



هیستامین، بیومارکر تازگی ماهی شیر (*Scomberomorus commerson*)

سمیرا گودرزی^۱، عمار مریم آبادی^۲، ایرج نبی پور^۳، غلامحسین محبی^{۳*}، سعیده آرمن^۲،
امیر وزیری زاده^۴، سرور شاغولی^۱

^۱ موسسه آموزش عالی خرد، بوشهر- ایران

^۲ واحد تحقیق و توسعه، شرکت بازرسی فنی شاخه زیتون لیان، بوشهر- ایران

^۳ مرکز تحقیقات زیست فناوری دریایی خلیج فارس، پژوهشکده علوم زیست پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

^۴ گروه زیست شناسی دریا، مرکز مطالعات و پژوهش های خلیج فارس، دانشگاه خلیج فارس، بوشهر، ایران

(دریافت مقاله: ۹۴/۹/۲۲- پذیرش مقاله: ۹۴/۱۰/۱۰)

چکیده

زمینه: سندروم اسکومبروئیدی (*Scombridae*)، یکی از مهم ترین مسمومیت غذایی با علائم شبیه آلرژی به غذاهای دریایی است که توسط آمین های بیوژنیک ایجاد می گردد. هیستامین از دکربوکسیلاسیون اسید آمینه هیستیدین موجود در ماهی ها، توسط آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز تولید می گردد. میزان هیستامین در ماهی و فرآورده های آن، یکی از مهم ترین بیومارکرها ی سنجش تازگی و یا فساد در ماهی می باشند. از اهداف این مطالعه، تعیین میزان هیستامین به روش HPLC، در ماهی های شیر، در شرایط نگهداری مختلف بود.

مواد و روش ها: تعداد ۲۱ نمونه ماهی شیر صید گردیده در سواحل بوشهر، پس از استخراج هیستامین به روش تری کلرواستیک اسید، میزان هیستامین آن ها در فواصل روزهای اول، دهم (نگهداری در ۴°C) و ۳۰ ام (نگهداری در ۲۰°C-) توسط HPLC با آشکارساز FLD در طول موج های $\lambda_x: 320 \text{ nm}$ و $\lambda_e: 450 \text{ nm}$ مورد ارزیابی قرار گرفتند.

یافته ها: میانگین هیستامین در نمونه ها در روزهای مذکور به ترتیب دارای مقادیر $12/96 \pm 0/29$ ، $17/02 \pm 0/53$ ، $17/7 \pm 0/56$ بود. کمترین میزان هیستامین در نمونه های ماهی شیر روزهای اول، دهم و سی ام به ترتیب: $2/77$ ، $7/07$ و بیشترین مقادیر به ترتیب $40/86$ ، $40/75$ ، $40/07$ بودند.

نتیجه گیری: با وجود شناسایی هیستامین در ۹۰ درصد از نمونه ها، هیچ کدام از مقادیر آن ها کمتر از بیشتر از مجاز پذیرفته شده توسط استاندارد ملی ایران (۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر) نبود. هرچند که میزان $28/57$ درصد از نمونه ها دارای میزان هیستامین بالاتر از میزان پیشنهاد شده توسط FDA بودند (۲۰ میکروگرم بر میلی لیتر).

واژگان کلیدی: هیستامین، ماهی شیر (*S. Commerson*)، روش HPLC-FLD، استخراج تری کلرواستیک اسید

* بوشهر، مرکز تحقیقات زیست فناوری دریایی خلیج فارس، پژوهشکده علوم زیست پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بوشهر، بوشهر، ایران

هیستامین پس از تولید، با غلظت زیاد در وزیکول‌های ماست سل‌ها ذخیره می‌گردد. این ترکیب توسط آنزیم‌های مونو آمین اکسیداز و دی آمین اکسیداز متابولیزه می‌شود. برای تشخیص تولید بیش از حد هیستامین در بدن می‌توان از اندازه‌گیری اسید ایمیدازول استیک در ادرار بهره گرفت. از آنجایی که اتکوید هیستامین از ماست سل‌ها در پاسخ به واکنش‌های آلرژیک فوری (با واسطه IgE) آزاد می‌گردد نقش پاتوفیزیولوژیک^۴ مهمی در رینیت فصلی (تب یونجه)، کهیر و ادم آنژیونورتیک^۵ ایفاء می‌نماید. همچنین هیستامین نقش فیزیولوژیک مهمی را در تنظیم ترشح اسید معده و به عنوان یک عصب رسانه بر عهده دارد (۱۱).

گرچه این سلول‌های خاص، در بدن انسان توانایی تولید هیستامین را دارند اما در بسیاری از مواد غذایی و نوشیدنی‌هایی چون پنیر، شیر، آبجو، شراب، سبزیجات، گوشت و به ویژه ماهی نیز یافت می‌گردند (۱۲). آنزیم‌های میکروبی موجود در مواد غذایی، اسیدآمین‌های هیستیدین را به هیستامین تبدیل می‌کنند. این آنزیم‌ها به میزان زیادی در روند تخمیر شدن تولید می‌گردند. مواد غذایی تخمیر شده (پنیرهای فرانسوی مانند کمبر، پنیر بری، چدار و همچنین پارمزان، مواد غذایی تهیه شده از سویا مانند ناتو (یک غذای سنتی از تخمیر سویا)، میسو (غذای سنتی ژاپنی، کره‌ای تهیه شده از خمیر سویا)، خیار شور، ماست‌ها، نوشیدنی‌های الکلی و سرکه از منابع هیستامین هستند. علاوه بر این، مواد غذایی و نوشیدنی‌های گیاهی و حیوانی دیگری نیز وجود دارند که حاوی میزان زیادی هیستامین هستند مانند ماهی کولی، آووکادو، گوشت‌های فرآوری شده، مرغ، اسفناج، گوجه‌فرنگی (به خصوص به صورت

کچاپ، سس و پوره) میوه‌های خشک، مرکبات، توت‌ها، زردآلو، گیلاس، بادمجان، قارچ‌ها، نان‌ها و شکلات‌ها. از بین چاشنی‌های حاوی هیستامین می‌توان به دارچین، پودر چیلی، چوب میخک، خردل، پودر کاری و فلفل کاین اشاره نمود (۱۳).

هیستامین عمدتاً توسط دسته باکتری‌های حاوی آنزیم هیستیدین دکربوکسیلاز نظیر لاکتوباسیلوس‌ها^۶، ویبریوها^۷، برخی سویه‌های کلستریدیوم‌ها^۸، خانواده انتروباکتریاسه^۹ تولید می‌شود (۷).

میزان هیستامین تشکیل شده در ماهی بستگی به نوع ماهی، تفاوت‌های گونه‌ای، میزان هیستیدین موجود در عضلات آن‌ها، فلور میکروبی و سایر پارامترهای مؤثر بر روی رشد میکروب‌ها مانند دما و رطوبت دارد (۱۴).

مسمومیت با هیستامین یا سندرم اسکومبروئید، نوعی مسمومیت غذایی با علائم شبه آلرژی غذاهای دریایی است (۱۵). به نظر می‌رسد که مسمومیت با هیستامین شایع‌ترین مسمومیت‌های غذایی دریایی در سراسر جهان باشد (۱۰). این نوع مسمومیت معمولاً مربوط به ماهیانی است که مقادیر بالایی از اسید آمینه هیستیدین دارند که توسط بعضی از گونه‌های فلور، به هیستامین دکربوکسیله می‌گردند. اگر این ماهیان برای چند ساعت در شرایط درجه حرارت اتاق یا در آفتاب نگهداری شوند هیستیدین در بافت‌های ماهیچه‌ای آن‌ها تحت اثر باکتری‌ها، ابتدا به سورین (saurine) که یک ماده‌ی هیستامین مانند است تبدیل می‌گردد. تأییدیه آزمایشگاهی ماهی آلوده با بررسی محتوی هیستامین آن حاصل می‌آید که در این صورت این میزان به بیش از ۱۰۰ میلی‌گرم در هر ۱۰۰ گرم بافت ماهیچه‌ای ماهی بالغ می‌گردد (۷ و ۱۰). دگرانوله شدن

^۶ *Lactobacillus*^۷ *Vibrio*^۸ *Clostridium*^۹ *Enterobacteriaceae*^۴ Pathophysiologic^۵ Angioneurotic

ماست سل‌ها، تظاهرات پوستی به خصوص در صورت و گردن، تائیکاردی، سردرد و همچنین علائم و نشانه‌های دستگاه گوارشی از برجسته‌ترین نشانه‌های مسمومیت سندرم اسکومبروئید هستند. علائمی نظیر اسهال اغلب آبکی، سردرد به صورت ضربان‌دار، تهوع، گرفتگی عضلات شکم، دردهای شکمی و ناراحتی‌های همراه با استفراغ گاه‌گاهی، تورم لب‌ها و زبان با تاول، خارش و تعریق، احساس خارش در عضلات، طعم و مزه غیرطبیعی، تنگی نفس، اغلب یک احساس سوزن سوزن شدن در سراسر دهان و نیز در زبان و پاها، احساس خارش در گلو و برونکواسپاسم از جمله علائم گزارش شده هستند. اسکومبروئید یک بیماری خود محدود شونده و نسبتاً خفیف است اما می‌تواند یک خطر جدی برای مسمومین مبتلا به بیماری‌های حساسیتی، سالمندان، افراد مبتلا به بیماری‌های قلبی و نیز بیماران تحت درمان با ایزونیازید تلقی گردد (۱۰).

یکی از اولین روش‌های تشخیص هیستامین، روش تأیید بیولوژیک، بر اساس انقباض ایلوم خوکچه هندی بود (۱۶). از جمله روش‌های اندازه‌گیری این ترکیبات، روش کروماتوگرافی است که شامل کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)^{۱۰}، کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC)^{۱۱} (۱۷)، کروماتوگرافی گازی (GC)^{۱۲}، کروماتوگرافی تعویض یونی (IEC)^{۱۳} می‌باشد (۸). روش‌های آنزیمی نظیر دی آمین اکسیداز (DAO)^{۱۴}، فلوروسکپی^{۱۵}، الکتروفورز^{۱۶} و روش الایزا^{۱۷} نیز به

کار برده شده‌اند (۸ و ۱۷). از بین روش‌های فوق روش HPLC به لحاظ دارا بودن کارایی و حساسیت بالا به عنوان روش مرجع اندازه‌گیری هیستامین در مواد غذایی مطرح است. بر این اساس، بررسی میزان آلودگی در مراحل مختلف نگهداری و فراآوری ماهی از طریق اندازه‌گیری میزان هیستامین ضروری است (۱۸).

تعیین دقیق آستانه سمیت هیستامینی در انسان به علت متفاوت بودن مکانیسم‌های توکسین زدایی افراد، آسان نیست. مقادیر هیستامین، طبق یک طبقه‌بندی، در محدوده‌های ۴۰-۸، ۱۰۰-۴۰ میلی‌گرم و بیش از ۱۰۰ میلی‌گرم در هر ۱۰۰ گرم ماده غذایی، به ترتیب ممکن است موجب مسمومیت خفیف، متوسط و شدید گردند.

لازم به ذکر است که در اکثر موارد مسمومیت هیستامینی، میزان هیستامین موجود در ماهیان ایجاد کننده بیماری، بیش از میکروگرم بر میلی‌لیتر ۲۰۰ بوده است (۸). با توجه به بروز مشکلات متعدد، شناسایی و تعیین مقدار این ترکیبات در مواد غذایی حاوی آن و از جمله ماهی‌های خانواده اسکومبروئید ضرورت می‌یابد.

سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA)، ۲۰ میلی‌گرم هیستامین در ۱۰۰ گرم گوشت ماهی را آستانه خطر تعیین نموده است (۱۹). جامعه اقتصادی اروپا، ۱۲ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم گوشت را حد خطرناک هیستامین معرفی نموده است. در کشور انگلستان، میزان بیش از ۲۲ میلی‌گرم هیستامین در ۱۰۰ گرم گوشت ماهی حد سمی بودن قلمداد می‌گردد (۱۵). میزان مجاز این ماده در ایران، برابر ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تعیین گردیده است (۱۹).

¹⁰ Thin Layer Chromatography

¹¹ High performance liquid Chromatography

¹² Gas Chromatography

¹³ Ion Exchange Chromatography

¹⁴ Diamine oxidase

¹⁵ Fluorescopy

¹⁶ Electrophoresis

¹⁷ Enzyme - linked immunosorbent assay

مواد و روش‌ها

مواد

مواد شیمیایی از جمله ارتوفتالدئید^{۱۸} (OPA)، تری‌کلرواستیک اسید^{۱۹} (TCA) و استاندارد هیستامین از شرکت سیگمای آلمان و آب دیونیزه، متانول ویژه کروماتوگرافی (HPLC grade) و کلروفرم، از شرکت مرک (Merck) آلمان خریداری گردیدند.

محلول‌ها و استانداردها

محلول‌های استاندارد میکروگرم بر میلی‌لیتر ۲۰۰ هیستامین در متانول، تری‌کلرواستیک اسید ۵ درصد در آب مقطر و ارتوفتالدئید ۱ درصد در متانول تهیه گردیدند. غلظت‌های ۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر نیز از محلول میکروگرم بر میلی‌لیتر ۲۰۰ هیستامین تهیه و از آن‌ها استانداردهای کاری ۵، ۱۰، ۱۵ و میکروگرم بر میلی‌لیتر ۲۰ تهیه گردیدند.

نمونه‌گیری و آماده‌سازی نمونه

در فروردین ماه ۱۳۹۴ گروه ماهی‌های شیر (*S. commerrson*) تازه صید شده از ساحل جفره بندر بوشهر و ماهیان سطح عرضه از بازار ماهی فروشان بندر بوشهر با ظاهر سالم و حدوداً هم اندازه، به طور تصادفی تهیه گردیدند. میانگین وزن ماهی‌ها 125.0 ± 5.0 گرم و میانگین طول آن‌ها 25.0 ± 1.7 میلی‌متر بودند. نمونه‌ها جهت آنالیز، به آزمایشگاه سم‌شناسی معاونت غذا و داروی دانشگاه علوم پزشکی استان بوشهر با همکاری آزمایشگاه

شاخه زیتون لیان ارسال گردیدند. از قسمت عضلات هر ماهی، سه نمونه مطابق با شرایط نمونه‌برداری استاندارد ملی ایران نمونه‌برداری گردیدند (۲۰). به طور خلاصه، پس از جداسازی پوست و استخوان‌های موجود، با استفاده از کارد فلزی استریل و تیغ استریل با ایجاد شکاف مکعبی شکل، حدود ۵۰ گرم از عضله هر ماهی را توسط هموژنایزر (*IKA, Germany*) (بدون اضافه کردن مایع رقیق کننده) به مدت ۵ دقیقه هموژن نموده تا به یک مخلوط کاملاً هموژن و همگن، تبدیل گردند.

استخراج

جهت استخراج هیستامین روش‌های متعددی وجود دارد که دو روش استخراج با تری‌کلرواستیک اسید (TCA) و متانولی (Methanolic)، روش متداولتری می‌باشند. بنابراین در ابتدا، در این مطالعه جهت انتخاب روش استخراج مناسب‌تر از هر دو روش استخراج با تری‌کلرواستیک اسید (TCA) و متانولی (Methanol) استفاده گردید.

استخراج به روش تری‌کلرواستیک اسید (TCA) استخراج هیستامین بر اساس روش هوانگ (Hwang) و همکاران (۲۰۰۳) انجام شد. به طور خلاصه، ۱۰ گرم از نمونه هموژن شده، با ۲۰ میلی‌لیتر تری‌کلرواستیک اسید (TCA) ۵ درصد وزنی حجمی، در ۴ درجه سانتی‌گراد برای ۱۵ دقیقه در دور ۸۵۰۰g سانتریفیوژ و پس از آن، محلول سوپرناتانت توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف گردید. سپس جهت خالص‌سازی، یک میلی‌لیتر از محلول فیلتر شده، با ۲ میلی‌لیتر

¹⁸ Ortho-phthalaldehyde

¹⁹ Trichloroacetic acid

آمده از دتکتور FLD با نتایج آنالیز نمونه‌ها توسط دتکتور UV-VIS مقایسه گردیدند.

آنالیز آماری

جهت تجزیه و تحلیل کمی در سیستم HPLC توسط نرم‌افزار Breeze انجام گردید. برای بررسی سطح معنی‌داری (۵ درصد) بین نمونه‌های مختلف، بین مقادیر حاصل از هر شاخص در روزهای صفر (روز صید)، ۱۰-۹ و ۳۰ از آنالیز واریانس یکطرفه (ANOVA) استفاده گردید.

میزان بازیافت^{۲۰} دستگاه

درصد بازیافت در نمونه اسپایک با میزان ۱۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر هیستامین، معادل ۹۵/۳۶ درصد به دست آمد.

یافته‌ها

مقایسه روش‌های استخراج تری کلرواستیک اسید

(TCA) و متانولی (Methanolic)

میانگین‌های هیستامین در روش‌های استخراج با TCA و متانولی، بر روی ۴ نمونه مشابه با سه بار تکرار، به ترتیب ۱۷/۷۹۶ و ۹/۷۳۸ به‌دست آمدند. این نتایج نشان داد که از بین این دو روش استخراج، روش استخراج با TCA، روش انتخابی‌تری خواهد بود. با توجه به این نتایج، جهت استخراج نمونه‌های مورد آزمون، از روش TCA با بازده استخراج بالاتر با اختلاف معنی‌داری نسبت به روش متانولی، استفاده گردید ($P < 0.05$).

کلروفرم مخلوط و مجدداً سانتریفیوژ گردیدند. در ادامه، پس از مشتق‌سازی توسط ارتوفتالدئید (OPA)، یک میلی‌لیتر از محلول فیلتر شده، جهت آنالیز با HPLC برداشته شد (۱۸).

استخراج به روش متانولی (Met)

۵۰ میلی‌لیتر متانول ۷۵ درصد به ۱۰ گرم از نمونه هموژن اضافه و به مدت ۲ دقیقه با دور بالا مخلوط گردیدند. سپس نمونه هموژن، در یک ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتر به مدت ۱۵ دقیقه، در یک بن ماری 60°C قرار گرفت. پس از سرد شدن و رسیدن به دمای محیط، مجدداً به مدت ۱۵ دقیقه، با ۴۰۰۰ دور در دقیقه، سانتریفیوژ و از محلول سوپرناتانت جهت مراحل بعدی آنالیز استفاده گردید (۲۱).

اندازه‌گیری هیستامین

جهت آنالیز هیستامین، از دستگاه HPLC با دتکتور فلورسانسی، در طول موج‌های تهییج ($\lambda_{\text{ex}}: 320\text{nm}$) و نشر ($\lambda_{\text{e}}: 450\text{nm}$) و فلوی یک میلی‌لیتر در دقیقه و موبایل فاز آب: متانول (۳۵:۶۵) به‌صورت ایزوکراتیک، استفاده گردید. همچنین ستون به کار رفته از نوع C_{18} به طول ۲۵ سانتی‌متر بود. سپس با سرنگ میکرولیتری حداقل میزان ۷۰ میکرولیتر از هر نمونه، همانند استانداردهای تهیه شده به دستگاه تزریق گردیدند. هیستامین موجود در نمونه‌ها بر اساس تطابق زمان ماندگاری (RT) پیک‌های نمونه‌های مجهول با نمونه استاندارد، شناسایی و با توجه به سطح زیر منحنی پیک با استفاده از منحنی استاندارد مربوط، تعیین غلظت و به‌صورت میکروگرم در گرم محاسبه گردیدند (۲۲).

همچنین در مرحله پیش مطالعه، جهت انتخاب دتکتور مناسب‌تر برای ادامه مطالعه، نتایج به‌دست

²⁰ Recovery

مقایسه آشکارسازها (جذبی و فلورسانسی)

به دلیل حساسیت و انتخابی بودن آشکارسازهای فلورسانسی، نسبت به آشکارسازهای جذبی (UV) در برخی از آزمون‌هایی چون تعیین برخی از آمینواسیدها، پپتیدها و ترکیبات بیولوژیکی (۲۳) و همچنین بررسی مقایسه‌ای کروماتوگرام‌های حاصل از هر آشکارساز در آزمایشگاه‌های سم شناسی و آنالیز دستگاهی معاونت غذا و دارو و شاخه زیتون لیان بوشهر در مرحله پیش مطالعه و مناسب‌تر بودن نتایج حاصل از آشکارساز فلورسانسی، از این آشکارساز برای ادامه این مطالعه استفاده گردید.

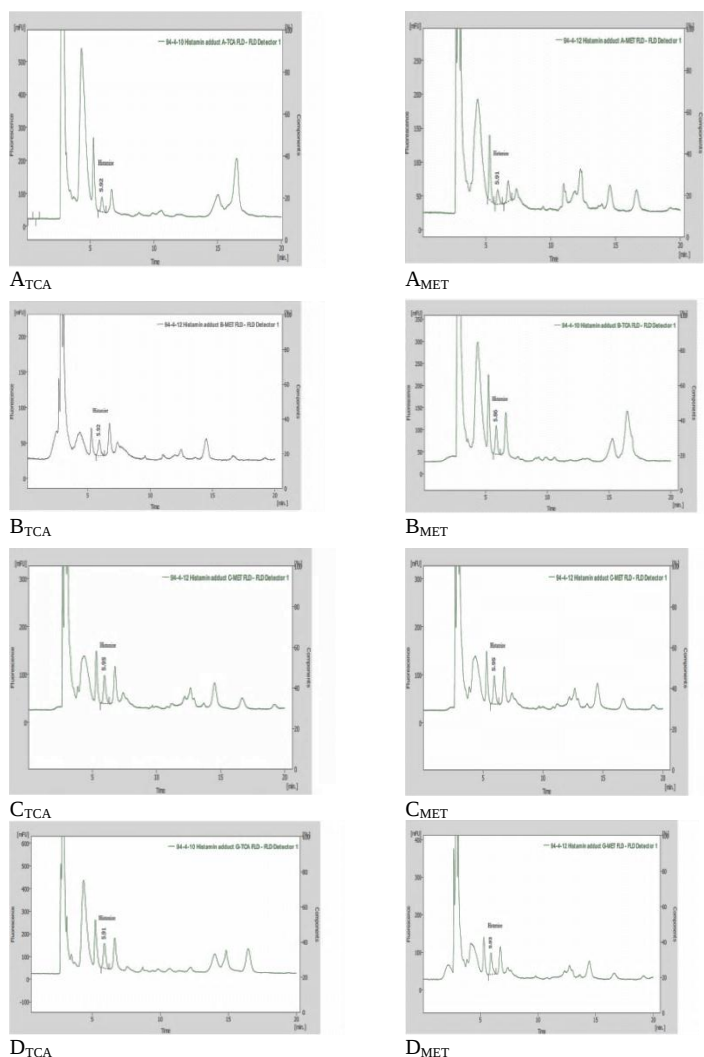
تعیین میزان هیستامین

نتایج مربوط به میانگین $\pm$ انحراف استاندارد (سه بار تکرار) هیستامین تعداد ۲۱ نمونه ماهی شیر در روزهای صفر (تازه صید شده)، ۹-۱۱ (نگهداری شده در شرایط یخچال 4°C) و روز ۳۰م (نگهداری شده در شرایط 20°C) در جدول (۱) آورده شده است. میزان LOD و LOQ به ترتیب 0.12 و 0.23 میکروگرم بر میلی‌لیتر بودند. شکل ۲ چند نمونه از کروماتوگرام مربوط به میزان هیستامین در نمونه‌های ماهی شیر در هر دو روش استخراج متانولی (سمت راست) و تری کلرو استیک اسید (سمت چپ) را نشان می‌دهد.

جدول (۱) میانگین $\pm$ انحراف معیار هیستامین در نمونه‌های مختلف درروزهای صفر، ۹-۱۱ (دمای 4°C) و روز سی ام (دمای 20°C)غلظت هیستامین (میانگین $\pm$ انحراف معیار)

نمونه	روز صفر (تازه صید شده)	روز ۹-۱۱ (4°C)	روز سی ام (20°C)
۱	۰/۱۷	۵/۶	۱۳/۵۸۷
۲	۰/۰۸	۱۲/۳۳	۱۳/۴۴۳
۳	۰/۳	۲/۴۶	۹/۱۳۳
۴	۰	ND	۱۱/۳۳۳
۵	۰/۳۷	۸/۵۴۳	۸/۷۱
۶	۰/۱۲	۵/۷۸۷	۹/۸۳۳
۷	۰/۲۹	۴۰/۸۶۷	۴۰/۰۷۳
۸	۰/۰۶	۷/۱۸	۱۷/۱
۹	۰/۱۶	۶/۶۲۷	۹/۷
۱۰	۰	ND	۷/۰۷
۱۱	۱/۰۳	۲۶/۱۴	۲۵/۰۴
۱۲	۰/۵۷	۱۲/۶۱۳	۲۳/۵۴
۱۳	۰/۰۶	۸/۱۲۷	۱۲/۲۲
۱۴	۰/۹۸	۳۱/۰۹۳	۳۱/۷۳
۱۵	۰/۴۳	۳/۲۵	۹/۲۴۳
۱۶	۰/۳۹	۲۶/۸۷۷	۲۸/۳۱۷
۱۷	۰/۲۲	۶/۳۲۷	۱۱/۴۸۷
۱۸	۰/۱	۱۰/۰۵	۲۰/۵۱۷
۱۹	۰/۰۹	۱۳/۴۷۷	۲۲/۱۱۳
۲۰	۰/۱۸	۲۲/۵۷۳	۲۶/۵۴۳
۲۱	۰/۰۳	۲۲/۲۱۳	۲۲/۳

ND: Not detectable



شکل ۲) برخی کروماتوگرام‌های مربوط به میزان هیستامین در چهار نمونه ماهی شیر در هر دو روش استخراج متانولی (سمت راست (MET)) و تری کلرو استیک اسید (سمت چپ (TCA)) را نشان می‌دهد.

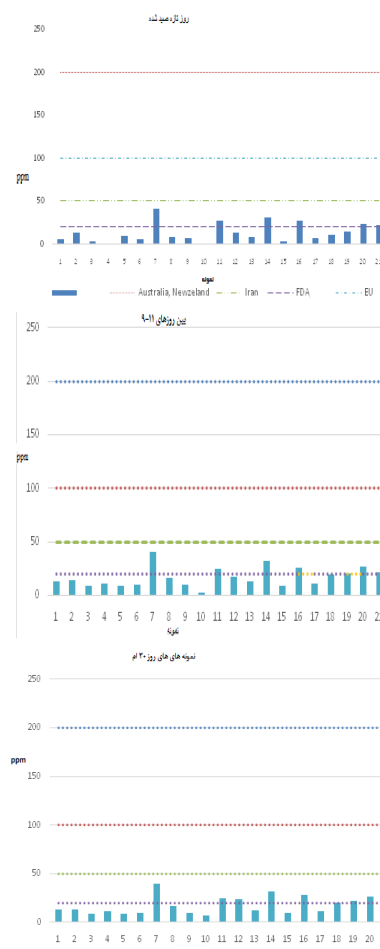
بررسی آماری میانگین محتوای هیستامینی ۲۱ نمونه‌ی ماهی، در روزهای صفر (تازه صید شده) و ۹-۱۱ نشان دادند که این مقادیر، در ۱۵ مورد (۴۲/۷۱ درصد)، دارای اختلاف معنی‌دار بودند ($P < 0.05$) و در سایر نمونه‌ها با وجود تفاوت در محتوای هیستامین، دارای اختلاف معنی‌داری نبودند. میانگین هیستامین در دمای نگهداری یخچال ($4-7^{\circ}\text{C}$) و با میانگین آن‌ها در دمای 20°C تغییرات نسبتاً کمی داشتند.

کمترین (Min) میزان میانگین هیستامین در نمونه‌های ماهی شیر تازه صید شده، نمونه‌های روز دهم (نگهداری در شرایط یخچال $4-7^{\circ}\text{C}$) و نمونه‌های

بررسی آماری میانگین محتوای هیستامینی ۲۱ نمونه‌ی ماهی، در روزهای صفر (تازه صید شده) و ۹-۱۱ نشان دادند که این مقادیر، در ۱۵ مورد (۴۲/۷۱ درصد)، دارای اختلاف معنی‌دار بودند ($P < 0.05$) و در سایر نمونه‌ها با وجود تفاوت در محتوای هیستامین، اختلاف معنی‌داری مشاهده نگردید ($P > 0.05$). میانگین محتوای هیستامینی ۶ مورد (۲۸/۵۷) از نمونه‌ها، بین روزهای ۹-۱۱ و همچنین روز ۳۰ام (نگهداری شده در شرایط 20°C) دارای

روز ۳۰ ام (نگهداری در شرایط 20°C) به ترتیب صفر (کمتر از حد تعیین مقدار)، ۲/۷۷، ۷/۰۷ و بیشترین (Max) میانگین مقدار هیستامین یافت شده به ترتیب، ۴۰/۸۶، ۴۰/۷۵، ۴۰/۰۷ بودند.

برخی کشورها میزان مجاز این ماده در مواد غذایی را تعیین نموده‌اند. (شکل ۳) مقایسه میزان هیستامین موجود در نمونه‌های مورد آزمون با استاندارد ملی ایران (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و برخی استانداردهای جهانی (اتحادیه اروپا (EU): ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، آمریکا (FDA): ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر، استرالیا (Aust) و نیوزلند (NZ): ۲۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر را نشان می‌دهد.



شکل ۳) مقایسه میزان هیستامین موجود در نمونه‌های در روزهای صفر، ۱۱-۹ (دمای 4°C) و روز سی ام (دمای 20°C) با برخی استانداردهای ملی و جهانی

از مقایسه سطوح مختلف هیستامین موجود در نمونه‌های روز صفر و نتیجه مشابه به آن در ۹-۱۱ روز بعد از نمونه‌گیری و روز ۳۰ ام (نگهداری در شرایط 20°C)، با استاندارد ملی و برخی از استانداردهای جهانی مشخص گردید که هیچ‌کدام از نمونه‌ها در این دوره‌های زمانی، دارای هیستامین بالاتر از حد مجاز استاندارد ملی ایران (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) و سایر استانداردهای جهانی ذکر شده، نبودند. اما ۲۸/۵۷ درصد نمونه‌ها در روز ۹-۱۱ و همچنین، ۴۲/۸۵ درصد تعیین شده در روز ۳۰ ام (نگهداری در شرایط 20°C) دارای هیستامین بالاتر از حد مجاز آمریکا (۲۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم) بودند.

بحث

مسمومیت هیستامینی ناشی از ماهی و فرآورده‌های آن، یک مشکل بهداشت عمومی شناخته شده است که علاوه بر مسائل بهداشتی می‌تواند مسئله‌ای مهم و مؤثر در واردات و صادرات آن‌ها نیز تلقی گردد. این مسمومیت، یکی از شایع‌ترین مشکلات ناشی از غذاهای دریایی در سراسر جهان است و موارد متعددی از این بیماری در برخی کشورها گزارش شده است. این مسئله ممکن است به دلیل مصرف زیاد ماهیان خانواده اسکومبروئید و یا سیستم گزارش بهتر موارد بیماری توسط این کشورها باشد (۲۴). با توجه به توصیه‌های فراوان اخیر مبنی بر افزایش مصرف ماهی به دلیل فواید آن بر سلامتی و گسترش شبکه جهانی صید، فرآوری و توزیع ماهی و فرآورده‌های آن، به نظر می‌رسد مدیریت مسمومیت هیستامینی نقش عمده‌تری در سلامت عمومی خواهد داشت.

بنابراین ارائه روشی دقیق و مناسب جهت بررسی میزان هیستامین در ماهی و فرآورده‌های آن و تأیید

سلامت آن‌ها با بر اساس معیارهای ملی و جهانی، ضرورت می‌یابد (۱۸).

در مطالعه اخیر با وجود افزایش هیستامین در نمونه‌ها، در طی یک هفته پس از صید در شرایط نگهداری 4°C ، لکن تولید این آمین از آن پس تا یکماه در شرایط نگهداری 20°C - افزایش قابل ملاحظه‌ای نیافته بود، لذا حفظ شرایط دمایی مناسب برای کنترل تولید هیستامین ضروری است.

در یک مطالعه، افشارمنش و همکاران (۱۳۹۱)، تغییرات برخی از آمین‌های بیوژنیک ماهی گیدر نگهداری شده در یخ و انجماد در شناورهای صیادی چابهار را مورد بررسی قرار دادند و بیان نمودند که جهت کنترل هیستامین و حفظ کیفیت تون ماهیان و جلوگیری از فساد آن‌ها، تمام لنج‌های صیادی باید به سامانه انجماد مجهز گردند (۲۵). مطالعه مشابه دیگری توسط کر (kerr) و همکاران (۲۰۰۲) بر روی تأثیر شرایط ذخیره‌سازی اولیه هنگام صیادی، بر روی شکل‌گیری هیستامین در ماهی تون تازه صید شده و فرآورده‌های آن، نشان داد که میزان هیستامین در تمام نمونه‌های مورد آزمون به طور نسبی از دمای 4°C به صفر درجه کاهش یافت (۲۶). شرایط نگهداری می‌تواند تولید برخی از آمین‌های بیوژنیک و رشد برخی از باکتری‌ها را تحت تأثیر قرار دهد. آنزیم دکربوکسیلاز باکتری‌ها در شرایط انجماد، دچار کاهش کارایی و عملکرد می‌گردد و به دنبال آن میزان آمین‌های تولیدی در حالت انجماد کمتر از شرایط یخچال 4°C خواهد بود. وضعیت هیستامین نیز تابع این شرایط نگهداری است زیرا تشکیل آن وابسته به فعالیت باکتری‌های مزوفیل بوده و نگهداری در شرایط سرد می‌تواند کارایی آنزیم دکربوکسیلاز این باکتری‌ها را محدود یا متوقف نماید یا در صورت تولید مقدار آن ناچیز باشد.

با وجود مزوفیل بودن باکتری‌های تولید کننده هیستامین و اینکه شرایط نگهداری سرد نمی‌تواند ضامن بقای باکتری‌های مزوفیل باشد پس چرا در حالت انجماد (شرایط 20°C -) نیز هیستامین، قابل ملاحظه است و میانگینی حدود مقدار روز هفتم دارد؟ این مورد شاید به این دلیل باشد که برخی از باکتری‌های تولید کننده هیستامین دارای تحمل بالایی از محدوده‌های دمایی بالا و پایین هستند و خواهند توانست حتی در شرایط نگهداری در حالت انجماد سبب تولید هیستامین حتی در مقادیر کم شوند. بعضی از جنس‌های ویبریو که قادر به تولید هیستامین در دمای پایین تر از 10°C هستند (۲۵).

در این مطالعه، میزان هیستامین موجود در نمونه‌های ماهی شیر، در زمان‌های متفاوت وابسته به دما بودند به طوری که میزان هیستامین در دمای نگهداری یخچال (4°C) در ظرف یک هفته پس از صید، نسبت به روز نخست افزایش معنی‌دار ($P < 0.05$) و در دمای 20°C - حتی پس از گذشت یکماه، تغییرات نسبتاً کمی نسبت به نگهداری در دمای 4°C داشتند.

با توجه به اینکه هیستامین، خود ترکیبی پایدار است و دارای تحمل زیادی در محدوده‌های دمایی بالا ($20.9/5^{\circ}\text{C}$) و پایین (زیر صفر درجه سانتی‌گراد) است می‌توان بیان نمود که یکی از قابل ملاحظه‌ترین منابع هیستامین مشاهده شده در نمونه‌های ماهی شیر نگهداری شده در دمای 20°C - پس از یکماه، احتمالاً هیستامینی است که در مراحل قبل از نگهداری در این شرایط تولید گشته‌اند.

مطابق نتایج آماری، میانگین هیچ‌کدام از نمونه‌های ماهی شیر، حاوی هیستامین بالاتر از حد مجاز استاندارد ملی ایران (۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) نبوده و در مقایسه با استاندارد FDA میزان $28/57$ درصد از نمونه‌های ماهی

شیر تازه، میزان ۲۸/۵۷ درصد از نمونه‌های روز دهم (نگهداری در شرایط 4°C) و میزان ۴۲/۸۵ درصد از نمونه‌های مورد آنالیز در روز ۳۰ ام، بالاتر از حد مجاز FDA (۲۰ میلی گرم در ۱۰۰ گرم) بودند. در مطالعه مشاک و همکاران (۱۳۹۱) میزان ۱۲/۵ درصد از نمونه‌های ماهی مورد بررسی، حاوی هیستامین بالاتر از حد مجاز FDA بودند (۲۷). همچنین در مطالعه دون (Donn) و همکاران (۱۹۹۱) حدود ۴/۷ درصد از نمونه‌ها حاوی هیستامین بالاتر از این حد بودند (۲۸). در مطالعه رو هوانگ (Ru – Huang) و همکاران (۲۰۱۰) میزان هیستامین در نمونه‌های ماهی مورد ارزیابی بالاتر از حد مجاز کشور تایوان (۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر (ppm)) بود (۲۹).

در مطالعه حاضر، میانگین کل هیستامین در نمونه‌های ماهی شیر تازه صید شده معادل ۱۲/۹۶ میکروگرم بر میلی لیتر بود و این میانگین کمتر از حد مجاز (FDA) بود. این مقدار در مطالعه حبیب (Habib) و همکاران (۲۰۱۱) بالاتر از ۲۰ میلی گرم در ۱۰۰ گرم بود (۳۰). کمترین میزان غلظت هیستامین با روش HPLC، در مطالعه افشارمنش و همکاران (۲۵) و نیز در مطالعه امل و حامد (Amal & Hamed) (۲۰۱۵) (۳۱) با میزان صفر (کمتر از حد تشخیص) بود. بیشترین میزان هیستامین در مطالعه زارعی و همکاران (۲۰۱۲) در ماهی ۶۴۸/۲ میکروگرم بر میلی لیتر بود (۳۲).

در مطالعه‌ی حاضر، کمترین مقادیر میانگین هیستامین در نمونه‌های ماهی شیر تازه صید شده، نمونه‌های روز دهم (نگهداری در شرایط 4°C) و نمونه‌های روز ۳۰ ام (نگهداری در شرایط 20°C) به ترتیب برابر صفر (کمتر از حد تشخیص)، ۲/۷۷، ۷/۰۷ و بیشترین مقدار هیستامین ردیابی شده به ترتیب معادل ۴۰/۸۶، ۴۰/۷۵ و ۴۰/۰۷ بودند.

استخراج هیستامین در بیشتر مطالعات انجام شده در ماهی و فراآورده‌های آن به روش متانولی صورت گرفته است. بریلانتس (Brillantes) و همکاران (۲۰۰۲) جهت استخراج هیستامین در ماهی از روش متانولی استفاده نمودند. دامنه تغییرات هیستامین در هفته اول در محدوده ۱۵۹-۲۲ و در هفته دوم ۶۸۶-۵۸۹ میلی گرم در کیلوگرم بود (۳۳). امل و حامد (۲۰۱۲) جهت استخراج هیستامین در ماهی فسیخ (Fesekh) و ساردین و برخی از محصولات ماهی در بازار قاهره از روش TCA استفاده نمودند (۳۱). مطالعه حاضر نیز نشان داد که روش TCA نسبت به روش متانولی جهت استخراج هیستامین دارای حساسیت و دقت بیشتری است.

همان‌گونه که قبلاً ذکر گردید روش‌های مختلفی جهت تعیین هیستامین در ماهی و فراآورده‌های آن وجود دارد. روش‌ها شامل روش‌های کمی و کیفی می‌باشند و انتخاب روش مناسب همسو با هدف مشخص شده در مطالعه مورد نظر است.

مسمومیت هیستامینی برای اولین بار در کشور ژاپن در اوایل دهه ۱۹۵۰ شناسایی گردید که بر اساس شواهد اپیدمیولوژیک، بزرگ‌ترین عامل بیماری منتقله از طریق مواد غذایی در آن دوران بوده است. در فاصله سال‌های ۸۰-۱۹۷۰ نیز در حدود ۴/۶۴ مورد مسمومیت هیستامینی توسط وزارت بهداشت ژاپن گزارش گردید. در دسامبر ۱۹۷۷ در سانفرانسیسکو، اپیدمی هیستامینی در اثر مصرف تن ماهیان با میزان هیستامین بالا و یا در کشور بریتانیا بین سال‌های ۸۶-۱۹۷۶ نیز ۲۵۰ مورد مسمومیت هیستامینی گزارش گردیدند. با اینکه مسمومیت هیستامینی به عنوان شایع‌ترین شکل مسمومیت ناشی از مصرف ماهی در سراسر جهان اتفاق می‌افتد ولی آمار قابل ارائه‌ای درباره میزان شیوع آن

میلی لیتر) و احتمال مسمومیت هیستامینی در این مقدار لازم است که در میزان حد مجاز بازنگری گردد.

نتیجه گیری

اگر چه هیستامین در حدود ۹۰ درصد از نمونه های ماهی شیر مورد آزمون، ردیابی گردید ولی هیچ کدام حاوی مقادیر هیستامین بالاتر از حد مجاز استاندارد ملی ایران (۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر) نبودند. همچنین مطالعه حاضر نشان داد که جهت تعیین هیستامین به روش HPLC، استخراج به روش TCA و استفاده از دتکتور فلورسانسی به دلیل حساسیت بالاتر، مناسب تر خواهد بود و این روش حساس، می تواند به عنوان یک استاندارد ملی جایگزین روش های قدیمی با حساسیت کمتر گردد.

موجود نمی باشد. این کاستی شاید به دلیل طبیعت ملایم بیماری، ضعف در گزارش بیماری های منتقله از غذا یا عدم تشخیص، توسط کادر پزشکی که مسمومیت هیستامینی را اشتباهاً عفونت سالمونلایی یا آلرژی اغلب تشخیص داده می شوند باشد (۲۷). در ایران گزارشی از اپیدمی مسمومیت هیستامینی وجود ندارد ولی با توجه به نتایج مطالعاتی چون زارعی (zareei) و همکاران (۲۰۱۲) مبنی بر بالا بودن میزان هیستامین به میزان ۶۴۸/۲ میکروگرم بر میلی لیتر در ماهی (۳۲)، احتمال موارد وقوع این مسمومیت وجود داشته اند ولی به دلیل عدم تشخیص دقیق و ثبت آن گزارشی از اپیدمی های رخ داده وجود ندارد.

با توجه به حدود مجاز پایین هیستامین در استانداردهای جهانی نسبت به استاندارد ملی ایران (۵۰ میکروگرم بر

References:

1. Mark R, Susan C, Hannah P, et al. Nutrient analysis of fish and fish products Analytical reports. (Accessed November 20, 2014, at <http://www.dh.gov.uk/publications>)
2. Ghorbanzadeh Karimi H, Afzali H, Eyni G. The annual yield of the Institute for Trade Studies and Research (2012–2013S). Institute for Trade Studies and Research. (Accessed November 20, 2014, at <http://www.itrsr.ir/Files/b2.pdf>.)
3. Adeli A, Hasangholipour T, Hossaini A, et al. Status of fish Consumption per capita of Tehran citizens. Iran J Fish Sci 2011; 10: 546-56.
4. Iran Statistical Yearbook 2012 [March 2012-March 2013]/ Presidency, Vice-Presidency for Strategic Planning and Supervision. Statistical Centre of Iran. Tehran Statistical Centre of Iran, December 2014 (First impression); 1-48. (Accessed September 7, 2015, at <http://www.amar.org.ir/Portals/1/yearbook/1391/preliminary.pdf>)
5. Prester L. Biogenic amines in fish, fish products and shellfish: a review. Food Addit Contam Part A 2011; 28: 1547-60.
6. Hamada-Sato N, Usui K, Kobayashi T, et al. Quality assurance of raw fish based on HACCP concept. J Food Control 2005; 16: 301-7.
7. Halasz A, Barath A, Simon-sarkadi L, et al. Biogenic amines and their production by microorganisms in food. Trends Food Sci Technol 1994; 5: 42-9.
8. Onal A. A review: Current analytical methods for the determination of biogenic amines in foods. Food Chem 2007; 103: 1475-86.
9. Food and Agriculture Organization (FAO). 2012 WHO Expert Meeting on the Public Health Risks of Histamine and Other Biogenic Amines from Fish and Fishery Products. Rome: Italy, 2012, 112.
10. Mohebbi Gh, Nabipour I, Vazirizad A. Neurotoxic syndromes in marine poisoning: a review. ISMJ 2014; 17: 451-75.
11. Laurence DR, Bennet PN. Clinical pharmacology. 6th ed. ELBS, 1987, 92-98.
12. Kordiovská P, Vorlova L, Borkovcová I, et al. The dynamics of biogenic amine formation in muscle tissue of carp (Cyprinus carpio). Czech J Anim Sci 2006; 51: 262-70.

13. Norian R, Mahmoudi R. Evaluation of histamine content in tuna and sardine fish used in cannery factories from Qazvin province. JFST 2013; 40: 21-6.
14. Svarc-Gajic J, Stojanovic Z. Determination of histamine in cheese by chronopotentiometry on a thin film mercury electrode. Food Chem 2011; 124: 1172-6.
15. Kamkar A, Hosseini H, Abuhossein G. A study of histamine contents of canned tuna and sardine of Iran. Pajouhesh Sazandegi 2003; 60: 44-50.
16. Fathi A, Pooladgar AR, Ghaem-Maghami SH, et al. The changes of evaluation biogenic amines (Histamine) by HPLC, in Shanak Yellow Fin fish (*Acantho pagruslatus*) within 18 days of ice storag. Ind J Sci Res 2013; 1: 29-34.
17. Muscarella M, Magro SL, Campaniello M, et al. Survey of histamine levels in fresh fish and fish product collected in Puglia (Italy) by ELISA and HPLC with fluorimetric detection. J Food Control 2013; 31: 211-7.
18. Hwang BS, Wang JT, Choong YM. A rapid gas chromatographic method for the determination of histamine in fish and fish products. Food Chem 2003; 82: 329-34.
19. Food and Agriculture Organization (FAO). Fisheries and aquaculture Fisheries and Aquaculture Department. Technical Paper. Rome, 2014, 105.
20. ISIRI 2870. Canned tuna in oil - Specification and test methods. Institute of Standards and Industrial Research of Iran (3rd Revision). 2014.
21. ISIRI 9594 (Institute of Standards and Industrial Research of Iran). Tunna fish-determination of Histamin by flourimetric method. 1st ed. 2006.
22. Tahmouzi S, Khaksar R, Ghasemlou M. Development and validation of an HPLC-FLD method for rapid determination of histamine in skipjack tuna fish (*katsuwonus pelamis*). J Food Chem 2011; 126: 756-61.
23. Etienne M. Methodology for histamine and biogenic amines analysis. Sea Food plus-Traceability- Valid- Methods for chemical quality assessment- Methodology for histamine and biogenic amines analysis. (Accessed February 20, 2006, at <http://archimer.ifremer.fr/doc/00000/6484/>)
24. Bulushi IA, Poole S, Deeth HC, et al. Biogenic amines in fish: roles in intoxication, spoilage, and nitrosamine formation-a review. Critical Rev Food Sci Nutrit 2009; 49: 369-77.
25. Afsharmanesh S, Paighambari Y, Shabanpure B, et al. Changes of Some Biogenic Amines in Yellow Fin Tuna (*Thunnus albacares*) During Iced and Frozen Storage in Fishing Vessels of Chabahar. Oceanolog 2012; 3: 59-67. (Persian)
26. Kerr M, Lawicki P, Aguirre S, et al. Effect of storage conditions on histamine formation in fresh and canned tuna. Victoria, Australia: Public Health Divi Victor Gover Depart Human, 2002, 5-20.
27. Mashak Z, Moradi B, Moradi B. Preliminary Study Of Histamine In Rainbow Trout (*Oncorhynchus Mykiss*) Samples From Fish Markets In Tehran. J Food Hyg 2011; 1: 39-47.
28. Ward DR, Hackney CA. Microbiology of marine Food Products. New York: Springer, 1991, 331-350.
29. Huang YR, Liu KJ, Hsieh HS, et al. Histamine level and histamine-forming bacteria in dried fish products sold in Penghu Island of Taiwan. Food Control 2010; 21: 1234-9.
30. Habib R. Bacteriological quality and biogenic amines determination by HPLC in BASSA fish imported to Saudia. Int J Pharm Pharma Sci 2011; 3: 343-7.
31. Amal A, Hamed A. Estimation of biogenic amines in salted-fermented fish and some fish products in Cairo Markets with special references to its storage. Report and Opinion. (Accessed April 6, 2012, at <http://www.sciencepub.net/report.>)
32. Zarei M, Najafzadeh H, Enayati A, et al. Biogenic Amines Content of Canned Tuna Fish Marketed in Iran. Am Eurasian J Tox Sci 2011; 3: 190-3.
33. Brillantes S, Paknoi S, Totalien A. Histamine formation in fish sauce production. J Food Sci Chicago 2002; 67: 2090-4.

Original Article

Histamine, as a biomarker of freshness in Barred mackerel (*Scomberomorus commerson*)

*S. Gudarzi*¹, *A. Maryamabadi*², *I. Nabipour*³, *GH. Mohebbi*^{3*},
*S. Armin*², *A. Vazirizadeh*⁴, *S. Shaghuli*¹

¹ Kherad institute of higher education, Bushehr - Iran

² Research and development Department, Shakheh Zeytoon Lian Inspection Co, Bushehr, Iran

³ The Persian Gulf Marine Biotechnology Research Center, The Persian Gulf Biomedical Research Institute, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran

⁴ Department of Marine Biotechnology, The Persian Gulf Research and Studies Center, The Persian Gulf University

(Received 13 Dec, 2015 Accepted 31 Dec, 2015)

Abstract

Background: Scombroid syndrome is one of the most important food poisoning with symptoms similar to seafood allergy, that caused by biogenic amines. Histamine is produced by decarboxylation of the amino acid histidine in fish, by histidine decarboxylase enzyme. The histamine levels in fish and its products is one of the most important biomarkers to assess the freshness or corruption of the fish. One of objectives of this study was determination of histamine levels in Barred mackerel (*Scomberomorus commerson*), by HPLC method, in different conditions of keeping.

Material and Methods: There were evaluated the histamine contents, in 21 Barred mackerel samples trapped in the Bushehr coasts (Iran), after TCA extraction method, at different periods of the first, tenth (keeping at 4°C) and 30th days (keeping at -20 °C) by HPLC with FLD detector in wavelengths λ : 320 and λ : 450 nm.

Results: The Mean $\pm$ SD of histamine in samples in revealed days were respectively the values of 12.96 $\pm$ 0.29, 17.02 $\pm$ 0.53 and 17.7 $\pm$ 0.56 ppm. The highest levels of histamine in all samples in first, tenth and thirty days were respectively, ND, 2.77 and 7.77 ppm; and maximum levels were respectively 40.86, 40.75 and 40.07 ppm.

Conclusion: Although the detection of histamine in 90% of samples, there was no sample above maximum Tolerable level (MTL) assigned by Institute of Standard and Industrial Research of Iran (50 ppm). However, the histamine levels in 27.87% of samples were exceeded the maximum levels set in the FDA (20ppm).

Key words: Histamine, *Scomberomorus commerson*, HPLC- FLD method, Trichloroacetic acid Extraction

*Address for correspondence: The Persian Gulf Marine Biotechnology Research Center, The Persian Gulf Biomedical Research Institute, Bushehr University of Medical Sciences, Bushehr, Iran. E-mail: mohebbihsn@yahoo.com

Website: <http://bpums.ac.ir>
Journal Address: <http://ismj.bpums.ac.ir>