تعیین مقدار اسید چرب سمی اروسیک در خوراک شیرخوار به روش گاز کروماتوگرافی

امید سبزواری[1*]
عباس دلیرج[2]
محمد محمدی[1]
حسین رستگار[2]

۱- گروه سم‌شناسی و فارماکولوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران
۲- اداره کل آزمایشگاههای کنترل غذا و دارو، وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی

*نویسنده مسئول، نشانی: تهران، صندوق پستی ۶۴۵۱-۱۴۱۵۵، تلفن: ۶۶۴۹۴۹۹۴
Email: omid@tums.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: خوراک شیرخوار مورد مصرف کودکان، بسته به نوع منابع مورد استفاده در ساخت آنها حاوی اسیدهای چرب مختلفی می‌باشند. برخی از این اسیدهای چرب ارزش تغذیه‌ای و بیولوژیکی مؤثر دارند اما حضور برخی از آنها در خوراک شیرخوار می‌تواند همراه با اثرات مضر باشد، در این میان اسید چرب اروسیک بیشتر از بقیه مورد توجه می‌باشد. این اسید چرب با تجمع در بافت میوکارد قلب، ایجاد آسیب می‌کند بنابراین تا حد امکان این اسید چرب مضر نباید در خوراک شیرخوار وجود داشته باشد.

روش بررسی: گاز کروماتوگرافی یکی از مهمترین روشهای جداسازی اسیدهای چرب از جمله اسیداروسیک در روغن‌ها و مواد غذایی حاوی روغن، می‌باشد. به منظور بررسی میزان اسید چرب مضر اروسیک در سه نوع خوراک شیرخوار پر مصرف در ایران به نامهای هومانا، بیومیل و ملتی از روش GC و با استفاده از ستون WCOT Fused Silica و آشکارساز FID استفاده گردید. با استفاده از غلظتهای مختلف اسید اروسیک منحنی کالیبراسیون رسم شد و برای کاستن خطای کار، از استاندارد داخلی Heneicosanoic Acid استفاده گردید.

یافته‌ها: در این بررسی اسید چرب اروسیک در خوراک شیرخوار هومانا ۰/۰۶٪ و در بیومیل ۰/۰۰۲٪ (کل اسیدهای چرب) یافت شد ولی در خوراک شیرخوار ملتی، یافت نشد.

نتیجه‌گیری: نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که مقادیر اسید چرب مضر اروسیک در سه نوع خوراک شیر خوار کمتر از حد مجاز اعلام شده استاندارد Codex (کمتر از ۱٪) می‌باشد.

کلمات کلیدی: اسید اروسیک، اسید چرب، خوراک شیرخوار، گاز کروماتوگرافی، آنالیز

مقدمه

شیر مادر کاملترین و سالم‌ترین غذا برای نوزاد است و در تامین سلامت جسمی و روانی و در رشد و تکامل مطلوب کودک نقش بسزایی دارد. در این میان شرایطی نیز بوجود می‌آید که سبب محروم شدن نسبی یا کامل نوزاد از شیر مادر می‌شود، لذا لازم است که نوزاد با خوراک شیرخوار با کیفیت بالا تغذیه شود. خوراکهای شیرخوار مورد مصرف بسته به منابع روغن مورد استفاده حاوی اسیدهای چرب مختلفی می‌باشند. تعدادی از این اسیدهای چرب ارزش تغذیه‌ای و بیولوژیکی موثر دارند اما حضور برخی از آنها می‌تواند باعث اثرات سمی شود. در این میان اسید چرب اروسیک (Erucic Acid) با تجمع در ارگانهای مختلف بدن از جمله قلب، کلیه و کبد می‌تواند اثرات سمی به همراه داشته باشد.[۱-۱۰] مقدار مجاز این اسید چرب سمی در خوراک شیر خوار، طبق استاندارد اعلام شده توسط مرجع Codex حداکثر یک درصد کل اسیدهای چرب موجود در این فرآورده می تواند باشد.[۱۸] تا کنون هیچ گونه مطالعه‌ای در

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-14]

رابطه با تعیین مقدار اسید چرب سمی اروسیک در خوراکهای شیرخوار پرمصرف در کشور ایران صورت نپذیرفته است لذا در این تحقیق تلاش خواهد شد که میزان این اسید چرب سمی در سه نوع خوراک شیرخوار پر مصرف در سطح کشور به نامهای هومانا، ملتی و بیومیل با استفاده از روش معتبر گاز کروماتوگرافی اندازه‌گیری و با یکدیگر مقایسه گردد.

روش بررسی

سه نوع خوراک شیرخوار هومانا، بیومیل و ملتی که به صورت تصادفی توسط کارشناسان وزارت بهداشت، نمونه‌برداری شده بودند استفاده شد.

مواد: استاندارد متیله شده اسیداروسیک (Methyl Erucate) از شرکت مرک (Merck) و استاندارد داخلی Heneicosanoic acid از شرکت سیگما (Sigma) خریداری شدند. کلیه حلالهای مورد نیاز جهت استخراج و متیلاسیون نیز از شرکت مِرک خریداری شد.

جهت استخراج اسیدهای چرب از خوراک شیرخوار، یک گرم خوراک شیرخوار وزن شد و در لوله استخراج با یک میلی‌لیتر آب بصورت خمیر درآمد و سپس ۹ میلی‌لیتر آب به آن اضافه شد و کاملا هم زده شد سپس به میزان یک میلی‌لیتر آمونیاک ۲۵ درصد به آن اضافه شد و بمدت ۵ دقیقه در بن‌ماری در دمای ۷۵ درجه قرار داده شد. پس از خنک شدن مخلوط در دمای محیط ۱۰ میلی لیتر اتانل، ۲۵ میلی‌لیتر دی‌اتیل‌اتر و ۲۵ میلی‌لیتر اتر دوپترول به آن اضافه شد و به مدت چند دقیقه تکان داده شد بمدت چند دقیقه صبر کرده تا دو فاز از هم جدا شود. بعد از جدا شدن دو فاز، فاز آلی به بالن درب سمباده‌ای منتقل شد. دو بار دیگر عمل استخراج با اضافه کردن چهار میلی‌لیتر اتانول، ۱۵ میلی‌لیتر دی‌اتیل‌اتر و ۱۵ میلی‌لیتر اتر دوپترول بر روی فاز مائی انجام شد و فاز آلی به ارلن منتقل شد. پس از جمع آوری فاز آلی برای تبخیر حلال از دستگاه روتاری در دمای ۴۵ درجه استفاده شد.

جهت متیله کردن، به چربی حاصله از مرحله استخراج ۴۵ میلی‌لیتر متانل، ۱۵ میلی لیتر بنزن و ۰/۵ میلی‌لیتر اسید سولفوریک ۰/۹۸ اضافه شد به مدت ۲/۵ ساعت رفلو و سپس سرد شد. ۵۰ میلی لیتر آب مقطر و ۵۰ میلی لیتر اتردوپترول به آن اضافه و به یک بالن دکانتاسیون منتقل شد. به مدت چند دقیقه تکان داده شد بعد از جداشدن دوفاز، فاز آلی به ارلن منتقل شد دو بار دیگر عمل استخراج با اضافه کردن ۵۰ میلی‌لیتر اتردوپترول بر روی فاز مائی انجام شد. لایه‌های اتری حداقل سه بار با ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر شستشو داده تا حاصل شستشوها در مجاورت با متیل رد اسیدی نباشد. لایه‌های اتری از پودر سولفات سدیم بدون آب عبور داده شد تا آب آن گرفته شود و با روتاری در دمای ۴۵ درجه حلال آن خارج شد.

در گاز کروماتوگرافی، جهت جداسازی فرم متیله اسیدهای چرب بویژه اسید چرب اروسیک از ستون WCOT Fused silica و فاز ساکن cp-sil 5 CB استفاده شد. این ستون قطبی و قابلیت شناسایی آن بالاست. گاز حامل مورد استفاده گاز نیتروژن با درجه خلوص ۹۹/۹۹ بود که طی آزمایشات انجام شده جریان سه میلی‌لیتر بر دقیقه برای آن در نظر گرفته شد.

از FID که آشکارساز انتخابی در شناسایی ترکیبات آلی است استفاده شد و دمای 300^0C برای آن انتخاب شد. دمای محل تزریق نیز بر روی 250^0C تنظیم شد.

برنامه دمایی ستون نیز پس از آزمایشات زیاد بصورت زیر تنظیم شد:

13°C/min 1°C/min 20°C/min

130 °C→→→215 °C (remain for 11 min)→ → →236 °C→→→270 °C

جهت اعتبار سنجی (Method Validation) روش کار با استفاده از دستگاه گازکروماتوگرافی، فاکتورهای دقت شامل فاکتور تکرارپذیری با استفاده از دو غلظت ۰/۰۸۷ و ۰/۱۷۴ میلی‌گرم بر میلی لیتر از محلول استاندارد اسیدچرب اروسیک و با تکرار (n=۳) در یک روز و فاکتور تجدیدپذیری با استفاده از دو غلظت ۰/۰۸۷ و ۰/۱۷۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر با تکرار n=۳ در سه روز متوالی انجام گرفت. همچنین فاکتور صحت با چهار غلظت و با تکرار n=۳ از هر غلظت انجام شد. از استاندارد داخلی برای کاستن خطای حین آزمایش استفاده شد و آزمایشات بر روی شش سری ساخت از هر خوراک شیرخوار و با تکرار تزریق n=۳ از هرکدام از نمونه‌ها انجام شد.

یافته‌ها

تعیین محل پیک استاندارد اسید اروسیک و استاندارد داخلی: پس از تهیه محلول استاندارد اسید اروسیک با غلظت ۰/۱۷۴ میلی‌گرم بر

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-14]

میلی‌لیتر و استاندارد داخلی با غلظت ۰/۰۸۷ میلی گرم بر میلی‌لیتر، یک میکرولیتر از هر کدام بصورت جداگانه و با هم به دستگاه GC تزریق شد. زمان بازداری اسید اروسیک در حدود دقیقه ۳۲ و زمان بازداری استاندارد داخلی در حدود دقیقه ۲۵ بدست آمد (شکل ۱،۲،۳). برای رسم منحنی کالیبراسیون غلظتهای ۰/۰۰۸۷، ۰/۰۱۷۴، ۰/۰۸۷ و ۰/۱۷۴ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از محلول استاندارد اسیداروسیک هر کدام سه بار تحت شرایط ذکر شده در بالا به دستگاه تزریق شد. نسبت سطح زیر منحنی (AUC) اسید چرب اروسیک به سطح زیر منحنی استاندارد داخلی هنیکوزانوئیک اسید بدست آمد (غلظت استاندارد داخلی در همه نمونه‌ها برابر با ۰/۰۸۷ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد). منحنی کالیبراسیون رسم شد به طوریکه غلظت در محور X و نسبت AUC در محور Y قرار دارد (شکل ۲). تعیین مقدار اسید چرب اروسیک در نمونه‌های خوراک شیرخوار برای هر کدام از سه خوراک شیرخوار هومانا، بیومیل و ملتی شش نمونه تهیه شد. پس از استخراج و متیله نمودن اسیدهای چرب موجود در نمونه‌ها، مقدار یک میکرولیتر که هر کدام حاوی استاندارد داخلی با غلظت ۰/۰۸۷ میلی‌گرم بر میلی لیتر می‌باشد با تکرار (n=۳) به دستگاه GC تزریق شد که نتایج آنالیز در جدول ۱ ارائه شده است.

تعیین بازیابی (Recovery)، دقت (Precision) و صحت (Accuracy): برای تعیین بازیابی از خوراک شیرخوار ملتی که فاقد اسیدچرب اروسیک بود استفاده شد. میزان بازیابی روش استخراج در سه غلظت کم (۱۷/۴ میکروگرم بر میلی لیتر)، متوسط (۸۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و زیاد (۱۷۴ میکروگرم بر میلی‌لیتر) انجام شد. میزان متوسط استخراج ۹۵ درصد بدست آمد. تکرارپذیری روش برای غلظت ۰/۰۸۷ بر حسب ضریب تغییرات (cv) برابر با ۲/۱٪ و برای غلظت ۰/۱۷۴ برابر با ۲٪ بدست آمد. تجدید پذیری برای غلظت ۰/۰۸۷ بر حسب ضریب تغییرات (cv) برابر با ۲/۲ و برای غلظت ۰/۱۷۴ برابر با ۲/۱٪ بدست آمد. صحت همه غلظت‌ها نیز در محدوده مجاز می‌باشد.

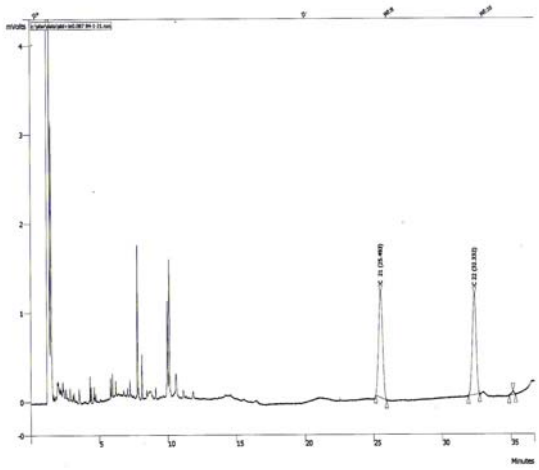
جدول-۱: سطح زیر منحنی اسید چرب اروسیک بر استاندارد داخلی (AUC)در سه خوراک شیرخوار

	نمونه شماره ۱	نمونه شماره ۲	نمونه شماره ۳	نمونه شماره ۴	نمونه شماره ۵	نمونه شماره ۶	میانگین
هومانا	۰/۸۴۲	۰/۴۰۹	۱/۱۳۲	۰/۸۷	۰/۴۱	۱/۱۳	۰/۷۹۸
بیومیل	–	۰/۱۷۷	۰/۲	–	۰/۲۰۱	۰/۲	۰/۱۲۹
ملتی	–	–	–	–	–	–	–

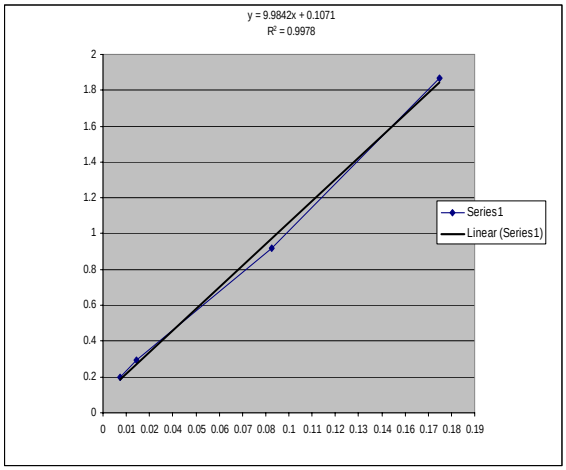
جدول-۲: مقادیر تکرارپذیری و تجدیدپذیری روش آنالیز

تجدید پذیری		تکرار پذیری		
غلظت (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	غلظت (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	غلظت (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)		
۰/۱۷۴	۰/۰۸۷	۰/۱۷۴	۰/۰۸۷	
۱/۸۶	۰/۸۸	۱/۸۱	۰/۹۰۱	
۱/۸۷	۰/۹۲	۱/۸۷	۰/۹۳۱	AUC
۱/۸۳	۰/۸۹	۱/۹۲	۰/۹۴	
۱/۸۲	۰/۸۹	۱/۸۷	۰/۹۲	میانگین
۰/۰۴	۰/۰۲	۰/۰۵۵	۰/۰۲	انحراف معیار

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-14]



شکل-۱: کروماتوگرام استاندارد اسید اروسیک و استاندارد داخلی (هنیکوزانوییک اسید)



شکل-۲: منحنی کالیبراسیون اسید اروسیک استاندارد

بحث

اسید اروسیک یک اسید چرب سمی می‌باشد که با تجمع در بافت میوکارد قلب باعث آسیب می‌شود، بنابراین تا حد امکان این اسیدچرب مضر نباید در خوراک شیرخوار وجود داشته باشد. در برخی مطالعاتی که در مورد شناسایی و تعیین مقدار کل اسیدهای چرب موجود در خوراک شیرخوار انجام شده است، این اسید چرب شناسایی و اندازه‌گیری نگردیده است.[۱۶و۱۷] با توجه به مصرف روز افزون خوراک شیرخوار در کشور و عدم تعیین میزان اسید چرب سمی اروسیک در این فرآورده‌ها، در این مطالعه میزان این اسید چرب سمی در سه نوع خوراک شیرخوار پر مصرف در کشور ایران با استفاده از یک روش آنالیز گاز کروماتوگرافی (GC)، تعیین گردید. در این مطالعه پس از تعیین محل پیکهای مربوط به استاندارد اسید اروسیک و استاندارد داخلی و رسم منحنی کالیبراسیون مربوط به غلظتهای مختلف استاندارد اسید اروسیک، میانگین سطح زیر منحنی اسید اروسیک در شش نمونه خوراک شیرخوار از هر کدام از خوراک‌های شیرخوار هومونا، بیومیل و ملتی نسبت به سطح زیر منحنی استاندارد داخلی تعیین گردید. جهت اعتبار سنجی روش و نتایج مربوط به آزمایش، فاکتورهای دقت شامل تکرارپذیری و تجدیدپذیری، صحت و بازیابی مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج حاصله نشان دهنده معتبر بودن روش بود. بر طبق نتایج حاصله میزان اسیدچرب اروسیک در خوراک شیر خوار هومانا ۰/۰۶٪ و بیومیل ۰/۰۰۲٪ نسبت به کل اسیدهای چرب موجود در این نمونه‌ها بدست آمد (جدول شماره ۱). در خوراک شیرخوار ملتی اسیدچرب اروسیک یافت نشد (جدول شماره ۱). حداکثر مقدار مجاز اسید مضر اروسیک اعلام شده توسط استاندارد Codex یک درصد کل اسیدهای چرب می‌باشد.[۱۸] بنابراین یافته های حاصل از این مطالعه نشان داد که میزان اسید چرب سمی اروسیک در خوراک شیر خوار هومانا، بیومیل و ملتی مورد مصرف در سطح کشور زیر حد مجاز استاندارد Codex قرار دارد.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-14]

References

1. Heiskanen KM, Savolainen KM. Erucic acid and erucic acid anilide-induced oxidative burst in human polymorphonuclear leukocytes. *Free Radic Res* 1997; 27: 477-85.
2. Kickler TS, Zinkham WH, Moser A, Shankroff J, Borel J, Moser H. Effect of erucic acid on platelets in patients with adrenoleukodystrophy. *Biochem Mol Med* 1996; 57: 125-33.
3. Badawy IH, Atta B, Ahmed WM. Biochemical and toxicological studies on the effect of high and low erucic acid rapeseed oil on rats. *Nahrung* 1994; 38: 402-11.
4. Stewart LC, Kramer JK, Sauer FD, Clarke K, Wolynetz MS. Lipid accumulation in isolated perfused rat hearts has no apparent effect on mechanical function or energy metabolism as measured by 31P NMR. *J lipid Res* 1993; 34: 1573-81.
5. Pasini E, Cargnoni A, Condorelli E, Marzo A, Lisciani R, Ferrari R. Effect of prolonged treatment with propionyl-L-carnitine on erucic acid-induced myocardial dysfunction in rats. *Mol Cell Biochem* 1992; 112: 117-23.
6. Pasini E, Comini L, Ferrari R, de Giuli F, Menotti A, Dhalla NS. Effect of propionyl-L-carnitine on experimental induced cardiomyopathy in rats. *Am J Cardiovasc Pathol* 1992; 4: 216-22.
7. Kramer JK, Farnworth ER, Thompson BK, Corner AH. Testing a short-term feeding trial to assess compositional and histopathological changes in hearts of rats fed vegetable oils. *Lipids* 1988; 23: 199-206.
8. Baudet MF, Esteva O, Lasserre M, Jacotot B. Dietary modifications of low-density lipoprotein fatty acids in humans: their effect on low-density lipoprotein-fibroblast interactions. *Clin Physiol Biochem* 1986; 4: 173-86.
9. Flatmark T, Christiansen EN, Kryvi H. Evidence for a negative modulating effect of erucic acid on the peroxisomal beta-oxidation enzyme system and biogenesis in rat liver. *Biochim Biophys Acta* 1983; 753: 460-6.
10. Clandinin MT. The role of dietary long chain fatty acids in mitochondrial structure and function. Effects on rat cardiac mitochondrial respiration. *J Nutr* 1978; 108: 273-81.
11. Ackman RG, Barlow SM, Duthie IF. Erucic acid in edible fats and oils: a collaborative study on determination by open-tubular (capillary) gas-liquid chromatography. *J Chromatogr Sci* 1977; 15: 290-5.
12. Misir R, Laarveld B, Blair R. Evaluation of a rapid method for preparation of fatty acid methyl esters for analysis by gas-liquid chromatography. *J Chromatogr* 1985; 331: 141-8.
13. Kohn G, van der Ploeg P, Mobius M, Sawatzki G. Influence of the derivatization procedure on the results of the gas romatographic fatty acid analysis of human milk and infant formulae. *Z Ernahrungswiss* 1996; 35: 226-34.
14. Preparation of Methyl ester of long-chain fatty acid A.O.C.S 1997. Method CE IF-96.
15. Eder K. Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters. *J Chromatogr* 1995; 67: 113-31.
16. Cantellops D, Reid AP, Eitenmiller RR, Long AR. Determination of lipids in infant formula powder by direct extraction methylation of lipids and fatty acid methyl esters (FAME) analysis by gas chromatography. *J AOAC Int* 1999; 82: 1128-39.
17. Satchithanandam, S., Fritsche, J,. Gas chromatographic analysis of infant formulas for total fatty acids, including trans fatty acids. J AOAC Int 2002; 85: 86-94.
18. Codex committee on nutrition and Dietary use: 2002.

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-14]

Tehran University Medical Journal; Vol. 64, No. 12, Mar 2007: 17-22

Identification and determination of erucic acid in infant formula using Gas Chromatography

Sabzevari O[1]
Daliraj A[2]
Mohammadi M[1]
Rastegar H[2].

1-Department of Toxicology and Pharmacology, Tehran University of Medical Sciencis.
2- Food and Drug Control Labs, Ministry of Health.

*Corresponding author, Depart.of Toxicology and Pharmacology, School of Pharmacy, Poursina Ave., Tehran-P.O. Box 14155/6451.
Tel: +9821-6649 4994
Email: omid@tums.ac.ir

Abstract

***Background*:** Infant formula, depending on the source, contains various fatty acids, which may possess important nutritional and biological value for infants. The presence of some of these fatty acids in infant formula, however, can be harmful and toxic for the infant. In this regard, more attention has been paid to erucic acid since its accumulation in myocardial tissues may cause damage to the heart. Therefore, a limit has been set by the Codex Alimentarius for the presence of erucic acid in infant formula (less than 1% of total fatty acids). The purpose of the present study is to investigate amount of erucic acid present in three infant formulas used predominantly in Iran.

***Methods*:** Gas chromatography (GC) is a valuable method applied for the separation of fatty acids, including erucic acid, from oils and oily food. Three brands of infant formulas, namely Humana, Biomil and Multi, were analyzed by GC using a wall coated open tubular (WCOT) fused silica column and flame ionization detector (FID). Heneicosanoic acid was employed as an internal standard.

***Results*:** The findings showed that Humana and Biomil infant formula samples contained 0.06% and 0.002% erucic acid (from total fatty acids), respectively, while no erucic acid was detected in the Multi infant formula samples.

Conclusion: The amount of erucic acid in the studied infant formulas was far below the Codex limit of 1% total fatty acids.

Keywords: Erucic acid, Fatty acid, Infant formula, Determination, Gas chromatography

[Downloaded from tumj.tums.ac.ir on 2024-07-14]