

## مطالعه توزیع فیتواسترول و تغییرات رنگ در ماست غنی شده با فیتواسترول به روش کروماتوگرافی گازی و نرم افزار فتوشاپ

زهرا ایزدی<sup>۱</sup> - علی نصیرپور<sup>۲</sup> - قاسمعلی گروسی<sup>۳\*</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۸۹/۱۲/۲۱

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۲/۱۹

### چکیده

از دهه ۱۹۵۰ فیتواسترول‌ها جهت کاهش کلسترول مورد استفاده قرار گرفتند. دمای ذوب بالا و طعم و مزه‌ی گچی، از مشکلات اصلی در غنی سازی مواد غذایی با فیتواسترول‌ها می‌باشد. وجود فرم‌های آزاد و الکلی فیتواسترول‌ها و امکان ایجاد پیوند محکم آنها با ماتریکس‌های غذایی، آنالیز و چگونگی توزیع آنها در مواد غذایی را مشکل و پیچیده می‌نماید. در این مطالعه جهت پراکنده نمودن و حل شدن فیتواسترول‌ها از ترکیب‌های متفاوت امولسیون، مرکب از فیتواسترول، امولسیفایر، روغن گیاهی سویا و آب استفاده شد و سپس نحوه‌ی توزیع فیتواسترول در ماست غنی شده با استفاده از کروماتوگرافی گازی مورد بررسی قرار گرفت. از آنجایی که رنگ و ظاهر مواد غذایی اولین پارامتر در ارزیابی کیفیت آن‌ها می‌باشد، با استفاده از تصویر برداری دیجیتال و نرم افزار فتوشاپ رنگ ماست‌های غنی شده با فیتواسترول مورد ارزیابی قرار گرفت. نتایج بررسی نشان داد که امولسیفایر و روغن گیاهی سویا می‌تواند راه حل مناسبی برای حل کردن و پراکنده نمودن فیتواسترول‌ها در فاز آبی بوده و استفاده از کروماتوگرافی گازی راه حل مناسبی جهت اندازه‌گیری نحوه‌ی پراکندگی فیتواسترول‌ها می‌باشد. در مطالعه رنگ سنجی تفاوت معنی داری در رنگ نمونه‌های ماست غنی شده و شاهد مشاهده نگردید. همچنین نتایج نشان داد که استفاده از نرم افزار فتوشاپ می‌تواند روش مناسب تری نسبت به روش‌ها و دستگاه‌های متداول برای رنگ سنجی ماست باشد.

**واژه‌های کلیدی:** ماست غنی شده، فیتواسترول، کلسترول، کروماتوگرافی گازی، نرم افزار فتوشاپ

### مقدمه

استرول‌ها/استانول‌ها، انواع جدیدی از غذاهای فراسودمند می‌باشند. میزان فیتواسترول موجود در رژیم غذایی حدوداً ۵۰۰-۱۸۰ میلی‌گرم است، که جهت کاهش کلسترول کافی نیست. اثر فیتواسترول در کاهش کلسترول حتی در مقادیر مصرف کم (۲-۱/۵ گرم در روز) موجب گسترش کاربرد این ترکیبات در مواد غذایی و غنی سازی آنها با فیتواسترول شده است.

مشکلات اساسی در غنی سازی مواد غذایی با فیتواسترول‌ها، نقطه‌ی ذوب بالا، طعم و مزه‌ی گچی و حلالیت پایین آن‌ها می‌باشد. فیتواسترول‌ها چربی دوست هستند، که این ویژگی استفاده از آنها را در غذاهای پرچرب تسهیل می‌نماید. از طرف دیگر تا حدی مومی هستند، که می‌تواند استفاده از آنها را مشکل کند. فرم کریستالی، جهت حل شدن در محلول نمک‌های صفاوی روزها یا هفته‌ها زمان نیاز دارد (Ostlund, 2002). حلالیت فیتواسترول‌های آزاد در تری‌گلیسیریدها نیز کم (۲-۱ درصد) می‌باشد (Noakes et al., 2005). لذا جهت پراکنده نمودن این ترکیبات از امولسیون‌ها می‌توان استفاده نمود. در این حالت کارایی آن‌ها در

استرول‌های گیاهی (موسوم به فیتواسترول‌ها) ترکیباتی هستند که به طور طبیعی در گیاهان وجود دارند و متعلق به گروه تری ترپن‌ها می‌باشند. در میان ۴۰۰۰ تری ترپن، بیش از ۲۰۰ نوع مختلف استرول وجود دارد (Goat et al., 1999). این ترکیبات به صورت پودر سفید رنگ با نقطه‌ی ذوب ۱۰۰-۲۱۵ °C بوده، که در هگزان و کلرفرم به آسانی و به طور کامل و در اتانول به میزان اندکی حل می‌شوند، اما در آب نامحلول می‌باشند.

طبق تأیید سازمان غذا و داروی آمریکا، فیتواسترول‌ها به عنوان ترکیبات ایمن شناخته شده‌اند. مواد غذایی غنی شده با فیتو-

۱- دانشجوی دکتری دانشگاه صنعتی اصفهان

۲- استادیار دانشگاه صنعتی اصفهان

۳- استادیار دانشکده فنی مهندسی، گروه بیوتکنولوژی کشاورزی دانشگاه بین المللی امام خمینی(ره)، قزوین، ایران، صندوق پستی ۲۸۸.

\*- نویسنده مسئول: (Email: agarooosi90@yahoo.com)

## مواد و روش‌ها

### مواد

شیر از مزرعه تحقیقاتی دانشگاه صنعتی اصفهان (ایران)، فیتو-استرول حاوی ترکیبات بتاسیتواسترول (حدود ۴۰ درصد)، استیگما-استرول (۳۰-۱۵ درصد)، کامپسترول (۳۰-۱۵ درصد) و براسیکااسترول (کمتر از ۱۰ درصد)، از شرکت دارویی ژیانگ<sup>۴</sup> (چین)، امولسیفایر، از شرکت پراتوس<sup>۵</sup> (بلژیک) و کشت آغازگر از شرکت پروکیگا (اسپانیا) تهیه گردید.

### فرمولاسیون امولسیون

در یک آزمایش مقدماتی ۲۴ امولسیون متفاوت از مخلوط نمودن چهار ترکیب فیتواسترول، امولسیفایر، آب و روغن گیاهی سویا در دامنه ای از تغییر هر یک از اجزاء امولسیون تهیه شدند (جدول ۱).

جدول ۱- حدود تغییرات ترکیب امولسیون‌ها

ترکیبات	مقادیر حداقل (وزنی/وزنی) %	مقادیر حداکثر (وزنی/وزنی) %
امولسیفایر	۵	۱۰
فیتواسترول	۱۰	۲۰
آب	۵۰	۸۵
روغن	۰	۲۰

جهت تهیه امولسیون با بافت یکنواخت و سفید رنگ، فیتو-استرول‌ها به همراه امولسیفایر و روغن در یک بشر مخلوط و تا دمای ۱۴۰-۱۳۰ °C حرارت داده شدند. فاز آبی هر امولسیون، که شامل آب مقطر است تا دمای جوش حرارت داده شد. سپس فاز روغنی در زیر همزن با سرعت ۷۰۰ دور در دقیقه به مدت ۲ دقیقه مخلوط و در ادامه، فاز آبی به تدریج به فاز روغنی اضافه گردید. عمل همزدن به مدت ۴ دقیقه با سرعت ۳۰۰۰ دور در دقیقه ادامه یافت.

### آماده سازی نمونه‌های ماست غنی شده با فیتواسترول

جهت تولید ماست، از شیر بدون چربی با ۹/۳ درصد ماده خشک بدون چربی به عنوان منبع شیر استفاده شد. برای هر فرمولاسیون ۱۰ ظرف ۱۵۰ گرمی جهت انجام آزمایش‌های لازم در طی یک دوره ۲۸ روزه نگهداری تهیه گردید.

قبل از پاستوریزاسیون، شیر در فشار ۲۰۰ بار هموژن و در دمای

کاهش کلسترول نیز افزایش می‌یابد. در رابطه با اثر فرم استری و آزاد فیتواسترول‌ها بر روی بتاکاروتن و آلفاکاروتن مشخص شده است که فرم استری فیتواسترول در مقایسه با فرم آزاد آن، فعالیت زیستی این ترکیبات را بیشتر کاهش می‌دهد (Richelle et al., 2004). به همین دلیل در این مطالعه از فرم آزاد فیتواسترول‌ها جهت غنی سازی ماست استفاده شد.

مصرف ۳-۲ گرم استر فیتواسترول میزان کلسترول (LDL)<sup>۱</sup> خون را به میزان ۱۰/۱ درصد کاهش می‌دهد، در حالیکه مصرف ۲-۱/۶ گرم فیتواسترول به فرم آزاد، کلسترول LDL را تا حدود ۱۳-۸ درصد کاهش می‌دهد (Nguyen, 1999). بنابراین اثر فیتواسترول‌های آزاد در کاهش کلسترول بیشتر است. از سوی دیگر، فیتواسترول‌ها، در حالت آزاد نسبت به فرم استری فعالیت آنتی-اکسیدانی بیشتری نشان می‌دهند. بالا بودن فعالیت آنتی-اکسیدانی فیتواسترول‌های آزاد، به دلیل توانایی گروه هیدروکسیل انتهایی برای واکنش با رادیکال‌های پراکسید می‌باشد. همچنین روغن‌هایی که نیاز به نگهداری بلند مدت (۱۲ ماه) را دارند تنها با استفاده از فیتواسترول‌های آزاد، توانایی کاهش اکسیداسیون را پیدا می‌کنند. استرهای فیتواسترول در مقایسه با فیتواسترول‌های آزاد، نه تنها روغن‌ها را در برابر اکسیداسیون محافظت نمی‌کنند، بلکه تمایل به اکسیداسیون لیپید را نیز افزایش می‌دهند (Emefa et al., 2008).

آنالیز فیتواسترول‌ها در مواد غذایی بدلیل وجود فرم آزاد و الکلی آن‌ها کار پیچیده‌ای بوده و ممکن است به آسانی استخراج نشده و یا با ماتریکس مواد غذایی پیوند محکمی برقرار نمایند. استرول‌های آزاد اغلب با روش کروماتوگرافی گازی آنالیز می‌گردند. جداسازی فیتواسترول‌ها به روش کروماتوگرافی و بر روی ستون‌های غیر قطبی اولین بار توسط هووینگ در سال ۱۹۹۵ انجام شد (Hoving, 1995). جداسازی فیتواسترول‌ها بر روی ستون‌های قطبی مویینه یا با قطبیت متوسط نیز انجام می‌شود (Abidi, 2001). تکنیک کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)<sup>۲</sup> نسبت به کروماتوگرافی گازی (GC)<sup>۳</sup>، کاربرد کمتری برای جداسازی فیتواسترول‌ها دارد؛ زیرا، آشکارساز آن نسبت به آشکارساز دستگاه کروماتوگرافی گازی حساسیت لازم را ندارد (Piironen et al., 2004).

نظر به اهمیت غذاهای فراسودمند، بویژه لبنیات و رنگ آن‌ها، در این مطالعه پس از غنی سازی ماست با فرم آزاد فیتواسترول به کمک امولسیون‌های متفاوت، نحوه توزیع فیتواسترول در ماست غنی شده با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی و امکان استفاده از تصویر برداری دیجیتالی و نرم افزار فتوشاپ، جهت مطالعه تغییرات رنگ ماست غنی شده با فیتواسترول مورد بررسی قرار گرفت.

- 1- Low Density Lipoprotein
- 2 -High performance liquid chromatography
- 3 -Gas chromatography

3- Zhejiang Medicine co (ZMC)

4 - peratus

صابونی شدن انجام شود. صابونی شدن موجب انتقال تری گلیسیرید-های محلول در چربی به درون ترکیبات محلول در آب گردیده و استخراج فیتواسترول‌ها و فیتواستاتول‌ها را تسهیل می نماید (Toivo *et al.*, 2001). بعد از صابونی شدن، جزء غیر صابونی (لایه رویی) با ۱ میلی لیتر هگزان استخراج شد. در مرحله بعد ۲۵۰ میکرولیتر از محلول به ویال‌ها منتقل و در دمای  $60^{\circ}\text{C}$  با گاز ازت خشک شد. باقیمانده خشک شده با ۵۰ میکرولیتر از (۹۹:۱) BSTFA: TMCS مخلوط گردید و برای جداسازی فیتواسترول‌ها ۱ میکرولیتر از آن به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق شد (Kuksis, 2001).

### کروماتوگرافی

در این مطالعه اندازه‌گیری فیتواسترول‌ها و فیتواستاتول‌ها بصورت اسپلیت، با نسبت ۱:۲۰ و با تزریق ۱ میکرولیتر از نمونه در دمای  $250^{\circ}\text{C}$  انجام شد.

سرعت جریان کل در  $63/5$  و جریان ستون در  $1/5$  میلی لیتر بر دقیقه تنظیم شد. گاز نیتروژن به عنوان فاز متحرک با فشار  $3/240$  بار در بالای ستون مورد استفاده قرار گرفت. برنامه دمایی برای دستگاه به صورت زیر تعریف شد:

دمای اولیه ستون در  $200^{\circ}\text{C}$  تنظیم شده و به مدت ۱ دقیقه در این دما نگه داشته شد و تا رسیدن به دمای  $300^{\circ}\text{C}$  هر دقیقه  $20^{\circ}\text{C}$  به دمای آن اضافه گردید. سپس به مدت ۱۰ دقیقه در دمای  $300^{\circ}\text{C}$  نگه داشته، بطوریکه مجموع زمان‌ها ۱۶ دقیقه شد. پیک‌های مربوط به فیتواسترول نیز در این بازه زمانی ظاهر شدند. دمای دتکتور نیز در  $280^{\circ}\text{C}$  تنظیم شد. میزان فیتواسترول نمونه‌های تزریق شده به دستگاه با مقایسه سطح زیر پیک نمونه‌ها و محلول استاندارد بدست آمدند (شکل ۳).

### اندازه‌گیری رنگ

در این مطالعه با استفاده از تصویر برداری دیجیتالی و نرم افزار فتوشاپ پارامترهای  $b^*$  و  $L^*$  اندازه‌گیری شدند که در آن  $L^*$  بیانگر میزان روشنایی با دامنه‌ای از ۰ تا ۱۰۰ و  $b^*$  بیانگر رنگ زرد با دامنه‌ای از ۱۲۰ تا ۱۲۰ می باشد (شکل ۱). به منظور فراهم آوردن شرایط ثابت و یکنواخت، نمونه‌ها در جعبه‌ای به ابعاد  $50 \times 50 \times 60$  (طول، عرض و ارتفاع) قرار داده شدند. دیوار داخلی آن توسط کاغذ کاملاً سفید پوشیده و از یک لامپ کم مصرف (۶۰ وات) جهت تأمین نور لازم برای عکس‌گرفتن استفاده شد. نمونه‌های ماست را داخل پتری ریخته و سطح آن‌ها صاف و یکنواخت شد، تا با بازتابش نور به سمت سقف جعبه علاوه بر پخش یکنواخت نور، از تابش مستقیم نور به سطح نمونه جلوگیری نموده و از پدیده برق افتادگی بر روی سطح نمونه‌ها جلوگیری شود. از یک دوربین دیجیتالی (ژاپن، مدل Sony

$85^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۰ دقیقه پاستوریزه‌گردید. مقداری از امولسیون مربوطه، حاوی ۲ گرم فیتواسترول برای هر ۱۰۰ میلی لیتر شیر به نمونه‌ها اضافه و سپس سریعاً تا دمای  $45^{\circ}\text{C}$  سرد و در ظروف ۱۵۰ گرمی توزیع شد. به هر ظرف به میزان ۲ درصد (w/v) استارتر (ترکیبی از دو باکتری اسید لاکتیک به نام‌های لاکتوباسیلوس دلبروکی زیر گونه‌ی بولگاریکوس و استرپتوکوکوس ترموفیلوس) اضافه‌گردید. نمونه‌ها تا زمانی که pH به  $4/3-4/5$  برسد در انکوباتور  $45^{\circ}\text{C}$  قرار داده شده و سپس به سردخانه ( $4^{\circ}\text{C}$ ) منتقل شدند و بعد از ۲۴ ساعت تست‌های مربوطه انجام شد.

### نمونه شاهد

تهیه نمونه شاهد مشابه تهیه ماست غنی شده با فیتواسترول می باشد با این تفاوت که بعد از مرحله پاستوریزاسیون، اضافه نمودن امولسیون‌های روغن در آب در مورد نمونه شاهد انجام نشد.

### آزمایشات فیزیکو شیمیایی

اندازه‌گیری توزیع فیتواسترول در ماست غنی شده با استفاده از کروماتوگرافی گازی واکنش‌گرهای مورد نیاز

هیدروکسید پتاسیم، اتانول خالص، هگزان (مرک، آلمان)، N-O-بیس- (تری متیل سیلان) تری فلورو استامید (BSTFA) با ۱ درصد تری متیل کلروسیلان (TMCS) (مرک، آلمان)، ستون HP-5MS (30 m  $\times$  0.25 mm i.d.  $\times$  0.25  $\mu\text{m}$  film thickness) جهت جداسازی فیتواسترول مورد استفاده قرار گرفتند.

### تهیه استاندارد

محلول استوک فیتواسترول با غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی لیتر در اتانول تهیه و محلول در دمای  $8-2^{\circ}\text{C}$  نگهداری شد.

### آماده سازی نمونه‌ها

مهمترین مرحله در تهیه نمونه‌ها جهت تزریق در دستگاه کروماتوگرافی گازی، استخراج فیتواسترول از ماتریکس غذایی می باشد. جهت افزایش بازده استخراج مستقیم فیتواسترول‌ها از ماتریکس غذایی از روش سانتوز و همکاران (Santos *et al.*, 2007) استفاده شد. بدین منظور، ابتدا نمونه‌های ماست غنی شده، با هموژنایزر دستی هموزن و سپس ۱۰ میلی لیتر از هر نمونه در سرعت ۴۰۰۰ دور در دقیقه و به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ شدند. از لایه رویی ۱۰۰ میکرولیتر برداشته و  $1/5$  میلی لیتر از پتاس الکل (محلول هیدروکسید پتاسیم در اتانول ۹۰ درصد)، به آن اضافه شد و نمونه‌ها در بن ماری در دمای  $60^{\circ}\text{C}$  و به مدت ۹۰ دقیقه قرار گرفتند تا عمل

$$\text{(فیتواسترول)(روغن)} + \text{(آب)(فیتواسترول)} = 0.00797 - 0.24237 / \text{(معادله ۱)}$$

$$\text{(آب)(روغن)} = 0.015319 + 0.005381$$

بر اساس معادله بالا، اثر امولسیفایر، فیتواسترول و آب روی پارامتر روشنایی مثبت است و در بین ترکیبات امولسیفایر بیشترین اثر را روی پارامتر روشنایی در ماست‌های غنی شده با فیتواسترول دارد (معادله ۱). اثر مثبت ترکیبات ممکن است به این دلیل باشد، که با خرد شدن ذرات چربی (امولسیفایر و فیتواسترول) در اثر هم‌وزن کردن، سطح کلی چربی افزایش یافته و نتیجه آن بازتاب بیشتر نور و سفیدتر شدن رنگ ماست است. همان طور که جدول ۲ نشان می‌دهد، اثر ترکیبات امولسیون بر روشنایی نمونه‌های ماست غنی شده با فیتواسترول معنی‌دار نیست. اثر متقابل ترکیبات امولسیون بر روشنایی ماست غنی شده نیز تفاوت معنی‌داری را نشان نداد. میزان روشنایی در ماست‌های غنی شده (۲۴ نمونه) تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند (جدول ۲).

#### پارامتر رنگ زرد

تجزیه آماری همبستگی بین اجزای امولسیون‌ها و میزان رنگ زرد، معادله ۲ را پیشنهاد نمود. اهمیت هر یک از ترکیبات و اثرات متقابل آنها در مدل به دست آمده نشان داده شده است.

$$\text{رنگ زرد (فیتواسترول)} = 2/40512 - \text{(امولسیفایر)} - 4/63692 = \text{رنگ زرد (امولسیفایر)(فیتواسترول)} + \text{(روغن)} + 0.322714 + 0.3152 \text{(آب)}$$

$$\text{(امولسیفایر)(روغن)} + \text{(امولسیفایر)(آب)} = 0.65746 + 0.338882$$

$$\text{(فیتواسترول)(روغن)} + \text{(فیتواسترول)(آب)} = 0.37606 + 0.237$$

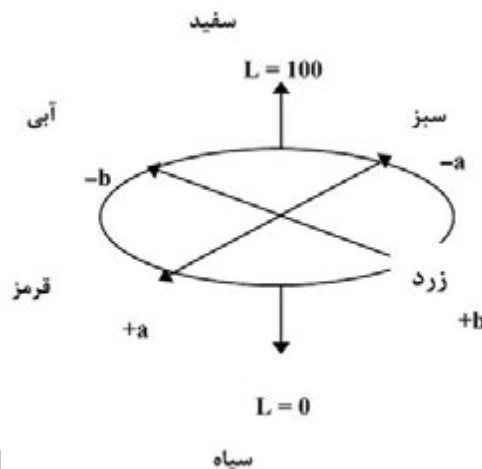
$$\text{(آب)(فیتواسترول)(امولسیفایر)} - \text{(آب)(روغن)} = 0.0534 - 0.30926$$

$$\text{(روغن)(فیتواسترول)(امولسیفایر)} - 0.00435 - \text{(فیتواسترول)(آب)(روغن)} = 0.00539 \text{(امولسیفایر)}$$

(معادله ۲)

در این مدل، اثر امولسیفایر، فیتواسترول و آب روی رنگ زرد منفی است. بدین معنی که، این ترکیبات نمونه‌ها را در برابر تغییر رنگ محافظت می‌نمایند. ولی به هر حال، در بین ترکیبات متفاوت امولسیون، امولسیفایر بیشترین و آب کمترین اثر را در محافظت نمونه‌ها در برابر تغییر رنگ از خود نشان داده و روغن گیاهی، اثر مثبت روی گسترش رنگ زرد داشت (شکل ۲ و معادله ۲). اثر ترکیبات امولسیون بر رنگ زرد نمونه‌های غنی شده با فیتواسترول معنی‌دار نشده و اثر متقابل ترکیبات امولسیون بر رنگ زرد ماست غنی شده نیز تفاوت معنی‌داری را نشان ندادند. در مجموع در ماست‌های غنی شده (۲۴ نمونه) تفاوت معنی‌داری در پارامتر رنگ زرد مشاهده نگردید (جدول ۲).

(DSC-T2) برای عکس برداری از نمونه‌ها و کارت‌های رنگی استفاده شد. برای این منظور دوربین بدون نور فلاش تنظیم گردید و برای اینکه در هنگام عکس‌گرفتن در محفظه بسته شود دوربین در حالت زمان ۱۰ ثانیه قرار داده شد و از نمونه‌ها ۳ بار بعنوان تکرار عکس گرفته شد. عکس‌ها به برنامه فتوشاپ منتقل شد و میانگین رنگ نقاط مختلف از نمونه‌ها مشخص گردید.



شکل ۱- فضای رنگی  $L^* \cdot a^* \cdot b^*$  (روشنایی)،  $a^*$  (رنگ قرمز)،  $b^*$  (رنگ زرد) (کمپسئون بین المللی روشنایی).

#### نتیجه گیری و بحث

##### رنگ

به منظور رنگ سنجی، داده‌های هر یک از پارامترهای  $L^*$ ،  $b^*$  در مقابل یکدیگر رسم شدند. نتایج نشان داد که رابطه بین داده‌ها خطی بوده و ضریب همبستگی بین آنها برای  $L^*$ ،  $b^*$  به ترتیب ۰/۹۹۶ و ۰/۹۹۵ بدست آمد. در مرحله بعد داده‌ها با کمک معادله خط به دست آمده از رسم نمودارها استاندارد شده و آنالیزهای آماری بر روی داده‌های استاندارد انجام شد.

##### پارامتر روشنایی

نتایج حاصل از رنگ سنجی با طرح مخلوط آنالیز شد. تجزیه آماری همبستگی بین اجزای امولسیون‌ها و میزان روشنایی، معادله ۱ را پیشنهاد نمود. اهمیت هر یک از ترکیبات و اثرات متقابل آنها در مدل به دست آمده نشان داده شده است.

$$\text{(فیتواسترول)} = 22/66837 + 1/794625 = \text{روشنایی (فیتواسترول)(امولسیفایر)} - \text{(روغن)} - 0.6794 - \text{(آب)} = 0.971575 + \text{(امولسیفایر)(روغن)} - \text{(امولسیفایر)(آب)} = 0.24594 - 0.2935$$

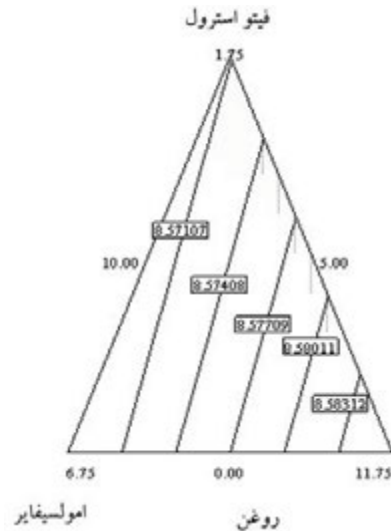
جهت اندازه‌گیری رنگ در چیبس سیب زمینی مورد استفاده قرار دادند و به این نتیجه رسیدند که استفاده از تصویر برداری دیجیتالی، روشی علمی، آسان، دقیق و ارزان جهت رنگ سنجی می‌باشد و همچنین می‌توان رنگ چیبس سیب زمینی را در تمام سطح یا بخشی از سطح که مورد نظر است اندازه‌گیری نمود. همچنین لارین و همکاران (Larrain et al., 2008) نیز جهت ارزیابی رنگ در گوشت گاو از روش تصویربرداری دیجیتالی استفاده نمودند و به این نتیجه رسیدند که به دلیل حساسیت و قیمت پائین، روش مفید جهت شناسایی رنگ در گوشت گاو و سایر مواد غذایی می‌باشد.

افشاری و همکاران (۱۳۸۸)، نیز تغییرات رنگ رطب مضافتی بم در طی رساندن مصنوعی را با استفاده از نرم افزار فتوشاپ و سیستم دستگاهی هانتربل اندازه‌گیری نمودند و نتایج نشان داد که پارامترهای رنگ بدست آمده از نرم افزار فتوشاپ و سیستم هانتربل دارای ضریب همبستگی مطلوبی می‌باشند.

در این مطالعه از کارت‌های رنگی به جای سیستم هانتربل استفاده شد و همبستگی برای پارامتر رنگ زرد و روشنایی به ترتیب ۰/۹۹۶ و ۰/۹۹۵ بدست آمد.

#### نحوه توزیع فیتواسترول در نمونه های غنی شده

شکل ۳، کروماتوگرام مخلوط استاندارد تزریق شده به دستگاه کروماتوگرافی گازی را نشان می‌دهد. پیک‌ها، اجزاء فیتواسترول (نمونه استاندارد) تزریق شده به دستگاه کروماتوگرافی گازی را نشان می‌دهند که در فاصله زمانی ۱۶ دقیقه ظاهر شدند. بزرگترین پیک مربوط به بتاسیتواسترول و کوچکترین مربوط به براسیکاسترول می‌باشد که از لحاظ میزان و نسبت با آنالیز فیتواسترول مشابه می‌باشند. نتایج بررسی کروماتوگرام نمونه‌های تزریق شده به دستگاه کروماتوگرافی گازی نشان داد، که نحوه‌ی توزیع فیتواسترول در بخش‌های مختلف نمونه‌های ماست غنی شده به میزان جزئی اختلاف دارد، به طوری که بیشترین مقدار فیتواسترول در کف و کمترین مقدار در بالای ظرف وجود داشت (شکل ۳). علت رسوب جزئی فیتواسترول مربوط به دانسیته‌ی بالای این ترکیب می‌باشد. لازم به ذکر است پیک‌های مربوط به کروماتوگرافی فیتواسترول که در شکل ۳ نشان داده شده است از لحاظ میزان و نسبت با آنالیز فیتواسترول (بتاسیتواسترول (حدود ۴۰ درصد)، استیگماسترول (۳۰-۱۵ درصد)، کامپسترول (۳۰-۱۵ درصد) و براسیکاسترول (کمتر از ۱۰ درصد)) مورد استفاده مطابقت داشتند، لذا استفاده از کروماتوگرافی گازی راه حل مناسبی جهت اندازه‌گیری فیتواسترول‌ها می‌باشد. معتبر بودن روش کروماتوگرافی گازی جهت تعیین استرول‌ها در مواد غذایی و سرم انسانی توسط Toivo; (Normén et al., 2002 et al., 2001) به اثبات رسیده است. لاگاردا و همکاران (Lagarda et al., 2006) تکنیک‌هایی که جهت آنالیز فیتواسترول‌ها در دسترس می‌باشند را بر اساس حساسیت و دقت به صورت زیر طبقه بندی نمودند: (کروماتوگرافی سیال فوق



شکل ۲- مدل مسطح پاسخ‌های پیش بینی شده‌ی پارامتر رنگ زرد در نمونه‌های ماست غنی شده با فیتواسترول

همانطوریکه در شکل ۲ مشاهده می‌شود اثر فیتواسترول و امولسیفایر بر روی رنگ زرد منفی است، به طوری که با افزایش میزان امولسیفایر (از ۵ به ۶/۷۵ درصد) و فیتواسترول (از ۰ به ۱/۷۵ درصد) پارامتر رنگ زرد در نمونه‌های ماست غنی شده کاهش می‌یابد. همچنین اثر روغن بر روی رنگ زرد مثبت است، به طوری که با افزایش میزان روغن از (۱۰ به ۱۱/۷۵ درصد) میزان پارامتر رنگ زرد افزایش می‌یابد؛ اما میزان این تغییرات معنی دار نمی‌باشد. در این تحقیق با استفاده از یک محفظه عکس برداری با شرایط کنترل شده (نور، محل دوربین، زاویه بین دوربین، نمونه و منبع نوری و فاصله دوربین تا نمونه) و نرم افزار فتوشاپ، پارامترهای روشنایی و رنگ زرد مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج حاصله نشان داد که ترکیبات امولسیون تأثیر معنی داری بر رنگ ماست غنی شده با فیتواسترول ندارند (جدول ۲).

با توجه به اینکه ترکیبات امولسیون موجب تغییر رنگ ماست نمی‌شوند لذا این محصول می‌تواند بازار پسندی و کیفیت ظاهری مناسبی داشته باشد. در مجموع نتایج رنگ سنجی نشان داد که تفاوت معنی داری در رنگ نمونه‌های ماست غنی شده با ترکیبات متفاوت امولسیونی وجود ندارد. در حال حاضر دستگاه‌هایی نظیر هانتربل، مینولتا و دکترلانگ در بازار جهت سنجش رنگ مورد استفاده قرار می‌گیرند. از معایب این دستگاه‌ها می‌توان به کم بودن سطح مورد ارزیابی و لزوم یکنواخت بودن سطح نمونه اشاره کرد. نتایج نشان داد که استفاده از نرم افزار فتوشاپ می‌تواند روش مناسبی جهت رنگ سنجی ماست بوده و علاوه بر رفع نقایص روش‌ها و دستگاه‌های متداول، نسبت به آن‌ها از هزینه کمتری برخوردار باشد. پدرسچی و همکاران (Pedreschi et al., 2006) این روش را

مپسترول) در رژیم غذایی مورد استفاده قرار گرفت (Lagarda *et al.*, 2006). بنابراین با توجه به دقت و حساسیت بالا و همچنین مطابقت نتایج کروماتوگرافی با آنالیز فیتواسترول (از لحاظ میزان و نسبت)، این تکنیک روش مناسب جهت اندازه گیری فیتواسترول ها می باشد.

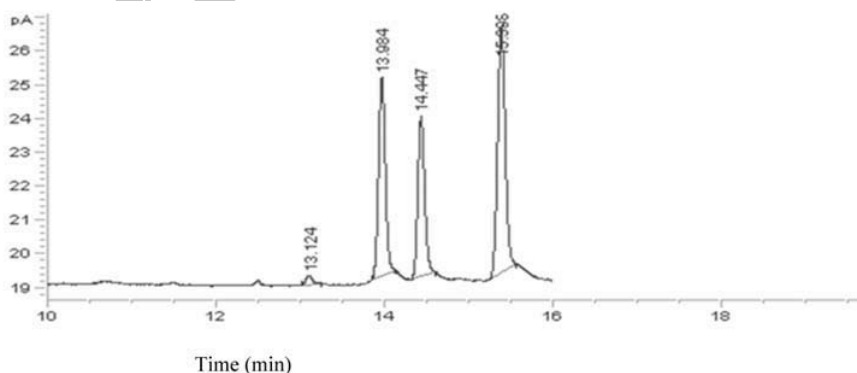
بحرانی) GC > HPLC > SFC. همچنین بیرونن و همکاران (Piironen *et al.*, 2004) بیان نمودند که تکنیک HPLC نسبت به GC کاربرد کمتری برای جداسازی فیتواسترول دارد؛ زیرا آشکار ساز آن نسبت به آشکار ساز دستگاه کروماتوگرافی گازی حساسیت لازم را ندارد. در هلند تکنیک GC جهت تخمین میانگین جذب (میلی گرم/روز) کلاسترول و فیتواسترول (بتاسیتواسترول، استیگماسترول، کا-

جدول ۲- تخمین احتمال و معنی دار بودن مدل ها و واکنش میان ترکیبات امولسیون (در ماست غنی شده)

پارامتر	اثر متقابل ترکیبات امولسیون*	P>F**
روشنایی	Model	۰/۸۴۴۰
	Leaner Mixture	۰/۲۰۵۶
	AB	۰/۴۶۴۰
	AC	۰/۶۱۲۰
	AD	۰/۲۹۰۴
	BC	۰/۳۱۵۴
	BD	۰/۴۰۸۶
	CD	۰/۲۳۴۸
	ABC	۰/۲۳۴۸
	ABD	۰/۱۹۹۹
	ACD	۰/۳۸۴۶
	BCD	۰/۹۵۱۵
	رنگ زرد	Model
Linear Mixture		۰/۴۶۰۷
AB		۰/۰۸۷۸
AC		۰/۱۲۳۱
AD		۰/۱۲۰۴
BC		۰/۷۹۸۸
BD		۰/۸۵۹۹
CD		۰/۰۹۳۵

\* A: امولسیفایر; B: فیتواسترول; C: آب; D: روغن

\*\* P-values less than 0.0500 indicate the model terms are significant; P-values greater than 0.1000 indicate the model terms are not significant.



شکل ۳- کروماتوگرام مخلوط استاندارد. پیکها به ترتیب از چپ به راست: پیک مربوط به براسیکااسترول، استیگمااسترول، کامپسترول، بتا-سیتواسترول.

## سپاسگزاری

بدین وسیله از آقای مهندس بهمن بهرامی و خانم مهندس طویی

ایزدی که در مراحل آزمایشگاهی و فنی این پژوهش یاری نمودند  
تشکر و قدردانی می‌گردد.

## مراجع

- افشاری، ح.، فرحناکی، ع.، ۱۳۸۸ امکان استفاده از نرم افزار فتوشاپ برای اندازه گیری رنگ مواد غذایی: بررسی تغییرات رنگ خرمای مضافتی بم در طی رساندن مصنوعی، نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی ایران، جلد ۵، شماره ۱، ص ۳۷-۴۶
- Abidi, S.L., 2001, Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils. *Journal of Chromatography*, 935, 173-201.
- Emefa, M., Blank, G., Holley, R. and Zawistowski, J., 2008, Phytosterol Effects on Milk and Yogurt Microflora. *Journal of Food science*, 73(3), M121-M126.
- Goad, J.L., Charlewood, B.V. & Banthorpe, D.V., 1991, *Methods in Plant Biochemistry*. Academic Press, London, 7, 369.
- Hoving, E.B., 1995, Chromatographic methods in the analysis of cholesterol and related lipids. *Journal of Chromatography B*, 671, 341-362.
- Kuksis, A., 2001, Plasma non-cholesterol sterols. *Journal of Chromatography A*, 935, 203-236.
- Lagarda, M.J., Garcia-Llatas, G. and Farré, R., 2006, Analysis of phytosterols in foods. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41, 1486-1496.
- Larrain, R.E., Schaefer, D.M. and Reed, J.D., 2008, Use of digital images to estimate CIE color coordinates of beef. *Food Research International*, 41, 380-385.
- Nguyen, T.T., 1999, the cholesterol-lowering action of plant stanol esters. *Journal of Nutrition*, 129, 2109-2112.
- Noakes, M., Clifton, P.M., Doornbos, A.M.E. and Trautwein, E.A., 2005, Plant sterol ester enriched milk and yogurt effectively reduce serum cholesterol in modestly hypercholesterolemic subjects. *European Journal of Nutrition*, 44, 214-222.
- Normén, L., Bryngelsson, S., Johnsson, M., Evheden, P., Ellegard, L., Brants, H., Andersson, H. and Dutta, P., 2002, *Journal of Food Composition and Analysis*, 15, 693-704.
- Ostlund, R.E., 2002, Phytosterols in human nutrition. *Annul Review of Human Nutritio*, 22, 533-549.
- Pedreschi, F., Leon, J., Mery, D. & Moyano, P., 2006, Development of a computer vision system to measure the color of potato chips. *Food Research International*, 39, 1092-1098.
- Piironen, V. & Lampi, A.M., 2004, in: P.C. Dutta (Ed.), *Phytosterols as Functional Food Components and Nutraceuticals*, Marcel Dekker, Inc., NewYork, pp. 1-32.
- Richelle, M., Enslin, M.C., Hager, M., Groux, I., Tavazzi, J.P., Godin, A., Berger, S., Metairon, S., Quaille, C., Piguet-Welsch, L., Sagalowicz, H. and Green, L.B., 2004, Both free and esterified plant sterols reduce cholesterol absorption and the bioavailability of beta-carotene and alpha-tocopherol in normocholesterolemic humans. *American Journal of Clinical. Nutrition*, 80, 171-177.
- Santos, R., Limas, E., Sousa, M., da Conceição Castilho, M., Ramos, F. & Irene Noronha da Silveira, M., 2007, Optimization of analytical procedures for GC-MS determination of phytosterols and phytostanols in enriched milk and yoghurt. *Journal of Food Chemistry*, 102, 113-117.
- Toivo, J., Phillips, K., Lampi, A.-M. and Piironen, V., 2001, Determination of sterols in foods: recovery of free, esterified, and glycosidic sterols. *Journal of Food Composition and Analysis*, 14, 631-643.