۹/۸۳ (۲/۳۶)
۸	۱۱/۹۴ (۱/۸۵)	۱۲/۷۸(۳/۴)	۱۴/۴۱ (۳/۵۱)
۱۰	۲۷/۱۸ (۴/۶۲)	۳۱/۳۷ (۵/۲)	۳۴/۴۳ (۶/۵۴)

www.SID.ir

Archive of SID

۴- نتیجه‌گیری

به طور کلی با افزایش دز تابش، مقدار محصولات رادیولیزی ایزومرهای تیروزین تشکیل شده در محلول‌های آبی فنیل‌آلانین به طور خطی افزایش یافت زیرا با افزایش دز و در نتیجه با افزایش انرژی جذب شده، یونیزاسیون و برانگیختگی‌های بیشتری در مولکول‌های آب و فنیل‌آلانین رخ داده که در نهایت سبب تشکیل بیشتر ایزومرهای تیروزین شده است. در دزهای بالای ۱۰kGy ایزومرهای تیروزین تشکیل شده به قدری می‌باشند که با مولکول‌های فنیل‌آلانین جهت واکنش با رادیکال‌های هیدروکسیل رقابت می‌نمایند بنابراین با افزایش دز، افزایش متناسبی در تشکیل ایزومرهای تیروزین مشاهده نمی‌شود. این نتایج نشان می‌دهند که واکنش هیدروکسیله شدن مولکول‌های فنیل‌آلانین به وسیله گروه‌های عاملی ترکیبات موجود در اطراف مولکول‌های فنیل‌آلانین تحت تأثیر قرار می‌گیرد و سرعت واکنش اجزای محلول با محصولات رادیولیزی آب عامل مهمی در تشکیل محصولات انتهایی پرتودهی می‌باشد. بدین ترتیب می‌توان انتظار داشت که مواد زمینه موجود در مواد غذایی پرتودهی شده بر تشکیل ارتوتیروزین تأثیر گذارد و تکرارپذیری روش ارتوتیروزین در آشکارسازی مواد غذایی پرتودهی شده را تضعیف نماید [۶].

تأثیر pH در مقدار ایزومرهای تیروزین تشکیل شده در محلول‌های آبی فنیل‌آلانین نشان می‌دهد که در آشکارسازی پرتودیدگی مواد غذایی با استفاده از روش ارتوتیروزین باید احتیاط‌های لازم جهت جلوگیری از تغییر pH موادغذایی صورت گیرد و آشکارسازی غذاهای پرتودهی شده‌ای که نیازمند تنظیم pH جهت کنترل میکروارگانیسم‌ها می‌باشند با این روش مشکل خواهد بود [۲۵].

بطوری که نشان داده شد در پرتودهی محلول‌های آبی فنیل‌آلانین، واکنش هیدروکسیله شدن حلقه آروماتیکی فنیل‌آلانین به وسیله شرایط پرتودهی نظیر: دما، pH، حضور اکسیژن و مقدار دز تحت تأثیر قرار می‌گیرد. این عوامل ممکن است بر نتایج حاصل از آشکارسازی پرتودیدگی موادغذایی با استفاده از روش ارتوتیروزین تأثیر گذارد.

پی‌نوشت‌ها:

۱-ESR: Electron Spin Resonsnce

۲- DEFT/APC: Differential Epiluoresence Filter Technique & Aerobic Plate Count

۳- Aqueous Electron

۴- Dose Rate

۵- Hydroperoxyl Radical

۶- Superoxide Radical

References:

1. IAEA general confferecce, Thechnical Co-operation report for food irradiation, GC(40) INF/3, (1996).
2. "Analytical detection methods for irradiated foods," A review of the current literature, Joint FAO/IAEA division of nuclear techniques in food and agriculture, IAEA-TECDOC-587 Austria, March, (1991).
3. H. Delincee, "Analytical methods to identify irradiated foods- a review, Radiat," Phys. Chem. 63, 455-458 (2002).
4. Y. Shimoyama, M. Ukai, H. Nakamura, "Advanced protocol for detection of irradiated food by electron spin resonance spectrometry," 76, 1837-1839 (2007).
5. E. Marchioni, P. Horvatovich, H. Charon, "Detection of irradiated ingredients included in low quantity in non irradiated food matrix," J. Agrical & food Chem, 53, 3769-3773 (2005).
6. R. Molins, "Food irradiation: principles and application," Wiley Interscience, New York (2001).
7. C.H. McMurray, "Detection methods for irradiated foods: current status, Cambridge," UK: Royal Society of Chemistry (1996).
8. L.R. Karam, M.G. Simic, "Formation of ortho-tyrosine by radiation and organic solvents in chiken tissue," J. Bio. Chem, 265 (20), 11581-11585 (1990).

www.SID.ir

Archive of SID

9. M. Miyahara, H. Ito, T. Nagasawa, "Determination of o- tyrosine production in aqueous solutions of phenylalanine irradiated with gamma ray using high performance liquid chromatography with Autometed pre-column derivatization and laser fluorometric detection," J. Health Sci, 46(3), 192-199 (2000).

10. M.G. Simic, E. Gajewski, M. Dizaroglu, "Kinetics and mechanisms of hydroxyl radical induced crosslinks between phenylalanine peptides," Radiat. Phys Chem, 24, 465-473 (1986).

11. S. Solar, W. Solar, N. Getoff, "Reactivity of OH with tyrosine in aqueous solution studied by pulse radiolysis," J. Phys. Chem, 88, 2091-2095 (1984).

12. H. Zegota, K. Kolodziejczyk, M. Krol, B. Krol, "O-tyrosine hydroxylation by ·OH radicals, Dopa formation in gamma irradiation aqueous solution," Rdiat. Phys. Chem, 72, 25-33 (2005).

13. M. Li, S. Carlson, J.A. Kinar, H. Perpall, "HPLC and LC- Ms studies of hydroxylation of phenylalanine as assay for hydroxyl radicals generated from Udenfriend's reagent," Biochem. Biophys. Res. Commun, 312, 316-322 (2003).

14. M.G. Simic, "Formation of o-tyrosine in aqueous phenylalanine solutions by gamma irradiation foods," J. Agric. Food Chem, 26, 5-14 (1976).

15. P. Krajinik, R.M. Quint, S. Solar, N. Getoff, G. Sntag, "Detection of irradiation of meats by HPLC determination for o-tyrosine using novel Laser fluorometric Detection, Z Natufrosch," 50a, 864-870 (1995).

16. W. Meier, R. burgen, D. Frohlich, "Analysis of o-tyrosine as a method for the identification of irradiated chicken and comparision with other methods," Radiat. Phys. Chem, 35, 332- 336 (1990).

17. N. Chuaqui-offerman, T. McDougall, "An HPLC method to determine o- tyrosine in chicken meat," J. Agric. Food Chem, 39, 300-302 (1991).

18. M. Miyahara, T. Nagasawa, "Identification of irradiation of boned chicken by determination of o-tyrosine and ESR spectrometry," J. of Health Sci, 48, 79-82 (2002).

19. W.G. Hein, T.J. Simat, H. Steinhart, "Determination of non protein bound o-tyrosine as a marker of the detection of irradiated shrimps," Europ. Food Res & Technol, 210 (4) (2000).

20. H. Ito, "Identification of irradiation of boned chicken by determination of o-tyrosine and electron spin resonance spectrometry," J. Health Sci, 48 (1), 79- 82 (2002).

21. M. Dizdaroglu, E. Gajewski, M.G. Simic, H.C. Krutzsch, "Detecting irradiated foods: use of hydroxyl radical biomarkers," Int. J. Radait. Biol, 43, 185- 193 (1983).

22. C.T. Pedersen, "The o-tyrosine method for identification of irradiated chicken," BCR workshop on potential new methods on detection of irradiated food, 13-15 Feb (1990).

23. K.W. Bogl, "Methods for identification of irradiated food," Radiat. Phys. Chem, 35, 301-310 (1990).

24. B.E. Proctor, D.S. Bhatia, "Influence of irradiation conditions on o-tyrosine formation in irradiated chicken meat," Biochem. J, 51, 535-538 (1952).

25. D. Wang, H.P. Schuchmann, C. Von Sonntag, Z. Naturforsch, "Analysis of o-tyrosine as a detection method of irradiated food," 48b, 761-770 (1993).

www.SID.ir