

تعیین سینیتیک تجزیه آسپارتام در شربت آلبالوی رژیمی با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی زیاد

هومان مولوی*^۱، جواد کرامت^۲

^۱مری گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهرکرد، شهرکرد، ایران.
^۲دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۸/۱۲ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۱/۱۱/۲۴

چکیده

در سالیان اخیر به دلایل چاقی و بیماری‌های وابسته، نوشابه‌های بدون الکل کم انرژی که با استفاده از شیرین کننده‌های پر قدرت تهیه می‌شوند، بسیار مورد توجه بوده‌اند. در این پژوهش جهت تهیه‌ی شربت‌های رژیمی، کل شکر مورد استفاده در فرمولاسیون شربت شاهد حذف گردید و به جای آن به عنوان ماده حجم دهنده از پکتین و به عنوان شیرین کننده از آسپارتام و آسه سولفام پتاسیم استفاده شد. برای بررسی فرمولاسیون‌های منتخب، این شربت‌ها در دو دما (دمای محیط و دمای ۴۰ درجه سانتی گراد) به مدت چهار ماه قرار گرفتند. میزان تجزیه آسپارتام با استفاده از HPLC اندازه گیری و سینیتیک تجزیه آن تعیین گردید. نتایج نشان داد که زمان و دما بر میزان آسپارتام اثر معنی‌دار داشت ($p < 0.001$) ولی فرمول (نوع شربت) اثر معنی‌دار نداشت. برای محاسبه ثابت سرعت تجزیه آسپارتام از معادله واکنش درجه اول استفاده شد. ثابت‌های سرعت محاسبه شده برای شربت‌های رژیمی نگهداری شده در دمای محیط حدود ۰/۱ و در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد حدود ۰/۳ بود. هم‌چنین میزان نیمه عمر تجزیه آسپارتام در دمای محیط حدود ۵ ماه و در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد حدود ۲ ماه بود. بنابراین میزان آسپارتام باقی مانده در محصول تابعی است از دما، زمان و شرایط محیطی که آسپارتام در آن قرار گرفته است. در دماهای بالا میزان مقبولیت محصول به واسطه تجزیه آسپارتام، کاهش می‌یابد لذا آسپارتام برای استفاده در شربت آلبالو در دماهای بالا پیشنهاد نمی‌شود ولی می‌توان از آن در دماهای حدود دمای محیط در فرمولاسیون شربت رژیمی آلبالو استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: آسپارتام، سینیتیک تجزیه، شربت رژیمی، کروماتوگرافی مایع با کارایی زیاد.

۱- مقدمه

رژیم‌های غذایی پرکالری به همراه عدم فعالیت فیزیکی کافی می‌تواند به افزایش وزن و نهایتاً به بیماری‌هایی نظیر دیابت غیر وابسته به انسولین، فشار خون، بیماری قلبی عروقی، سنگ کیسه صفرا و سرطان رحم منجر شود (۱۳، ۲۲ و ۲۳). در سالیان اخیر بیشترین توجه در مورد نوشابه‌های بدون الکل کم‌انرژی بوده است که با استفاده از شیرین‌کننده‌های پر قدرت تهیه می‌شوند (۶). از دهه هشتاد میلادی تمایل به افزایش میزان استفاده از آسپارتام در نوشابه‌ها بیشتر شد که دلایل عمده آن کیفیت شیرینی و قابلیت هم‌افزایی آن با دیگر شیرین‌کننده‌ها بود. آسپارتام یک مشتق دی‌پتید است که شیرینی ۲۵۰-۱۸۰ برابر ساکارز داشته و بی‌شک یکی از موفق‌ترین شیرین‌کننده‌های پر قدرت در محصولات رژیمی جدید می‌باشد (۱۹). تحقیقات نشان داد که نگرانی‌های اولیه درباره ایمنی آسپارتام بی‌اساس بوده است. بر طبق گزارشات متخصصین FDA هیچ مدرک علمی که نشان‌دهنده‌ی ارتباط بین آسپارتام و هر نوع سرطان باشد، وجود ندارد (۱۵). در سال ۲۰۰۵ محققین مؤسسه اروپایی رامازینی نتیجه گرفتند که آسپارتام موجب سرطان خون و لیمفوما می‌گردد (۲۷). پس از بازمی‌داده‌ها، اداره سلامت غذایی اروپا اعلام نمود که نتایج مؤسسه رامازینی پشتوانه اطلاعاتی ندارد (۱۵). آسپارتام در شرایط مرطوب نسبت به حرارت مقاوم نبوده و دست خوش هیدرولیز می‌گردد. میزان تخریب بستگی به میزان رطوبت، درجه حرارت و pH دارد. بیشینه پایداری آن در pH برابر ۴/۲ است و در محدوده pH خارج از ۵/۵-۲/۵، شیرینی به سرعت از بین می‌رود. برای محصولاتی که pH آن‌ها در محدوده پایداری آسپارتام قرار دارد، می‌توان از آن به عنوان یک شیرین‌کننده مناسب، بدون کاهش معنی‌دار در میزان شیرینی استفاده کرد (۲۴). پایداری آسپارتام به سیستمی بستگی دارد که در آن مورد استفاده قرار می‌گیرد. برخی محدودیت‌ها بر روی پایداری آسپارتام ناشی از ماهیت شیمیایی آن به عنوان متیل‌استر دی‌پتید آسپارتیل فنیل آلانین می‌باشد. این پیوند تحت شرایط خاص ممکن است هیدرولیز شود. هیچ کدام از محصولات هیدرولیز شیرین نمی‌باشد ولی بر اثر هیدرولیز فقط کاهش شیرینی درک می‌شود و بدطعمی ایجاد نمی‌شود (۱۷). مانند اکثر واکنش‌های شیمیایی، هیدرولیز و حلقوی شدن آسپارتام در دماهای بالا با سرعت بیشتری اتفاق می‌افتد. این تغییرات، استفاده از آسپارتام را در محصولاتی که تحت فرایندهای با دمای

بالا و زمان‌های طولانی قرار می‌گیرند محدود می‌کند (۹). پایداری آسپارتام در حالت خشک کاملاً مناسب است (۱۷). عمر نگهداری محصول حاوی آسپارتام بستگی زیادی به دمای انبارداری دارد. برای مثال pH بستنی خارج از محدوده پایداری آسپارتام می‌باشد ولی به علت حالت فیزیکی منجمد محصول، سرعت واکنش به شدت کاهش پیدا می‌کند (۲۴). آسپارتام به علت ناپایداری و هم‌چنین مسائل اقتصادی معمولاً در ترکیب با دیگر شیرین‌کننده‌ها به کار می‌رود (۳۰). شیرین‌کننده مصنوعی مهم دیگر، آسه‌سولفام پتاسیم است. پس طعم فلزی آسه‌سولفام پتاسیم استفاده از آن را به تنهایی محدود می‌کند. یک خصوصیت مهم آسه‌سولفام پتاسیم هم‌افزایی آن با دیگر شیرین‌کننده‌ها و نیز پایداری حرارتی بالای آن می‌باشد (۱۹). یافته‌ها نشان داده است که این شیرین‌کننده هنگامی که با آسپارتام یا ساکارز مخلوط می‌شود اثر هم‌افزایی مثبت دارند. علاوه بر این، آسه‌سولفام پتاسیم به طور قابل توجهی ارزان‌تر از آسپارتام است و جهت کاهش هزینه‌ی تولید استفاده می‌شود (۱۶). آسه‌سولفام پتاسیم به طور تصادفی در سال ۱۹۶۰ کشف شد. شیرینی نسبی آن حدود ۲۰۰-۱۸۰ برابر ساکارز است (۲۱). FDA و JECFA^۱ این شیرین‌کننده را ایمن ارزیابی کرده‌اند (۱۴ و ۱۵). اگر در یک نوشیدنی بخشی یا تمام قندها با شیرین‌کننده‌های پر قدرت جایگزین شود، میزان اضافه شدن این شیرین‌کننده‌ها باید صحیح و کنترل شده باشد (۳۲). در برخی از روش‌های اندازه‌گیری شیرین‌کننده‌ها، تعدادی از نگه‌دارنده‌ها نیز اندازه‌گیری می‌شوند؛ مانند روش ویلامز (۳۱) که در این روش تعدادی از رنگ‌ها، شیرین‌کننده‌ها و نگه‌دارنده‌ها در کمتر از ۵ دقیقه جداسازی می‌شوند. روش اختصاصی دیگر روش لاورنس و چارونو (۲۰) می‌باشد که در این روش از HPLC فاز معکوس با سیستم بافر فسفات-استونتریل و به صورت گرادینت استفاده می‌شود. سانگ و همکاران (۲۸) از روش جداسازی فاز معکوس برای اندازه‌گیری آسپارتام استفاده کردند در حالیکه آرگودلیس (۵) از سیستم تعویض کاتیونی قوی استفاده کرد و استامپ و لابوزا (۲۶) دستور کار HPLC فاز معکوس زوج یون به صورت ایزوکراتیک را ارائه کردند. در این تحقیق ساکارز با شیرین‌کننده‌های آسه‌سولفام پتاسیم و آسپارتام در شربت آلبالو برای تولید یک محصول رژیمی جایگزین گردید و میزان تجزیه آسپارتام در

¹ The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives

یک به یک از این دو شیرین کننده استفاده شد که بر این اساس ۳۶ نوع فرمولاسیون مطابق جدول ۱ تهیه گردید. کلیه شربت‌ها به ترتیب دارای ۲۵۰ و ۱۵۰ میلی گرم در لیتر سوربات و بنزوات به عنوان نگه‌دارنده بودند.

ارزیابی حسی ۳۶ فرمول فوق با روش مقیاس نه طبقه‌ای نشان داد که فرمولاسیون‌هایی که تفاوت معنی دار با شاهد نداشتند، فرمول‌های شماره ۱۲، ۲۱ و ۳۰ بودند که همگی دارای ۰/۴ درصد آسپارتام و به ترتیب ۰/۴، ۰/۸ و ۱/۲ پکتین می‌باشند. بنابر این از این سه فرمول منتخب برای ادامه تحقیق و بررسی میزان تجزیه آسپارتام در حین انبارداری استفاده گردید. برای این منظور این شربت‌ها در دو دما (دمای ۲۵ درجه سانتی گراد یا دمای محیط و ۴۰ درجه سانتی گراد) به مدت چهار ماه قرار گرفتند.

۲-۴-۴- آزمایشات فیزیکی و شیمیایی کنسانتره و شربت آلبالو

اندازه‌گیری خاکستر کل، pH، اسیدیته، مواد جامد محلول در آب (بریکس)، دانسیته (با استفاده از روش پیکنومتری)، قند (با استفاده از روش فهلینگ) و خاکستر کنسانتره و شربت آلبالو مطابق با استاندارد انجام شد (۱، ۲ و ۱۱).

۲-۵-۵- اندازه‌گیری میزان تجزیه آسپارتام در دوره نگهداری

اندازه‌گیری میزان آسپارتام و تجزیه آن در دوره انبارداری با استفاده از روش لاورنس و چارنونو با کمی تغییر انجام شد (۲۰).

۲-۵-۱- آماده‌سازی حلال متحرک

بدین منظور از پتاسیم دی هیدروژن فسفات ۰/۰۲ مولار و استونیتریل به نسبت ۹۷ به ۳ استفاده شد که توسط آب بدون یون تهیه گردید. سپس توسط فیلتر ۵ میکرون میلی پور صاف گردید و به مدت ۲۰ دقیقه با پمپ خلأ کاملاً هواگیری شد.

۲-۵-۲- آماده‌سازی نمونه

میزان ۰/۵ گرم از شربت‌های رژیمی نمونه با استفاده از آب بدون یون به حجم ۵۰ میلی لیتر رسانده شد، پس از صاف کردن با فیلتر ۰/۴۵ میکرون میلی پور، میزان ۵ میکرو لیتر به دستگاه تزریق شد.

حین انبارداری، اندازه‌گیری و در نهایت سینیتیک تجزیه آن تعیین گردید.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- دستگاه‌های مورد استفاده

دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا ساخت کمپانی شیمادزو ژاپن، مجهز به سیستم تزریق دستی با لوپ ۲۰ میکرو لیتر و والو رتودین، پمپ از نوع LC-6A (شیمادزو)، آون ستون از نوع CTO-6A (شیمادزو)، شناساگر SPD-6AV (شیمادزو) شامل شناساگرهای مرئی، ماوراء بنفش و اندیس شکست، سیستم کنترل SCL-6A (شیمادزو)، کروماتوپک C-R4A (شیمادزو) و ستون ODS با ابعاد ۲۵۰×۴/۶ میلی متر، دارای محافظ ستون ODS با ابعاد ۱۰×۴/۶ میلی متر مورد استفاده قرار گرفت. سایر تجهیزات مواد استفاده شامل ترازوی حساس شیمادزو با دقت ۰/۰۰۰۱ گرم ساخت کشور ژاپن و رفراکتومتر رومیزی اب^۱ ساخت کشور آلمان بود.

۲-۲- مواد مورد استفاده

مواد مورد استفاده در این تحقیق شامل کنسانتره آب آلبالو تهیه شده از کارخانه شهد کوه‌رنگ شهرکرد، شکر تجارتي، آسپارتام و آسه‌سولفام پتاسیم تجارتي تولید شرکت آجینوموتو ژاپن، آسپارتام استاندارد تولید شرکت ساپلکو^۲، پکتین تجارتي تولید شرکت هرکولز جنو کوپنهاگ^۳، اسیدسیتریک تولید شرکت مرک آلمان بود.

۲-۳- فرمولاسیون شربت حاوی شکر (شاهد) و شربت‌های رژیمی

شربت حاوی شکر مطابق با استاندارد شماره ۱۸۱۲ فرموله شد. میزان و ترکیبات مورد استفاده جهت فرمولاسیون شامل ۹ درصد کنسانتره آلبالو، ۰/۴ درصد اسیدسیتریک، ۶۳/۸ درصد شکر و ۲۶/۸ درصد آب بود. جهت تهیه‌ی شربت‌های رژیمی، کل شکر مورد استفاده در فرمولاسیون شربت شاهد حذف گردید و به جای آن به عنوان ماده حجم دهنده^۴ از پکتین و به عنوان شیرین کننده از آسپارتام و آسه‌سولفام پتاسیم هر یک به تنهایی و همچنین مخلوط

1- Abbe
2- Supelco
3- Hercules jenu Copenhagen
4- Bulking agent

جدول ۱- میزان شیرین کننده‌های به کار رفته در انواع فرمولاسیون شربت‌های رژیمی آلبالو

| شماره فرمول | ٪ پکتین | ٪ آسولفام | ٪ اسپارتام | شماره فرمول | ٪ پکتین | ٪ آسولفام | ٪ اسپارتام | شماره فرمول | ٪ پکتین | ٪ آسولفام | ٪ اسپارتام | شماره فرمول | ٪ پکتین | ٪ آسولفام | ٪ اسپارتام |
|-------------|---------|-----------|------------|-------------|---------|-----------|------------|-------------|---------|-----------|------------|-------------|---------|-----------|------------|
| ۱ | ۰/۰ | ۰/۰ | ۰/۲ | ۱۹ | ۰/۸ | ۰/۰ | ۰/۲ | ۲۸ | ۰/۲ | ۰/۰ | ۰/۲ | ۱۰ | ۰/۴ | ۰/۰ | ۰/۲ |
| ۲ | ۰/۰ | ۰/۰ | ۰/۲ | ۲۰ | ۰/۸ | ۰/۰ | ۰/۳ | ۲۹ | ۰/۳ | ۰/۰ | ۰/۳ | ۱۱ | ۰/۴ | ۰/۰ | ۰/۳ |
| ۳ | ۰/۰ | ۰/۰ | ۰/۲ | ۲۱ | ۰/۸ | ۰/۰ | ۰/۴ | ۳۰ | ۰/۴ | ۰/۰ | ۰/۴ | ۱۲ | ۰/۴ | ۰/۰ | ۰/۴ |
| ۴ | ۰/۰ | ۰/۲ | ۰/۲ | ۲۲ | ۰/۸ | ۰/۲ | ۰/۲ | ۳۱ | ۰/۲ | ۰/۲ | ۰/۲ | ۱۳ | ۰/۴ | ۰/۲ | ۰/۲ |
| ۵ | ۰/۰ | ۰/۳ | ۰/۲ | ۲۳ | ۰/۸ | ۰/۳ | ۰/۳ | ۳۲ | ۰/۳ | ۰/۳ | ۰/۳ | ۱۴ | ۰/۴ | ۰/۳ | ۰/۳ |
| ۶ | ۰/۰ | ۰/۴ | ۰/۲ | ۲۴ | ۰/۸ | ۰/۴ | ۰/۴ | ۳۳ | ۰/۴ | ۰/۴ | ۰/۴ | ۱۵ | ۰/۴ | ۰/۴ | ۰/۴ |
| ۷ | ۰/۰ | ۰/۱ | ۰/۲ | ۲۵ | ۰/۸ | ۰/۱ | ۰/۱ | ۳۴ | ۰/۱ | ۰/۱ | ۰/۱ | ۱۶ | ۰/۴ | ۰/۱ | ۰/۱ |
| ۸ | ۰/۰ | ۰/۱۵ | ۰/۲ | ۲۶ | ۰/۸ | ۰/۱۵ | ۰/۱۵ | ۳۵ | ۰/۱۵ | ۰/۱۵ | ۰/۱۵ | ۱۷ | ۰/۴ | ۰/۱۵ | ۰/۱۵ |
| ۹ | ۰/۰ | ۰/۲ | ۰/۲ | ۲۷ | ۰/۸ | ۰/۲ | ۰/۲ | ۳۶ | ۰/۲ | ۰/۲ | ۰/۲ | ۱۸ | ۰/۴ | ۰/۲ | ۰/۲ |

جدول ۲- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی کنسانتره آلبالو در مقایسه با استاندارد شماره ۵۵۲۸ ایران.

| توضیحات | مقدار تعیین شده توسط استاندارد | مقدار محاسبه شده * | آزمایش |
|---|-----------------------------------|-----------------------|---------------------|
| - | ۲/۵-۴ | ۳/۱±۰/۲ | pH |
| گرم در صد گرم نمونه بر حسب اسید مالیک | ۵-۱۲ | ۵/۷۱±۰/۴۴ | اسیدیته |
| درجه بریکس در ۲۰ درجه سانتی گراد | حد اقل ۶۳ | ۶۴/۴±۰/۴ | ماده جامد محلول |
| گرم بر سانتی متر مکعب در ۲۰ درجه سانتی گراد | ۱/۳۱۵±۰/۰۱۵ | ۱/۳۲۹۳±۰/۰۰۲۱ | دانسیته |
| گرم در صد گرم نمونه | ۱/۵-۳ | ۱/۸۲±۰/۲۷ | خاکستر کل |
| گرم در صد گرم نمونه | حد اقل ۲۵ | ۵۶/۳±۳/۱ | قند های احیاء کننده |

*مقادیر محاسبه شده میانگین ۵ تکرار می‌باشند.

جدول ۳- خصوصیات فیزیکی و شیمیایی شربت‌ها در مقایسه با استاندارد شماره ۱۸۱۲ ایران.

| توضیحات | مقادیر محاسبه شده * | | | | استاندارد ۱۸۱۲ | آزمایش |
|--|---------------------|--------------|---------------|---------------|-------------------|-----------------|
| | شربت ۴ | شربت ۳ | شربت ۲ | شربت ۱* | | |
| - | ۳/۵±۰/۱ | ۳/۶±۰/۱ | ۳/۵±۰/۱ | ۳/۵±۰/۱ | حد اکثر ۳/۶ | pH |
| گرم در صد گرم نمونه بر حسب اسید سیتریک | ۰/۸۵±۰/۱۵ | ۰/۸۶±۰/۰۶ | ۰/۸۵±۰/۰۶ | ۰/۸۷±۰/۱۱ | حد اقل ۰/۶ | اسیدیته |
| درجه بریکس در ۲۰ درجه سانتی گراد | ۶۹±۰/۳ | ۷/۷±۰/۵ | ۷/۳±۰/۲ | ۷/۲±۰/۲ | حد اقل ۶۵ | ماده جامد محلول |
| گرم در صد گرم نمونه | ۰/۳۳±۰/۲۰ | ۰/۲۱±۰/۱۵ | ۰/۱۸±۰/۰۳ | ۰/۱۷±۰/۱۷ | حد اکثر ۰/۵ | خاکستر کل |
| گرم در صد گرم نمونه | ۶۶/۲±۲/۳ | ۵/۲±۱/۵ | ۵/۳±۲/۰ | ۵/۰±۱/۲ | حد اقل ۶۰ | قند کل |
| گرم بر سانتی متر مکعب در ۲۰ درجه سانتی گراد | ۱/۳۷۵۱±۰/۰۰۳۳ | ۱/۰۴۱۱±۰/۰۰۸ | ۱/۰۳۶۵±۰/۰۰۱۰ | ۱/۰۳۲۳±۰/۰۰۰۷ | - | دانسیته |

*مقادیر محاسبه شده میانگین ۵ تکرار می‌باشند.

* شربت ۱، ۲ و ۳ به ترتیب حاوی ۰/۴، ۰/۸ و ۱/۲ درصد پکتین و ۰/۴ درصد اسپارتام می‌باشند. شربت ۴ شاهد بوده و حاوی ساکارز می‌باشد.

ایران می‌باشد. شربت‌های رژیمی فرموله شده به علت حذف کامل ساکارز دارای ماده جامد محلول بسیار کمتر از شربت شاهد می‌باشند.

به دلیل این که مقدار pH نقش بسیار مهمی در میزان ثبات یا تجزیه آسپارتام دارد، pH هر یک از نمونه‌ها در طول دوره انبارداری اندازه‌گیری شد. نتایج نشان داد که pH و اسیدیته نمونه‌ها در طول ۴ ماه انبارداری تقریباً ثابت بود.

۲-۳- نتایج حاصل از اندازه‌گیری میزان تجزیه آسپارتام در دوره نگهداری

آسپارتام با روش ذکر شده در زمان ۷/۶ دقیقه جداسازی گردید. نتایج تجزیه واریانس اندازه‌گیری میزان آسپارتام در مورد شربت‌های رژیمی در دوره نگهداری نشان داد زمان و دما در سطح ۰/۱ درصد بر میزان آسپارتام اثر معنی‌دار داشته‌اند ولی فرمول (نوع شربت) اثر معنی‌دار بر میزان آسپارتام نمونه‌ها نداشته است. آزمون مقایسه میانگین دانکن در سطح احتمال ۵ درصد در مورد دما و زمان و چگونگی تأثیر این پارامترها انجام شد (جدول ۴ و ۵). نتایج نشان داد دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد نسبت به دمای محیط موجب کاهش معنی‌دار میزان آسپارتام شد. افزایش زمان نیز موجب کاهش معنی‌دار میزان آسپارتام نمونه‌ها گردید ولی درصدهای مختلف پکتین بر میزان آسپارتام اثر معنی‌دار نداشتند. نتایج حاصل از مقایسه میانگین میزان آسپارتام با استفاده از آزمون دانکن در سطح احتمال ۵ درصد نشان داد در دمای محیط (جدول ۶) و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد (جدول ۷) افزایش زمان موجب کاهش معنی‌دار میزان آسپارتام گردید.

جدول ۴- نتایج مقایسه میانگین میزان آسپارتام شربت‌های

رژیمی تحت تأثیر دما

| دما | میانگین میزان آسپارتام (درصد وزنی حجمی) |
|--------------------|---|
| دمای محیط | 0.279 ± 0.036^a |
| ۴۰ درجه سانتی‌گراد | 0.181 ± 0.067^b |

اختلاف میانگین‌های دارای حروف غیر مشترک با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد معنی‌دار است.

۲-۵-۳- شرایط دستگاه کروماتوگرافی

درجه حرارت ستون 40°C و سیستم مورد استفاده ایزوکراتیک بود. سرعت عبور حلال در ستون ۱ میلی‌لیتر در دقیقه انتخاب شد و طول موج شناساگر در ۲۱۰ نانومتر تنظیم شد.

۲-۵-۴- رسم منحنی استاندارد برای تعیین کمیت آسپارتام

منحنی استاندارد آسپارتام بدین ترتیب رسم گردید که پنج غلظت ۵، ۱۰، ۲۰، ۳۰ و ۴۰ پی‌پی‌ام از آسپارتام توسط آب بدون یون تهیه شد و به میزان ۵ میکرو لیتر از هر کدام به دستگاه تزریق و منحنی استاندارد رسم گردید.

۲-۵-۵- تعیین راندمان

برای تعیین راندمان روش و دستگاه در اندازه‌گیری آسپارتام، شربت رژیمی با استفاده از آسپارتام خالص تهیه شد و همانند نمونه رقیق سازی و پس از صاف کردن به دستگاه تزریق شد (۴ و ۱۰).

۲-۶- تجزیه و تحلیل آماری

آزمایش اندازه‌گیری آسپارتام جهت تعیین میزان تجزیه آسپارتام در دوره نگهداری با استفاده از آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی $2 \times 3 \times 4$ با ۳ تکرار انجام شد که اثر ۳ سطح شربت (شربت‌های رژیمی حاوی ۰/۴، ۰/۸ و ۱/۲ درصد پکتین)، ۴ سطح زمان (۱، ۲، ۳ و ۴ ماه) و ۲ سطح دما (دمای محیط و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد) بررسی شد. تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از نرم افزار SAS v8 تحت رویه GLM انجام شد (۳).

۳- نتایج و بحث

۳-۱- نتایج آزمایشات فیزیکی و شیمیایی کنسانتره و شربت آلبالو

نتایج حاصل از اندازه‌گیری pH، اسیدیته، بریکس، دانسیته، خاکستر و قند در مورد کنسانتره و شربت آلبالو و مقایسه نتایج با استانداردهای مربوطه در جدول ۲ و ۳ مشاهده می‌شود. همان‌طور که از جدول ۲ مشخص است نمونه کنسانتره مورد استفاده منطبق بر ضوابط تدوین شده توسط موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران شماره ۵۵۲۸ بود و مطابق با جدول شماره ۳ نیز شربت فرموله شده در این پروژه (شربت شاهد) مطابق با استاندارد شماره ۱۸۱۲

بل و وتزل (۸) در تحقیقات خود سرعت تجزیه آسپاراتام را در محلول‌های بافر سیترات و فسفات مورد ارزیابی قرار دادند. ثابت‌های سرعت تجزیه آسپاراتام در pH برابر ۳ کمتر از pH=۷ بود و سرعت واکنش در بافر فسفات سریع‌تر از بافر سیترات بود. از این نتایج چنین بر می‌آید که استفاده از بافر سیترات نسبت به بافر فسفات از دست رفتن آسپاراتام را کاهش می‌دهد. بنابراین، نوشابه‌های رژیمی فرموله شده با بافر سیترات ممکن است عمر نگهداری بیشتری نسبت به آنهایی که با بافر فسفات فرموله شده‌اند، داشته باشند. در مقایسه با شربت آلبالوی تهیه شده در این تحقیق با توجه به اینکه اسید مورد استفاده در فرمولاسیون آن اسید سیتریک می‌باشد، می‌توان انتظار داشت که آسپاراتام پایداری نسبتاً بهتری در این شرایط داشته باشد.

جدول ۷- نتایج مقایسه میانگین میزان آسپاراتام شربت‌های رژیمی در دمای ۴۰ °C در دوره نگهداری.

| زمان (ماه) | میانگین میزان آسپاراتام (درصد وزنی حجمی) |
|------------|--|
| ۰ | ۰/۳۸۱±۰/۰۰۸ ^a |
| ۱ | ۰/۲۷۷±۰/۰۰۴ ^b |
| ۲ | ۰/۱۹۵±۰/۰۱۲۳ ^c |
| ۳ | ۰/۱۵۸±۰/۰۰۶ ^d |
| ۴ | ۰/۰۹۶±۰/۰۰۷ ^e |

اختلاف میانگین‌های دارای حروف غیر مشترک با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد معنی‌دار است.

جدول ۸- ثابت‌های سرعت محاسبه شده برای تجزیه آسپاراتام در شربت‌های رژیمی

| فرمول | ثابت سرعت (ماه ^{-۱}) |
|---------------------|--------------------------------|
| حاوی ۰/۴ درصد پکتین | ۰/۱۱۹ ^a (۰/۹۹۲۰)* |
| حاوی ۰/۸ درصد پکتین | ۰/۱۲۳ ^a (۰/۹۹۳۹) |
| حاوی ۱/۲ درصد پکتین | ۰/۱۱۶ ^a (۰/۹۹۲۷) |

* اعداد داخل پرانتز ضرب همبستگی می‌باشند.

اختلاف میانگین‌های دارای حروف غیر مشترک با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد معنی‌دار است.

برای محاسبه ثابت سرعت تجزیه آسپاراتام از معادله واکنش درجه اول توصیف شده در تحقیقات بل و لوبوزا (۷) سوبلی و لوبوزا (۲۹) و پرودل و همکاران (۲۵) استفاده شد:

$$\ln\left\{\frac{[APM]}{[APM_0]}\right\} = -k_{obs}t$$

بنابراین لگاریتم درصد آسپاراتام باقی‌مانده نسبت به زمان یک خط مستقیم با شیب k_{obs} می‌باشد که در حقیقت ثابت سرعت می‌باشد. ثابت‌های سرعت محاسبه شده برای شربت‌های رژیمی در جدول ۸ نشان داده شده است. روند تغییرات آسپاراتام در طی انبارداری در دمای محیط و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در شکل‌های ۱ و ۲ ارائه شده است.

با تحقیقات انجام شده در این پروژه (شربت آلبالوی رژیمی) میزان نیمه‌عمر تجزیه آسپاراتام در دمای محیط حدود ۵ ماه پیش بینی شد و در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد حدود ۲ ماه تعیین شد.

جدول ۵- نتایج مقایسه میانگین میزان آسپاراتام شربت‌های رژیمی تحت تأثیر زمان

| زمان (ماه) | میانگین میزان آسپاراتام (درصد وزنی حجمی) |
|------------|--|
| ۱ | ۰/۳۰۲±۰/۰۲۷ ^a |
| ۲ | ۰/۲۴۴±۰/۰۵۲ ^b |
| ۳ | ۰/۲۰۹±۰/۰۵۲ ^c |
| ۴ | ۰/۱۶۵±۰/۰۷۲ ^d |

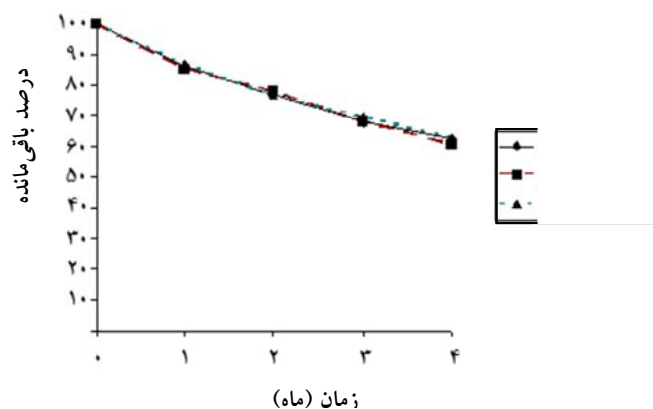
اختلاف میانگین‌های دارای حروف غیر مشترک با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد معنی‌دار است.

جدول ۶- نتایج مقایسه میانگین میزان آسپاراتام شربت‌های رژیمی در دمای محیط در دوره نگهداری

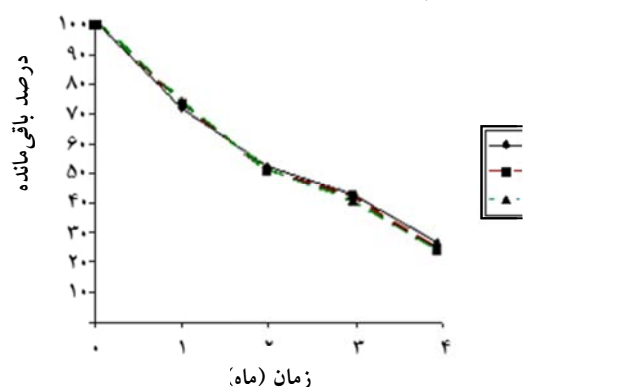
| زمان (ماه) | میانگین میزان آسپاراتام (درصد وزنی حجمی) |
|------------|--|
| ۰ | ۰/۳۸۱±۰/۰۰۸ ^a |
| ۱ | ۰/۳۲۷±۰/۰۰۸ ^b |
| ۲ | ۰/۲۹۳±۰/۰۱۰ ^c |
| ۳ | ۰/۲۶۰±۰/۰۰۴ ^d |
| ۴ | ۰/۲۳۵±۰/۰۰۵ ^e |

اختلاف میانگین‌های دارای حروف غیر مشترک با آزمون دانکن در سطح ۵ درصد معنی‌دار است.

شربت‌های آلبالوی مورد آزمایش در این تحقیق احتمالاً ال-فنیل آلانین متیل استر تولید شده است که گزارشی مبنی بر احتمال ایجاد خطر توسط آن مشاهده نگردیده است. کلر و همکاران (۱۸) نیمه عمر آسپارتام را در شیر شکلاتی استریل شده با $pH=6/74$ و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد $28/7$ روز گزارش کردند. بنابر این همان طور که انتظار می‌رود pH بالاتر پایداری آسپارتام را کاهش می‌دهد. فلوز و همکاران (۱۲) پایداری آسپارتام را در مخلوط‌های میوه‌ای مورد استفاده در ماست، بررسی کردند. pH مخلوط میوه‌ای در نوعی تمشک سیاه $3/6$ ، گیلان $4/0$ و توت فرنگی $3/7$ بود که مشابه با pH نمونه‌های تهیه شده در این تحقیق (شربت آلبالوی رژیمی) می‌باشد. افزایش دما در سطح احتمال ۵ درصد موجب ایجاد اختلاف معنی‌دار در تجزیه آسپارتام شد و در 25 درجه سانتی‌گراد ثابت سرعت تجزیه آسپارتام $0/089$ در ماه پیش‌بینی شد که نشان‌دهنده‌ی نیمه عمر به مدت $7/8$ ماه بود که بیشتر از نیمه عمر تجزیه آن در شرایط مشابه در مورد شربت آلبالوی تهیه شده در این تحقیق می‌باشد. این مسئله می‌تواند به دلیل حضور سایر ترکیبات در مخلوط‌های میوه‌ای باشد که موجب افزایش پایداری آسپارتام در آن سیستم شده‌اند. بل و لابوزا (۳۰) با تحقیق بر روی نوشیدنی‌های استریل شده‌ی طعم دار نشان دادند پایداری آسپارتام در نوشیدنی نگهداری شده در 30 درجه سانتی‌گراد بسیار کم بود و نیمه عمر آن در این نوشیدنی‌ها فقط $82/5$ ساعت بود. آن‌ها هم چنین نشان دادند که نگهداری در دمای پایین موجب افزایش پایداری آسپارتام در این نوع از نوشیدنی‌ها می‌شود. برای مثال نیمه عمر آسپارتام در نوشیدنی حاوی بافر فسفات در $pH=6/38$ که در 4 درجه سانتی‌گراد نگهداری شده بود به 53 روز افزایش پیدا کرد. هم چنین نشان داده شد که کاهش pH موجب افزایش معنی‌دار پایداری آسپارتام می‌شود. این تحقیق نیز تأکید بر این مسئله می‌باشد که در مورد شربت آلبالوی رژیمی نیمه عمر بالاتر آن مشخصاً به دلیل pH پایین‌تر می‌باشد. ضمن این که در هر دو تحقیق کاهش دما موجب افزایش پایداری آسپارتام گردیده است. خان (۱۹) گزارش کرد که در نوشیدنی‌های گازدار انبارداری شده به مدت ۶ هفته، دماهای ۲۰ و ۳۰ درجه سانتی‌گراد منجر به از دست رفتن به ترتیب ۱۶-۱۱ و ۲۸ درصد آسپارتام گردید. در این پروژه (شربت آلبالوی رژیمی) در مدت زمان مشابه (۶ هفته) در دمای



شکل ۱- روند تغییرات میزان آسپارتام شربت‌های رژیمی نگهداری شده در دمای محیط به صورت درصد باقی مانده آسپارتام بر حسب زمان



شکل ۲- روند تغییرات میزان آسپارتام شربت‌های رژیمی نگهداری شده در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به صورت درصد باقی مانده آسپارتام بر حسب زمان

سوبلی و لابوزا (۲۹) تجزیه آسپارتام را در محلول به عنوان یک تابع از غلظت و pH در نوشابه‌های بر پایه شیر مطالعه کردند. افزایش در pH و غلظت بافر باعث افزایش در سرعت از دست رفتن آسپارتام شد. در pH و غلظت بافر ثابت در دمای بالاتر سرعت تجزیه به طور معنی‌داری بیشتر بود. در غلظت بافر و درجه حرارت ثابت، سرعت تجزیه آسپارتام با افزایش pH ، افزایش یافت که نشان‌دهنده کاتالیز قلیایی آسپارتام است. نتایج حاصل از شربت آلبالوی رژیمی نیز مطابق با نتایج حاصل از این تحقیق بود. پاتانارگسون و همکاران (۲۴) تجزیه آسپارتام را در محلول‌های بافر سترات-فسفات با pH های ۲، ۴، ۶، ۷، ۸، ۱۰ و ۱۲ با استفاده از HPLC فاز معکوس بررسی کردند و نشان دادند که محصول مهم تجزیه در pH ۲ تا ۶، ال-فنیل آلانین متیل استر و در pH ۷ تا ۱۰، دی کتوپیرازین و در $pH=12$ ، ال-آسپارتیل-فنیل آلانین بود. بنابراین، بر اثر تجزیه آسپارتام در

آگریا) استان اصفهان طی انبارداری با روش کروماتوگرافی با کارایی زیاد، مجله علوم و فنون کشاورزی و منابع طبیعی، انتشارات دانشگاه صنعتی اصفهان، جلد ۵، شماره ۱، ۱۶۱-۱۷۲.

5. Argoudelis, C. J. 1984. Isocratic liquid chromatography method for the simultaneous determination of aspartame and other additives in soft drinks. *Journal of Chromatography*, 303(1): 256-262.
6. Ashurst, P. R. 1998. *Chemistry and technology of soft drinks and fruit juices*. Sheffield Academic Press.
7. Bell, L. N. and Labuza, T. P. 1991. Aspartame degradation kinetics as affected by pH in intermediate and low moisture food systems. *Journal of Food Science*, 56: 17-22.
8. Bell, L. N. and Wetzel, C. R. 1995. Aspartame degradation in solution as impacted by buffer type and concentration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 2608-2612.
9. Cloninger, M. R. and Baldwin, R. E. 1974. L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester (aspartame) as a sweetener. *Journal of Food Science*, 39: 347-349.
10. Dokhani, Sh. 1998. HPLC Analysis of organic acids in recombined Iranian fermented white cheese. *Iran Agricultural Research*, 17: 125-138.
11. Egan, R., Kirk, S., Sawyer, R. and Pearson, D. 1981. *Pearson's chemical analysis of foods*. 8th ed. Churchill Livingstone, INC.
12. Fellows, J. W. Chang, S. W. and Shazer W. H. 1991. Stability of aspartame in fruit preparations used in yogurt. *Journal of Food Science*, 56(3) : 689-691.
13. Finer, N. 2006. Medical consequences of obesity. *Medicine*, 34(12) : 510-514.
14. Food and Drug Administration. 1998. Food Additives Permitted for Direct Addition to Foods for Human Consumption: Acesulfame Potassium. *Federal Regulations*, 36(128) : 36362-36365.
15. Food and Drug Administration. 2006. FDA Statement on European Aspartame Study. Available at: <http://www.fda.gov>. (Accessed Jun. 2009).
16. Grendby, T. H. 1996. *Advances in sweeteners*. Blackie Academic and professional.
17. Homler, B. E. 1984. Properties and stability of aspartame. *Food Technology*, 38: 50-55.
18. Keller, S. E., Nash, T. C., Newberg, S. S. and Shazer W. H. 1991. The Degradation of aspartame in chocolate milk related to

محیط و دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به ترتیب حدود ۲۰-۱۵ درصد و ۴۰-۳۵ درصد از آسپارتام تجزیه شد. علت تجزیه بیشتر آسپارتام در نمونه‌های مورد آزمایش در این تحقیق می‌تواند pH بالاتر این نمونه‌ها نسبت به pH نوشابه‌های گاز دار باشد.

۴- نتیجه‌گیری

بررسی سینتیک تجزیه آسپارتام در محصول نشان داد آسپارتام پایداری نسبتاً خوبی در این سیستم (شربت آلبالوی رژیمی) داشت. همچنین نتایج نشان داد نگهداری محصول در دمای بالاتر و نیز افزایش زمان انبارداری موجب افزایش تجزیه آسپارتام می‌گردد. حذف کامل شکر و افزودن مقادیر مختلف پکتین اثر معنی‌داری بر روی میزان تجزیه آسپارتام نداشت، ولی با توجه به مقایسه ثابت‌های سرعت تجزیه آسپارتام در گزارشات علمی مختلف به نظر می‌رسد ثابت سرعت تجزیه آسپارتام تحت تأثیر ترکیباتی مانند نوع اسیدها و نیز سایر ترکیبات موجود در مواد غذایی باشد. در این تحقیق با توجه به استفاده از اسید سیتریک در فرمول، می‌توان انتظار داشت که آسپارتام پایداری نسبتاً بهتری داشته باشد. نیمه‌عمر تجزیه آسپارتام در دمای محیط حدود ۵ ماه و در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد حدود ۲ ماه محاسبه گردید. در نهایت به دلیل اینکه درصدهای مختلف پکتین مورد استفاده تفاوت معنی‌داری در تجزیه آسپارتام نداشت، به لحاظ اقتصادی فرمولی که حاوی کم‌ترین درصد پکتین بود (۰/۴ درصد پکتین همراه با ۰/۴ درصد آسپارتام) به عنوان بهترین فرمول این تحقیق انتخاب گردید.

۵- سپاس‌گزاری

از جناب آقای مهندس بهمن بهرامی به خاطر کمک‌ها و راهنمایی‌های بی‌دریغشان در این تحقیق تشکر و قدردانی می‌نمایم.

۶- منابع

۱. استاندارد ملی ایران شماره‌ی ۱۸۱۲، شربت آلبالو.
۲. استاندارد ملی ایران شماره‌ی ۵۵۲۸، آب آلبالو-ویژگی‌ها.
۳. جمال زاده، م. ا. و شارق، م. ۱۳۸۳. تحلیل‌های آماری با استفاده از تحلیل‌گر کاربردی SAS. نشر بادران.
۴. دخانی، ش. و ربیعی مطمئن، ل. ۱۳۸۰. بررسی میزان تغییر قندها و اسیدهای آلی ارقام سیب زمینی (مورن، مارفونا و

2005. Separation and simultaneous determination of four artificial sweeteners in food and beverages by ion chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1085: 143-146
19. Khan, R. 1993. *Low-calorie foods and food ingredients*. Blackie Academic and Professional, INC.
20. Lawrence, J. F. and Charbonneau, C. F. 1988. Determination of seven artificial sweeteners in diet food preparations by reverse-phase liquid chromatography with absorbance detection. *Journal of AOAC*, 71(5) : 934-937.
21. Lipinski, G. W. R. 1985. The new intense sweetener acesulfame K. *Food Chemistry*, 6(3) : 295-269.
22. Louis, J. I., Balestrieri, M. L. and Napoli, C. 2007. Nutrition, physical activity, and cardiovascular disease. *Cardiovascular Research*, 73(2) : 326-340.
23. Michael, S., Barry, J. G. and Timon, W. V. 2005. Type 2 diabetes: principles of pathogenesis and therapy. *The Lancet*, 365(9467) : 1333-1346.
24. Pattanaargson, S., Chuapradit, C. and Srisukphonraruk, S. 2001. Aspartame degradation in solutions at various pH conditions. *Journal of Food Science*, 66(6) : 808-809.
25. Prudel, M., Davidcova, E., Davidek, J. and Kminek, M. 1986. Kinetic decomposition of aspartame hydrochloride (USAL) in aqueous solutions. *Journal of Food Science*, 51(6) : 1393.
26. Stamp, J. A. and Labuza, T. P. 1989. An ion-pair high performance liquid chromatographic method for the determination of aspartame and its decomposition products. *Journal of Food Science*, 54(4) : 1043-1046.
27. Stanner, S. A. 2005. Aspartame in the news again. *Nutrition Bulletin*, 30(4) : 309-310.
28. Tsang, W. S., Clark, M. A. and Parrish, F. W. 1985. Detection and determination of aspartame and its breakdown products in soft drinks by RP-HPLC with UV detection. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33(4): 734-738.
29. Tsubeli, N. and Labuza, T. P. 1991. Accelerated kinetic study of aspartame degradation in the neutral pH range. *Journal of Food Science*, 56(6): 1671-1675.
30. Vetsch, W. 1985. Aspartame: Technical considerations and predicted use. *Food Chemistry*, 16(3): 245-258.
31. Williams, M. L. 1986. Rapid separation of soft drinks ingredients using high performance liquid chromatography. *Food Chemistry*, 22(3): 235-244.
32. Zhu, Y., Guo, Y., Ye, M. and James, F. S. processing conditions and subsequent microbial load. *Journal of Dairy Science*, 74: 1214-1217.