

تعیین غلظت آمین‌های آروماتیک حلقوی در گوشت‌های حرارت‌دیده با استفاده از روش مؤثر استخراج با ماکروویو و ریزاستخراج همراه با دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا

فاطمه برزگر^۱، نرگس امید^۱، مرضیه کمانکش^۲، عبدالرضا محمدی^۳

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
۲- دانشجوی دکتری، دانشکده شیمی، دانشگاه علم و صنعت ایران، تهران، ایران
۳- نویسنده مسئول: استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، پست الکترونیکی: ab.mohammadi@sbmu.ac.ir

تاریخ پذیرش: ۹۸/۳/۸

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۲/۱۷

چکیده

سابقه و هدف: آمین‌های آروماتیک حلقوی ترکیبات شیمیایی سرطان‌زا و جهش‌زایی هستند که توسط حرارت دادن مواد غذایی غنی از پروتئین از جمله گوشت و فرآورده‌های گوشتی تشکیل می‌گردند. استخراج این ترکیبات از بافت پیچیده‌ی گوشت‌های حرارت‌دیده و کباب شده ابتدا با پیش استخراج توسط امواج مایکروویو و روش دقیق، سریع و حساس ریزاستخراج انجام گرفت و پس از فرآیند آماده‌سازی و استخراج، نمونه به دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا تزریق شد.

مواد و روش‌ها: بهینه‌سازی متغیرهای مؤثر در استخراج آمین‌های آروماتیک حلقوی به کمک رویه یک متغیر در یک زمان انجام پذیرفت که نوع و حجم حلال استخراجی، نوع و حلال پخشی، مقدار نمک و pH به عنوان مهم‌ترین پارامترهای مؤثر بر کارایی فرآیند استخراج، بهینه‌سازی شدند. به منظور معتبرسازی روش پیشنهادی، ارقام شایستگی روش محاسبه شد. در نهایت غلظت آمین‌های آروماتیک حلقوی موجود در چند نمونه از فرآورده‌های گوشتی تهیه شده از سوپرمارکت‌ها و رستوران‌های مختلف شهر تهران با استفاده از روش پیشنهادی تعیین گردید.

یافته‌ها: مقادیر بهینه‌ی متغیرهای مؤثر بر کارایی روش پیشنهادی تعیین شد. ارقام شایستگی روش پیشنهادی از جمله حد تشخیص بین ۲/۵ تا ۳/۱ نانوگرم بر گرم و انحراف استاندارد بین ۵/۸٪ تا ۸/۱٪ گزارش شد که قابل مقایسه و یا در مواردی بهتر از روش‌های دیگر می‌باشند. کارایی روش پیشنهادی در نمونه‌های حقیقی به خوبی اثبات گردید.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این پژوهش ثابت کرد که روش پیشنهادی توانایی بالایی جهت استخراج و اندازه‌گیری مقادیر بسیار اندک آمین‌های آروماتیک حلقوی را از بافت پیچیده فرآورده‌های گوشتی مختلف دارد.

واژگان کلیدی: آمین‌های آروماتیک حلقوی، فرآورده‌های گوشتی حرارت‌دیده، استخراج بر پایه‌ی مایکروویو، ریزاستخراج، کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا

• مقدمه

آمین‌های آروماتیک حلقوی شامل 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b] pyridine (PhIP)، 2-amino-3,8-methylimidazo[4,5-f]quinolone (IQ)، 2-amino-dimethylimidazo[4,5-f]quinolone (MeIQ) و 3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) تولید می‌کند که برای بدن انسان بسیار مضر است (۴). مطالعات اپیدمیولوژیک حاکی از آن است که این مواد باعث افزایش خطر ابتلا به سرطان سینه، معده، روده بزرگ، پانکراس،

گوشت و فرآورده‌های گوشتی مهم‌ترین منبع پروتئین، چربی، آمینواسیدهای ضروری، املاح، ویتامین‌ها و دیگر مواد مغذی برای بدن انسان هستند (۱). این ماده‌ی غذایی با ارزش در سلامت بشر نقش مهمی را ایفا می‌کند (۲). امروزه مصرف این ماده‌ی غذایی به طور چشمگیری افزایش یافته است. در سال ۲۰۱۴ سرانه مصرف گوشت در جهان ۷۱/۳۱٪ گزارش شد (۳). اما این ماده غذایی غنی از پروتئین در حین فرآیند پخت در دماهای بالا ترکیبات سرطان‌زا و جهش‌زایی از جمله

ریزاستخراج مایع-مایع پخشی (DLLME) به عنوان یک روش ریزاستخراج کارا و مؤثر در استخراج انواع گوناگون ترکیبات، توسط اسدی و همکاران ایشان ابداع شد. این روش بر پایه‌ی سیستم سه فازی محلول نمونه، حلال استخراجی و حلال پخشی در استخراج گونه‌ی مورد نظر می‌باشد (۱۸) که دارای مزایایی از قبیل نیاز به حجم محدودی از حلال‌های استخراجی، استفاده‌ی آسان، قابلیت جفت شدن با دستگاه‌های آنالیزی، دوست‌دار محیط زیست، فاکتور تغلیظ بالا و افزایش بازدهی استخراج می‌باشد (۴). پس از اجرای مرحله‌ی آماده-سازی نمونه‌ی مورد هدف آماده تریق به دستگاه تجزیه‌ای می‌گردد.

دستگاه‌های تجزیه‌ای که تا به امروز برای تعیین مقدار آمین‌های آروماتیک حلقوی در مطالعات گوناگون به کار رفته-اند شامل: کروماتوگرافی مایع-طیف‌سنج جرمی (۱۹)، کروماتوگرافی گازی-طیف‌سنج جرمی (۲۰)، کروماتوگرافی مایع فوق سریع (۲۱) و کروماتوگرافی مایع با آشکارساز فرابنفش و فلورسانس (۲۲) می‌باشند.

در این مطالعه روش MAE-DLLME-HPLC به عنوان یک تکنیک مؤثر و انتخاب‌پذیر برای تعیین مقدار ۴ نوع از آمین‌های آروماتیک حلقوی شامل PhIP، MeIQ، MeIQx و IQ در فرآورده‌های گوشتی ارائه می‌شود.

• مواد و روش‌ها

استانداردها، مواد شیمیایی و نمونه‌ها: استانداردهای ۴ نوع از آمین‌های آروماتیک حلقوی شامل 2-amino-1-phenylpyridine (PhIP)، 2-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (MeIQ)، 2-amino-3-methylimidazo[4-5-f]quinolone (IQ)، 2-amino-3,8-dimethylimidazo[4,5-f]quinolone (MeIQx) و 2-amino-3,4-dimethylimidazo[4,5-f]quinoxaline (MeIQx) از شرکت Santa Cruz Biotechnology (Dallas, TX, USA) تهیه شد. متانول و استونیتریل HPLC grade از شرکت مرک (Darmstadt, Germany) خریداری شد. استون، ۱-اکتانول، استیک اسید، سدیم استات، هیدروکلریک اسید (۳۷w/w)، سدیم کلراید و پتاسیم هیدروکسید نیز از شرکت مرک (Darmstadt, Germany) تهیه شد. محلول‌های کاراز از قبیل پتاسیم هگزا فروسیانید (کارز I) و استات روی (کارز II) به ترتیب از Panreac (Spain) و Merck (Darmstadt, Germany) تهیه شدند. آب نیز با سیستم GFL2104 (Burgwedel, Germany) تخلیص شد. محلول استاندارد مرجع در غلظت ۲۰۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر تهیه گردید. سپس محلول‌های کاری ۱، ۲۰، ۵۰،

پروستات و... می‌شوند (۴-۸). عواملی از قبیل مدت زمان پخت، روش پخت، pH، نوع گوشت، میزان چربی، میزان آمینواسیدهای آزاد، کراتین، کراتینین و... بر میزان و آمین‌های آروماتیک حلقوی تشکیل شده در گوشت و فرآورده‌های گوشتی حرارت‌دیده تأثیر می‌گذارد (۹-۱۲). بنابراین تعیین و اندازه‌گیری این مواد شیمیایی مضر در نمونه‌های غذایی نام برده از اهمیت بالایی برخوردار می‌باشد.

به علت حضور مقادیر ناچیز آمین‌های آروماتیک حلقوی در بافت پیچیده گوشت، تریق مستقیم بافت جامد این نمونه غذایی به دستگاه آنالیزی، بدون هیچ گونه آماده‌سازی جهت اندازه‌گیری آمین‌های آروماتیک حلقوی امکان‌پذیر نخواهد بود. بنابراین به کارگیری روش آماده‌سازی دقیق و با راندمان استخراج بالا که دارای قابلیت استخراج مقادیر بسیار اندک این ترکیبات مضر را از بافت پیچیده فرآورده گوشتی داشته باشد، لازم و ضروری است (۱۳، ۱۴).

یک روش آماده‌سازی سریع و مناسب به منظور آنالیز گونه‌های موجود در بافت نمونه‌های جامد و پیچیده، نظیر انواع گوشت و فرآورده‌های آن، روش استخراج بر پایه‌ی امواج مایکروویو می‌باشد. مکانیسم عمل در این روش بدین صورت است که جذب امواج توسط نمونه و حلال باعث تغییر و نوسان حرکت چرخشی مولکول‌ها می‌گردد. تمایل مولکول‌ها در برگشت به حالت چرخشی قبلی خود باعث برخورد آن‌ها به یکدیگر شده و در نتیجه دمای محیط افزایش پیدا می‌کند. نظر به اینکه تابش این امواج در سرتاسر نمونه و به صورت یکنواخت انجام می‌پذیرد، پس از تابش امواج، دمای نمونه به سرعت بالا رفته و باعث نرم شدن یا تخریب دیواره‌های سلولی بافت نمونه گشته و همین امر باعث می‌شود که آنالیت با سهولت و بسیار سریع و با راندمان بالا از آن جدا شود. این روش می‌تواند به عنوان یک تکنیک پیش استخراج بسیار مؤثر جهت خروج آنالیت از بافت جامد نمونه به محیط آبی، مورد استفاده قرار گیرد. همچنین این تکنیک یکی از بهترین روش‌ها جهت کم کردن زمان استخراج و افزایش میزان درصد بازیافت آنالیت در تجزیه‌ی مواد غذایی جامدی که آنالیت مورد نظر دارای پایدار گرمایی است، می‌باشد.

روش‌های قدیمی آماده‌سازی مانند استخراج مایع-مایع (۱۵) و استخراج فاز جامد (۱۶) دارای محدودیت‌هایی از قبیل قابلیت بازیابی پایین، احتمال از دست رفتن آنالیت و... هستند (۱۷). در صورتی که اخیراً، روش‌های ریزاستخراج به‌عنوان روش‌های برگزیده و جدید برای استخراج انواع آنالیت‌ها از جمله آمین‌های آروماتیک حلقوی معرفی شده‌اند. روش

مدت ۵ دقیقه در ۹۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد و در نهایت فاز رویی به فالكون ۱۵ منتقل شد و آماده فرآیند ریزاستخراج مایع-مایع پخشی گشت. در این مرحله ۱ گرم از سدیم کلرید به محلول حاصل از مراحل قبل اضافه شد و عمل شیک کردن به خوبی انجام گرفت تا نمک به خوبی حل شود. سپس ۶۲۵ میکرولیتر متانول به عنوان حلال پخشی و ۶۰ میکرولیتر ۱-اکتانول به عنوان حلال استخراجی به محلول اضافه شد و به طور کامل هم زده شد تا یک محلول کدر حاصل گردد. سپس به مدت ۵ دقیقه با سرعت ۹۰۰۰ rpm سانتریفیوژ شد. آمین-های آروماتیک حلقوی به عنوان آنالیت‌های موردنظر در فاز رویی که شامل ۱-اکتانول است جمع شدند و به صورت مستقیم به HPLC تزریق شدند.

بهینه‌سازی روش: در این مطالعه پارامترهای مؤثر بر فرآیند ریزاستخراج آمین‌های آروماتیک حلقوی در نمونه گوشت‌های حرارت دیده از جمله نوع و حجم حلال پخشی، نوع و حجم حلال استخراجی، pH محلول نمونه و اثر نمک مورد بررسی قرار گرفتند (۲۲،۴) و مقادیر بهینه‌ی آن‌ها جهت کاربرد در اندازه‌گیری مقادیر آنالیت‌های مورد نظر در نمونه‌های حقیقی مورد استفاده قرار گرفتند. بهینه‌سازی پارامترهای مذکور با استفاده از رویه یک متغیر در یک زمان انجام گرفت. حجم‌های ارائه شده از این روش طراحی آزمایش جهت بهینه‌سازی برای حلال استخراجی ۴۰، ۶۰، ۸۰ و ۱۰۰ برای حلال پخشی ۳۰۰، ۴۷۵، ۶۲۵ و ۸۰۰ درصد نمک ۰، ۵، ۱۰، ۲۰ و رنج pH ۲ تا ۱۲ در نظر گرفته شد.

• یافته‌ها

نتایج بهینه‌سازی عوامل مؤثر بر استخراج با استفاده از رویه یک متغیر در یک زمان (OVAT): تمام متغیرهای مؤثر بر فرآیند ریزاستخراج با استفاده از شیوه یک متغیر در یک زمان بهینه شدند. جداسازی، بهینه و آشکارسازی آمین-های آروماتیک حلقوی توسط بهینه‌سازی چندین فاکتور مؤثر بر فرآیند ریزاستخراج مایع-مایع پخشی از قبیل: نوع و حجم حلال‌های استخراجی و پخشی، میزان نمک و pH نمونه انجام گرفت.

حلال استخراجی مناسب و تعیین حجم بهینه‌ی آن برای روش MAE-DLLME-HPLC: یکی از مهم‌ترین پارامترهای مؤثر در تکنیک ریزاستخراج مایع-مایع پخشی، نوع حلال استخراج کننده می‌باشد. به منظور انتخاب نوع حلال استخراجی مناسب، سه نوع حلال سیکلوهگزان، هگزانول و ۱-اکتانول تحت شرایط یکسان مورد مقایسه قرار گرفتند. مقایسه

۱۰۰، ۵۰۰ و ۱۰۰۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر با رقت‌سازی توسط متانول بدست آمد. همه مواد شیمیایی و استانداردها در دمای یخچال نگهداری شدند. ۴ نمونه کباب کوبیده، ۳ نمونه ناگت مرغ و ۳ نمونه ماهی از رستوران‌ها و سوپر مارکت‌های سراسر شهر تهران تهیه شدند.

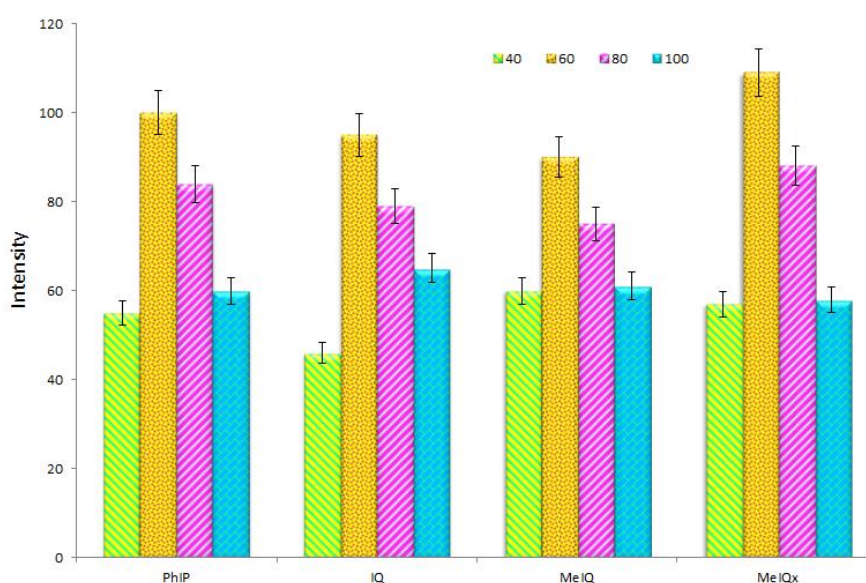
اطلاعات دستگاهی: آنالیز دستگاهی توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا مدل Agilent 1260 series USA که با پمپ چهارگانه G1311C، واحدهای چند گانه انتقال حلال، محفظه اختلاط‌سازی، گاززدای تحت خلا و دریچه شش گانه (Rheodyne model 7125, USA)، آشکارساز ODS(250 mm × 4 و ستون G1314B UV-Vis (Berlin PUR C₁₈-M-SE mm I.D., 5 μm) (Charlottenburg, Germany) مجهز شده است. نرم‌افزار Agilent Chemstation G2170AA برای پردازش اطلاعات حاصل مورد استفاده قرار گرفت. جداسازی ۴ نوع از آنالیت‌های ذکر شده توسط بافر استات سدیم (pH=۳) و استونیتریل با نسبت V/V ۹۲:۸ به عنوان فاز متحرک با سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه و طول موج ۲۶۴ نانومتر انجام گرفت. محفظه تزریق ۲۰ میکرولیتر بوده و دمای ستون ۲۵ درجه سانتی‌گراد بوده است. مدت زمان هر تزریق برای ردیابی پیک‌های مربوط به هر ۴ آنالیت ۳۰ دقیقه در نظر گرفته شد. دستگاه هضم مایکروویو (Delonghi 7 days (Treviso, Italy) برای استخراج اولیه آنالیت‌های مذکور مورد استفاده قرار گرفت.

آماده‌سازی نمونه و ریزاستخراج: نمونه‌های گوشت گرما دیده با یک مخلوط‌کن به صورت یکنواخت و به حالت پودری درآمد. ۱۰ میلی‌لیتر از محلول پتاسیم هیدروکسید (1 mol L⁻¹)^۱، استونیتریل و اتانول با نسبت ۱۰:۲۰:۷۰ با ۱ گرم از نمونه مورد نظر در ظرف مایکروویو مخلوط شد. سپس به مدت ۱/۵ دقیقه تحت امواج ۵۰ مگاهرتز مایکروویو قرار گرفت. بعد از سرد شدن نمونه‌ها تا دمای محیط، محتوای ظروف مایکروویو به فالكون ۵۰ میلی‌لیتر منتقل شد و در ۹۰۰۰ rpm به مدت ۱/۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. پس از اتمام سانتریفیوژ فاز رویی به فالكون ۵۰ میلی‌لیتر دیگر منتقل شد و pH آن تا عدد ۳ تنظیم شد. سپس برای رسوب دادن پروتئین‌ها ۱ میلی‌لیتر از کارز I و ۱ میلی‌لیتر کارز II به آن اضافه شد. محلول حاصل مجدداً در ۹۰۰۰ rpm به مدت ۵ دقیقه تحت سانتریفیوژ قرار گرفت. پس از پایان سانتریفیوژ فاز رویی جدا شده و به فالكون ۵۰ میلی‌لیتر دیگر انتقال یافت و pH نهایی توسط پتاسیم هیدروکسید تا عدد ۱۲ تنظیم شد. محلول حاصل مجدداً به

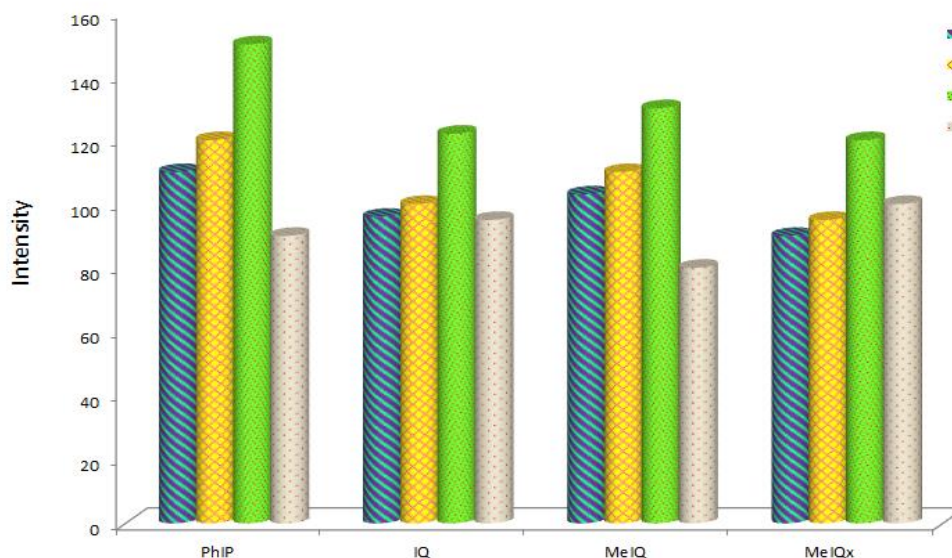
حلال پخشی سه حلال استون، متانول و اتانول مورد ارزیابی قرار گرفتند که اطلاعات بدست آمده، بالا بودن درصد استخراج را با به کارگیری حلال متانول نشان داد. همچنین به منظور تعیین حجم بهینه حلال پخشی گستره‌ی حجمی ۳۰۰، ۴۷۵، ۶۲۵ و ۸۰۰ میکرولیتر از متانول برای تعیین بهترین شرایط استخراجی مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به شکل ۲ بازده استخراجی در حجم ۶۲۵ میکرولیتر افزایش یافت و در حجم بالاتر و پایین‌تر از آن بازده استخراجی کاهش یافت. بنابراین این حجم به عنوان حجم بهینه در آزمایش‌ها استفاده گردید.

میانگین سطح زیر پیک آمین‌های آروماتیک حلقوی برای سه حلال استخراجی مذکور نشان داد که حلال ۱-اکتانول بیشترین کارایی استخراج و رفتار کروماتوگرافی بهتری را در استخراج آنالیت‌های مذکور نسبت به حلال‌های دیگر دارد. به منظور بهینه‌سازی حجم حلال استخراجی، حجم‌های متفاوتی از ۱-اکتانول شامل ۴۰، ۶۰، ۸۰، ۱۰۰ میکرولیتر در شرایط آزمایشی یکسان مورد بررسی قرار گرفتند. همان‌طور که در شکل ۱ مشخص است، پاسخ با افزایش حجم ۱-اکتانول تا ۶۰ میکرولیتر افزایش یافت.

حلال پخشی مناسب و تعیین حجم بهینه آن برای روش MAE-DLLME-HPLC: با هدف انتخاب بهترین نوع



شکل ۱. روند تغییر بازدهی استخراج با تغییر حجم حلال استخراجی (میکرولیتر) در فرآیند ریزاستخراج

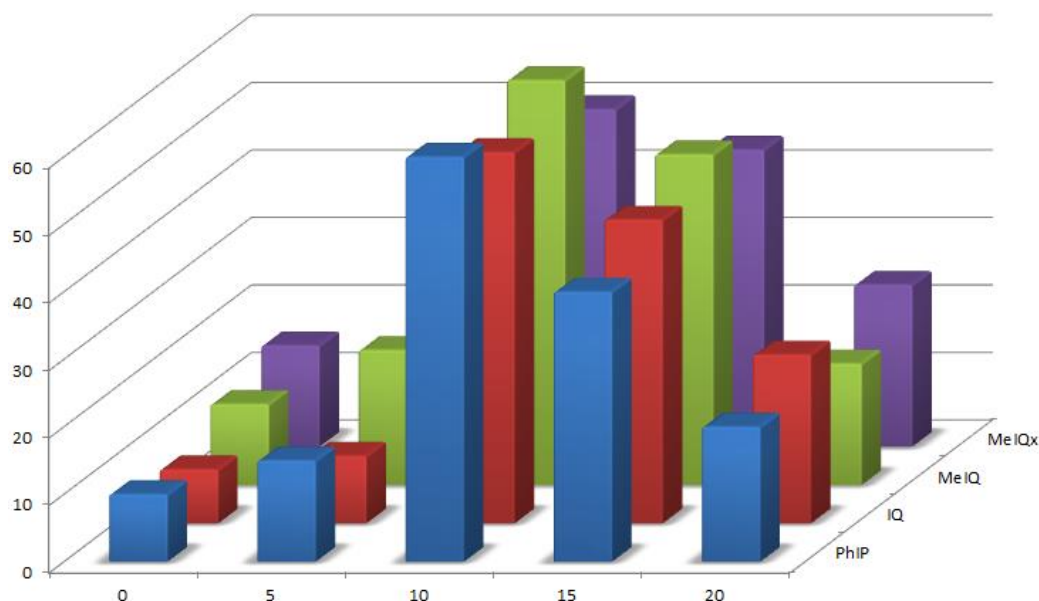


شکل ۲. روند تغییر بازدهی استخراج با تغییر حجم حلال پخشی (میکرولیتر) در فرآیند ریزاستخراج

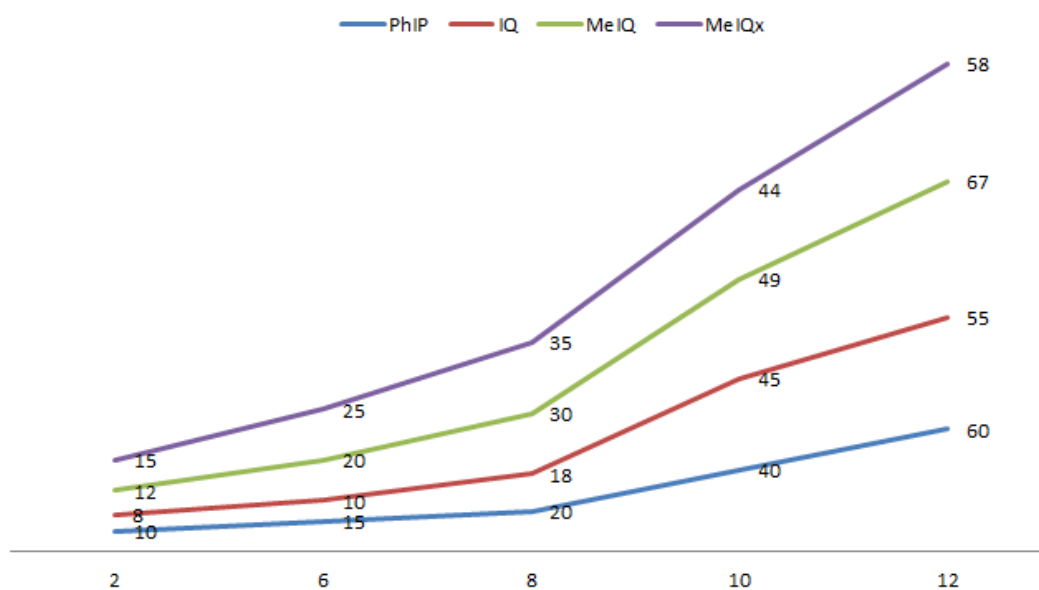
۱۰ میلی لیتر محلول) از سدیم کلرید بیشترین بازده استخراجی مشاهده شد. (شکل ۳)

تعیین pH بهینه در روش MAE-DLLME-HPLC: به منظور تعیین pH بهینه، فرآیند استخراج در محدوده pH ۲ تا ۱۲ مورد آزمایش قرار گرفت و با توجه به شکل ۴ pH نهایی فرآیند استخراج، عدد ۱۲ انتخاب شد.

میزان نمک مورد استفاده‌ی بهینه در روش MAE-DLLME-HPLC: براساس نتایج به دست آمده از مراحل بهینه‌سازی، گستره‌ی انتخابی نمک سدیم کلرید در فرآیند ریزاستخراج برای بهینه‌سازی ۰، ۵، ۱۰ و ۲۰ درصد انتخاب شدند که این مقادیر در شرایط یکسان آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت و در نتیجه در مقدار ۱۰ درصد (۱ گرم در



شکل ۳. روند تغییر بازدهی استخراج با تغییر مقدار نمک (%) در فرآیند ریزاستخراج



شکل ۴. روند تغییر بازدهی استخراج با تغییر pH در فرآیند ریزاستخراج

نتایج اندازه‌گیری غلظت HAAs در انواع نمونه‌های گوشت‌های حرارت‌دیده: جدول ۳ مقادیر یافت شده‌ی HAAs را در نمونه‌های مختلف گوشت‌های کباب‌کوبیده، ناگت مرغ و ماهی حرارت‌دیده نشان می‌دهد.

نتایج معتبرسازی روش پیشنهادی جهت تعیین HAAs: نتایج حاصل از معتبرسازی روش، در جدول ۱ نشان داده شده است. همچنین ارقام شایستگی روش پیشنهادی با ارقام شایستگی روش‌های دیگر آنالیز HAAs در مطالعات پیشین مقایسه شده است (جدول ۲).

جدول ۱. ارقام شایستگی روش پیشنهادی جهت آنالیز HAAs

آنالیت	گستره‌ی خطی (نانوگرم بر گرم)	ضریب همبستگی	درصد بازدهی	حد تشخیص (نانوگرم بر گرم)	حد تعیین (نانوگرم بر گرم)	انحراف استاندارد نسبی (%)	فاکتور تغلیظ
PhIP	۱-۱۰۰۰	۰/۹۸۹	۸۶	۲/۹	۹/۶	۶/۴	۱۰۰
IQ	۱-۱۰۰۰	۰/۹۹۲	۹۳	۲/۵	۸/۳	۵/۸	۱۱۰
MeIQ	۱-۱۰۰۰	۰/۹۷۸	۹۷	۲/۷	۸/۹	۷/۹	۱۰۵
MeIQx	۱-۱۰۰۰	۰/۹۹۰	۸۹	۳/۱	۱۰/۲	۸/۱	۱۳۵

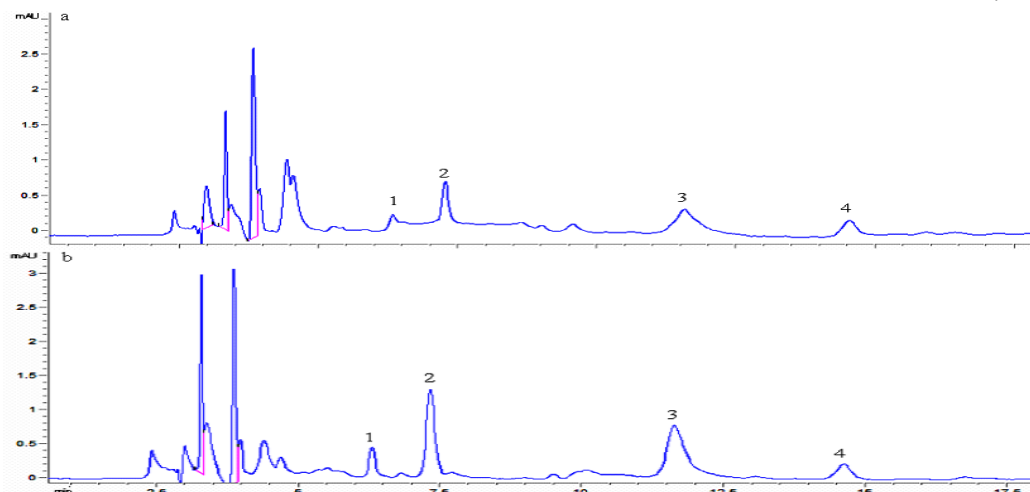
جدول ۲. مقایسه ارقام شایستگی روش پیشنهادی جهت آنالیز HAAs با روش‌های دیگر

روش	گستره‌ی خطی (نانوگرم بر گرم)	ضریب همبستگی	درصد بازدهی	حد تشخیص (نانوگرم بر گرم)	انحراف استاندارد نسبی (%)	منبع
SPE-UHPLC-MS/MS	-	۰/۹۹۵۷-۰/۹۹۹۶	۵۸/۲-۱۰۷/۶	۰/۰۱۳-۰/۲۷۵	-	۲۵
PLE-LC-MS/MS	-	۰/۹۴۵-۰/۹۹۹	۴۵-۷۹	۰/۰۲-۱	< ۱۳	۱۹
SPE-HPLC-UV-DAD	-	۰/۹۹۷-۰/۹۹۹	۵۲/۷-۶۹/۴	۰/۰۱۱	-	۲۶
DLIME-HPLC	-	-	۶۹-۱۰۰	-	۵/۴-۱۰/۹	۲۲
MAE-DLIME-HPLC	۱-۱۰۰۰	۰/۹۷۸-۰/۹۹۲	۸۶-۹۷	۲/۵-۳/۱	۵/۸-۸/۱	مطالعه حاضر

جدول ۳. میانگین غلظت HAAs (نانوگرم بر گرم) در گوشت‌های حرارت‌دیده‌ی مورد مطالعه

نمونه	PhIP	IQ	MeIQ	MeIQX
ناگت ۱	۲۸۴/۶۰ ± ۲۲/۱۹	۳۱۶۶ ± ۱۸۶/۷۹	۱۳۳۳۸ ± ۸۷/۹۷	۱۲۵۰ ± ۹۸/۷۵
ناگت ۲	۴۸۴/۶۰ ± ۳۷/۷۹	۲۳۱۶ ± ۱۳۶/۶۴	ND	۳۵۰۰ ± ۲۷۶/۵۰
ناگت ۳	۱۸۸۲/۳۰ ± ۱۴۶/۸۱	۶۴۱۶ ± ۳۷۸/۵۴	۴۱۶ ± ۲۷/۴۵	ND
ناگت ۴	۳۰۰ ± ۲۳/۴۰	۱۰۸۳ ± ۶۳/۸۹	ND	۱۴۰۰ ± ۱۱۰/۶۰
کباب ۱	۲۳۵/۸۴ ± ۸/۷۲	۱۱۲/۵۰ ± ۶/۷۵	۹۱/۲۷ ± ۵/۲۹	۲۵۰ ± ۲۰/۲۵
کباب ۲	۱۴۱/۵ ± ۵/۲۳	۱۵۰ ± ۹/۰۰	۷۷/۵۸ ± ۴/۵۷	۵۷ ± ۴/۶۱
کباب ۳	۱۶۰/۳۷ ± ۵/۹۳	۱۲۵۰ ± ۷۵	۵۱۷/۲۴ ± ۳۰/۵۱	۴۰ ± ۳/۲۴
ماهی ۱	۸/۹ ± ۰/۶۵	ND	۱۸/۲ ± ۱/۱۸	۱۷/۸ ± ۱/۴۷
ماهی ۲	۳/۲ ± ۰/۲۳	ND	۲۰/۵ ± ۱/۳۳	۲۵/۲ ± ۲/۰۹
ماهی ۳	ND	ND	۱۱/۷ ± ۰/۷۶	۱۳/۶ ± ۱/۱۲

ND: تشخیص داده نشد.



شکل ۵. کروماتوگرام مربوط به چهار نوع HAA استخراج شده با روش پیشنهادی (۱: PhIP، ۲: IQ، ۳: MeIQ، ۴: MeIQX). شکل a مربوط به نمونه‌ی non-spiked کباب‌کوبیده و شکل b مربوط به نمونه‌ی spike کباب‌کوبیده در غلظت ۵۰۰ نانوگرم بر گرم می‌باشد.

● بحث

انتخاب حلال استخراجی مناسب و تعیین حجم بهینه

آن برای روش MAE-DLLME-HPLC: یکی از مهم‌ترین پارامترهای مؤثر در تکنیک ریزاستخراج مایع-مایع پخشی، نوع حلال استخراج کننده می‌باشد. عواملی از قبیل سازگاری با شرایط دستگاهی، کارایی بالا برای استخراج آنالیت‌های موردنظر و کمترین میزان حلالیت در آب از ویژگی‌های یک حلال استخراجی مناسب است. به‌طور کلی حلال‌های استخراجی چگالی کم‌تر یا بیشتر از آب دارند. حلال‌هایی که چگالی آن‌ها بیشتر از آب است در آنالیز با HPLC فرآیند استخراج را طولانی‌تر می‌کنند زیرا به تبخیر شدن و حل شدن آنالیت‌ها در حلال سازگار با دستگاه تجزیه‌ای نیاز است (۲۳). بنابراین در این پژوهش، ۱-اکتانول به علت نشان دادن بازدهی بالا در مرحله‌ی استخراج آنالیت‌های مورد هدف و سازگاری مناسب با دستگاه آنالیزی، به عنوان حلال استخراجی مناسب انتخاب گردید. در بحث تعیین حجم بهینه اکتانول، در حجم‌های کمتر از ۶۰ میکرولیتر به دلیل کم بودن حجم حلال آلی تمام آنالیت‌ها نمی‌توانند از فاز آبی به فاز آلی استخراج شوند و همچنین جمع‌آوری تکرارپذیر حلال آلی در پایان استخراج با مشکل رو به رو است، در نتیجه میزان استخراج کم است. در حجم‌های بیشتر از ۶۰ میکرولیتر نیز به دلیل زیاد شدن حجم حلال آلی و رقیق شدن محلول، فاکتور پیش‌تغلیظ کاهش می‌یابد. بنابراین حجم بهینه ۶۰ میکرولیتر به عنوان حجم مناسب حلال استخراجی در نظر گرفته شد.

انتخاب حلال پخشی مناسب و تعیین حجم بهینه آن

برای روش MAE-DLLME-HPLC: از مهم‌ترین ویژگی‌های مورد نظر در انتخاب حلال پخشی در روش ریزاستخراج، امتزاج پذیری مناسب این حلال با فاز آبی و نیز با حلال استخراج کننده می‌باشد. لازم به ذکر است که حلال پخشی کننده با توجه به اثرگذاری مستقیمی که بر روی ویسکوزیته-ی محیط آبی و حلال استخراجی ایفا می‌کند، می‌تواند در چگونگی و کیفیت تولید قطرات در مرحله‌ی اضافه شدن حلال استخراجی و پخشی به محلول نمونه و کلونیدی شدن و در نتیجه در درصد بازدهی استخراج نقش به‌سزایی داشته باشد (۴). در این تحقیق از بین سه نوع حلال پخشی استون، متانول و اتانول، نتایج به دست آمده از به کارگیری حلال متانول تاکید کننده‌ی سازگاری بهتر و بیشتر این حلال با شرایط آزمایش و نیز استخراج بیشتر گونه‌ها با این حلال می-

باشد. زیرا متانول به علت قطبیت بالا باعث می‌شود تا ۱- اکتانول به خوبی در محلول آبی نمونه پخش شود. بنابراین متانول به عنوان مناسب‌ترین حلال پخشی انتخاب و در مراحل بعدی آزمایش مورد استفاده قرار گرفت. به منظور کسب بهترین حجم حلال پخشی نیز شواهد آزمایشگاهی نشان داد که در حجم‌های کمتر از ۶۲۵ میکرولیتر متانول، حالت ابری (کدر) در محلول به خوبی شکل نمی‌گیرد و فرآیند استخراج مختل می‌شود. حجم‌های بیشتر از ۶۲۵ میکرولیتر متانول نیز باعث کاهش ضریب توزیع ترکیبات مورد نظر در حلال آلی استخراج کننده شده و در نتیجه باعث کاهش میزان استخراج می‌شود. بنابراین حجم بهینه برای این حلال ۶۲۵ میکرولیتر انتخاب گردید.

تعیین میزان نمک مورد استفاده در روش MAE-

DLLME-HPLC: حلالیت آنالیت‌های موردنظر در فاز آبی هنگامی که قدرت یونی محیط افزایش یافته، کاهش می‌یابد زیرا مولکول‌های آب درگیر مولکول‌های مولد قطبیت در محیط شده (مثلا نمک اضافه شده در محیط) و این عمل یک نوع رهایی برای آنالیت‌های مورد نظر برای استخراج به وجود می‌آورد که به آن اثر salting out نمک می‌گویند. همین امر باعث افزایش کارایی در فرآیند ریزاستخراج می‌شود (۲۴). براساس نتایج بدست آمده بهترین استخراج، زمانی صورت می‌گیرد که مقدار سدیم کلرید مورد استفاده ۱ گرم باشد. کاهش کارایی استخراج در مقادیر بالاتر از ۱ گرم نمک به دلیل ایجاد حالت فوق اشباع در محلول بوده و ذرات نمک در این مقدار توانایی حل شدن در فاز آبی را نداشته و عملاً ادامه‌ی استخراج غیرممکن خواهد بود.

تعیین pH بهینه در روش MAE-DLLME-HPLC: جهت

انجام فرآیند استخراج در شرایط بهینه مقدار pH عدد ۱۲ با بیشترین درصد بازدهی استخراج به دست آمد. اصولاً به دلیل ساختار آمینی HAAs در محیط‌های قلیایی، تمایل آن‌ها برای استخراج در یک حلال آلی بیشتر خواهد بود. زیرا در این محیط ساختار HAAs به سمت شکل خنثی تغییر می‌کند و در نتیجه تمایل این آنالیت به نفوذ از نمونه‌ی آبی به حلال آلی بیشتر می‌گردد.

معتبرسازی روش اندازه‌گیری پیشنهادی جهت تعیین

HAAs در نمونه گوشت‌های حرارت‌دیده: معتبرسازی روش اندازه‌گیری HAAs با تکنیک پیشنهادی برای کسب اطمینان از کارایی روش ضروری می‌باشد. لذا معیارهای معتبرسازی یک روش تجزیه‌ای که عبارتند از: صحت، دقت،

می‌باشد. در تفسیر این یافته‌ها می‌توان اظهار داشت که از آن-جایی که در هر نوع نمونه (ماهی، کباب و ناگت) نوع ترکیبات تشکیل دهنده متفاوت بوده و حتی در نمونه‌های یکسان نیز مقادیر این ترکیبات و پیش‌سازها از جمله آمینواسیدهای آزاد، کراتین و کراتینین متفاوت است، بنابراین میزان و انواع هر نوع از آمین‌های آروماتیک حلقوی تشکیل شده در هر نمونه متفاوت خواهد بود. حتی نوع و مقدار ادویه‌جات مورد استفاده، میزان و زمان حرارت‌دهی و میزان چربی نیز می‌تواند در نوع و مقدار آمین‌های آروماتیک حلقوی تشکیل یافته در هر نمونه مؤثر باشد. در گوشت‌هایی که حاوی میزان چربی کمتری باشد مقدار پیش‌سازهای آمین‌های آروماتیک حلقوی بیشتر بوده و در نتیجه تشکیل این ترکیبات بیشتر خواهد بود. ادویه‌جات و به طور خاص برخی از این ترکیبات می‌توانند در کاهش یا حتی جلوگیری از تشکیل این مواد سرطان‌زا مؤثر باشند. هر آن‌چه زمان حرارت‌دهی و میزان آن در فرآیند طبخ بیشتر باشد میزان تشکیل آمین‌های آروماتیک حلقوی بیشتر خواهد بود. همان‌گونه که ذکر شد در این آزمایش بیشترین مقدار آمین‌های آروماتیک حلقوی بدست آمده برای MeIQ و مربوط به نمونه ۱ می‌باشد (جدول ۳)

نتیجه‌گیری

در تحقیق حاضر، روش MAE-DLLME-HPLC به عنوان یک تکنیک سریع، آسان، با حساسیت و انتخاب‌پذیری بالا و همچنین دارای کارایی بالا برای استخراج مقادیر بسیار کم آمین‌های آروماتیک حلقوی از بافت پیچیده‌ی نمونه‌های کباب کوبیده، کباب ترکی، ناگت و ماهی سرخ شده معرفی گردید. تکنیک مذکور در مقایسه با روش‌های متداول رایج از سرعت و حساسیت بالاتری برخوردار است. همچنین دقت زیاد، بازیابی بالا، انتخاب‌پذیری، فاکتور تغلیظ چشم‌گیر و قابلیت سازگاری با دستگاه تجزیه‌ای از مزایای دیگر روش پیشنهادی در این پژوهش می‌باشند.

سپاسگزاری

در پایان از معاونت محترم پژوهشی دانشکده و انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، به خاطر حمایت‌های مالی تشکر و قدردانی می‌شود.

محدوده خطی بودن، حد آشکارسازی و حد اندازه‌گیری مورد بررسی قرار گرفتند (۲۴).

بررسی منحنی‌های کالیبراسیون ترکیبات HAA در آب نشان می‌دهد که این منحنی‌ها با ضریب همبستگی بالا ($R^2 > 0.978$) در محدوده غلظتی $1-1000 \mu\text{g/L}$ خطی می‌باشند. بررسی نتایج مربوط به انحراف استاندارد نسبی نشان-دهنده دقت بالای روش می‌باشد ($0.5/8-0.8/1$). صحت روش (درصد بازیابی) اندازه‌گیری در حد قابل قبول می‌باشد (97% - 106%). حد تشخیص روش پیشنهادی برای HAAs برابر $2/5-3/1 \text{ ng/g}$ می‌باشد. حد اندازه‌گیری بدست آمده توسط این روش نیز، $8/3-10/2 \text{ ng/g}$ می‌باشد. مقادیر فاکتور تغلیظ در حد قابل قبول می‌باشد ($100-135$).

نتایج حاصل از معبرسازی روش نشان داد که روش توسعه یافته در این پژوهش روشی قابل اعتماد و مناسب برای اندازه‌گیری مقدار HAAs و مشتقات آن در نمونه‌های گوشت حرارت‌دیده می‌باشد. همچنین مقایسه ارقام شایستگی روش پیشنهادی با ارقام شایستگی دو روش دیگر نشان می‌دهد که منحنی کالیبراسیون آن در محدوده‌ی قابل قبولی برای اندازه‌گیری HAAs و مشتقات آن خطی می‌باشد.

مقدار HAAs در انواع نمونه‌های گوشت‌های حرارت-دیده:

در پژوهش حاضر، روش ریزاستخراج مایع-مایع پخشی برای جداسازی و اندازه‌گیری HAAs در ۱۰ نمونه حقیقی از انواع گوشت‌های حرارت‌دیده که از سوپرمارکت‌ها و رستوران-های سطح شهر تهران تهیه شده بود، مورد استفاده قرار گرفت. براساس جدول ۳ نتایج حاکی از آن است که کم‌ترین و بیش‌ترین غلظت بدست آمده برای PhIP به ترتیب $3/2 \pm 0/23$ (نمونه ماهی ۲) و $146/81 \pm 1882/30$ (ناگت ۳) نانوگرم بر گرم، کم‌ترین و بیش‌ترین غلظت IQ به ترتیب غیرقابل تشخیص (نمونه‌های ماهی) و $6416 \pm 378/54$ (ناگت ۳) نانوگرم بر گرم، کم‌ترین و بیش‌ترین میزان تعیین شده برای MeIQ غیر قابل تشخیص (ناگت ۲) و $87/97 \pm 13338$ (ناگت ۱) نانوگرم بر گرم و همچنین کم‌ترین و بیش‌ترین مقدار بدست آمده از نمونه‌ها برای MeIQx غیرقابل تشخیص (ناگت ۳) و $3500 \pm 276/50$ (ناگت ۲) نانوگرم بر گرم

References

1. Biesalski H-K. Meat as a component of a healthy diet – are there any risks or benefits if meat is avoided in the diet? *Meat Sci.* 2005;70(3):509–24.
2. Higgs JD. The changing nature of red meat: 20 years of improving nutritional quality. *Trends Food Sci Technol*

2000;11(3):85–95.

3. Zhang W, Naveena BM, Jo C, Sakata R, Zhou G, Banerjee R, et al. Technological demands of meat processing—An Asian perspective. *Meat Sci* 2018;132:35–44.

4. Aeenehvand S, Toudehrousta Z, Kamankesh M, Mashayekh M, Tavakoli HR, Mohammadi A. Evaluation and application of microwave-assisted extraction and dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography for the determination of polar heterocyclic aromatic amines in hamburger patties. *Food Chem* 2014;190:429–35.
5. Namiranian N, Moradi-Lakeh M, Razavi-Ratki SK, Doayie M, Nojomi M. Risk factors of breast cancer in the Eastern Mediterranean Region: a systematic review and meta-analysis. *Asian Pac J Cancer Prev* 2014;15(21):9535–41.
6. Oba S, Shimizu N, Nagata C, Shimizu H, Kametani M, Takeyama N, et al. The relationship between the consumption of meat, fat, and coffee and the risk of colon cancer: A prospective study in Japan. *Cancer Lett* 2006;244(2):260–7.
7. Paluszkiwicz P, Smolińska K, Dębińska I, Turski WA. Main dietary compounds and pancreatic cancer risk. The quantitative analysis of case-control and cohort studies. *Cancer Epidemiol* 2012;36(1):60–7.
8. Puangsombat K, Gadgil P, Houser TA, Hunt MC, Smith JS. Heterocyclic amine content in commercial ready to eat meat products. *Meat Sci* 2011;88(2):227–33.
9. Oz F, Kaban G, Kaya M. Effects of cooking methods on the formation of heterocyclic aromatic amines of two different species trout. *Food Chem* 2007;104(1):67–72.
10. Oz F, Kaban G, Kaya M. Effects of cooking methods and levels on formation of heterocyclic aromatic amines in chicken and fish with Oasis extraction method. *LWT - Food Sci Technol* 2010;43(9):1345–50.
11. Toribio F, Busquets R, Puignou L, Galceran MT. Heterocyclic amines in griddled beef steak analysed using a single extract clean-up procedure. *Food Chem Toxicol* 2007;45(4):667–75.
12. Zaidi R, Kumar S, Rawat PR. Rapid detection and quantification of dietary mutagens in food using mass spectrometry and ultra performance liquid chromatography. *Food Chem* 2012;135(4):2897–903.
13. Barceló-Barrachina E, Santos FJ, Puignou L, Galceran MT. Comparison of dimethylformamide dialkylacetal derivatization reagents for the analysis of heterocyclic amines in meat extracts by gas chromatography-mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 2005;545(2):209–17.
14. Kanai Y, Wada O, Manabe S. Detection of carcinogenic glutamic acid pyrolysis products in cigarette smoke condensate. *Carcinogenesis* 1990;11(6):1001–3.
15. Gu YS, Kim IS, Ahn JK, Park DC, Yeum DM, Ji C II, et al. Mutagenic and carcinogenic heterocyclic amines as affected by muscle types/skin and cooking in pan-roasted mackerel. *Mutat Res* 2002;515(1–2):189–95.
16. Rezaei F, Yamini Y, Moradi M, Ebrahimpour B. Solid phase extraction as a cleanup step before microextraction of diclofenac and mefenamic acid using nanostructured solvent. *Talanta* 2013;105:173–8.
17. Chen BH, Yang DJ. An improved analytical method for determination of heterocyclic amines in chicken legs. *Chromatographia* 1998;48(3–4):223–30.
18. Rezaee M, Assadi Y, Milani Hosseini M-R, Aghaee E, Ahmadi F, Berijani S. Determination of organic compounds in water using dispersive liquid-liquid microextraction. *J Chromatogr A* 2006;1116(1–2):1–9.
19. Khan MR, Busquets R, Santos FJ, Puignou L. New method for the analysis of heterocyclic amines in meat extracts using pressurised liquid extraction and liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *J Chromatogr A* 2008;1194(2):155–60.
20. Krach C, Sontag G. Determination of some heterocyclic aromatic amines in soup cubes by ion-pair chromatography with coulometric electrode array detection. *Anal Chim Acta* 2000;417(1):77–83.
21. Oz F. Quantitation of heterocyclic aromatic amines in ready to eat meatballs by ultra fast liquid chromatography. *Food Chem* 2011;126(4):2010–6.
22. Agudelo Mesa LB, Padró JM, Reta M. Analysis of non-polar heterocyclic aromatic amines in beefburguers by using microwave-assisted extraction and dispersive liquid-ionic liquid microextraction. *Food Chem* 2013;141(3):1694–701.
23. Barzegar F, Kamankesh M, Mohammadi A. Heterocyclic aromatic amines in cooked food: A review on formation, health risk-toxicology and their analytical techniques. *Food Chem* 2019;280:240–54.
24. Mohammadi M, Kamankesh M, Hadian Z, Mortazavian AM, Mohammadi A. Determination of Biogenic Amines in Cheese Using Simultaneous Derivatization and Microextraction Method Followed by Gas Chromatography-Mass Spectrometry. *Chromatographia* 2017;80(1):119–26.
25. Yan Y, Zeng M.-M, Zheng Z.-P, He Z.-Y, Tao G.-J, Zhang S, Gao Y.-H and Chen J. A novel one-step extraction method for simultaneously determining eleven polar heterocyclic aromatic amines in meat products by UHPLC-MS/MS. *Analytical Methods*. 2014, 6, 6437.
26. Dundar A, Saricoban C and Yilmaz M.T. Response surface optimization of effects of some processing variables on carcinogenic/mutagenic heterocyclic aromatic amine (HAA) content in cooked patties. *Meat Science*. Volume 91, Issue 3, July 2012, Pages 325-333.

Determination of Heterocyclic Aromatic Amines in Heated Meat Samples Using an Efficient Microwave Assisted Extraction and Microextraction Method Followed by HPLC

Barzegar F¹, Omidi N¹, Kamankesh M², Mohammadi A^{*3}

1- MSc Student of Food Science and Technology, Faculty of Nutrition and Food Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2- Ph.D Student, Research Laboratory of Spectroscopy & Micro and Nano Extraction, Department of Chemistry, Iran University of Science and Technology, Iran

3- Corresponding author: Prof, Dept. of Food Science and Technology, Faculty of Nutrition and Food Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran, Email: ab.mohammadi@sbmu.ac.ir

Received 8 Mar, 2019

Accepted 29 May, 2019

Background and Objectives: Heterocyclic aromatic amines (HAAs) are carcinogenic and mutagenic substances, which are formed during the heating process of proteinaceous foods such as meat and meat products. The extraction of these compounds from the complex matrix of meat products was carried out by microwave assisted pre-extraction and a precise, rapid and high sensitive microextraction method. After the extraction process, the amount of HAAs in the samples was measured using a reverse phase high-performance liquid chromatography (RP-HPLC) coupled to a UV detector.

Materials and Methods: Optimization of effective parameters on the microextraction process of HAAs was carried out using *one factor at a time procedure*, which included the type and volume of extraction solvent, the type and volume of dispersive solvent salt, and pH. In order to validation of the proposed method, the merit figures of microextraction method were calculated. The amount of HAAs in several meat products from supermarkets and restaurants in Tehran was determined by the mentioned method.

Results: The optimum amount of effective parameters on the microextraction efficiency was obtained using central composite design (CCD). The merit figures of the proposed method included the limited detection (LOD) and the relative standard deviation (RSD) (5.8-8.1 ng/g) and (2.5-3.1), respectively. The efficiency of the proposed method in real samples was illustrated.

Conclusion: The results proved that the proposed method had high ability to extract and measure the trace quantities of HAAs from the complex matrix of meat products.

Keywords: Heterocyclic aromatic amines, Meat products, Microextraction, High performance liquid chromatography