شناسایی و اندازه‌گیری فیتواسترول‌ها در ماست به‌روش کروماتوگرافی‌گازی

مریم جدی[۱]، جلیل خندقی[۲*]

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، واحد سراب، دانشگاه آزاد اسلامی، سراب، ایران
۲. استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سراب، دانشگاه آزاد اسلامی، سراب، ایران
*نویسنده مسئول مکاتبات: khandaghi@iausa.ac.ir
(دریافت مقاله: ۹۶/۱۱/۲۷ پذیرش نهایی: ۹۷/۳/۲۳)

چکیده

استرول‌ها بیش‌ترین مقدار از بخش غیرصابونی شونده لیپیدها را تشکیل می‌دهند. عمده‌ترین ترکیبات استرولی چربی‌ها و روغن‌های گیاهی، فیتواسترول‌ها هستند که فراوان‌ترین انواع آن‌ها در گیاهان عبارتند از سیتواسترول، کمپسترول و استیگماسترول. انواع ماست به‌خصوص ماست‌های پرچرب یکی از غذاهای مناسب حامل استرول‌های گیاهی می‌باشد. در این مطالعه، وجود کلسترول و چهار ترکیب فیتواسترولی در ٦٢ نمونه ماست مختلف در شهر تبریز به‌منظور پی‌بردن به افزودن تقلبی روغن‌های گیاهی مورد ارزیابی قرار گرفت. برای این‌منظور پس از صابونی کردن و استخراج مایع – مایع نمونه‌ها، مواد غیرصابونی‌شونده با روش کروماتوگرافی لایه نازک خالص‌سازی شدند. سپس بدون مرحله مشتق‌سازی، با روش کروماتوگرافی‌گازی با آشکارساز یونیزاسیون شعله‌ای شناسایی شدند. در مطالعه اخیر، مراحل صابونی کردن بهینه‌سازی و اعتبارسنجی گردید. نتایج نشان داد روش مذکور آسان، سریع و تکرارپذیر می‌باشد و از کارایی بالایی در تشخیص استرول‌ها در نمونه‌های ماست برخوردار است. بیش‌ترین ترکیب استرولی در نمونه‌های ماست کلسترول (٦٥ تا ٩٩ درصد) بود و از بین استرول‌های گیاهی، کمپسترول (٤/٧ درصد) و پس از آن، براسیکاسترول (٢/٠٨ درصد) غالب بودند. بر اساس استانداردهای ملی ایران، در مجموع ٤٦ نمونه ماست (٧٤/٢ درصد) غیرقابل مصرف تشخیص داده شد.

واژه‌های کلیدی: فیتواسترول، ماست، کروماتوگرافی‌گازی، کروماتوگرافی لایه نازک

مقدمه

ماست یکی از فرآورده‌های تخمیری است که از تخمیر شیر توسط میکروارگانیسم به‌دست می‌آید. از نظر غذایی، ماست یکی از بهترین فرآورده‌های شیر است. مواد پروتئینی آن به‌صورت قابل هضم‌تری در آمده و مصرف آن باعث سهولت و تسریع هضم غذا می‌شود و به‌علت وجود اسید لاکتیک، باعث عدم رشد باکتری‌های مضر در روده می‌گردد (Tamime and Deeth, 1980).

تقلبات در مواد خوراکی به اشکال مختلفی صورت می‌پذیرد؛ مانند مخلوط کردن مواد غذایی با مواد ارزان‌تر، پنهان کردن کیفیت نامناسب، جایگزین کردن و تغییر مواد اصلی با مواد دیگر (Georgios *et al*., 2016). از آن‌جایی که افزایش چربی سبب استحکام بافت ماست می‌شود و از طرفی، یکی از مشکلات تکنولوژیکی رایج در تولید این فرآورده بافت شل و نامناسب آن است (Tamime and Deeth, 1980)، تمایل به استفاده از جایگزین‌های چربی در این فرآورده غذایی پرمصرف وجود دارد. با توجه به قیمت پایین روغن‌های گیاهی مختلف نسبت به چربی شیر، یکی از تقلبات رایج در این زمینه، استفاده از روغن‌های گیاهی به‌خصوص در تولید ماست‌های با درصد بالای چربی است.

روغن‌ها دارای دو بخش ترکیبات عمده شامل تری‌آسیل‌گلیسرول‌ها و ترکیبات جزئی از جمله استرول‌ها، توکوفرول‌ها، هیدروکربن‌ها و مقادیری از ترکیبات فرار می‌باشند (Azadmard-Damirchi, 2010). فیتواسترول‌ها (Phytosterols) عمده مواد غیرصابونی روغن‌های گیاهی را تشکیل می‌دهند و در اکثر روغن‌ها تا ۱٪ آن را شامل می‌شوند. استرول‌ها عمدتاً مخلوطی از استرول‌های آزاد و استراسترول‌ها می‌باشد. روغن‌های گیاهی حاوی مخلوطی از فیتواسترول‌ها هستند که عمدتاً شامل کمپسترول (Campesterol)، استیگمااسترول (Stigmasterol)، بتاسیتواسترول (β-Sitosterol)، ارگواسترول (Ergosterol) و براسیکااسترول (Brassicasterol) می‌باشند (Piironen *et al*., 2000; Kamal-Eldin and Appelqvist, 1994).

تاکنون مطالعات مختلفی برای اندازه‌گیری استرول‌های گیاهی در مواد غذایی انجام گرفته است (Duong *et al*., 2016; Fathi-Achachlouei *et al*. 2016; Cynthia and Ermias, 2015; Tsape *et al*. 2010; Derakhshan-Honarparvar *et al*. 2010; Santos *et al*. 2007). روش استاندارد برای آنالیز فیتواسترول‌ها شامل صابونی کردن نمونه روغن، استخراج مواد غیرصابونی و خالص‌سازی آن‌ها به‌روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)، مشتق‌سازی به‌روش سیلانیزه کردن (Silylation) و آنالیز با استفاده از سیستم کروماتوگرافی گازی می‌باشد (ISIRI, 11880/2009; Lagarda *et al*. 2006). با توجه به طولانی شدن مدت زمان آنالیز و نیز مشکلاتی که ترکیبات سیلانیزه کننده در آلودگی شناساگرها در روش‌های کروماتوگرافی به‌وجود می‌آورند (Farajzadeh *et al*., 2014)، حذف این مرحله به‌شرط عدم کاهش کارایی روش‌های استخراج، حائز اهمیت است. متداول‌ترین استرول‌های گیاهی شامل براسیکااسترول، کمپسترول، استیگمااسترول و بتاسیتواسترول هستند (Moreau *et al*., 2002). هدف این مطالعه، بهینه‌سازی و اعتبارسنجی استخراج فیتواسترول‌ها و استرول حیوانی کلسترول (Cholesterol) از نمونه ماست بدون مرحله مشتق‌سازی و در عین‌حال با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک (به‌منظور خالص‌سازی نمونه‌ها) بود که در مرحله بعد

پروفایل استرول های موجود در نمونه ها و احتمال افزودن چربی های گیاهی به‌روش کروماتوگرافی گازی مجهز به دتکتور یونیزاسیون شعله‌ای (Flame Ionization Detector) بررسی شد.

مواد و روش‌ها

- نمونه‌برداری

در این مطالعه ٦٢ نمونه از انواع ماست شامل ۲۱ نمونه ماست پرچرب، ۱۹ نمونه ماست خامه‌ای و ۱۷ نمونه ماست کم‌چرب تولید شده توسط کارخانجات مختلف و ۵ نمونه ماست سنتی، از محل‌های توزیع در سطح شهر تبریز در بهار و تابستان سال ۱۳۹۵ جمع‌آوری و در یخچال به آزمایشگاه شیمی تجزیه دانشکده شیمی دانشگاه تبریز منتقل شدند و مورد آزمایش قرار گرفتند.

- تهیه محلول استاندارد از مخلوط فیتواسترول‌ها

به‌منظور تهیه محلول استاندارد ۱۰۰۰ میلی‌گرم در لیتر از استرول‌های براسیکااسترول، کمپسترول، استیگمااسترول، بتاسیتواسترول و کلسترول (Sigma, England)، ۱۰ میلی‌گرم از هر استرول در ۱۰ میلی‌لیتر تتراهیدروفوران (Merck, Germany) حل گردید. این محلول به‌منظور کنترل کیفی سیستم کروماتوگرافی و تکرارپذیری، هر روز سه بار به دستگاه (Dani 1000, Italy) GC تزریق شد و مساحت زیر پیک هریک از آنالیت‌ها برای محاسبه راندمان استخراج مورد استفاده قرار گرفت (ISIRI, 11880/2009). محلول های کار مورد نیاز هر روز با رقیق‌سازی مناسب محلول استاندارد به‌دست آمدند که در اجرای مراحل بهینه سازی شرایط استخراج آنالیت‌های مورد نظر با روش‌های پیشنهادی مورد استفاده قرار گرفتند.

- استخراج و صابونی کردن استرول‌های ماست

در این کار پژوهشی از روش استخراج مایع- مایع (Liquid-Liquid extraction) به منظور استخراج استرول‌های مورد مطالعه از نمونه‌های ماست استفاده شده است. برای این منظور ابتدا باید عمل صابونی کردن ترکیبات چربی ماست انجام بگیرد تا استرول‌ها (که ترکیبات غیرصابونی شونده هستند) از دیگر اجزای چربی جدا شوند، که این‌کار با استفاده از محلول پتاس (Merck, Germany) در متانول (Merck, Germany) انجام شد. یعنی روی ۱۰۰ گرم نمونه ماست ۱۰۰ میلی‌لیتر محلول پتاس متانولی اضافه شد و مخلوط حاصله به‌مدت ۵۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سلسیوس رفلاکس گردید. پس از سرد شدن، مخلوط حاصله صاف شده و فاز آبی باقی‌مانده به داخل یک قیف دکانتاسیون انتقال داده شد. پس از آن مخلوط حاصله با ۵۰ میلی‌لیتر حلال استخراج گردید (Lagarda *et al.* 2006).

- بهینه‌سازی شرایط استخراج و صابونی کردن استرول‌ها

عوامل تأثیرگذار در کارایی روش انتخاب شده شامل نوع حلال استخراج کننده (از بین حلال‌های اکتان، هپتان و هگزان)، حجم حلال استخراج کننده (از بین حجم‌های ۲۵، ۵۰، ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌لیتر)، غلظت عامل هیدرولیز کننده (از بین غلظت‌های ۲، ٤، ٦، ۸ و ۱۰ درصد w/v)، دمای واکنش مشتق سازی (از بین دماهای ۵۰، ٦۰، ۷۰، ۸۰ و ۹۰ درجه سلسیوس) و مدت زمان عمل مشتق سازی (از بین زمان‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ٤۰، ۵۰، ٦۰ و ۷۰ دقیقه) مورد بررسی و شرایط بهینه انتخاب شد.

- جداسازی با کروماتوگرافی لایه نازک

به‌منظور پاک‌سازی بیش‌تر، حلال استخراج شده (حاوی استرول‌ها و دیگر ترکیبات) به‌وسیله کرو ماتوگرافی لا یه نازک (TLC) تخلیص شد؛ به طوری‌که فاز استخراج شده در داخل روتاری تبخیر شده و روغن باقی‌مانده به‌صورت یک لکه بر روی پلیت TLC از جنس سیلیکاژل (Merck, Germany) قرار داده شد. پلیت حاصله با فاز متحرک هگزان-دی اتیل اتر (٦٥ :٣٥) جداسازی اولیه شده و پس از آن معرف رودآمین (Merck, Germany) ۲ درصد الکلی بر روی پلیت اسپری شد و در زیر لامپ UV محل لکه‌های مربوط به آنالیت‌ها نشانه‌گذاری گردید (محل لکه‌های مربوط به آنالیت‌ها در طول موج‌های ٣٣٦ و٢٥٤ نانومتر به‌صورت رنگ قهوه‌ای در ابتدای TLC مشخص شد که به‌علت قطبی بودن کم‌تر به فاز متحرک تمایل داشته و در نتیجه در قسمت پائین TLC باقی می‌ماند). سپس لکه مربوط به آنالیت‌ها تراشیده شده و در داخل ۲ میلی‌لیتر هگزان حل شد (ISIRI, 11880/2009).

- شرایط آنالیز با دستگاه کروماتوگرافی

برای دستیابی به حداکثر تفکیک در سیستم کروماتوگرافی، جدا سازی آنالیت‌ها باید در شرایط بهینه صورت گیرد. شرایط کاری بهینه شده GC-FID برای جداسازی آنالیت‌ها از نمونه‌های ماست انتخاب و در جدول (۱) ارائه شده‌اند.

جدول (۱)- شرایط بهینه شده GC-FID برای جداسازی فیتوسترول‌ها از ماست

برنامه دمایی ستون	۲۰۰ درجه سلسیوس به‌مدت ۱ دقیقه، ۲۰ درجه افزایش دما در دقیقه تا ۳۰۰ درجه و تثبیت دما به‌مدت ۱۵ دقیقه
نوع ستون	DB-5: ۳۰ متر، ID: ۰/۲۵ میکرومتر، ضخامت فاز ساکن: ۰/۲۵ میکرومتر
تزریق کننده	Split/Splitless، دما:۲۷۰ ، نوع کنترل جریان: سرعت خطی، نسبت اسپلیت: ۱:۱۰
آشکارساز	FID ، دما: ٢٦٠ درجه سلسیوس
گاز حامل	هلیوم با جریان خطی ۳۰ سانتی‌متر در ثانیه
گاز میک آپ	هلیوم با جریان ۳۰ میلی‌لیتر در دقیقه
سوخت	هیدروژن با جریان ٤٠ میلی‌لیتر در دقیقه
اکسیدان	هوا با جریان ۳۰۰ میلی‌لیتر در دقیقه

آنالیت های استخراج شده در هگزان (Merck, Germany) به دستگاه کرو ماتوگرافی گازی تزریق گردید. همه نتایج نسبت به پیک استاندارد داخلی سنجیده شدند، به طوری‌که سطح زیر منحنی هر پیک به سطح زیر منحنی استاندارد داخلی تقسیم شده و نسبت آن‌ها گزارش شد. در این روش از محلول ۱۰۰۰ میلی‌گرم بر لیتر ۵-آل فا کلستان در نر مال- هپ تان (Sigma, England) به‌عنوان استاندارد داخلی استفاده شد.

- مشخصات تجزیه‌ای

به‌منظور اعتبارسنجی روش به‌کار رفته برای آنالیز اسیدهای چرب در این تحقیق، پس از ترسیم نمودار معیارگیری یا منحنی کالیبراسیون، حد تشخیص (LOD)، حد ا ندازه‌گیری (LOQ) و تکرار پذیری بررسی و محاسبه شدند.

- تجزیه و تحلیل آماری

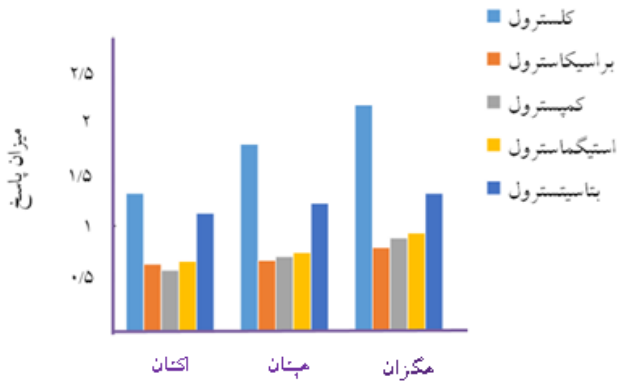
تجزیه و تحلیل آماری با روش آنالیز واریانس یک‌طرفه با استفاده از نرم‌افزار SPSS, 10 انجام گرفت. برای بررسی معنی‌دار بودن اثر نوع ماست بر مقدار استرول‌ها از تجزیه واریانس یک طرفه (ANOVA) استفاده شد و به‌منظور بررسی برابری واریانس‌ها از آزمون لون (Levene) استفاده شد، که نتیجه آن نشان داد این شرط تقریباً برای هیچ‌کدام از استرول‌ها برقرار نیست. از این‌رو به‌جای آزمون معمولی فیشر از آزمون ولچ (Welch) استفاده شد. با توجه به عدم برقراری شرط برابری واریانس‌ها برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون گیمز- هول (Games-Howell) استفاده شد. مقادیر $p< ۰/۰۵$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. برای رسم نمودارها نیز از نرم‌افزار Excel, 2007 استفاده شد.

یافته‌ها

- نتایج بهینه‌سازی عوامل مؤثر در استخراج استرول‌ها

- نوع حلال

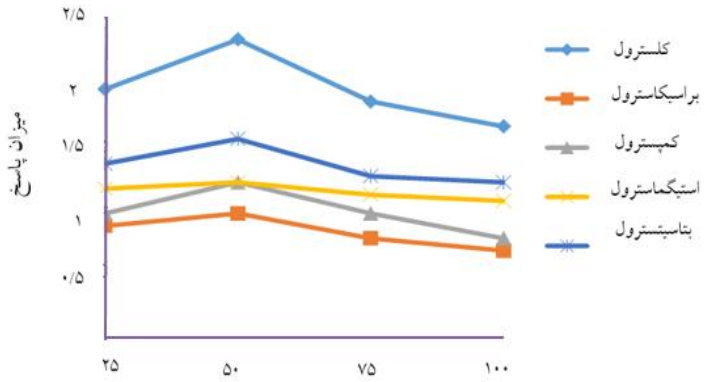
طبق نتایج حاصله، برای همه استرول‌های مورد مطالعه هگزان دارای بیش‌ترین راندمان استخراج می‌باشد. از این رو هگزان به‌عنوان مناسب ترین حلال برای استخراج انتخاب شد (نمودار ۱).



نمودار (۱)- بررسی نوع حلال در استخراج استرول‌ها از ماست

- حجم حلال

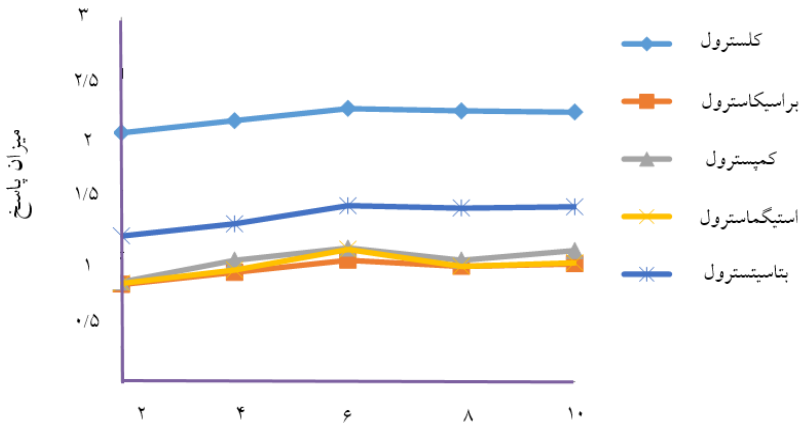
نتایج به‌دست آمده طبق نمودار (۲) نشان داد که با افزایش حجم هگزان تا ۵۰ میلی‌لیتر سیگنال‌های تجزیه‌ای افزایش یافته و پس از آن کاهش می یابند. افزایش سیگنال‌های تجزیه‌ای تا ۵۰ میلی‌لیتر مربوط به استخراج بیشتر آنالیت‌ها و کاهش آن پس از ۵۰ میلی‌لیتر مربوط به رقیق شدن آنالیت‌ها می‌باشد. از این‌رو ۵۰ میلی‌لیتر به‌عنوان حجم بهینه برای حلال استخراج کننده انتخاب شد.



نمودار (۲)- انتخاب حجم حلال (میلی‌لیتر) در استخراج استرول‌ها از ماست

- غلظت عامل هیدرولیز کننده

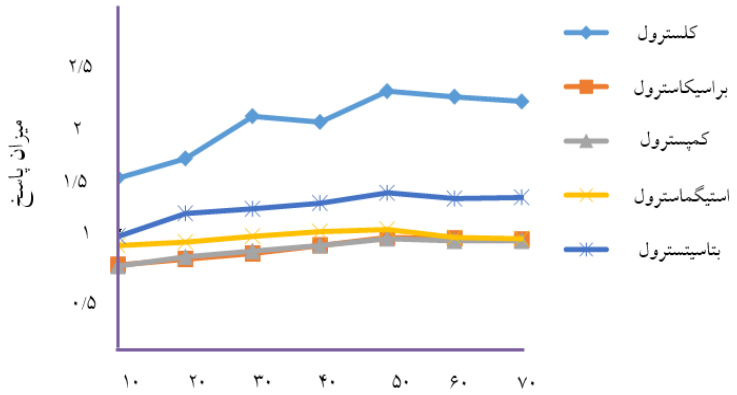
مطابق نمودار (۳)، نسبت پیک آنالیت ها به پیک استاندارد داخلی با افزایش غلظت پتاس متانولی تا ٦ درصد (w/v) افزایش یافته و پس از آن ثابت باقی می‌ماند از این رو غلظت ٦ درصد به‌عنوان بهینه برای معرف هیدرولیز کننده انتخاب شد.



نمودار (۳)- بهینه‌سازی درصد پتاس در استخراج استرول‌ها از ماست

- مدت زمان واکنش هیدرولیز

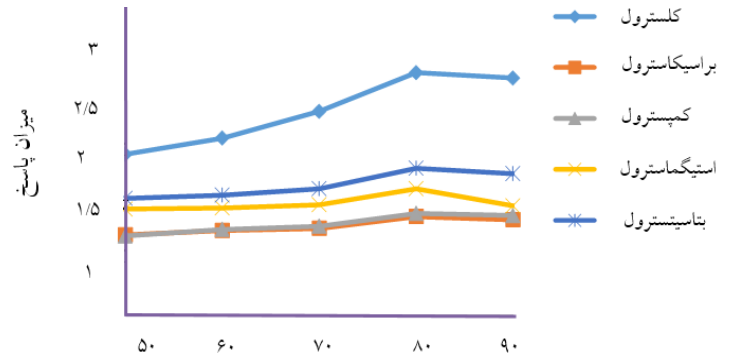
با افزایش زمان هیدرولیز تا ۵۰ دقیقه راندمان استخراج آنالیت‌ها و کارایی فرآیند هیدرولیز افزایش یافته و پس از آن ثابت باقی می‌ماند؛ از این رو ۵۰ دقیقه به‌عنوان مدت زمان لازم برای فرآیند هیدرولیز انتخاب شد. نتایج در نمودار (٤) نشان داده شده است.



نمودار (٤)- بهینه‌سازی مدت زمان (دقیقه) هیدرولیز در استخراج استرول‌ها از ماست

- دمای واکنش هیدرولیز

با افزایش دمای واکنش هیدرولیز تا ۸۰ درجه سلسیوس راندمان استخراج آنالیت‌ها افزایش یافته و پس از آن ثابت باقی می‌ماند؛ از این رو ۸۰ درجه سلسیوس به‌عنوان دمای بهینه برای واکنش هیدرولیز انتخاب شد. نتایج به‌دست آمده در نمودار (۵) نشان داده شده است.



نمودار (۵)- بررسی دمای واکنش (سلسیوس) هیدرولیز در استخراج استرول‌ها از ماست

- محاسبه مشخصات تجزیه‌ای

نمودار معیارگیری از رسم نسبت سیگنال تجزیه‌ای آنالیت‌های استخراج شده در غلظت‌های ۰/۵، ۱/۰، ۱/۵، ۳/۰، ٦/۰، ۱۰/۰، ۲۵/۰، ۵۰/۰، ۲۵۰/۰، ۵۰۰/۰ میکروگرم بر لیتر از آنالیت‌ها به‌دست آمد. معادله رگرسیون برای داده‌های حاصله در محدوده مورد بررسی، خطی بوده و در جدول (۲) بیان شده‌اند. از منحنی کالیبراسیون مقدار مجذور ضریب همبستگی r^2 و محدوده خطی روش برای هر یک از آنالیت‌ها به‌دست آمد. حد تشخیص و حد اندازه‌گیری روش به‌ترتیب برابر غلظت‌هایی در نظر گرفته شدند که در آن‌ها نسبت S/N = ۳ و S/N =۱۰ می‌باشند. به‌منظور بررسی تکرارپذیری و دقت روش از انحراف استاندارد نسبی (RSD%) استفاده گردید. برای این منظور ٦ محلول حاوی ۲۵ نانوگرم بر میلی‌لیتر از

آنالیت‌ها با شرایط یکسان و در حالت بهینه استخراج شدند. انحراف استاندارد نسبی بر اساس مساحت پیک در محدوده ۳/۵ تا ۷/٤ به‌دست آمد که نشان از تکرارپذیری بالای روش ارائه شده دارد. نتایج حاصل از مشخصات تجزیه‌ای روش در جدول (۲) ارائه شده است.

جدول (۲)- مشخصات تجزیه‌ای روش استخراج فیتوستروال‌ها از ماست

نام استرول	حد تشخیص (µg/l)	حد اندازه‌گیری (µg/l)	مجذور ضریب همبستگی	انحراف استاندارد نسبی (٪) n=٦	راندمان استخراج ± انحراف استاندارد n=۳
کلسترول	۲/۳	۷/۲	۰/۹۹۸	۳/۵	۹٤±۳
براسیکااسترول	۵/۹	۱۸/٤	۰/۹۹۷	٤/۸	٦۷±۳
کمپسترول	۷/۸	۲/۲۳	۰/۹۹۷	۵/۲	۹۲±٤
استیگمااسترول	۷/۲	۲۲/۱	۰/۹۹٦	٦/۲	۹۳±٤
بتاسیتسترول	٤/۹	۱/۱٦	۰/۹۹۹	۷/٤	۸٤±۳

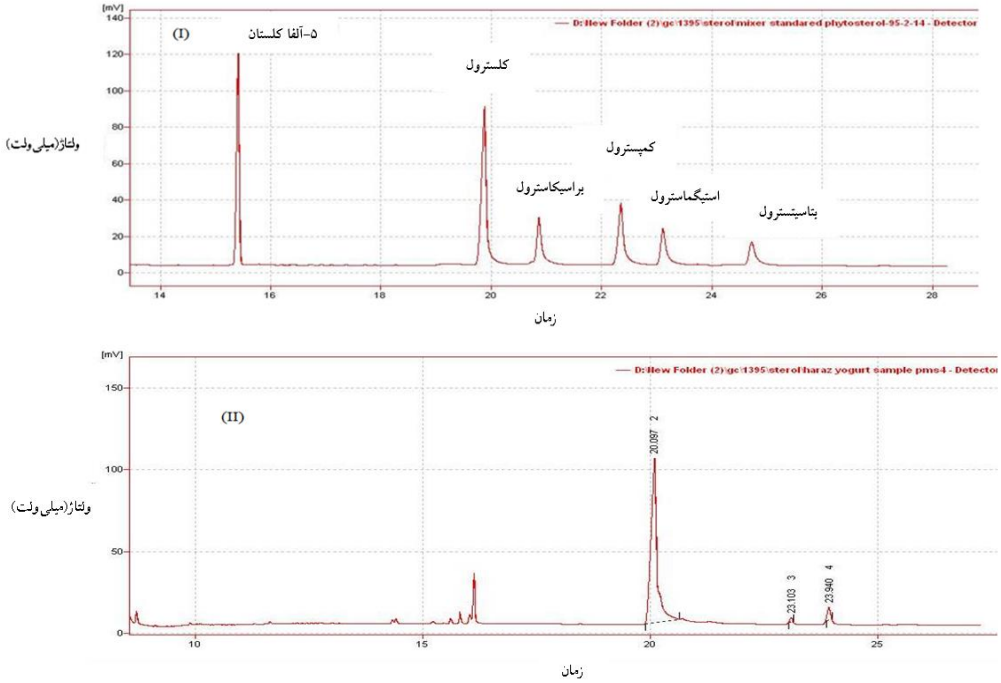
با توجه به این‌که ماست حاوی لاکتوز، پروتئین و چربی می‌باشد و ممکن است ماتریکس نمونه در اندازه‌گیری استرول‌ها تداخل ایجاد کند، از این‌رو تأثیر ماتریکس نمونه در میزان استخراج هر یک از استرول‌ها با روش افزایش استاندارد مطالعه شد. برای این منظور ۱۰۰ گرم از یک نمونه ماست با مقادیر مختلفی از استرول‌های مورد مطالعه اسپایک شد و با روش پیشنهادی استخراج و مقادیر آنالیت‌های به‌دست آمده با مقادیر اولیه مقایسه گردید (جدول ۳). بر اساس این نتایج، ماتریکس ماست در کارایی روش پیشنهادی مؤثر بوده و از فاکتور تصحیح برای محاسبه مقادیر آنالیت‌ها استفاده شد.

جدول (۳)- بررسی اثر ماتریکس در استخراج فیتوستروال‌ها از ماست

نام استرول	درصد اسپایک شده	درصد به‌دست آمده	فاکتور تصحیح
کلسترول	۵۵	۵۳/۵	۲/۷
براسیکااسترول	۱۵	۱۲/۸	۱٤/٦
کمپسترول	۱۰	۸/٦	۱٤
استیگمااسترول	۱۰	۹/۱	۹
بتا سیتسترول	۱۰	۸/۹	۱۱

- استرول‌های موجود در نمونه‌های ماست

کروماتوگرام استرول‌های موجود در یک نمونه است در نمودار (٦) و میانگین درصد وزنی استرول‌های مورد مطالعه در انواع ماست در جدول (٤) ارائه شده است.



نمودار (٦)- کروماتوگرام GC-FID, (I) حاصل از تزریق مستقیم نمونه استاندارد و (II) یک نمونه ماست

جدول (٤)- درصد وزنی (میانگین ± انحراف معیار) استرول‌های مورد مطالعه در انواع ماست

نوع استرول	انواع ماست			
	کم‌چرب	پرچرب	خامه‌ای	سنتی
کلسترول	۸۹/۳۱±۱۰/۷۳	۸۸/۱۰±۸/۵۷	۸۹/۸۰±۱۰/٤۷	۹۹±۰
براسیکااسترول*	۲/۲۹ ±۲/۷۹ b	۲/۲۷±۱/٦۰ b	۱/٦۳±۱/۰۹ b	۰ ± ۰ a
کمپسترول	٤/۵۵±۵/۲۲	٦/۲٦±۵/۰۳	٤/۳٤±٤٦/٤	۰ ± ۰
استیگمااسترول	۲/۲۰±۲/۸۹	۱/۹٤±۲/۳۰	۲/۲۲±۳/٤۷	۰ ± ۰
بتا سیتسترول	۱/۵۱±۲/۷۵	۱/۳۳±۲/۳۲	۱/۲۸±۳/۲۳	۰ ± ۰

* فقط میانگین مقادیر برا سیکاا سترول در انواع ما ست دارای اختلاف معنی‌دار (P<۰/۰۵) بود که با حروف غیرمشابه نشان داده شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حا ضر از روش ا ستخراج مایع- مایع برای استخراج، اندازه‌گیری و شناسائی استرول‌ها از نمونه‌های مختلف ماست استفاده گردید. روش پیشنهاد شده به‌دلیل حذف مرحله مشتق‌سازی سریع بوده و طبق نتایج جدول (۲)، جزو روش‌های تکرارپذیر (۷/٤-۳/٥) می باشد. این پارامتر تجز یه‌ای در روش های دیگر اندازه‌گیری استرول‌ها در ماست ٤/٤ تا ٤/٩ گزارش شده است (Santos *et al*. 2007; Saraiva *et al*. 2011). هم‌چنین روش مورد استفاده دارای د قت بالایی در ا ستخراج ا سترول‌ها از نمونه ما ست ا ست (٨٦ در صد) که نزدیک به نتایج مطالعات مشابه انجام گرفته با ۹۱/۵ درصد راندمان استخراج می‌باشد (Santos *et al*. 2007; Saraiva *et al*. 2011).

همان‌طور که در جدول (٤) نشان داده شده است، کلسترول عمده‌ترین ۸۹/۸۳ درصد) ترکیب ا سترولی در همه نمونه‌های ماست بود که به‌طور طبیعی از شیر تولید می‌شود. اختلاف بین مقادیر کلسترول در نمونه‌های ماست سنتی و دیگر انواع ماست (صنعتی) در این مطالعه معنی‌دار است ($P<۰/۰۵$). هیچ‌یک از ترکیبات فیتواسترول مورد مطالعه در ماست‌های سنتی یافت نشد. جایگزین شدن کلسترول با دیگر ترکیبات استرولی (نظیر فیتواسترول‌ها) در ماست‌های صنعتی سبب کاهش مقدار کلسترول در این جزء از ترکیبات غیرصابونی شونده از ترکیبات لیپیدی ماست‌ها شده است به‌طوری‌که مقدار کلسترول همه نمونه‌های رد شده کمتر از ۹۷ درصد بوده است. لذا می‌توان حداقل به‌عنوان یک مرحله مقدماتی و به‌منظور غربال‌کردن نمونه‌های ما ست از این نظر، تنها مقدار کلسترول آن‌ها را مورد توجه قرار داد.

در بین استرول‌های گیاهی مورد مطالعه، بیش‌ترین مقدار به کمپسترول (٤/۷۰ درصد) و پس از آن به براسیکااسترول (۲/۰۸ درصد) اختصاص دارد، در حالی‌که در مطالعات دیگر محققین سیتواسترول به‌عنوان ا سترول گیاهی غالب در مواد غذایی گزارش شده ا ست (Domeno *et al*. 2005; Piironen *et al*. 2002).

در بسیاری از نقاط دنیا از افزودن ا سترول‌های گیاهی به مواد غذایی مختلف به‌منظور کاهش کلسترول خون و کاهش خطر بیماری‌های قلبی- عروقی ا ستفاده می شود (Cynthia and Ermias, 2015; Lagarda *et al*. 2006) که در این بین توجه ویژه‌ای به مصرف شیر و ماست غنی‌شده با فیتواسترول‌ها در کاهش مؤثر کلسترولمی می‌شود (Saraiva *et al*. 2011) ولی از طرفی بررسی پروفایل استرول‌های مواد غذایی مختلف یکی از راه‌های پی‌بردن به درجه خلوص و کشف تقلبات مواد غذایی ا ست (Azadmard-Damirchi *et al*. 2010; Carreraa *et al*. 1998) ولی طبق بررسی نویسندگان این مقاله تاکنون مطالعه‌ای درخصوص تعیین پروفایل استرول‌های ماست با هدف کشف تقلبات در آن صورت نگرفته است. با توجه به استانداردهای ملی ایران، تنها مواد مجاز برای ا ستاندارد کردن چربی شیر مورد ا ستفاده در ما ست سازی، خامه و روغن کره ا ست و مقدار بیشینه در صد ا سترول‌های گیاهی از کل ترکیبات ا سترولی در این دو فرآورده نیز ۳ ا ست، لذا در ما ست حداکثر مجاز مجموع فیتواسترول‌ها نباید بالاتر از ۳ درصد باشد (ISIRI, 162/2016; ISIRI, 191/2016; ISIRI, 695/2008). بر این اساس ۱۳ نمونه از ماست‌های

کم‌چرب (۷٦/٤ درصد)، ١٤ نمونه از ماست‌های خامه‌ای ۷۳/٦ درصد) و ۱۹ نمونه از ماست‌های پرچرب ۹۰/٤ در صد) غیرمجاز تشخیص داده شد، در حالی‌که تصور بر این بود که ماست‌های با مقدار چربی بالاتر مشکل بیشتری از این نظر داشته باشند. نتایج ثابت کرد ماست‌های کم‌چرب پس از ماست‌های پرچرب و بیشتر از ماست‌های خامه‌ای بیش‌ترین تعداد نمونه‌های رد شده را به خود اختصاص داد.

سپاسگزاری

بدین‌وسیله از دکتر محمدرضا افشار که در مراحل آزمایشگاهی و فنی این تحقیق یاری نموده‌اند و نیز دکتر شهروز بصیری که در تحلیل آماری داده‌های تحقیق یاری‌مان کردند، تشکر و قدردانی می‌شود.

تعارض منافع

نویسندگان هیچ‌گونه تعارض منافعی برای اعلام ندارند.

منابع

- Azadmard-Damirchi, S. (2010). Review of the use of phytosterols as a detection tool for adulteration of olive oil with hazelnut oil. Food Additive and Contaminants, 27(1): 1-10.
- Carreraa, F., Leon-Camachob, M., Pablosa, F. and Gonzalez, A.G. (1998). Authentication of green coffee varieties according to their sterolic profile. Analytica Chimica Acta, 370: 131-139.
- Cynthia, T.S. and Ermias, A.H. (2015). Quantification of plant sterols/stanols in foods and dietary supplements containing added phytosterols. Journal of Food Composition and Analysis, 40: 163–176.
- Derakhshan-Honarparvar, M., Hamedi, M.M. and Pirouzifard, M.Kh. (2010). Rice bran phytosterols of three widespread iranian cultivars. Journal of Agricultural Science and Technology, 12: 167-172.
- Domeno, C., Ruiz, B. and Nerin, C. (2005). Determination of sterols in biological samples by SPME with on-fiber derivatization and GC/FID. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 381: 1576-1583.
- Duong, S., Strobel, N., Buddhadasa, S., Stockham, K., Auldist, M., Wales, B. *et al*. (2016). Rapid measurement of phytosterols in fortified food using gas chromatography with flame ionization detection. Food Chemistry, 211: 570–576.
- Farajzadeh, M.A., Nouri, N. and Khorram, P. (2014). Derivatization and microextraction methods for determination of organic compounds by gas chromatography (Review). Trends in Analytical Chemistry, 55: 14–23.
- Fathi-Achachlouei, B., Alirezalu, K., Azadmard-Damirchi, S. (2016). Evaluation of oil content, fatty acids profile and phytosterols of Milk Thistle (*Silybum marianum L.*) oil in several different ecotypes in north -west of Iran. Journal of Food Science and Technology, 52(13): 25-34.
- Georgios, P.D., Aristidis, S.T., Caminb, F., Brusicc, V. and Georgioua, C.A. (2016). Food authentication: techniques, trends & emerging approaches. Trends in Analytical Chemistry, 85: 123- 132.
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran (2009). Anhydrous milk fat– Determination of sterol composition by gas liquid chromatography (Reference method). 1st edition, ISIRI No. 11880. [In Persian]
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (2016). Pasteurized butter-Specifications and test methods. 6th revision, ISIRI No. 162. [In Persian]

- Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (2016). Pasteurized & UHT cream-Specifications & test method. Amendment No.1, ISIRI No. 191. [In Persian]
- Institute of Standards and Industrial Research of Iran. (2008). Yogurt – Specifications and test methods. 4th revision, ISIRI No. 695. [In Persian]
- Kamal-Eldin, A. and Appelqvist, L.A. (1994). Variations in the composition of sterols, tocopherols and lignans in seed oils from 4 sesamum species. Journal of the American Oil Chemists Society, 71(2): 149–156.
- Lagarda, M.J., Garcıa-Llatas, G. and Farre, R. (2006). Analysis of phytosterols in foods (Review). Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, 41: 1486–1496.
- Moreau, R.A., Whitaker, B.D. and Hicks, K.B. (2002). Phytosterols, phytostanols and their conjugates in foods: structural diversity, quantitative analysis and health promoting uses. Progress in Lipid Research, 41: 457–500.
- Piironen, V., Lindsay, D.G., Miettinen, T.A., Toivo, J. and Lampi, A.M. (2000). Plant sterols: biosynthesis , biological function and their importance to human nutrition. Journal of the Science of Food and Agriculture, 80(7): 939-966.
- Piironen, V., Toivo, J. and Lampi, A.M. (2002). Plant sterols in cereals and cereal products. Cereal Chemistry, 79: 148–154.
- Santos, R., Limas, E., Sousa, M., Castilho, M.C., Ramos, F. and Silveira, M.I.N. (2007). Optimization of analytical procedures for GC–MS determination of phytosterols and phytostanols in enriched milk and yoghurt. Food Chemistry, 102: 113–117.
- Saraiva, D., da Conceição Castilho, M., do Rosário Martins, M., da Silveira M.I.N. and Ramos F. (2011). Evaluation of phytosterols in milk and yogurts used as functional foods in Portugal. Food Analitical Methods, 4: 28–34.
- Tamime, A.Y. and Deeth, H. (1980). Yogurt: Technology and biochemistry. Journal of Food Protection, 43: 939-977.
- Tsape, K., Sinanoglou, V.J., Miniadis-Meimaroglou, S. (2010). Comparative analysis of the fatty acid and sterol profiles of widely consumed Mediterranean crustacean species. Food Chemistry, 122: 292–299.

Detection and quantification of phytosterols in yogurt using gas chromatography

Jeddy, M.[1], Khandaghi, J.[2*]

1. M.Sc Graduate of Food Science and Technology, Sarab Branch, Islamic Azad University, Sarab, Iran
2. Assistance Professor of Department of Food Science and Technology, Sarab Branch, Islamic Azad University, Sarab, Iran

[*]Corresponding Author's E.mail: khandaghi@iausa.ac.ir
(Received: 2018/2/16 Accepted: 2018/6/13)

Abstract

Sterols form the largest proportion of the unsaponifiable fraction of lipids. Plant fats and oils contain phytosterol as naturally occurring constituents. The most common types of phytosterols in plants are cytosterol, compressor and stigmometol. Different types of yogurt and especially high-fat types are foods that are likely to contain added phytosterol. In this study, the presence of cholesterol and four phytosterols in 62 different yogurts in Tabriz city was investigated in order to assess the addition of vegetable oils. For this purpose, after saponification and liquid-liquid extraction of the samples, non-absorbent materials were purified by thin layer chromatography. Then, without the derivative step, the compounds were detected by gas chromatography with a flame ionization detector. In the recent study, the saponification process was optimized and validated. According to the results, the method was estimated as easy, fast and repeatable, and had a high efficiency in detecting sterols in our samples. Cholesterol was found as the highest sterolic compound in all samples (65-99%). Among the phytosterols, campesterol was predominated (4.7%) followed by brassicasterol (2.08%). According to the guidelines of Institute of Standards and Industrial Research of Iran, 46 (74.2%) yogurt samples were found unacceptable.

Conflict of interest: None declared.

Keywords: Phytosterol, Yogurt, Gas chromatography, Thin layer chromatography