

استعمال تقنية الفصل الكروماتوغرافي على طبقة رقيقة-تحليل الصورة لمعايرة المونوصوديوم غلوتامات في بعض الأغذية

الدكتور زيد العساف*

الدكتور محمد منير عطائي**

عفرء النقرى***

(تاريخ الإيداع 16 / 5 / 2013. قُبل للنشر في 14 / 8 / 2013)

□ ملخص □

تم تطوير طريقة كروماتوغرافيا على طبقة رقيقة - تحليل الصورة (TLC-image analysis) بسيطة وقليلة الكلفة لتحديد وقياس كمي سريع للمونوصوديوم غلوتامات (MSG) في بعض عينات الغذاء، و تحقق الفصل الكروماتوغرافي على صفائح السيليكاجيل TLC، باستخدام البوتانول: حمض الخل الثلجي: الماء (1:3:5 v/v/v) كطور متحرك، والننهيدين ككاشف للبقع. أنجز تحليل صورة للصفحة المسوحة ضوئياً لتحديد كمية (MSG)، و تم تقويم الطريقة و ضبطها فوجد أنها تتمتع بصحة النتائج و النوعية ومناسبتها لتحليل MSG في بعض عينات الغذاء.

الكلمات المفتاحية: الفصل الكروماتوغرافي على طبقة رقيقة، تحليل الصورة، المونوصوديوم غلوتامات، الغذاء.

*أستاذ - قسم الكيمياء التحليلية والغذائية- كلية الصيدلة- جامعة دمشق- سورية.

**أستاذ - قسم الكيمياء التحليلية والغذائية- كلية الصيدلة- جامعة دمشق- سورية

***طالبة دراسات عليا (دكتوراه)- قسم الكيمياء التحليلية والغذائية- كلية الصيدلة- جامعة دمشق- سورية.

Thin layer chromatography–image analysis method for the determination of monosodium glutamate in food

Dr. Zeed Alassaf^{*}
Dr. Mohammed Manar Ataaey^{**}
Afraa Alnokary^{***}

(Received 16 / 5 / 2013. Accepted 14 / 8 / 2013)

□ ABSTRACT □

A simple and low cost thin layer chromatographic (TLC)-image analysis method was developed for rapid determination and quantification of monosodium glutamate (MSG) in some food samples. Chromatographic separation of MSG was achieved on silica gel TLC plates, using n-butanol:glacial acetic acid:water (5:3:1, v/v/v) as the mobile phase and ninhydrin for spot detection. Image analysis of the scanned TLC plate was performed to quantify the amount of MSG. The method was validated and found to be accurate, specific, reliable and convenient for the analysis of MSG in some food sample.

Key words: Thin layer chromatography- image analysis- monosodium glutamate- food.

^{*}Professor, Department of Analytical Chemistry and Food, Faculty of Pharmacy, University of Damascus, Syria.

^{**}Professor, Department of Analytical Chemistry and Food, Faculty of Pharmacy, University of Damascus, Syria.

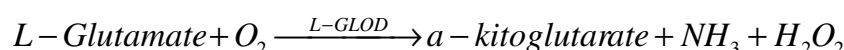
^{***}Postgraduate Student, Department of Analytical Chemistry and Food, Faculty of Pharmacy, University of Damascus, Syria.

مقدمة:

يعد أحادي غلوتامات الصوديوم MSG ملحاً صورياً للحمض الأميني غير الاساسي حمض الغلوتامي، يضاف للطعام كمادة معززة للنكهة، و شاع استعمال هذه المادة في العديد من المنتجات الغذائية، كالمأكولات السريعة ومنتجات اللحوم والحساء وغيرها، ويعرف باسم الملح الصيني^[1]

وفي السنوات الأخيرة عزي لهذا المضاف العديد من الاتهامات، أولها مجموعة من الأعراض عرفت باسم متلازمة المطعم الصيني وهي: صداع في الرأس - آلام في الصدر - مشاكل هضمية - تشنج قضيبي^[2] أشارت العديد من الدراسات العالمية على حيوانات التجربة، إلى أن اتباع حمية مرتفعة المحتوى من MSG (1%) قد أدت إلى تأثيرات في الأنسجة العصبية لهذه الحيوانات ولوحظ حدوث آفات نسيجية في الدماغ الأوسط والمخيخ.^[3] كما بيت دراسات على فئران التجربة أن تطبيق MSG بجرعة 4 ملغ/غ من وزن الجسم وما فوق، يؤدي إلى زيادة الشدة التأكسدية في أنسجة القلب عن طريق تغيير فاعلية بعض الأنزيمات وكبح أخرى^[4].

ومن هنا تبرز أهمية الطرائق التحليلية التي تساعد على التقدير الكمي الدقيق لهذا المركب في الأغذية. تعددت الطرائق المستخدمة لمعايرة حمض الغلوتامي سواء في الأوساط الحيوية أم الغذائية، منها استخدام المجسات الحيوية biosensors كالغلوتامات أكسيداز L-GLOD والغلوتامات ديهيدروجيناز (L-GLDH) والغلوتامات دي كاربوكسيلاز (L-GLDC)^[5] وأكثرها شيوعاً هو التفاعل الأنزيمي التالي:



حيث يتم التحديد الكمي للغلوتامات من خلال تحديد أحد عناصر التفاعل كتحديد كمية الأكسجين المستهلك^[4]، أو تحديد كمية H_2O_2 المتشكلة بالطرائق الكهروكيميائية^[6] أو اللونية باستخدام تقنيات مختلفة Flow injection analysis^[7] و test strip^[8] كما أن هناك طرائق الكروماتوغرافيا السائلة (HPLC) وذلك بعد إجراء الاشتقاق اللازم لكنها معقدة وتحتاج لوقت طويل، كما أن العينات تحتاج لمعالجة قبل مقياستها^[9].

يقدم هذا البحث طريقة جديدة وقليلة التكلفة وسريعة ولا تحتاج إلا إلى معدات بسيطة متوفرة تسمح بقياس عدد كبير نسبياً من العينات في وقت واحد، و تعتمد الطريقة على فصل كروماتوغرافي على الطبقة الرقيقة TLC لا MSG عن غيره من أملاح الحموض الأمينية الموجودة في عينات الغذاء، وإجراء تلوين للبقع المفصولة، ومن ثم قراءة هذه البقع من أجل قياسها كميّاً اعتماداً على التحليل المعلوماتي للصورة الرقمية digital image analysis باستعمال ماسح ضوئي عادي scanner^[10].

هنالك العديد من البحوث التي تم فيها الاعتماد على تحليل الصورة ولكن باستعمال كاميرا ديجيتال أو باستخدام densitometer كجهاز متكامل.

تم إنجاز هذا العمل في كلية الصيدلة، جامعة دمشق عام (2013).

أهمية البحث وأهدافه:

تأتي أهمية البحث من خلال مراقبة الأغذية من حيث احتوائها على غلوتامات الصوديوم لأهمية هذه المادة وخطورتها على الصحة كما أثبتت بعض الدراسات الحديثة.

يهدف البحث إلى إيجاد طريقة تحليلية بسيطة للإجراء قليلة الكلفة و مناسبة لمراقبة محتوى الأغذية من هذه المادة ضمن هدف سلامة الأغذية.

طرائق البحث ومواده:

- المواد والكميائيات
 - صفائح سيلكاجيل Macherey-Nagel pre-coated TLC- Sheets Alugram SIL G
 - الملح الصودي لحمض الغلوتامي MSG من Sigma aldrich
 - ننهيدرين من انتاج شركة Sigma aldrich
 - بوتانول من May&Baker
 - حمض خل ثلجي من شركة Panreac
 - ماء مقطر
- الأجهزة
 - حوض ترحيل
 - ممص معايير دقيق 1 µl micropipette
 - ميزان حساس ماركة Sartorius
 - مثقلة Labofuget
 - محم J.P. Selecta
 - ماسح ضوئي Plug-N-Scan 1248UB Mustek scanner لأخذ الصورة
 - حاسوب مزود بطابعة
- الاعتيان
 - شملت الدراسة عينات حساء مختلفة (فطر - عدس - خضار) إضافة إلى عينات نودلز متوفرة في السوق المحلية في دمشق و بلغ عدد العينات المدروسة الكلي خمس عشرة عينة.
- تحضير الطور المتحرك
 - حيث تم تعديل تركيب الطور المتحرك الوارد بطريقة (Ting Q et al 2010) ^[11] ليصبح كالاتي:
(N-butanol: glacial acetic acid: water) (5 : 3 : 1) بنفس الترتيب ليعطي فصلاً أفضل و تم حل الننهيدرين في الطور المتحرك بنسبة 0.4% (w/v).
- تحضير السلسلة المعيارية
 - حضرت السلسلة المعيارية للـ MSG اعتباراً من محلول 1000مكغ/مل في مجال ما بين 40 و 170 مكغ/مل
- تحضير العينات
 - جرت مجانسة محتوى كل عبوة من المنتجات الجافة في هاون نظيف و أخذ منها وزنة قدرها 25 ملغ نقلت كميّاً إلى وعاء زجاجي نظيف حيث تم الاستخلاص بـ 20 مل من الماء المقطر باستثناء عينات العدس التي احتاجت إلى تكثيف ليكون حجم سائل الاستخلاص 10 مل لضمان وقوع القيم المتوقعة في هذه العينات ضمن السلسلة، وتم

التوصل إلى اعتماد هذا الحجم بعد إجراء دراسة تجريبية، ثم وضعت في المثقلة لمدة 15 دقيقة عند سرعة 2000 دورة/ دقيقة، ثم أخذ السائل الطافي للتحليل.

تم تطبيق 1 ميكرو لتر من كل محلول من محاليل السلسلة و العينات على شكل بقعة على صفيحة TLC، ثم وضعت هذه الصفيحة في حوض الفصل الحاوي الطور المتحرك و كاشف الننهيدرين، وتركت حتى وصول الطور المتحرك إلى مسافة 10 سم من خط البدء. رفعت من الحوض و وضعت في المحم عند درجة حرارة 50° مئوية لمدة 15 دقيقة .

• القياس باستخدام تحليل الصورة الرقمية

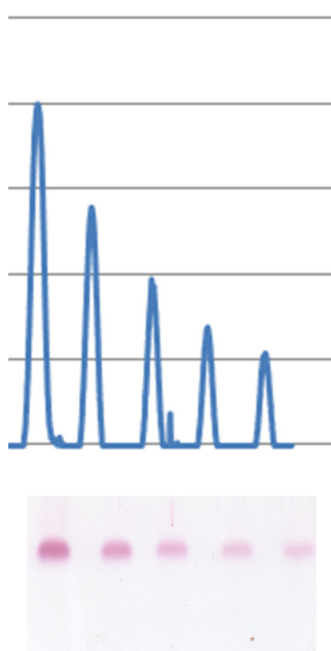
تم أخذ صورة لصفيحة كل من السلسلة المعيارية والعينات المدروسة باستخدام Scanner ضمن الشروط

التالية:

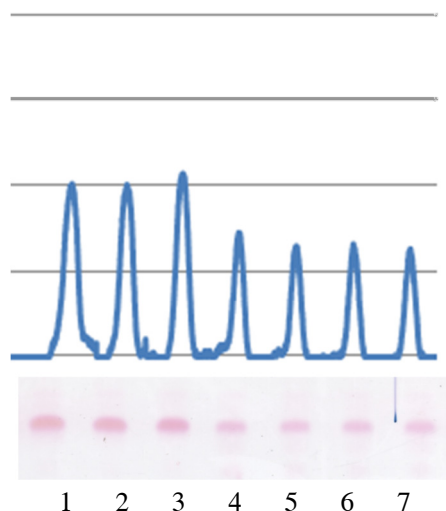
(نوع الصورة: Bitmap image (BMP) و resolution: 600 DPI)

نقلت الصورة الرقمية إلى الحاسوب حيث تمت معالجتها حسب المراحل التالية:

1. إيجاد طول الموجة الواجب تطبيقه (باستعمال البرنامج الخاص) حيث كان 532 نانومتر.
2. أخذ سطح من الصفيحة غير حاوٍ على غلوتامات ملونة (ناصع) وإدخاله في عملية الحساب
3. معالجة البقعة.
4. إجراء الحساب معلوماتياً ورسم المخطط الناتج الشكل (1) و (2)



الشكل (1) صورة لبقع السلسلة المعيارية على صفيحة TLC مع القمم المقابلة لها



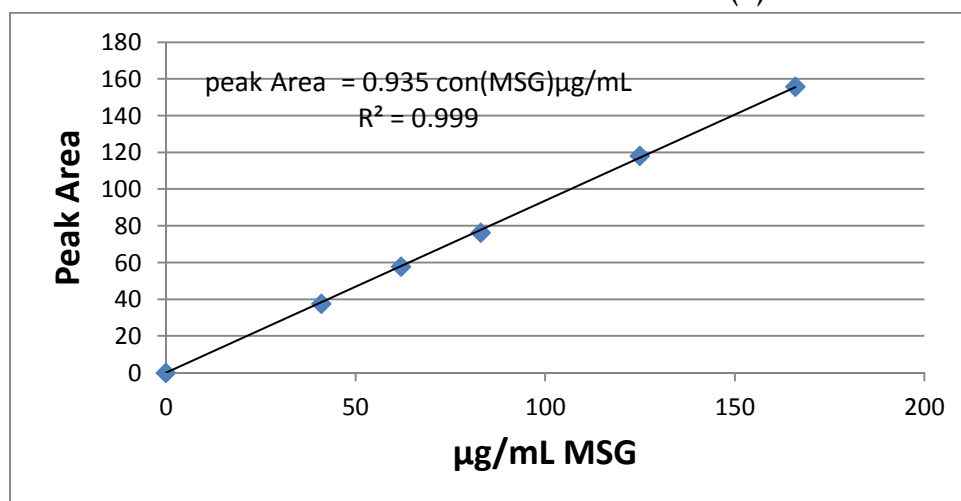
الشكل (2) صورة لبقع بعض العينات على صفيحة TLC مع القمم المقابلة لها
1-3: عينات حساء العدس، 4-7: عينات حساء الخضار

النتائج و المناقشة:

النتائج:

• دراسة الطريقة و مضبوطيتها

تمت قراءة البقع لتراكيز حددت تجريبياً و تراوحت ما بين 23 و 500 مكغ/مل حيث تم تحميل البقعة بحجم 1 ميكرو لتر من المحلول، فنتبين أنها تحقق العلاقة الخطية ما بين التركيزين 40 - 170 مكغ/مل وحسبت قيمة معامل الارتباط $R^2 = 0.999$ الشكل (3).



الشكل (3) منحنى السلسلة المعيارية

ومن أجل دراسة الحساسية مدد المحلول 1 ملغ/مل بنسبة 1/44 وتم قياسه حسب الطريقة المدروسة فبلغت قيمة حد الكشف في البقعة (LOD) Limit of detection 0.0227 مكغ.

و لدراسة الدقة تم تطبيق ست بقع لإحدى العينات على صفيحة TLC و قيس كما سبق فأعطت قيم مساحات القيم التالية: 157.9637, 157.3097, 155.3327, 154.898, 155.1402, 153.2564، حيث يلاحظ تمتع الطريقة بدقة precision جيدة فكانت قيمة الانحراف المعياري النسبي $RSD=1.83$.

تم حساب قيمة الاستعادة (Recovery) ولهذا الغرض جرى استخلاص عينة حساء عدس بالطريقة المذكورة سابقاً، فكانت الكمية المكتشفة فيها 47 مكغ/مل، حضرت محاليل معيارية لل MSG تحوي التراكيز التالية 193 – 113 153 مكغ/مل ومن ثم أخذ من كل منها 1 مل و أضيفت إلى 1 مل من الخلاصة السابقة فتم الحصول على التراكيز الجديدة التالية بعد المزج 80-100-120 مكغ/مل حيث تم قياسها حسب الطريقة المذكورة مع إعادة القياس للبقع الناتجة عن الأمزجة المحضرة ثلاث مرات فكانت النتائج كما في الجدول(1):

الجدول(1) قيم الاستعادة للغلوتامات المعيارية المضافة إلى عينة الحساء

الاستعادة %	وسطى التراكيز العملية مكغ/مل	التراكيز النظرية مكغ/مل
99.3	79	80
101	101	100
99.6	119.5	120

حددت قيمة R_f لل MSG بالمقارنة مع مادة عيارية فكانت 0.77.

• تطبيق الطريقة على عينات الغذاء

تم تحديد تركيز MSG في كل عينة من عينات الحساء والنودلز المدروسة، بعد إجراء ثلاثة قياسات متتالية لكل عينة. حسبت النتائج معبراً عنها بـ غ/كغ من MSG بغض النظر عن وزن العبوة في كامل محتوى العينة (العبوة) وتراوح القيم بين 0.82- 4.84 غ/كغ.

الجدول(2) قيم MSG في عينات الحساء والنودلز المقاسة باستخدام الطريقة المذكورة

متوسط الغلوتامات في كامل العبوة*	نوع العينة
تركيز الغلوتامات $SD \pm g/kg$	
4.58 ± 0.04	حساء الفطر(1)
4.84 ± 0.09	حساء الفطر(2)
4.46 ± 0.04	حساء الفطر(3)
3.51 ± 0.09	حساء الخضار(1)
3.25 ± 0.11	حساء الخضار(2)
3.7 ± 0.09	حساء الخضار(3)
0.90 ± 0.04	حساء العدس(1)
0.97 ± 0.12	حساء العدس(2)
0.82 ± 0.11	حساء العدس(3)

النودلز (1)	2.70 ± 0.09
النودلز (2)	4.61 ± 0.11
النودلز (3)	4.7 ± 0.12
النودلز (4)	4.68 ± 0.05
النودلز (5)	4.71 ± 0.13
النودلز (6)	4.67 ± 0.05

* اعتماداً على الوزن المصرح عنه على غلاف العبوة.

المناقشة:

يقدم هذا البحث طريقة جديدة لفصل ومعايرة MSG، تميزت بالسرعة وسهولة التطبيق وقلة التكلفة، مع إمكانية إجراء فصل وقياس لعدد كبير نسبياً من العينات في وقت واحد، حيث يجري في التحليل الواحد فصل عدد من العينات يصل إلى 12 عينة، وتسمح تقنية تحليل الصورة من تحقيق التحليل الكمي لكل البقع المفصولة في نفس الوقت، إضافة إلى إمكانية تبويب النتائج وأرشفتها وإعادة القياس لبقع أية صفيحة قيست سابقاً نظراً لإمكانية حفظ صور الصفائح على شكل ملفات في ذاكرة الحاسوب والرجوع إليها في أي وقت و قد لا تتوفر هذه الميزة في جميع أجهزة HPLC . تحتاج طريقة HPLC المستعملة إلى عملية اشتقاق للغلوتاميك أسيد ومجموعة من الإجراءات المعقدة التي تحتاج إلى وقت طويل لتحضير و قياس كل عينة ^[12]، إضافة إلى الكلفة العالية العائدة لثمن الجهاز والكواشف والمحاليل المستهلكة في كل تحليل.

كما توفر طريقة تحليل الصورة Image analysis بديلاً لمقياس densitometer المرتفع الثمن مما قلل من شيوع استعماله، إضافة إلى أنه تم في هذا البحث استعمال ماسح ضوئي عادي scanner الأرخص ثمناً والأسهل استخداماً مع توفير إنارة متجانسة عند النقاط الصورة مما يجعل هذا الاستخدام يتفوق على استخدام الكاميرا. كما تم استخدام برنامج معلوماتي يوفر إمكانية تحديد طول موجة القياس و التحديد الكمي للبقع المفصولة وذلك عن طريق حساب مساحات القيم المقابلة للبقع (Peak Area)^[10,13]

هنالك العديد من البحوث التي تم فيها الاعتماد على تحليل الصورة ولكن باستعمال كاميرا ديجيتال لالنقاط الصورة ضمن علبة مظلمة مما يسبب صعوبة في التطبيق و التحكم بزاوية الإنارة عند أخذ الصورة^[14] أو باستخدام densitometer كجهاز متكامل من صنع شركات عالمية كبيرة^[15]

تم تحقيق تجانس توزيع اللون في كامل البقعة، بشكل أفضل من الطريقة المعتمدة على الرذاذ Spray من خلال حل النهدرين في الطور المتحرك،^[16] أعطت الطريقة السابقة خطية ممتازة $R^2 = 0.999$ ، وتمتعت بتكرارية repeatability جيدة $RSD = 1.83$ ، وحساسية ملائمة ($LOD = 0.0227$ مكغ) تجعلها قابلة للتطبيق في مجالات عدة.

الاستنتاجات و التوصيات:

نخلص من هذه الدراسة إلى أن تقانة الكروماتوغرافيا بالطبقة الرقيقة بالمشاركة مع تقانة تحليل الصورة طريقة مناسبة لتحديد تركيز غلوتامات الصوديوم في الأغذية. نوصي باعتماد هذه الطريقة لتحديد محتوى الأغذية من غلوتامات الصوديوم، حيث يمكن اعتمادها من قبل مخابر مراقبة الأغذية والمخابر الاقتصادية. شكر: شكر خاص للدكتور مازن رجب للمساعدة القيمة التي قدمها في إنجاز عمليات القياس باستخدام تقنية تحليل الصورة.

المراجع:

1. Jinap, S; Hajeb, P. Glutamate. Its applications in food and contribution to health. *Appetite* 55, 2010, 1–10.
2. RAITEN, D. J; TALBOT, J. M; FISHER, K. D. Executive Summary from the Report: Analysis of Adverse Reactions to Monosodium Glutamate (MSG). *J. Nutr U.S.A*, 125(1), 1995, 2893-2906.
3. ATI, Kh. A; MOHAMMED, S; SAAD, A. M; AND MOHAMED, H. E. Response of broiler Chicks to dietary Monosodium Glutamate. *Pakistan vet. J*, 29 (4), 2009, 165-168.
4. SINGH, K; PUSHPA, A. Alteration in some antioxidant enzymes in cardiac tissue upon Mono Sodium Glutamate (MSG) administration to adult male, *Indian journal of Clinical bio chemistry*, India, 20(1), 2005, 43-46.
5. BASU, A. K; CHATTOPADHYAY, P; R OYCHUDHURI, U; CHAKRABORTY, R. Development of biosensors based on immobilized L-glutamate oxidase for determination of monosodium glutamate in food, *Indian Journal of Experimental Biology*, India, 44, 2006, 392-398.
6. VILLARTA, R. L; CUNNINGHAM, D. D; GUILBAULT, G. G. Amperometric enzyme electrode for the determination of L-glutamate. *Talanta*, 38, 1991, 49-55.
7. LI, Q; ZHANG, S; and YU, J. Immobilization of L-glutamate oxidase and peroxidase for glutamate determination in flow injection analysis system. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, china, 59, 1996, 53-61.
8. MUSLIM, N. Z. M; AHMAD, M; HENG, L. Y; SAAD, B. Optical biosensor test strip for the screening and direct determination of l-glutamate in food samples. *Sensors and Actuators*, 161, 2012, 493– 497.
9. JAMBOR, A; MOLNAR-PERL, I. Amino acid analysis by high-performance liquid chromatography after derivatization with 9-fluorenylmethyloxycarbonyl chloride. *Journal of Chromatography A*, 1216, 2009, 3064–3077.
10. SAFADI, F; AL ATAIE, M; and RAJAB; M. Un systeme polyvalent pour les mesures photometriques spectrophotometriques par l'analyses d'image. *Bulletin officiel de le propriete industrielle Paris, France*, No 01139, No de publication 2806796, 2001.
11. QIU, T; Li, H; and Cao, Y. Pre-staining thin layer chromatography method for amino acid detection. *African Journal of Biotechnology*, 9 (50), 2010, 8679-8681.

12. POPULIN, T; MORET, S; TRUANT, S; CONTE, L. S. A survey on the presence of free glutamic acid in foodstuffs, with and without added monosodium glutamate. Food Chemistry 104, 2007, 1712–1717.
13. العطائي، محمد منير. التحليل المعلوماتي للصورة الرقمية كطريقة بديلة لإجراء القياسات الضوئية والطيفية الضوئية. المجلة العربية للعلوم الصيدلانية، المجلد الثالث، العدد الأول، 2005، 59 – 67.
14. TIE-XIN, T; HONG, W. An Image Analysis System for Thin-Layer Chromatography Quantification and Its Validation. Journal of Chromatographic Science, 46, 2008, 560-564.
15. PHATTANAWASIN, P; SOTANAPHUN, U; SRIPHONG, L. Validate TLC-Image analysis method for simultaneous quantification of curcuminoids in curcuma longa. Chromatographia, 69, 2009, 397-400.
16. JENTSCH, J. The use of a new silica gel separation system in thin-layer chromatography. Amino Acids, 1, 1991, 279-281.