مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال یازدهم، شماره 2، تابستان 1395، صفحات 146-137

معتبرسازی روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) جهت شناسایی و تعیین مقدار لیزینوآلانین در شیر خشک نوزادان

گلناز کرمی[1]، مریم شکرچی[2]، رویا خسروخاور[3]

1- دانش آموخته کارشناسی ارشد- علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم دارویی- کارشناس مرکز آزمایشگاه‌های مرجع کنترل غذا و دارو، سازمان غذا و دارو، تهران، ایران
2- دانشیار مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران
3- نویسنده مسئول: دانشیار مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران.
پست الکترونیکی: khosrokhavar_r@yahoo.com

تاریخ دریافت: 94/10/1 تاریخ پذیرش: 94/11/30

چکیده

سابقه و هدف: لیزینوآلانین طی تهیه و فرآوری شیر خشک در اثر حرارت، pH قلیایی با واکنش حذفی بتا، تشکیل دهیدروآلانین و واکنش با ترکیبات آمین دار ایجاد می‌گردد. در این مطالعه طراحی و معتبر سازی روشی مناسب جهت شناسایی و تعیین مقدار لیزینوآلانین در شیر خشک نوزادان با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) مد نظر قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش ابتدا شرایط بهینه HPLC (ستون C18، آشکارساز فلورسانس، مشتق سازی توسط دنسیل کلراید، سرعت جریان فاز متحرک ml/min 9 /0، شویش گرادیانت و فاز متحرک شامل بافر فسفات pH=7 و استونیتریل) تعیین شد. بر اساس شرایط فوق روش معتبر سازی گردید و کارآمدی روش معتبر شده با آنالیز 10 نمونه شیر خشک بررسی شد.

یافته‌ها: نمودار کالیبراسیون در محدوده غلظتی 80- 5 میلی‌گرم بر لیتر، خطی بود. ضریب همبستگی R2 =0/9949 به دست آمد. حد تشخیص (Limit of Detection) 2mg/L و حد تعیین مقدار (Limit of Quantification)mg/L 5 و درصد بازیافت (Recovery) 87/8 _ 83/7 درصد به دست آمد. در ارزیابی دقت روش، انحراف استاندارد نسبی (RSD%) سطح منحنی و غلظت به دست آمده محاسبه شد. برای Intra day به ترتیب کمتر از 3/87 و 2/7 درصد و برای Inter day به ترتیب کمتر از 5/2 و 7/4 درصد به دست آمد. در 7 مورد از شیرهای آنالیز شده، لیزینوآلانین شناسایی نشد و در 3 نمونه مقدار آن بین LOD, LOQ به دست آمد.

نتیجه گیری: این روش در جهت تشخیص و شناسایی لیزینوآلانین در شیرخشک نوزادان از دقت، صحت و کارایی لازم برخوردار بوده و در دسترس و مقرون به صرفه می‌باشد.

واژگان کلیدی: لیزینوآلانین، شیر خشک نوزادان، کروماتوگرافی مایع باکارایی بالا، آشکارساز فلورسانس، معتبرسازی

• مقدمه

فرآوری مواد غذایی گاهی منجر به تشکیل ترکیبات نامطلوب می‌شود. این ترکیبات در نتیجه تأثیر عوامل فیزیکی و واکنش‌های شیمیایی گوناگون به وجود می‌آیند و می‌توانند بر کیفیت و سلامت غذا تأثیر داشته باشند. تشکیل ترکیبات سمی حاصل از پروتئین‌ها حین حرارت دهی، فرآوری صنعتی و نگهداری معمولاً با کاهش کیفیت تغذیه‌ای پروتئین همراه هستند. تهیه شیر خشک به‌واسطه ماهیت شیر و اعمال حرارت منجر به تولید ترکیبات و آلاینده‌های مختلف می‌گردند مانند لیزینوآلانین که طی حرارت و pH قلیایی با واکنش حذفی بتا آغاز می‌گردد و محصول این واکنش دهیدرو آلانین است که بسیار واکنش‌پذیر بوده و با ترکیبات آمین دار واکنش می‌دهد. مطالعات نشان داده است که این ترکیب علاوه بر این که قابلیت دسترسی بدن را به اسیدهای آمینه ضروری کاهش می‌دهد، اثرات سمی بر کلیه نیز دارد و

می‌تواند باعث اختلال در عملکرد کلیه‌ها و سنتز DNA و تقسیم میتوز شود. شیر خشک نوزادان به جهت حساس بودن گروه هدف باید عاری از هر گونه آلاینده ای از جمله لیزینوآلانین باشد (3- 1).

تغذیه با شیر مادر بهترین نوع تغذیه برای نوزادان است. شیر مادر حاوی کلیه مواد لازم برای رشد نوزاد، برطرف کننده تمامی نیازهای تغذیه‌ای آن‌ها می‌باشد. از طرفی شیر مادر حاوی برخی از فاکتورهای تنظیم کننده سیستم ایمنی است که برای کامل شدن سیستم ایمنی نوزاد مفید است. همچنین تغذیه با شیر مادر باعث افزایش مقاومت نوزادان در برابر اختلالات گوارشی، عفونت تنفسی و تب می‌شود. با وجود اینکه شیر مادر اولین انتخاب برای تغذیه نوزاد است ولی فرآورده‌های جایگزین شیر مادر در مواردی که تغذیه با شیر مادر غیرممکن، ناکافی و یا ناخوشایند باشد، نقش مهمی در تغذیه نوزادان می‌یابند. در راستای برطرف کردن این نیاز تغذیه‌ای نوزادان و ایجاد امکان رشد و تکامل کافی در آن‌ها، ترکیباتی با عنوان شیر خشک نوزادان (Infant formula) شیر خشک برای تأمین نیازهای تغذیه‌ای نوزاد از ماه‌های اول زندگی تا شروع تغذیه تکمیلی (6 ماهگی) طراحی شده است. در بعضی موارد شیرخشک نوزادان تا 2 سالگی نیز مورد مصرف دارد که follow up نامیده می‌شود (2).

با توجه به انواع روش‌های تهیه شیرخشک (خشک و مرطوب) و استفاده از حرارت در فرآیند پاستوریزاسیون و استرلیزاسیون روی شیر خام اولیه، امکان تشکیل ترکیبات ناخواسته از جمله لیزینوآلانین وجود دارد(3).

Agostino و همکاران در سال 2003، مقدار لیزینوآلانین را در برخی فرمول‌های غذای کودک مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه 23 نمونه پودر غذای کودک یا نمونه مایع با استفاده از دستگاه HPLC و مشتق سازی توسط FMOC (9- فلوئورونیل متیل کلروفرمات)، مورد آزمون قرار گرفتند(4).

Boschin و همکاران، در یک مطالعه میزان لیزینوآلانین در فرمول‌های تغذیه وریدی را اندازه‌گیری کردند. (کازئین و کازئینات‌ها اجزای اصلی تشکیل دهنده فرمول‌های تغذیه‌ای وریدی هستند). در فرآیند تولید این محصولات انجام تیمار حرارتی به منظور اطمینان از ایمنی از لحاظ میکروبی و زمان ماندگاری ضروری است و این فرآیند حرارتی منجر به تشکیل لیزینوآلانین می‌گردد(5).

در یک بررسی در سال 2007، توسط Montilla و همکاران، میزان لیزینوآلانین در نمونه‌های تخم مرغ پخته، کازئینات تجاری، پنیر تازه، پنیر تازه تهیه شده از شیر غنی شده با کازئینات با کمک GC-FID تعیین شد. بررسی نشان داد که لیزینوآلانین در تخم مرغ خام وجود نداشت ولی با انجام فرآیند حرارتی و افزایش مدت زمان، به تدریج میزان لیزینوآلانین افزایش یافت و تشکیل آن در سفیده تخم مرغ بیشتر از زرده تخم مرغ بود (6).

در سال 1390، خورشیدیان و همکاران به بررسی مقدار لیزینوآلانین در برخی از نمونه‌های شیر پاستوریزه و استریلیزه مصرفی شهر تهران و همچنین اثر دوره نگهداری بر تغییرات لیزینوآلانین در شیر استریل در دمای 25 درجه سانتی‌گراد پرداختند. در این مطالعه نیز از دستگاه HPLC با آشکارساز فلورسانس و مشتق سازی توسط دانسیل کلراید جهت تعیین مقدار لیزینوآلانین استفاده شد(7).

با توجه به مراحلی که برای تهیه شیر خشک طی می‌شود و همچنین انجام فرآیندهای حرارتی لازم جهت پاستوریزاسیون شیر خام اولیه، راه‌اندازی روشی که بتواند این آلاینده را در شیر خشک نوزادان شناسایی و تعیین کند، ضروری است.

• مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی: هیدروکلریک اسید 37%، هیدروکسید سدیم، ایزوپروپیل الکل و استو نیتریل با درجه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا ساخت شرکت Merck آلمان، استاندارد لیزینوآلانین 99% ساخت شرکت Bachem سوئیس و دانسیل کلراید 99% ساخت شرکت Sigma آمریکا.

بافر بورات 0/5 نرمال، pH=9 (تهیه شده از اسیدبوریک، کلرید پتاسیم، هیدروکسید پتاسیم Merck آلمان)

بافر فسفات 10 میلی مول، pH=7 (تهیه شده از دی پتاسیم هیدروژن فسفات، اسید فسفریک Merck آلمان)

استاندارد ذخیره (Stock): 2 میلی‌گرم از استاندارد لیزینوآلانین(99%) در استونیتریل حل و حجم آن 2 میلی‌لیتر رسانده شد تا محلول استاندارد ذخیره (Stock) به غلظت 1000 mg/L تهیه شود تا در مراحل بعدی جهت غنی‌سازی (Spike) و تهیه استانداردهای کاری از این استاندارد ذخیره استفاده شود.

نمونه‌های شیر خشک نوزادان: تعدادی نمونه از فرمول‌های شیر خشک پرمصرف بازار که جهت کنترل کیفیت و ایمنی به مرکز آزمایشگاه‌های مرجع کنترل غذا و دارو ارسال شده بودند، به عنوان نمونه‌های کاری مورد بررسی قرار گرفتند.

آماده‌سازی نمونه

هیدرولیز: مطابق روش Faist و همکاران در سال 2000 (8)، جهت هیدرولیز اسیدی ابتدا میزان پروتئین تام شیرخشک‌های نوزادان محاسبه شد، مقداری از شیر خشک که حاوی 0/25 گرم پروتئین بود توزین و در ارلن درپیچ دار، در

15 میلی‌لیتر آب مقطر حل شد. 50 میلی‌لیتر اسید کلریدریک 6 نرمال به ماتریکس تهیه شده اضافه شد. (نسبت اسید کلریدریک 6 نرمال افزوده شده به پروتئین تام 200 به 1 می‌باشد (9). سپس ارلن‌ها دربندی شدند و به مدت 22 ساعت، در دمای 110 درجه سانتی‌گراد در آون قرار گرفتند تا لیزینوآلانین تشکیل شده در ماتریکس آزاد شود. پس از 22 ساعت، در شرایط خلأ، ماتریکس تا حد امکان تغلیظ گردید. باقیمانده در مقداری آب مقطر حل شد و توسط هیدروکسیدسدیم 12 نرمال، pH در عدد 9 تنظیم شد، حاصل به بالن ژوژه منتقل و حجم نهایی توسط آب مقطر به 10 میلی‌لیتر رسانده شد.

آلوده کردن نمونه (Spike): به 0/5 میلی‌لیتر از نمونه شیر خشک هیدرولیز شده طبق مراحل فوق، به ترتیب مقادیر 10، 20، 40، 100، 160 میکرولیتر از استاندارد ذخیره (Stock) 1000mg/L افزوده شد تا پس از طی مراحل مشتق سازی، استانداردهای کاری ۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰، ۸۰ mg/L به دست آید. از این محلول‌های آلوده، در رسم نمودار کالیبراسیون استفاده شد. همچنین به 0/5 میلی‌لیتر از نمونه شیر خشک هیدرولیز شده طبق مراحل فوق به ترتیب مقادیر 15، 30، 80 میکرلیتر از استاندارد ذخیره (Stock) اضافه شد و پس از مشتق سازی نمونه‌های آلوده (Spike) با غلظت‌های 7/5، 15 و 40 mg/L به دست آمد. از نمونه‌های آلوده در معتبرسازی روش، تعیین صحت و دقت، استفاده شد.

جهت تکمیل مطالعات مربوط به حساسیت، حد تشخیص (Limit of detection) و حد تعیین مقدار (Limit of quantification)، به 0/5 میلی‌لیتر نمونه آماده شده، مقادیر 4 و 10 میکرولیتر از استاندارد ذخیره اضافه شد تا پس از طی مراحل مشتق سازی، غلظت‌های2 و 5 mg/L از استاندارد لیزینوآلانین در ماتریکس شیرخشک نوزادان به دست آید.

مشتق سازی: جهت تهیه محلول مشتق ساز،100 میلی‌گرم از مشتق ساز دانسیل کلراید(99%) توزین و در ایزوپروپیل الکل حل و حجم آن به 10 میلی‌لیتر رسانده شد تا غلظت 1000mg/L به دست آید. به 0/5 میلی‌لیتر از نمونه شیر خشک آماده شده (هیدرولیز شده) در مراحل قبلی، 0/5میلی‌لیتر بافر بورات (0/5 نرمال و pH=9) و یک میلی‌لیتر محلول دانسیل کلراید (1000mg/L) اضافه شده و به مدت 2 دقیقه به‌شدت بهم زده شد، سپس به مدت یک ساعت در دمای 40 درجه سانتی‌گراد و دور از نور قرار گرفت تا مرحله مشتق سازی تکمیل شود. نمونه‌های آماده شده در این مرحله به مدت دو هفته در دمای 40- درجه سانتی‌گراد قابل نگهداری هستند. در این پژوهش نمونه‌ها در هر نوبت کاری به صورت تازه تهیه شدند. نمونه‌های آماده شده در این مرحله پس از فیلتراسیون (0/45 میکرونی) به میزان 20 میکرولیتر به دستگاه HPLC تزریق شدند.

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا(HPLC): با استفاده از سیستم HPLC مدل Dionex مجهز به پمپ مدل Ultimate 3000 با دو ورودی حلال، سیستم گازدا (Degasser) مدل CSI6150، ستون Hichrome P5 ODS (C18) به طول mm 250 و قطر داخلی 4/6mm که با ذراتی با ابعاد µm 5 پر شده، آشکارساز فلورسانسRF2000 Fluorscence Dionex، طول موج تهییج 330 و طول موج نشر 550 نانومتر وشویش گرادیانت، فاز متحرک شامل دو بخش A (بافر فسفات با pH= 7 و استونیتریل به نسبت 85 :15) و B (استونیتریل) طبق جدول زمان‌بندی (جدول 1) و سرعت جریان ml/min 0/9، روش ارتقاء پیدا کرد و معتبر شد. لیزینوآلانین با تزریق 20 میکرولیتر از نمونه آماده شده، حدوداً در دقیقه 24، جدا، شناسایی و تعیین مقدار شد. داده‌ها با بهره‌گیری از نرم‌افزار Chromeleon version 6.60 جمع‌بندی شدند.

جدول 1. برنامه گرادیانی مورد استفاده در اندازه‌گیری لیزینوآلانین

زمان (دقیقه)	سرعت جریان (میلی‌لیتر در دقیقه)	A % (فاز متحرک)	B % (فاز متحرک)
زمان اولیه	0/9	20	80
5 /5	0/9	20	80
15/5	0/9	58	42
30/5	0/9	58	42
31/5	0/9	20	80
46/5	0/9	20	80

نمودار کالیبراسیون: جهت تهیه نمودار کالیبراسیون از استاندارد ذخیره 1000mg/L مقادیر10، 20، 40، 60، 80، 100 میکرولیتر برداشته شد، یک میلی‌لیتر از محلول دانسیل کلراید(10 mg/mL)و 0/5 میلی‌لیتر بافر بورات (0/5 نرمال، pH=9) به آن افزوده و حجم نهایی با آب یون‌زدایی شده به 2 میلی‌لیتر رسانده شد، سپس به مدت یک ساعت در دمای 40 درجه سانتی‌گراد و دور از نور قرار گرفت تا مرحله مشتق‌سازی تکمیل شود و غلظت‌های 5، ۱۰،۲۰، 30، 40، 50 mg/L از لیزینوآلانین به دست آید. 20 میکرولیتر از استانداردهای ساخته شده به دستگاه HPLC تزریق شد و از سطح زیر منحنی لیزینوآلانین جهت رسم نمودار کالیبراسیون اولیه، جهت انتخاب ماتریکس عاری از لیزینوآلانین استفاده شد. معادله خط y=ax±b محاسبه شد. x، غلظت و y، سطح زیر منحنی لیزینوآلانین است.

20 میکرولیتر از استانداردهای تهیه شده به صورت ماتریکس آلوده (Spiked) 5، ۱۰،۲۰، 50، 80 mg/L به HPLC تزریق شد. سطح زیر محنی لیزینوآلانین جهت رسم نمودار کالیبراسیون استفاده شد، معادله خط به صورت y=ax±b و ضریب همبستگی (R^2) محاسبه شد.

معتبرسازی روش

صحت (Accuracy): با استفاده از تعیین میزان بازیافت (Recovery) محاسبه می‌شود (10). 20 میکرولیتر از نمونه‌های آلوده شده (Spiked) در سطوح غلظتی 7/5 ، 15 و 40mg/L و از هر کدام 3 ساخت، به دستگاه HPLC تزریق شد، بازیافت از طریق محاسبه درصد میزان غلظت لیزینوآلانین بازیافت شده به میزان اضافه شده(Spiked) به دست آمد و درصد انحراف معیار نسبی(RSD %) نیز محاسبه شد.

دقت (Precision): محاسبه دقت روش به‌وسیله معیار تکرارپذیری در یک روز (intra-day) و در 3 روز متوالی (inter_day) انجام شد (12، 11).

به منظور بررسی دقت در یک روز، از نمونه‌های آلوده شده (Spiked) در سطوح غلظتی 7/5 ، 15 و 40 mg/L Spike گردید و در سه نوبت به دستگاه تزریق شد. همچنین به منظور بررسی دقت در 3 روز پی در پی، در سطوح غلظتی 7/5 ، 15 و 40 mg/L، سه نمونه از طریق Spike تهیه شد و در سه نوبت به دستگاه HPLC تزریق شد. سطح زیر منحنی هر پیک و درصد انحراف معیار نسبی هر پیک لیزینوآلانین محاسبه شد.

حساسیت، حد تشخیص (LOD) و حد تعیین مقدار (LOQ): کمترین غلظتی که در یک ماتریکس قابل تشخیص است ولی به دقت قابل اندازه‌گیری نمی‌باشد به عنوان LOD شناخته می‌شود و کمترین غلظتی که با دقت و صحت قابل قبول، قابل اندازه‌گیری می‌باشد به عنوان LOQ تعریف می‌شود. برای تعیین LOD و LOQ از نسبت سیگنال به نویز استفاده می‌شود. نسبت 3:1 برای تعیین LOD و نسبت 10:1 برای تعیین LOQ به کار می‌رود (16- 13).

کاربرد روش: 10 نمونه از موارد پرمصرف بازار که جهت کنترل کیفیت و سلامت به مرکز آزمایشگاه‌های مرجع کنترل غذا و دارو ارسال شده بود با روش فوق مورد ارزیابی قرار گرفت. کلیه نتایج به دست آمده با برنامه Excel 2010 پردازش شد.

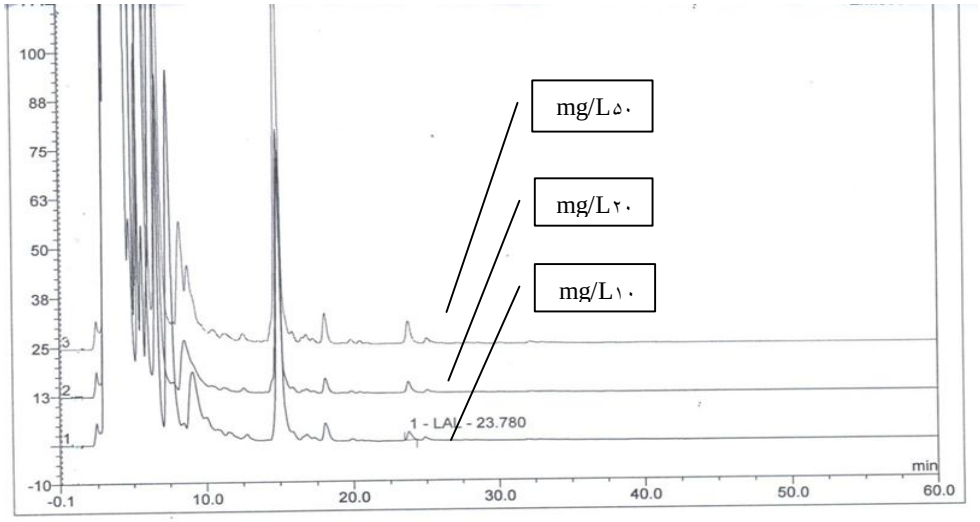
• یافته‌ها

شرایط بهینه شده دستگاه HPLC در شناسایی و تعیین مقدار لیزینوآلانین در شیرخشک نوزادان و همچنین کروماتوگرام به دست آمده از سه غلظت آلوده شده در سطوح 10، 20، 50 میلی‌گرم بر لیتر در شکل 1 آمده است.

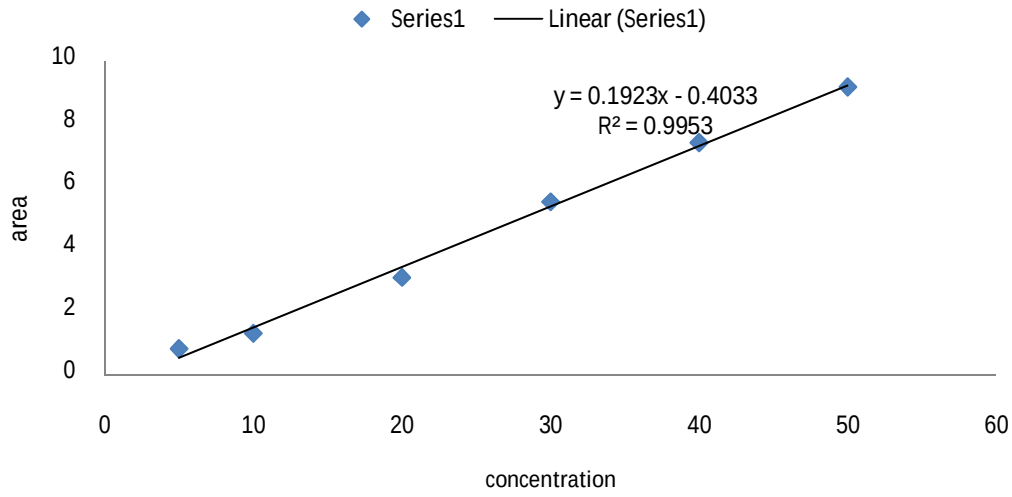
نتایج حاصل از معتبر سازی روش اجرایی به شرح زیر است.

خطی بودن: ارزیابی خطی بودن و تعیین معادله خط کالیبراسیون در ماتریکس آب در5 سطح غلظتی مختلف (n=3)، جهت تعیین نمونه عاری از لیزینوآلانین،0/4033- y=0/1923x و ضریب رگرسیون 0/9953= R2 به دست آمد (نمودار 1).

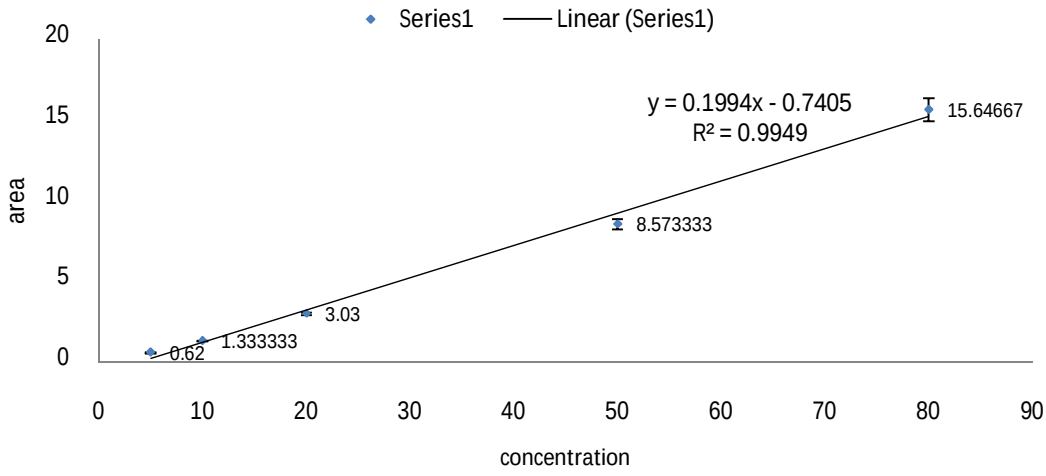
همچنین ارزیابی خطی بودن روش آنالیز با استفاده از رسم نمودار غلظت سطح زیر منحنی در 5 غلظت مختلف (n=3) به دست آمد. معادله خط 0/7405 -y=0/1994x بود. نمودار کالیبراسیون برای سطح زیر منحنی در محدوده غلظت 5 تا 80 mg/L خطی بود و 0/9949 =R^2 محاسبه شد (جدول 2، نمودار 2).



شکل1. کروماتوگرام‌های مربوط به استاندارد لیزینوآلانین در سه غلظت 10، 20، 50 میلی‌گرم بر لیتر در ماتریکس شیرخشک نوزاد



نمودار1. منحنی کالیبراسیون و معادله خط به دست آمده از لیزینوآلانین در آب



نمودار2. منحنی کالیبراسیون در شیرخشک نوزادان

جدول 2. نتایج خطی بودن کالیبراسیون لیزینوآلانین

غلظت افزوده شده (Spiked) (mg/L)	میانگین مساحت به دست آمده ±انحراف معیار	درصد انحراف معیار نسبی (%RSD)
5/0	0/6 ± 0/1	%11/3
10/0	1/3 ±0/1	%1/1
20/0	3/03 ±0/1	%4/0
50/0	8/6±0/5	%6/4
80/0	15/6±1/2	%1/6
Slope		0/1994
رگرسیون (R^2)		0/9949

n=3

حد تشخیص(LOD) و حد تعیین مقدار (LOQ): LOD و RSD مربوطه به ترتیب 2 mg/L و % 11/3 و LOQ و RSD مربوطه به ترتیب 5 mg/L و 13/8 بود (جدول 3).

صحت: محدوده بازیافت به دست آمده بین 83/6 تا 87/7 بود و درصد انحراف معیار نسبی (%RSD) 0/91 تا 2/7 درصد بود (جدول4).

دقت: نتایج تکرار پذیری در یک روز و در سه روز متوالی در جداول 5 و 6 ارائه شده است.

کاربرد روش: نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان لیزینوآلانین در تعداد 10 نمونه شیرخشک پر مصرف بازار با روش فوق در 7 نمونه، غیرقابل شناسایی در 3 نمونه بین LOD و LOQ نشان داد (جدول 7).

جدول 3. نتایج LOD و LOQ تعیین شده برای لیزینوآلانین

پارامتر	غلظت(mg/L)	مساحت*	%RSD
LOD	2	0/2 ± 0/03	13/9
LOQ	5	0/6 ± 0/07	11/3

* میانگین ± SD

جدول 4. نتایج ارزیابی صحت روش بر اساس بازیافت (Recovery)

غلظت افزوده شده (Spiked) (mg/L)	میانگین درصد بازیافت± انحراف معیار	درصد انحراف معیار نسبی بازیافت (RSD %)
7/5	83/7 ±0/9	1/1
15/0	87/8 ±2/4	2/8
40/0	85/6 ±0/8	0/9

جدول 5. نتایج حاصل از بررسی معیار سنجی دقت روش در یک روز (Intra – Day)

سطوح آلوده شده (spiked) (mg/L)	میانگین غلظت به دست آمده SD ± (mg/L) n =9	میانگین سطح ± SD	درصد انحراف معیار نسبی مساحت به دست آمده (RSD %)
7/5	6/ 3 ±0/07	0/51±0/01	2/5
15/0	13/2 ±0/4	1/9±0/07	3/9
40/0	34/2 ±0/3	6/1±0/06	0/01

جدول 6. نتایج حاصل از بررسی دقت در چند روز (Inter_Day)

غلظت افزوده شده (mg/L)(Spiked)	روز اول		روز دوم		روز سوم	
	میانگین مساحت± SD	*(%RSD)	میانگین مساحت± SD	*(%RSD)	میانگین مساحت± SD	*(RSD%)
7/5	0/5±0/01	2/5	0/5± 0/01	2/7	0/5±0/04	7/4
15/0	1/8±0/07	3/8	1/7±0/05	2/9	1/9±0/05	5/2
40/0	6/08±0/06	1/01	5/ 9±0/1	2/8	6/3±0/2	3/2

*درصد انحراف معیار نسبی

جدول 7. نتایج آلودگی لیزینوآلانین در نمونه‌های مجهول شیر خشک نوزادان با روش معتبر شده

کد اختصاری نمونه	میزان لیزینوآلانین (n=3)
نمونه 1	N.D*
نمونه 2	N.D
نمونه 3	N.D
نمونه 4	N.D
نمونه 5	N.D
نمونه 6	N.D
نمونه 7	N.D
نمونه 8	LOD<cc<LOQ
نمونه 9	LOD<cc<LOQ
نمونه 10	LOD<cc<LOQ

*Not Detected:غیر قابل تشخیص

• بحث

اندازه‌گیری لیزینوالانین مستلزم جداسازی لیزینوآلانین متصل به پروتئین‌ها و مستلزم هیدرولیز است. بر اساس مطالعات انجام شده، در مقابل هیدرولیز قلیایی و آنزیمی، بهترین روش هیدرولیز پروتئین‌های شیر خشک که باعث تخریب لیزینوآلانین نمی‌شود و حداکثر جداسازی این آنالیت را از شبکه پروتئینی فراهم می‌کند روش هیدرولیز اسیدی به کمک اسید کلریدریک 6 نرمال و به مدت 22 ساعت در درجه حرارت 110 درجه سانتی‌گراد انجام می‌شود (19-17، 4).

در مطالعات قدیمی روش‌هایی که برای اندازه‌گیری لیزینوآلانین در مواد غذایی به کار رفته‌اند، شامل روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) و استفاده از نین هیدرین برای شناسایی لیزینوآلانین و کروماتوگرافی تعویض یونی) (Ion Exchange Choromatography بودند ولی امروزه از دیگر روش‌های کروماتوگرافی مانند کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) برای تعیین مقادیر بسیار کم لیزینوآلانین استفاده می‌شود (20). در این مطالعه نیز استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با شرایط مطلوب (جدول 2)، قابل اطمینان بود و امکان دسترسی و اجرا در آزمایشگاه‌های کنترل فراهم است.

روش‌های مشتق سازی عموماً به منظور افزایش امکان تشخیص و بالا بردن حساسیت آشکارسازهای جذب پرتو ماورای بنفش- مرئی (UV-Visible) و فلورسانس مورد استفاده قرار می‌گیرد. دانسیل کلراید یکی از ترکیباتی است که برای تبدیل نمودن مواد فاقد خاصیت فلورسانس به ترکیب دارای خاصیت فلورسانس استفاده می‌شود. این ترکیب با گروه‌های آمین اولیه و ثانویه به وسیله جایگزینی نوکلئوفیلی واکنش می‌دهد و به 1- دی متیل آمینو نفتالن 5- سولفونیک اسید تبدیل می‌شود که یک ترکیب با خاصیت فلورسانس بالا است و برای مشتق سازی نمونه‌ها قبل از تزریق به ستون به کار می‌رود. در مطالعاتی که به‌وسیله D,Agostina و همکاران در سال 2002 انجام شد از مشتق ساز 9 فلورو- اتیل متیل کلروفورمات (FMOC-CL) به عنوان مشتق ساز استفاده شده و قبل از تزریق به HPLC از ستون‌های استخراج فاز جامد (SPE) جهت خالص‌سازی آنالیت استفاده شد که این روشی گران و هزینه‌بر است. در این مطالعه، با استفاده از مشتق ساز دانسیل کلراید، لزومی به استفاده از ستون‌های SPE نمی‌باشد.

در این مطالعه از ستون‌های C18 استفاده شد که گروه‌های اکتا دسیل سیلان (ODS) بر روی آن پوشش داده

شده‌اند و فاز متحرک نیز مخلوطی از بافر فسفات و استونیتریل بود که در کنار هم شرایط مطلوبی را جهت جداسازی فراهم نمود. مطالعات قبلی نیز این مورد را تأیید می‌نمایند (8، 7).

علت استفاده از آشکارساز فلورسانس این است که در مقایسه با آشکارسازهای UV بسیار حساس‌تر است و از آنجایی که در آشکارسازهای فلورسانس هم طول موج تهییج و هم طول موج نشر تغییر می‌کند، لذا این آشکارساز بسیار انتخاب‌گر بوده و برای تجزیه مقادیر بسیار کم ماده در نمونه، مناسب می‌باشد که در این پژوهش نیز از این آشکارساز استفاده شد.

مقایسه نتایج مربوط به معتبر سازی روش اندازه‌گیری لیزینوآلانین با نتایج سایر محققین نشان می‌دهد که روش به کار رفته، روش مناسب و قابل اعتمادی برای اندازه‌گیری محتوای لیزینوآلانین شیرخشک می‌باشد. ضریب همبستگی نزدیک به یک نشان دهنده خطی بودن منحنی کالیبراسیون در سطح غلظت‌های تهیه شده است (15).

LOD و LOQ روش (به ترتیب 2 و 5mg/L) در مقایسه با مقادیر گزارش شده توسط Boscha (5 و 15/2 mg /100gr pro)، Montilla در سال 2007، (50 و 152mg/l) مقادیر کمتری است که نشان دهنده حساسیت بیشتر روش نسبت به روش‌های قبلی می‌باشند (21، 6). توصیه می‌شود که RSD برای LOQ باید کمتر یا مساوی 15% باشد. RSD کوچک نشان دهنده دقت روش است (16).

با توجه به حساس بودن مصرف کنندگان این فرآورده، معمولاً از بهترین نوع شیر خام استفاده می‌شود لذا قابل قبول بودن میزان محتوای لیزینوالانین در این محصول توجیه پذیر است لیکن به دلیل اینکه در شیرخشک‌های صنعتی این حساسیت وجود ندارد و ممکن است که از شیر خام با کیفیت بالا تهیه نشوند و یا به دلیل آلودگی میکروبی شیر خام دریافتی و فرسوده بودن تجهیزات، کنترل دما و زمان به درستی صورت نگیرد و در نتیجه میزان لیزینوآلانین در شیر خشک‌های صنعتی افزایش یابد. بنابراین پیشنهاد می‌شود میزان این آلاینده در شیر خشک‌های صنعتی نیز مورد مطالعه و بررسی قرار گیرد.

سپاسگزاری: از کلیه مسئولان و همکاران محترم آزمایشگاه‌های مرجع کنترل و مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو که ما را در انجام این پژوهش یاری رساندند قدردانی می‌شود.

• References

1. Friedman M, Gumbmann MR, Masters PM. Protein – alkali reactions: chemistry, toxicology, and nutritional consequences. Adv Eep Biol 1984; 177:367_412

2. Bakker-Zierikzee AM, Alles MS, Knol J, Kok FJ, Tolboom JJ, Bindels JG. Effects of infant formulacontaining a mixture of galacto- and fructo-oligosaccharides or viable Bifidobacterium animalison the intestinal microflora during the first 4 months of life. Br J Nutr 2005; 94(5): 783–90.

3. Kevin A, Bridget W, Robinson D, Hendrickson C, Nicholas L, Rider Erik G, et al. Classical maple syrup urine disease and brain development: Principles of management and formula design; Molecular Genetic and Metabolisem 2010; 99(4):333-345.

4. Agostina A, Boschin G, Rinaldi A, Arnoldi A. Updating on the lysinoalanine content of commercial infant formula and beicost products. Food Chem 2003; 80:483- 8.

5. Boschin G, D' Agostina A, Rinaldi A, Arnoldi A. Lysinoalanine content of formulas for enteral nutrition. J Dairy Sci 2003;2283- 7.

6. Montilla A, Gomez- Ruiz JA, Olano A, del Castillo MD. A GC- FID method for analysis of lysinoalanine. Mol Nutr Food Res 2007; 51:415- 422.

7. Khorshidian N,Taslimi A, Mashayekh M, Azadniya E. Determination of lysinoalanine in pasteurized and sterilized milks consumed in the city of Tehran, 2011. Iranian J Nut Sci Food Technol 2013; 8: 167- 175 [in persian]

8. Faist V, Drusch S, Kiesner C, Elmadfa I, Erbersdobler HF. Determination of lysinoalanine in foods containing milk protein by high-performance chromatography after derivatisation with dansyl chloride. Int Dairy J 2000; 10:339 - 346.

9. Moret S, Cherubin S, Rodriguez- Estrada MT, Lercker G. Determination of lysinoalanine by high performance liquid chromatography. J High Res Chrom 1994; 17:827- 30

10. Dhooghe L, Mesia K, Kohtala E, Tona L, Pieters L, Vlietinck AJ. Development and validation of an HPLC-method for the determination of alkaloids in the stem bark extract of Nauclea pobeguinii. Talanta 2008; 76: 462–468.

11. Space JS, Opio AM, Nickerson B, Jiang H, Dumont M, Berry M. Validation of a dissolution method with HPLC analysis for lasofoxifene tartrate low dose tablets. J Pharm and Biomed Anal 2007; 44: 1064–1071.

12. Bae H. Jayaprakasha GK, Jifon J, PatilExtraction BS. Efficiency and validation of an HPLC method for flavonoid analysis in peppers. Food Chem 2012; 130: 751–758.

13. Rozet E, Ceccato A, Hubert C, Ziemons E, Oprean R, Rudaz S. Analysis of recent pharmaceutical regulatory

documents on analytical method validation. J Chromatogr 2007; 1158: 111–125.

14. Vial J, Jardy A. Experimental comparison of the different approaches to estimate LOD and LOQ of an HPLC Method. Anal Chem 1999; 71: 2672–2677.

15. Beer D, Joubert E. Development of HPLC method for cyclopia subternata phenolic compound analysis and application to other Cyclopia spp. J Food Comp Anal 2010; 23: 289–297.

16. Jia S, Kang YP, Park JH, Lee J, Kwon SW. Simultaneous determination of 23 amino acids and 7 biogenic amines in fermented food samples by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. J Chromatogr 2011; 1218: 9174–9182.

17. Karayiannis NI, MacGregor JT. Lysinoalanine Formation in alkali-treated proteins and model peptides. Fd Cosmet Toxicol 1979;17:585-90.

18. Provansal MP, Cheftel JC. Chemical and nutritional modifications of sunflower proteins due to alkaline processing. J Agric Food Chem 1975;23:938-43.

19. Corpet D, Tache S, Sylviane A, Michael C, Bruce WR. Dehydroalanine and lysinoalanine in thermolyzed casein do not promote colon cancer in the rat. Fd Cosmet Toxicol 2008; 46: 3037-42.

20. Faist V, Drusch S, Kiesner C, Elmadfa I, Erbersdobler HF. Determination of lysinoalanine in foods containing milk protein by highperformance chromatography after derivatisation with dansyl chloride. Int Dairy J 2000; 10: 339-46.

21. Boscha L, Luz Sanzb M, Montillac A, Alegríaa A, Farréa R, Dolores del M. Simultaneous analysis of lysine, Nε-carboxymethyllysine and lysinoalanine from proteins. J Chromatogr B 2007; 860: 69- 77.

Validation of a HPLC Method for Detection and Determination of Lysinoalanine in Infant Formula

Karami G[1], Shekarchi M[2], Khosrokhavar R[3]*

1-M.Sc in Food Science and Technology. Pharmaceutical Sciences Branch. Islamic Azad University. Expert of Reference Food and Drug Control Labs, Tehran, Iran.

2-Associate Prof, Food and Drug, Laboratory Research Center, Food and Drug Organization, Tehran, Iran.

*3-*Corresponding Author: Associate Prof., Food and Drug Laboratory Research Center, Food and Drug Organization, MOH &ME, Tehran, Iran. E-Mail: khosrokhavar_r@yahoo.com*

Received 21 Jan, 2016 **Accepted 19 Feb, 2016**

Background and Objectives: *Lysinoalanine* (LAL) is created in the course of preparation of infant formula during the heat processing, alkaline pH, β elimination, dehydroalanine production and reaction with amines group. Produced LAL not only results in losses of necessary amino acids' content, but also could cause nephrotoxic effects. So the formulated infant formula must be free from LAL. In this study, HPLC for detection and determination of LAL was developed and validated.

Materials and Methods: HPLC conditions were optimized (C18 Column, Fluorescence detector, Column temperature 30℃, flow rate 0.9 ml/min. Mobile phase consisted of mixed phosphate buffer, pH: 7, acetonitrile and pure acetonitrile in gradient elution), and LAL was dansylated by adding dansyl chloride. The method was validated according to the above conditions. 10 infant formula brands were analyzed according to the validated method.

Results: The calibration curve for concentration versus LAL peak area (R^2= 0.9949) was linear in the range of 5_80 mg/L. LOD and LOQ were 2 and 5 mg/L respectively, and the accuracy result (recovery range) was within 83.6-87.7%. Assessment of precision showed that the relative standard deviation (RSD%) of concentration and area peak of spike samples in the intra-day study were less than 2.7% and 3.8% respectively, and in inter-day study were less than 7.4% and 5.2%, respectively. In the analyzed infant formula in seven samples, LAL was not detectable, and it was detected between LOD and LOQ only in three samples.

Conclusion: This method is a valuable validated way, available, reliable and cost benefit in LAL detection and determination in infant formula.

Keywords: Lysinoalanine, Infant formula, HPLC, Fluorescence detector