



تشکیل ایزومرهای تیروزین در محلول‌های آبی فنیل آلانین 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 - ایران

چکیده: روش آشکارسازی ارتو تیروزین را می‌توان برای آشکارسازی پرتویدگی مواد غذایی سرشار از پروتئین بکار برد. به منظور اطلاع از اساس این روش، ایزومرهای تیروزین تشکیل شده در محلول‌های آبی فنیل آلانین پرتودهی شده با پرتو گاما در گستره وسیعی از دز تابش ($0.1-50 \text{ kGy}$) مورد بررسی قرار گرفته است. اندازه‌گیری ایزومرهای تیروزین در محلول‌های آبی فنیل آلانین با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و آشکارسازی فلورسانس انجام گرفت. حد آشکارسازی ارتو تیروزین 0.01 ppm و گستره خطی بودن پاسخ دستگاه برابر 0.1 تا 50 ppm و انحراف استاندارد نسبی اندازه‌گیری‌ها بین $13-4\%$ بود. در محلول‌های آبی فنیل آلانین (1 mg/ml)، تا دز 10 kGy 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 فنیل آلانین افزایش می‌یابد اما افزایش بیشتر غلظت فنیل آلانین تأثیری در افزایش تشکیل ایزومرهای تیروزین ندارد. با دز کلی 10 kGy ، استفاده از سرعت‌های دز $2/3 \text{ kGy/h}$ و $1/2 \text{ kGy/h}$ تغییر قابل ملاحظه‌ای در مقدار ایزومرهای تیروزین تشکیل شده ایجاد نکرد. نتایج نشان داد در پرتودهی محلول‌های آبی فنیل آلانین، تشکیل ایزومرهای تیروزین تحت تأثیر دما، pH و اکسیژن محیط قرار می‌گیرد.

واژه‌های کلیدی: محلول آبی فنیل آلانین، 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 ($0.1-50 \text{ kGy}$) 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 0.01 ppm 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 10 kGy 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 2.3 kGy/h to 1.2 kGy/h with a total amount of 10 kGy 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



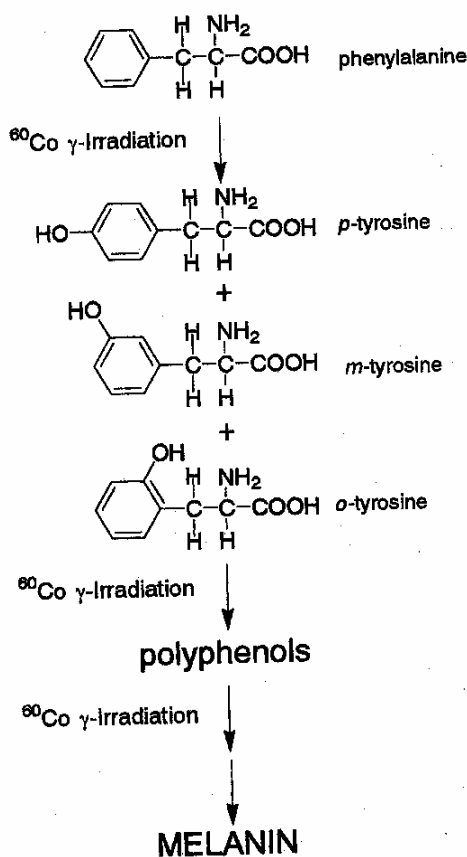
۱- مقدمه

نتیجه به مصرف کنندگان کمک می‌نماید تا مطمئن شوند که پرتو دهندگان و توزیع کنندگان تحت نظارت قرار دارند. تاکنون روش‌های کافی برای آشکارسازی مواد غذایی پرتو دهی 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 مواد غذایی پرتو دهی شده در جدول ۱ ارایه شده است [۳، ۴ و ۵].

نظر به اینکه پرتو دهی مواد غذایی عملاً تغییری در ظاهر، طعم یا دمای مواد غذایی ایجاد نمی‌کند، شناسایی مواد غذایی پرتو دهی شده و همچنین تعیین میزان دز به کار رفته در پرتو دهی مواد غذایی مشکل خواهد بود. روش‌های آشکارسازی پرتو دیدگی مواد غذایی را می‌توان به عنوان روش‌های کنترل کننده مقررات پرتو دهی مواد غذایی در نظر گرفت و در

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

Method	Basis	Suitable materials	Suitable foods	Equipment	Advantage	disadvantage
^(۱) ESR	free radical or paramagnetic species 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
^(۲) DEFT/APC	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



شکل ۱- محصولات رادیولیزی حاصل از اسید آمینه فنیل آلانین.

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 [۱۶ تا ۲۰]. 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 باشد [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

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 مواد غذایی 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 مواد غذایی اکثراً به وسیله محصولات رادیولیزی آب ایجاد می‌شوند. محصولات رادیولیزی آب به طور طبیعی ناپایدار بوده و در کسری از ثانیه (10^{11} - 10^{10} $\text{m}^{-1}\text{s}^{-1}$) به وسیله واکنش با یکدیگر و یا با دیگر اجزای مواد غذایی 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).



رادیکال هیدروکسیل ($\cdot\text{OH}$) یک واکنشگر اکسیدکننده قوی است در حالی که 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].

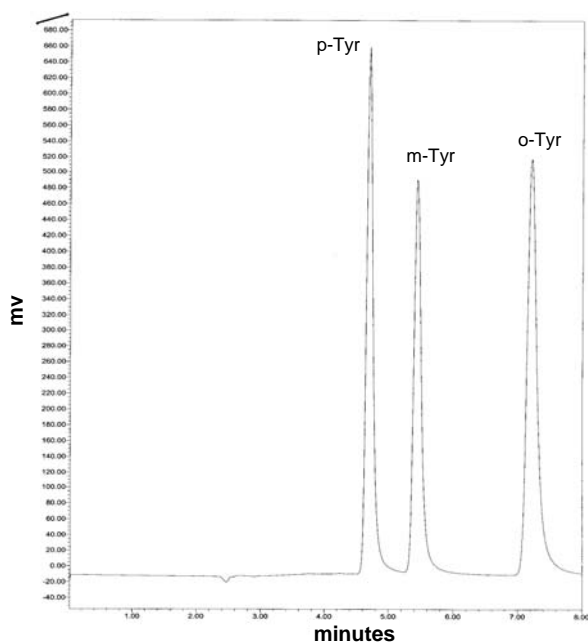
در محلول‌های آبی اسید آمینه فنیل آلانین، هیدروکسیل شدن حلقه آروماتیکی، واکنش اصلی انجام شده بوسیله رادیکال‌های هیدروکسیل است. رادیکال‌های هیدروکسیل به واسطه طبیعت الکتروفیلی خود به نقاط سرشار از الکترون حلقه آروماتیک اضافه می‌شوند و محصولات ایزومری ۲-، ۳-، ۴- هیدروکسی فنیل آلانین (پارا، متا، ارتو-تیروزین) 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 فنیل آلانین صورت گرفته است که مکانیسم تشکیل ایزومرهای تیروزین را به خوبی نشان می‌دهند [۱۰ تا ۱۳]. *krajnik*، *Miyahara*، *Simic* شرایط پرتودهی بر ایزومرهای تیروزین تشکیل شده در محدوده معینی از دزهای پرتودهی را نشان داده‌اند [۹، ۱۴ و ۱۵].



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

۳- تأثیر شرایط پرتودهی بر تشکیل ایزومرهای تیروزین ۱-۳ تأثیر دز

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



شکل ۲- کروماتوگرام حاصل از جداسازی ایزومرهای تیروزین با استفاده از ستون NOVA-Pak C₁₈.

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

۲- روش کار ۱-۲ مواد و دستگاهها

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

۲-۲ روش پرتودهی

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

۲-۳ اندازه‌گیری کمی ایزومرهای تیروزین به وسیله HPLC

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

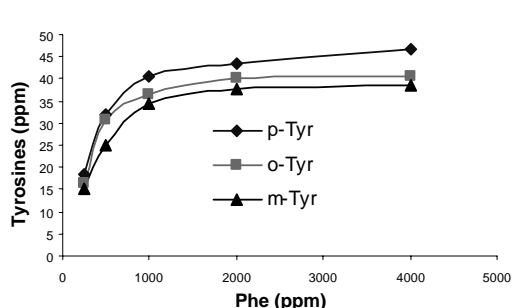
- Column: Waters NOVA Pak C₁₈, 150×4.6 mm
 Column oven: 25 °C
 Eluents: A) 1% acetonitrile, 1% sodium chloride, water
 B) 50% acetonitrile, 0.5% sodium chloride, Water
 C) 60% acetonitrile, 40% water
 (بعد از پایان کار برای نگهداری ستون)
- Gradient: 0-7 minutes: 100% A
 7-12 minutes: 100% B
 (برای حذف 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: 20 μl of 1 μg/ml of tyrosines in 0.01N HCl

**۳-۲ اثر غلظت فنیل آلانین**

اثر غلظت فنیل آلانین در تشکیل ایزومرهای تیروزین در شکل ۵ نشان داده شده است. محلول‌های آبی فنیل آلانین (۴-۲۵ mg/ml) در دمای اتاق و با دز ۱۰ kGy پرتو دهی شده‌اند. افزایش میزان تشکیل ایزومرهای تیروزین با افزایش غلظت فنیل آلانین تا ۱ mg/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 فنیل آلانین بالاتر از ۱ mg/ml، غلظت محصولات رادیولیزی حاصل از پرتو دهی به مقداری باشند که با مولکول‌های فنیل آلانین جهت واکنش با رادیکال‌های هیدروکسیل به وجود آمده از یونیزاسیون آب رقابت کنند. به عبارت دیگر مقداری از رادیکال‌های هیدروکسیل به جای واکنش با فنیل آلانین، با ایزومرهای تیروزین تشکیل شده برای تشکیل دادن محصولات ثانوی وارد واکنش می‌شوند.

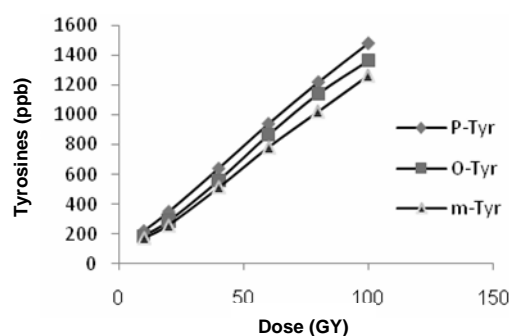
۳-۳ اثر pH

اثر pH محلول فنیل آلانین بر میزان تشکیل ایزومرهای تیروزین در دزهای ۴ و ۱۰ kGy 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 Miyahara و Procter درباره تأثیر pH در تولید ایزومرهای تیروزین هماهنگ می‌باشند [۹ و ۲۴]. محلول آبی پرتو دهی شده در شرایط اسیدی خاصیت احیاء کنندگی، و در شرایط بازی خاصیت اکسید کنندگی دارد، بنابراین

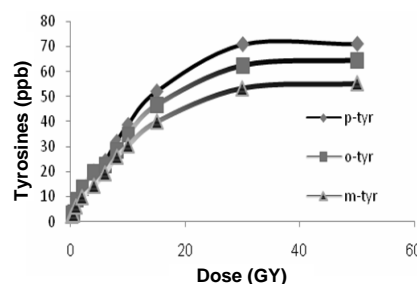


شکل ۵- تأثیر غلظت فنیل آلانین در تشکیل ایزومرهای تیروزین در دز ۱۰ kGy شرایط پرتو دهی (دمای محیط؛ سرعت دز: ۲/۳ kGy/h؛ pH: خنثی).

(۲۰۰ ppb (μg/l) می‌باشد. در محدوده دزهای کم، بین دز پرتو دهی 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 فنیل آلانین 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 فنیل آلانین برای واکنش با رادیکال‌های هیدروکسیل شرکت کنند. لذا در دزهای بالای ۱۵ kGy، 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 (۱۰-۱۰۰ Gy) شرایط پرتو دهی (دمای محیط؛ pH: خنثی؛ غلظت فنیل آلانین: ۱ mg/ml سرعت دز: ۲/۳ kGy/h).



شکل ۴- اثر مقدار دز تابش در تشکیل ایزومرهای تیروزین (۵۰ kGy) شرایط پرتو دهی (دمای محیط؛ pH: خنثی؛ غلظت فنیل آلانین: ۱ mg/ml سرعت دز: ۲/۳ kGy/h).



۳-۴ اثر دما

برای بررسی اثر دما، محلول آبی ۱mg/ml فنیل آلانین 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 پرتویدگی 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 فنیل آلانین در ۰/۱۰ و ۲۰°C وجود ندارد، همسان می‌باشد [۹] و [۱۵].

۳-۵ اثر سرعت دز

ایزومرهای تیروزین حاصل از پرتودهی محلول آبی فنیل آلانین (۱mg/ml) با سرعت دز ۱/۲kGy/h و تا دز کلی ۱۰kGy در جدول ۳ ارائه شده است. در این جدول همچنین مقدار ایزومرهای تیروزین حاصل از پرتودهی محلول فنیل آلانین 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].

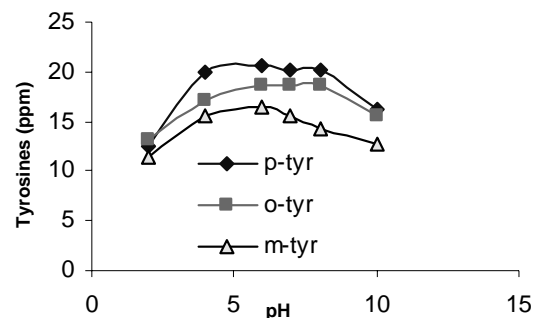
۳-۶ اثر اکسیژن

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

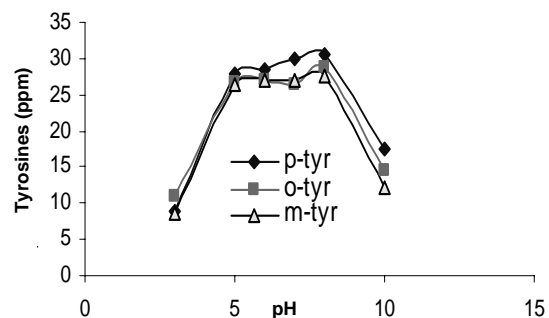
جدول ۲- تأثیر دما در تشکیل ایزومرهای تیروزین در ۰/۲۵kGy شرایط پرتودهی؛ سرعت دز: ۲/۳kGy/h؛ pH: خنثی؛ غلظت فنیل آلانین: ۱mg/ml

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

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 می‌شود 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.



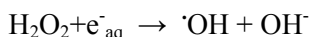
شکل ۶- تأثیر pH در تشکیل ایزومرهای تیروزین در ۴kGy شرایط پرتودهی؛ دما: محیط؛ سرعت دز: ۲/۳ kGy/h؛ غلظت فنیل آلانین: ۱mg/ml



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



که در نهایت پروکسید هیدروژن رادیکال هیدروکسیل را تولید نماید:



بدین ترتیب حضور اکسیژن اکسایش فنیل آلانین 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 ایده آل 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 فنیل آلانین، محلول‌های فنیل آلانین (۱ mg/ml) که در pHهای مختلف با دز ۱۰ kGy 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 ایزومرهای 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 فنیل آلانین پرتودهی شده به صورت یخزده، مقدار تخریب ایزومرهای تیروزین را به مقدار قابل توجهی کاهش می‌دهد.

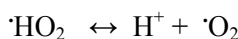
جدول ۴- درصد تخریب ایزومرهای تیروزین موجود در محلول‌های آبی فنیل آلانین (۱ mg/ml) پرتودهی شده با دز ۱۰ kGy که به مدت شش ماه در یخچال و فریزر نگهداری شده بودند.

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)

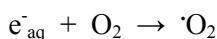
پیرکس در بدار قرار داده شد و با عبور دادن گاز نیتروژن از درون محلول و حذف اکسیژن محلول و اکسیژن موجود در هوای درون لوله پیرکس، دهانه آن محکم بسته شد. مقدار ایزومرهای تیروزین حاصل از پرتودهی این نمونه با سرعت دز ۲/۳ kGy/h و تا دز کلی ۱۰ kGy در جدول ۳ نشان داده شده است. مقایسه این نتایج با پرتودهی محلول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



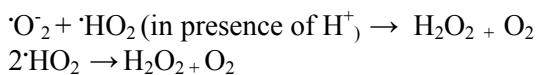
رادیکال هیدروپروکسیل در تعادل با رادیکال آنیون پروکسید ($\cdot O_2^-$) می‌باشد:



همچنین رادیکال آنیون سوپراکسید^(۶) می‌تواند به وسیله واکنش الکترون‌های آبی با اکسیژن تشکیل شود:



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



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

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



پی‌نوشت‌ها:

- ۱-ESR: Electron Spin Resonance
- ۲- DEFT/APC: Differential Epiluoescence Filter Technique & Aerobic Plate Count
- ۳- Aqueous Electron
- ۴- Dose Rate
- ۵- Hydroperoxyl Radical
- ۶- Superoxide Radical

References:

1. IAEA general conference, Technical Cooperation 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 chicken tissue," J. Bio. Chem, 265 (20), 11581-11585 (1990).

۴- نتیجه‌گیری

به طور کلی با افزایش دز تابش، مقدار محصولات رادیولیزی ایزومرهای تیروزین تشکیل شده در محلول‌های آبی فنیل آلانین 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 فنیل آلانین 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 فنیل آلانین 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 فنیل آلانین به وسیله گروه‌های عاملی ترکیبات موجود در اطراف مولکول‌های فنیل آلانین 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 فنیل آلانین نشان می‌دهد که در آشکارسازی پرتو دیدگی مواد غذایی با استفاده از روش ارتوتیروزین باید احتیاط‌های لازم جهت جلوگیری از تغییر pH مواد غذایی 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 فنیل آلانین، واکنش هیدروکسیله شدن حلقه آروماتیکی فنیل آلانین 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 پرتو دیدگی مواد غذایی با استفاده از روش ارتوتیروزین تأثیر گذارد.



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 Automated pre-column derivatization and laser fluorometric detection," *J. Health Sci*, 46(3), 192-199 (2000).
10. M.G. Simic, E. Gajewski, M. Dizdaroğlu, "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. Krajcinik, 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 Naturforsch*," 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 comparison 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. Dizdaroğlu, 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).