

شناسایی و اندازه‌گیری فیتواسترول‌ها در ماست به‌روش کروماتوگرافی گازی

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 ۶۲ 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 غیرصابونی شونده با روش کروماتوگرافی لایه نازک خالص‌سازی شدند. سپس بدون مرحله مشتق‌سازی، با روش کروماتوگرافی گازی 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 (۶۵ تا ۹۹ درصد) بود و از بین استرول‌های گیاهی، کمپسترول (۴/۷ درصد) و پس از آن، براسیکاسترول (۲/۰۸ درصد) غالب بودند. بر اساس استانداردهای ملی ایران، در مجموع ۴۶ نمونه ماست (۷۴/۲ درصد) غیرقابل مصرف تشخیص داده شد.

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

مقدمه

ماست یکی از فرآورده‌های تخمیری است که از تخمیر شیر توسط میکروارگانیسم به دست می‌آید. از نظر غذایی، ماست یکی از بهترین فرآورده‌های شیر است. مواد پروتئینی آن به صورت قابل هضم‌تری در آمده و مصرف آن باعث سهولت و تسریع هضم غذا می‌شود و به علت 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 به خصوص 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 به روش کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)، مشتق‌سازی به روش 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 به وجود می‌آورند (Farajzadeh et al., 2014)، حذف این مرحله به شرط 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 عین حال با استفاده از کروماتوگرافی

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 این کار 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 به مدت ۵۰ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سلسیوس رفلکس گردید. پس از سرد شدن، مخلوط حاصله صاف شده و فاز آبی باقی مانده 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، ۴، ۶، ۸ و ۱۰ درصد w/v)، دمای واکنش مشتق‌سازی (از بین دماهای ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰ و ۹۰ درجه سلسیوس) و مدت زمان عمل مشتق‌سازی (از بین زمان‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰،

لایه نازک (به منظور خالص‌سازی نمونه‌ها) بود که در مرحله بعد پروفایل استرول‌های موجود در نمونه‌ها و احتمال افزودن چربی‌های گیاهی به روش کروماتوگرافی گازی مجهز به دتکتور یونیزاسیون شعله‌ای (Flame Ionization Detector) بررسی شد.

مواد و روش‌ها

- نمونه برداری

در این مطالعه ۶۲ 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

به منظور 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 به منظور کنترل کیفی سیستم کروماتوگرافی و تکرارپذیری، هر روز سه بار به دستگاه (Dani 1000, Italy) تزریق شد و مساحت زیر پیک هریک از آنالیت‌ها برای محاسبه راندمان استخراج مورد استفاده قرار گرفت (ISIRI, 11880/2009). محلول‌های کار مورد نیاز هر روز با رقیق‌سازی مناسب محلول استاندارد به دست آمدند که در اجرای مراحل بهینه‌سازی شرایط

لکه‌های مربوط به آنالیت‌ها در طول موج‌های ۳۳۶ و ۲۵۴ نانومتر به صورت رنگ قهوه‌ای در ابتدای TLC مشخص شد که به علت 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، جداسازی 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.

۵۰، ۶۰ و ۷۰ دقیقه) مورد بررسی و شرایط بهینه انتخاب شد.

- جداسازی با کروماتوگرافی لایه نازک

به منظور پاک‌سازی بیش‌تر، حلال استخراج شده (حاوی استرول‌ها و دیگر ترکیبات) به وسیله کروماتوگرافی لایه نازک (TLC) تخلیص شد؛ به طوری که فاز استخراج شده در داخل روتاری تبخیر شده و روغن باقی‌مانده به صورت یک لکه بر روی پلیت TLC از جنس سیلیکاژل (Merck, Germany) قرار داده شد. پلیت حاصله با فاز متحرک هگزان-دی اتیل اتر (۶۵:۳۵) 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

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

۲۰۰ درجه سلسیوس به مدت ۱ دقیقه، ۲۰ درجه افزایش دما در دقیقه تا ۳۰۰ درجه و تثبیت دما به مدت ۱۵ دقیقه	برنامه دمایی ستون
DB-5: ۳۰ متر، ID: ۰/۲۵ میکرومتر، ضخامت فاز ساکن: ۰/۲۵ میکرومتر	نوع ستون
Split/Splitless، دما: ۲۷۰، نوع کنترل جریان: سرعت خطی، نسبت اسپلیت: ۱:۱۰	توزیع کننده
FID، دما: ۲۶۰ درجه سلسیوس	آشکارساز
هلیوم با جریان خطی ۳۰ سانتی‌متر در ثانیه	گاز حامل
هلیوم با جریان ۳۰ میلی‌لیتر در دقیقه	گاز میک آپ
هیدروژن با جریان ۴۰ میلی‌لیتر در دقیقه	سوخت
هوا با جریان ۳۰۰ میلی‌لیتر در دقیقه	اکسیدان

میلی‌گرم بر لیتر ۵-آلفا کلستان در نرمال-هپتان (Sigma, England) به عنوان استاندارد داخلی استفاده شد.

- مشخصات تجزیه‌ای

به منظور اعتبارسنجی روش به کار رفته برای آنالیز اسیدهای چرب در این تحقیق، پس از ترسیم نمودار

آنالیت‌های استخراج شده در هگزان (Merck, Germany) به دستگاه کروماتوگرافی گازی تزریق گردید. همه نتایج نسبت به پیک استاندارد داخلی سنجیده شدند، به طوری که سطح زیر منحنی هر پیک به سطح زیر منحنی استاندارد داخلی تقسیم شده و نسبت آن‌ها گزارش شد. در این روش از محلول ۱۰۰۰

شرط برابری واریانس‌ها برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون گیمز- هول (Games-Howell) استفاده شد. مقادیر $p < 0/05$ معنی‌دار در نظر گرفته شد. برای رسم نمودارها نیز از نرم‌افزار Excel, 2007 استفاده شد.

یافته‌ها

- نتایج بهینه‌سازی عوامل مؤثر در استخراج استرونها -
- نوع حلال

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

معیارگیری یا منحنی کالیبراسیون، حد تشخیص (LOD)، حد اندازه‌گیری (LOQ) و تکرارپذیری 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 استرونها 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 استرونها برقرار نیست. از این رو به‌جای آزمون معمولی فیشر از آزمون ولچ (Welch) استفاده شد. با توجه به عدم برقراری

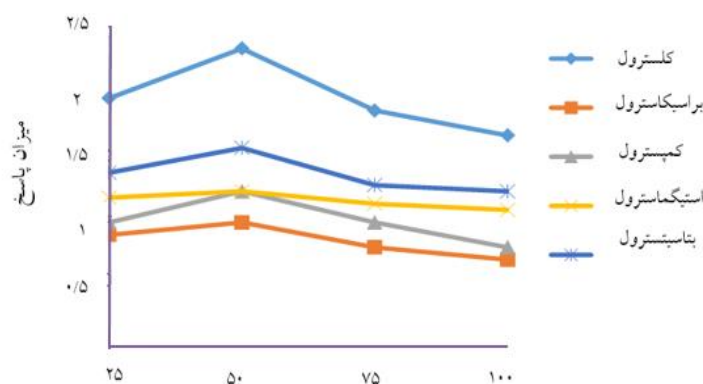


نمودار (۱) - بررسی نوع حلال در استخراج استرونها از ماست

استخراج بیشتر آنالیت‌ها و کاهش آن پس از ۵۰ میلی‌لیتر مربوط به رقیق شدن آنالیت‌ها می‌باشد. از این رو ۵۰ میلی‌لیتر به‌عنوان حجم بهینه برای حلال استخراج کننده انتخاب شد.

- 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 می‌یابند. افزایش سیگنال‌های تجزیه‌ای تا ۵۰ میلی‌لیتر مربوط به

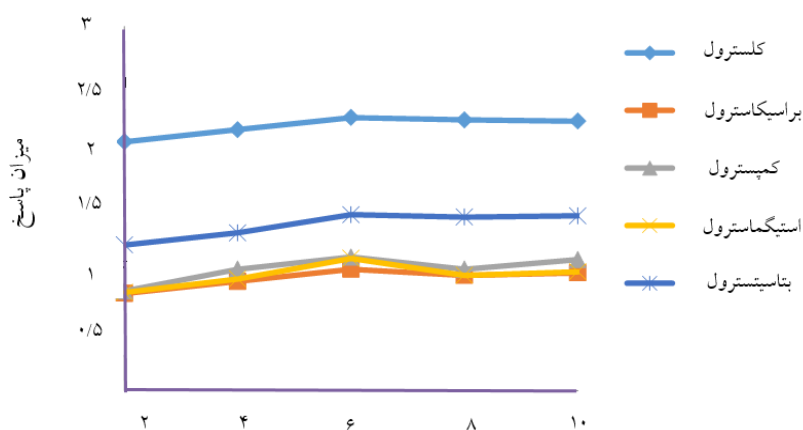


نمودار (۲) - انتخاب حجم حلال (میلی‌لیتر) در استخراج استرول‌ها از ماست

- غلظت عامل هیدرولیز کننده

می‌ماند از این رو غلظت ۶ درصد به‌عنوان بهینه برای معرف هیدرولیز کننده انتخاب شد.

مطابق نمودار (۳)، نسبت پیک آنالیت‌ها به پیک استاندارد داخلی با افزایش غلظت پتاس متانولی تا ۶ درصد (w/v) افزایش یافته و پس از آن ثابت باقی

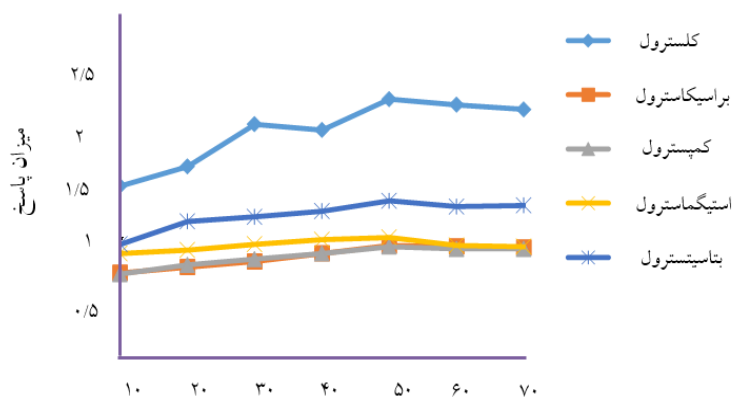


نمودار (۳) - بهینه‌سازی درصد پتاس در استخراج استرول‌ها از ماست

- مدت زمان واکنش هیدرولیز

به‌عنوان مدت زمان لازم برای فرآیند هیدرولیز انتخاب شد. نتایج در نمودار (۴) نشان داده شده است.

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

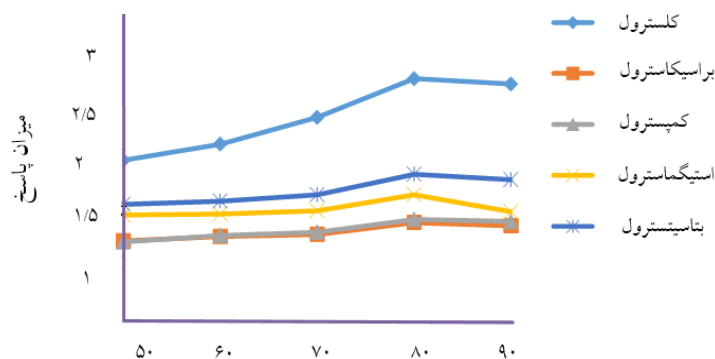


نمودار (۴) - بهینه‌سازی مدت زمان (دقیقه) هیدرولیز در استخراج استرونها از ماست

- 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 استرونها 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، ۶/۰، 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 $S/N = 3$ و $S/N = 10$ می‌باشند. به‌منظور بررسی تکرارپذیری و دقت روش از انحراف استاندارد نسبی (RSD%) استفاده گردید. برای این منظور ۶ 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 ۷/۴ به دست 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 فیتواسترول‌ها از ماست

نام استرول	حد تشخیص (µg/l)	حد اندازه‌گیری (µg/l)	مجدور ضریب همبستگی	انحراف استاندارد نسبی (%) n=6	راندمان استخراج ± انحراف استاندارد n=3
کلسترول	۲/۳	۷/۲	۰/۹۹۸	۳/۵	۹۴±۳
براسیکااسترول	۵/۹	۱۸/۴	۰/۹۹۷	۴/۸	۶۷±۳
کمپسترول	۷/۸	۲/۲۳	۰/۹۹۷	۵/۲	۹۲±۴
استیگمااسترول	۷/۲	۲۲/۱	۰/۹۹۶	۶/۲	۹۳±۴
بتا سیتسترول	۴/۹	۱/۱۶	۰/۹۹۹	۷/۴	۸۴±۳

استرول‌های مورد مطالعه اسپایک شد و با روش پیشنهادی استخراج و مقادیر آنالیت‌های به دست 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.

با توجه به این که ماست حاوی لاکتوز، پروتئین و چربی می‌باشد و ممکن است ماتریکس نمونه در اندازه‌گیری استرول‌ها تداخل ایجاد کند، از این رو 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

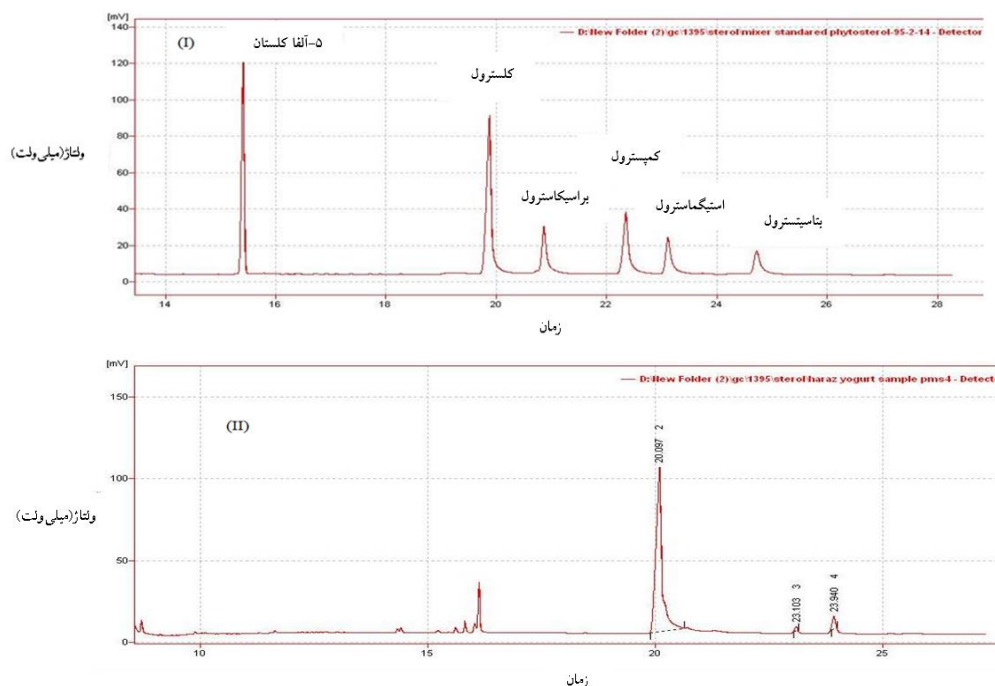
جدول (۳) - بررسی اثر ماتریکس در استخراج فیتواسترول‌ها از ماست

نام استرول	درصد اسپایک شده	درصد به دست آمده	فاکتور تصحیح
کلسترول	۵۵	۵۳/۵	۲/۷
براسیکااسترول	۱۵	۱۲/۸	۱۴/۶
کمپسترول	۱۰	۸/۶	۱۴
استیگمااسترول	۱۰	۹/۱	۹
بتا سیتسترول	۱۰	۸/۹	۱۱

مورد مطالعه در انواع ماست در جدول (۴) ارائه شده است.

- استرول‌های موجود در نمونه‌های ماست

کروماتوگرام استرول‌های موجود در یک نمونه است در نمودار (۶) و میانگین درصد وزنی استرول‌های



نمودار (۶)- کروماتوگرام GC-FID، (I) حاصل از تزریق مستقیم نمونه استاندارد و (II) یک نمونه ماست

جدول (۴)- درصد وزنی (میانگین \pm انحراف معیار) استرول‌های مورد مطالعه در انواع ماست

نوع استرول	انواع ماست		
	سنتی	خامه‌ای	پرچرب
کلسترول	۹۹ \pm ۰	۸۹/۸۰ \pm ۱۰/۴۷	۸۸/۱۰ \pm ۸/۵۷
براسیکااسترول*	۰ \pm ۰ ^a	۱/۶۳ \pm ۱/۰۹ ^b	۲/۲۷ \pm ۱/۶۰ ^b
کامپسترول	۰ \pm ۰	۴/۳۴ \pm ۴۶/۴	۶/۲۶ \pm ۵/۰۳
استیگمااسترول	۰ \pm ۰	۲/۲۲ \pm ۳/۴۷	۱/۹۴ \pm ۲/۳۰
بتا سیتسترول	۰ \pm ۰	۱/۲۸ \pm ۳/۲۳	۱/۳۳ \pm ۲/۳۲

* فقط میانگین مقادیر براسیکااسترول در انواع ماست دارای اختلاف معنی‌دار ($P < 0/05$) بود که با حروف غیر مشابه نشان داده شده است.

بحث و نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر از روش استخراج مایع-مایع برای استخراج، اندازه‌گیری و شناسایی استرول‌ها از نمونه‌های مختلف ماست استفاده گردید. روش پیشنهاد شده به دلیل حذف مرحله مشتق‌سازی سریع بوده و طبق نتایج جدول (۲)، جزو روش‌های تکرارپذیر ($3/5-7/4$) می‌باشد. این پارامتر تجزیه‌ای در روش‌های دیگر اندازه‌گیری استرول‌ها در ماست $4/4$ تا $4/9$ گزارش شده است (Santos *et al.* 2007; Saraiva *et al.* 2011). هم‌چنین روش مورد استفاده دارای دقت بالایی در استخراج استرول‌ها از نمونه ماست است (۸۶ درصد) که نزدیک به نتایج مطالعات مشابه انجام گرفته با $91/5$ درصد راندمان استخراج می‌باشد (Santos *et al.* 2011; Saraiva *et al.* 2007).

همان‌طور که در جدول (۴) نشان داده شده است، کلسترول عمده‌ترین ($89/83$ درصد) ترکیب استرولی 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 ($P < 0/05$). 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 97 درصد بوده است. لذا می‌توان حداقل به‌عنوان یک مرحله مقدماتی و با هدف غربال‌کردن نمونه‌های ماست

از این نظر، تنها مقدار کلسترول آن‌ها را مورد توجه قرار داد.

در بین استرول‌های گیاهی مورد مطالعه، بیش‌ترین مقدار به کمپسترول ($4/70$ درصد) و پس از آن به براسیکااسترول ($2/08$ درصد) اختصاص دارد، در حالی‌که در مطالعات دیگر محققین سیتواسترول به‌عنوان استرول گیاهی غالب در مواد غذایی گزارش شده است (Domeno *et al.* 2005; Piironen *et al.* 2002).

در بسیاری از نقاط دنیا از افزودن استرول‌های گیاهی به مواد غذایی مختلف به‌منظور کاهش کلسترول خون و کاهش خطر بیماری‌های قلبی-عروقی استفاده می‌شود (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 کلسترول 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 است (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 استاندارد کردن چربی شیر مورد استفاده در ماست‌سازی، خامه و روغن کره است و مقدار بیشینه درصد استرول‌های گیاهی از کل ترکیبات استرولی در این دو فرآورده نیز 3 است، لذا در ماست حداکثر مجاز مجموع فیتواسترول‌ها نباید بالاتر از 3 درصد باشد (ISIRI, 162/2016; ISIRI, 191/2016; ISIRI, 695/2008). بر این اساس 13 نمونه از ماست‌های

سپاسگزاری

بدین وسیله 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 منافی برای اعلام ندارند.

کم‌چرب (۷۶/۴ درصد)، ۱۴ نمونه از ماست‌های خامه‌ای (۷۳/۶ درصد) و ۱۹ نمونه از ماست‌های پرچرب (۹۰/۴ درصد) غیرمجاز تشخیص داده شد، در حالی که 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.

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(2-3): 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(2): 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(8): 1576-1583.
- Duong, S., Strobel, N., Buddhadasa, S., Stockham, K., Auldish, 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 (ISIRI) (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. (ISIRI) (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. (ISIRI) (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., Garcia-Llatas, G. and Farre, R. (2006). Analysis of phytosterols in foods (Review). *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41(5): 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(6): 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(1): 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(1): 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 Analytical Methods*, 4(1): 28–34.
- Tamime, A.Y. and Deeth, H. (1980). Yogurt: Technology and biochemistry. *Journal of Food Protection*, 43(12): 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(1): 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: 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