تشخیص روغن های گیاهی در فرآورده‌های لبنی صنعتی کرمانشاه با استفاده از روش‌های کروماتوگرافی

زینب رفتنی امیری[1*]، سمیه سلمانی[2و3]

۱- نویسنده مسئول و دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
۲- دانشجوی دکتری، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی ساری، ساری، ایران
۳- کارشناس آزمایشگاه کنترل مواد خوراکی، آشامیدنی و آرایشی بهداشتی، معاونت غذا و دارو، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه

(تاریخ دریافت: ۹٤/۱۲/۰۱ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۳/۲۵)

چکیده

مصرف گسترده شیر و فرآورده‌های لبنی سبب شده است این محصولات به ویژه توسط تولید کنندگان، هدف بسیاری از تقلبات قرار بگیرد. یکی از تقلبات رایج در این زمینه، افزودن روغن‌های گیاهی با قیمت پائین با هدف افزایش سودآوری محصولات می‌باشد. در این بررسی ۷۳ نمونه از فرآورده-های لبنی صنعتی شامل شیر، ماست، کره و روغن حیوانی از ۲۳ فروشگاه در سطح شهرستان کرمانشاه به صورت تصادفی خریداری شد. جهت تشخیص تقلب در فرآورده‌ها، پروفایل ترکیبات استرولی و اسید چرب آنها پس از استخراج چربی، توسط تکنیک‌های کروماتوگرافی مایع و گازی تعیین گردید. پس از انجام کروماتوگرافی، حضور استرول‌های گیاهی بتاسیتواسترول و استیگمااسترول در ۳۳٪ از نمونه‌های ماست، ۲۶٪ از نمونه‌های کره، ۲۵٪ از نمونه‌های روغن حیوانی و ۱۳٪ از نمونه‌های شیر به اثبات رسید. نمونه‌های ماست حاوی بیشترین میزان بتاسیتواسترول و استیگمااسترول و نمونه‌های روغن حیوانی حاوی کمترین میزان این استرول‌های گیاهی بودند. هم چنین بررسی پروفایل اسید چرب نمونه‌های ماست و کره به ترتیب نشان دهنده حضور مقادیر بالای اسیدهای چرب چند غیر اشباعی نظیر اسید لینولئیک و مقادیر کم اسید میریستیک بود که افزودن روغن‌های گیاهی به این فرآورده‌های لبنی را تائید کرد. بنابراین می‌توان گفت که بررسی ترکیب استرولی و اسیدهای چرب ابزارهای مناسبی برای اعتبار سنجی چربی شیر در فرآورده‌های لبنی محسوب می‌شوند. نتایج نشان داد تقریبا ۲۵ درصد از ۷۳ نمونه لبنی (شیر، ماست،کره و روغن حیوانی) حاوی روغن گیاهی بودند.

کلید واژگان: تقلب، استرول، فرآورده‌های لبنی، کروماتوگرافی

* مسئول مکاتبات: zramiri@gmail.com

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-20]

۱- مقدمه

تقلب در زمینه‌ی تجارت مواد غذائی دارای پیشینه تاریخی بوده و تنها مربوط به عصر حاضر نمی‌شود. با گذشت زمان شیوه‌های تقلب در مواد غذائی پیچیده‌تر شده به طوری که گاهاً از پیشرفت‌های صورت گرفته در علوم تجزیه پیشی گرفته اند [۱]. به دلیل ارزش غذائی بسیار بالا، فرآورده‌های لبنی گروه-های خاصی از مصرف کنندگان مانند کودکان، زنان باردار، شیرده و سالمندان را در بر می‌گیرد [۲]. چربی شیر متشکل از ۹۸٪ تری آسیل گلیسرول و ۲٪ چربی‌های دیگر از قبیل دی آسیل گلیسرول، منو آسیل گلیسرول، اسیدهای چرب آزاد، فسفولیپید و کلسترول بوده و غنی از ویتامین‌های محلول در چربی و اسیدهای چرب ضروری می‌باشد. به دلیل نیاز بالای مصرف کنندگان و افزایش تقاضا، چربی شیر یکی از مواد غذائی بوده که تقلبات زیادی در آن صورت گرفته که شامل جایگزینی بخشی از آن با چربی‌های ارزانتر با منشاء گیاهی یا جانوری بوده است. این جایگزینی نه تنها از نظر اقتصادی نوعی تقلب به شمار می‌آید بلکه ممکن است به نوعی، سلامت انسان را نیز تهدید نماید [۳].

اصولاً روش‌های تجزیه‌ای که از قدیم برای تشخیص تقلب در چربی شیر مورد استفاده قرار گرفته‌اند، بیشتر مبتنی بر اندازه-گیری اسید بوتیریک می‌باشند که اسید چرب اختصاصی چربی شیر است. با این وجود افزودن روغن‌هائی با پروفایل اسید چرب مشابه شیر تشخیص تقلب را با این روش دشوار می-نماید. در ادامه آنالیز تری آسیل گلیسرول‌ها جایگزین روش قبلی شد. اما بعداً مشخص گردید تغییرات فصلی و تغذیه‌ای حیوان می‌تواند پروفایل تری‌گلیسیریدی را نیز تحت تاثیر قرار دهد. هم چنین جهت تفسیر نتایج نیاز به استفاده از روش‌های رگرسیونی غیر خطی وجود دارد [٤]. امروزه اساس روش‌های تشخیص تقلب در چربی شیر، بر مبنای آنالیز ترکیبات چربی بسیار کم مقدار مانند استرول‌ها قرار گرفت. چربی‌های حیوانی از قبیل چربی شیر عمدتاً حاوی کلسترول می‌باشند و فیتو استرول‌ها اصولاً در محصولات با منشاء حیوانی قابل تشخیص نمی‌باشند. در بین انواع مختلف استرول‌های موجود در منابع گیاهی، بتا سیتواسترول عمده‌ترین ترکیب استرولی محسوب می‌شود و بنابراین شاخص بسیار مناسبی برای تشخیص این نوع تقلب است [٤]. روش‌های سنتی عمدتاً شامل صابونی کردن روغن یا چربی می‌باشد که در ادامه اجزای غیر صابونی شونده استخراج شده و مستقیماً آنالیز می‌شوند یا اینکه پس از جداسازی استرول‌ها با روش‌های کروماتوگرافی تهیه‌ای لایه‌ی نازک[1] تعیین استرول‌ها با کروماتوگرافی گازی بر اساس درصد استرول‌های آزاد یا مشتقات تری متیل سیلیل صورت می‌پذیرد. جداسازی استرول‌ها هم چنین با روش‌های کروماتوگرافی روی ستون‌های ژل سیلیکا یا کروماتوگرافی مایع با کارائی بالا (HPLC) امکان پذیر می‌باشد [۵].

اخیراً استفاده از روغن‌های گیاهی به ویژه روغن پالم در صنایع لبنی کشورمان به یکی از نگرانی‌های اصلی مصرف کنندگان تبدیل شده است که منجر به رواج مصرف فرآورده‌های لبنی سنتی در بین مردم شده است. هدف از این تحقیق تشخیص و تعیین تقلب حضور روغن گیاهی در فرآورده‌های لبنی صنعتی در سطح شهر کرمانشاه می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد شیمیائی

استانداردهای کلسترول، استیگمااسترول و بتاسیتوسترول از شرکت سیگما و سایر مواد شیمیائی از شرکت مرک تهیه شدند.

۲-۲- نمونه‌برداری

محصولات لبنی صنعتی شامل ۲۳ نمونه ماست، ۲۳ نمونه شیر، ۱۹ نمونه کره و ۸ نمونه روغن حیوانی به صورت تصادفی از مغازه‌های در سطح شهر کرمانشاه خریداری و در شرایط یخچال به آزمایشگاه منتقل شد.

۲-۳- تعیین پروفایل استرولی فرآورده‌های لبنی با کروماتوگرافی مایع و گازی

در مورد نمونه‌های روغن و کره ٤-۲ گرم و برای ماست و شیر حدود ۱۰۰ میلی‌لیتر از نمونه توزین شد. ۱۰۰ میلی‌لیتر پتاس اتانلی و چند عدد سنگ جوش به محتویات اضافه و به مدت ۲ ساعت روی هیتر تقطیر معکوس گردید. پس از سرد شدن، ۱۰۰ میلی‌لیتر آب به آن اضافه و به درون یک دکانتور ۵۰۰ میلی‌لیتری منتقل شد. ۱۰۰ میلی‌لیتر هگزان اشباع برای حل مواد غیر قابل صابونی به دکانتور اضافه شد. فاز بالائی چند بار با آب مقطر شستشو داده شد. سپس فاز هگزانی با استفاده از تبخیر کننده چرخان تحت خلأ در دمای ۵۰°C تبخیر شد. با افزودن ۲-۱ میلی‌لیتر کلروفرم مواد غیرقابل صابونی حل شده و

1. Preparative thin-layer chromatography

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-20]

به یک ویال ۲ میلی‌لیتری منتقل گردید. از محلول فوق ۲۰ میکرولیتر به دستگاه HPLC (شرکت Knauer، آلمان) مجهز به دتکتور ماوراء بنفش و ستون C_{18} به طول 25 cm تزریق شد. فاز متحرک استونیتریل: اتانل (۸۵ :۱۵) و شناسائی ترکیبات در طول موج ۲۰۵ nm صورت گرفت[٦].

برای شناسائی استرول‌ها بوسیلهٔ کروماتوگرافی گازی، محلول کلروفرمی حاوی مواد غیرقابل صابونی را روی صفحات TLC انتقال داده و این صفحه در نهایت داخل تانک کروماتوگرافی حاوی حلال هگزان : دی اتیل اتر (٦٥ :۳۵) قرار گرفت. با استفاده از محلول استاندارد کلسترول و نور ماوراء بنفش، محدوده لکه استرولها با اسپاچول تراشیده شد و به درون ویال ۵ میلی‌لیتری ریخته و ۳-۲ میلی‌لیتر کلروفرم به آن اضافه گردید. پس از اعمال ۳ دقیقه فراصوت توسط یک سونیکاتور آزمایشگاهی (مدل VCX750 شرکت Sonics کشور آمریکا) و ۱ دقیقه همزدن با سانتریفوژ با ٤۰۰۰ دور در دقیقه مدل Z36HK شرکت Hermle آلمان ، فاز شفاف بالائی جدا و جهت تزریق به GC درون یک ویال ۵ میلی‌لیتری ریخته شد. دستگاه GC (شرکت Thermo finnigan، ایتالیا) مجهز به آشکارساز یونیزاسیون شعله (FID) و ستون RTX-5 به طول ۳۰m بود. دمای تزریق و دمای آشکارساز ۳۲۰°C و برنامه دمائی آون ثابت ۲۹۰°C و زمان شناسائی ۳۵ دقیقه بود [۷ و ۸].

۲-٤- تعیین پروفایل اسیدهای چرب فرآورده-های لبنی با کروماتوگرافی گازی

برای تعیین پروفایل اسیدهای چرب، ابتدا از فرآورده‌های لبنی ۸ نمونه ماست (یک نمونه فاقد و ٤ نمونه حاوی استرول گیاهی)و ۸ نمونه کره (۳ نمونه کره فاقد ۵ و نمونه کره حاوی استرول گیاهی) برای آنالیز اسید چرب انتخاب شدند.

ابتدا ۱۰ گرم نمونه هموژن شد، چربی آنها توسط مخلوط کلروفرم: متانول (۱v/v :۲) استخراج شد. سپس، اسیدهای چرب به استرهای متیله اسیدهای چرب تبدیل شدند. ۵۰۰ میلی گرم از چربی استخراج شده در لوله ریخته شد و ۵ میکرولیتر از محلول اسید نونادکانوئیک در n- هگزان به عنوان استاندارد داخلی به آنها افزوده شد. سپس ۵ میلی لیتر محلول سدیم متوکسید اضافه شده و لوله‌های آزمایش به مدت ۱۰ دقیقه در ۵۰ °C حرارت داده شدند. سپس ۵ میلی لیتر از محلول بورون تری فلورید در متانول به مخلوط حاصله افزوده و حرارت دهی به مدت ۲۰ دقیقه دیگر ادامه یافت. ۲۰ میلی لیتر حلال هگزان به مخلوط افزوده شد و فاز روئی حاوی استرهای متیله جدا گردید. حلال اضافی تحت جریان گاز نیتروژن جدا شد. ۵ میلی لیتر هگزان افزوده و به مدت ۱ دقیقه با ورتکس هم زده شد. بعد از متیله کردن این فاز در دمای ۲۰°C- منجمد و برای آنالیزهای بعدی نگهداری شد.

تعیین پروفایل اسیدهای چرب با کروماتوگرافی گازی (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) مجهز به آشکارساز یونیزاسیون شعله و ستون (J&W Scientific, Agilent Technologies) با ابعاد ۰/۲۵ µm × ٦۰m و قطر داخلی ۰/۲۵mm صورت گرفت. سرعت جریان گاز هلیم ۰/۷ml/min، دمای تزریق ۲۵۰ °C و دمای آشکارساز ۲۷۰ °C بود. حجم تزریق ۱ میکرولیتر در نظر گرفته شد. دمای اولیه ۵۰ °C، افزایش دما از ۵۰ به ۲۰۰ °C با سرعت /min ۵ °C به مدت ۳۰ دقیقه، از ۲۰۰ تا ۲۱۰ °C با سرعت /min ۱ °C به مدت ۱۰ دقیقه، از ۲۱۰ تا ۲٤۰ °C با سرعت /min ٤ °C به مدت ۷/۵ دقیقه و در نهایت دما در ۲٤۰ °C به مدت ۱۰ دقیقه نگه داشته شد. تعیین پیک استرهای متیله‌ی اسیدهای چرب با مقایسه زمان بازداری آنها با استانداردهای متیله صورت گرفت. نرم افزار اجیلنت (G2070 Chemstation) برای تفکیک پیک‌ها مورد استفاده قرار گرفت [۹].

۳- نتایج و بحث

۳-۱- پروفایل استرولی فرآورده‌های لبنی

در این بررسی از تکنیک‌های GC و HPLC، برای تایید شناسائی و تعیین کمی استرول‌ها مورد استفاده قرار گرفتند. حد تشخیص استرول‌ها با روش HPLC، ۱۱/۹mg/kg-۵/۲، ضریب تغییرات ٤/۲-٦/۷ درصد و در صد بازیافت ۹۲-۸۵ درصد بود. در روش GC حد تشخیص ۱٦/۵ mg/kg-۸/٤، ضریب تغییرات ٦/۸-۱۱ درصد و درصد باز یافت ۸٦-۷۸ بود. کلسترول به همراه لیپیدهای قطبی، پروتئین‌ها، گلیکوپروتئین، گانگلیوزید و آنزیم‌ها، اجزای اصلی سازنده غشاء گلبول‌های چربی شیر (MFGM) را تشکیل می‌دهند و وظیفه آن حفظ سیالیت و یکپارچگی غشاء می‌باشد. مطابق جدول ۱، در صد تقلب در نمونه‌های ماست بیشتر از سایر نمونه‌های مورد بررسی بود و پس از آن کره، روغن حیوانی و در نهایت شیر از درصد تقلب کمتری برخوردار بودند. همانطور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود بیشترین میزان استیگماسترول و بتاسیتواسترول در نمونه‌های روغن حیوانی مشاهده گردید و پس از آن نمونه-های کره، ماست و شیر قرار داشتند. بیشترین میزان کلسترول نیز در روغن حیوانی و کره مشاهده گردید. هم چنین در تمام

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-20]

نمونه‌ها، مقادیر استرول‌های تعیین شده با روش HPLC بیشتر از GC بود.

Table 1 Some dairy samples containing plant oil

Dairy product	Sample containing plant oil (%)	Number of analyzed sample
Milk	13.04	23
Yoghurt	32.80	23
Butter	26.30	19
Butter oil	25.00	8

شکل ۱، نمونه‌ای از کروماتوگرام مربوط به نمونه‌ی شیر حاوی روغن‌های گیاهی را نشان می‌دهد. در کروماتوگرام نمونه شیر پیک استیگمااسترول و بتاسیتواسترول مشاهده می‌گردد که حاکی از تقلبی بودن نمونه مورد بررسی می‌باشد. کروماتوگرام مربوط به نمونه روغن‌های حیوانی خالص (a) و تقلبی (b) نیز در شکل ۲ نشان داده شده است. در روغن حیوانی تقلبی، علاوه بر کلسترول پیک‌های مربوط به استیگمااسترول و بتاسیتواسترول نیز مشاهده می‌شود که حاکی از افزودن روغن گیاهی به نمونه می‌باشد حال آنکه در نمونه دیگر، تنها پیک کلسترول مشاهده گردید که حاکی از خالص بودن نمونه می-باشد.

Table 2 Sterol content of different dairy products containing plant oil analyzed with HPLC and GC

Dairy products	β-sitosterol mg/kg		Stigmasterol mg/kg		Cholesterol mg/kg	
	GC	HPLC	GC	HPLC	GC	HPLC
Milk	63.8-145	85.2-176.4	16.3-41.8	21.5-49.2	29.6-49.4	35.8-53.3
Yoghurt	112.4-226.1	139.6-253.7	25.4-57.6	32.4-68.1	37.8-124.2	44.7-139.2
Butter	185.3-386.4	214.5-421.3	44.2-102.9	56.7-116.5	1591-1918.5	1607.9-1992.9
Butter oil	239.7-445.4	269.2-484.1	59.6-123.8	68.4-139.2	1946.2-2153	2044.2-2260.1

با مقایسه پارامترهای اعتبار سنجی در هر دو دستگاه می‌توان نتیجه گیری کرد دستگاه HPLC جهت اندازه‌گیری استرول‌های گیاهی از اعتبار بیشتری برخوردار بود.

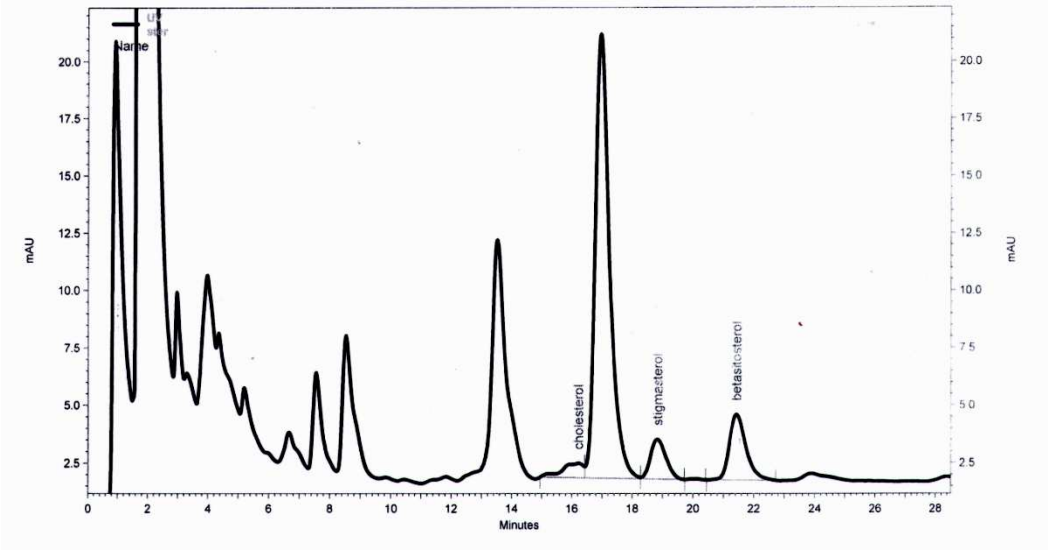
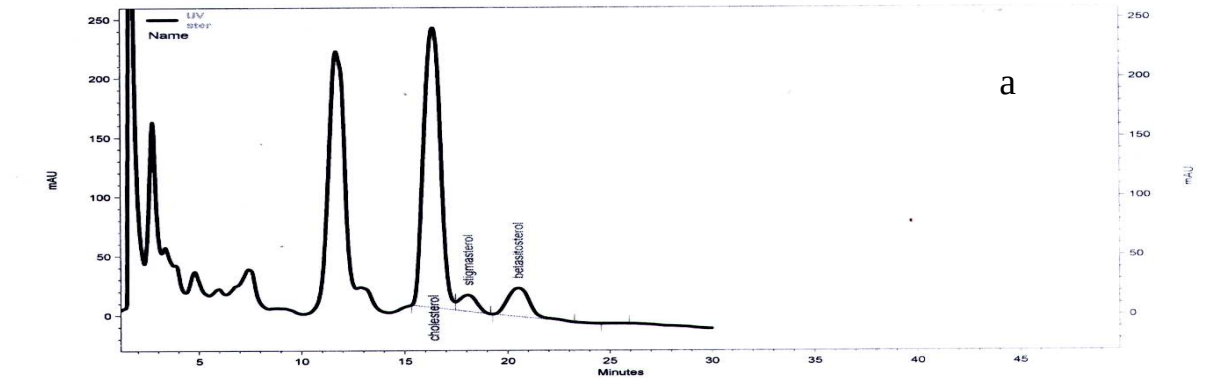


Fig1 Chromatogram of milk sample containing plant oil

تشخیص درصدهای پائین روغن در مخلوطی از روغن‌ها یا تشخیص برخی منابع روغنی فرایند دشواری است. امروزه آنالیز استرول‌ها به یکی از روش‌های مهم در زمینه تشخیص حضور روغن‌های ارزان قیمت در منابع گران قیمت‌تر تبدیل شده است [۵].

تکنیک‌های کروماتوگرافی امکان جداسازی سریع و تعیین کمی ترکیبات میکرو و ماکرو با ساختار شیمیائی مشابه از ماتریکس‌های پیچیده مواد غذائی را فراهم می‌آورند. به دلیل ظرفیت جداسازی بالا، این تکنیک‌ها می‌توانند برای اعتبار سنجی و ردیابی مواد غذائی مورد استفاده قرار بگیرند. در زمینه فرآورده‌های لبنی نیز تعیین کمی اجزای کم مقدار و پر مقدار می‌تواند تعیین منشاء ماده غذائی را تسهیل نماید [۱۰].

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-20]



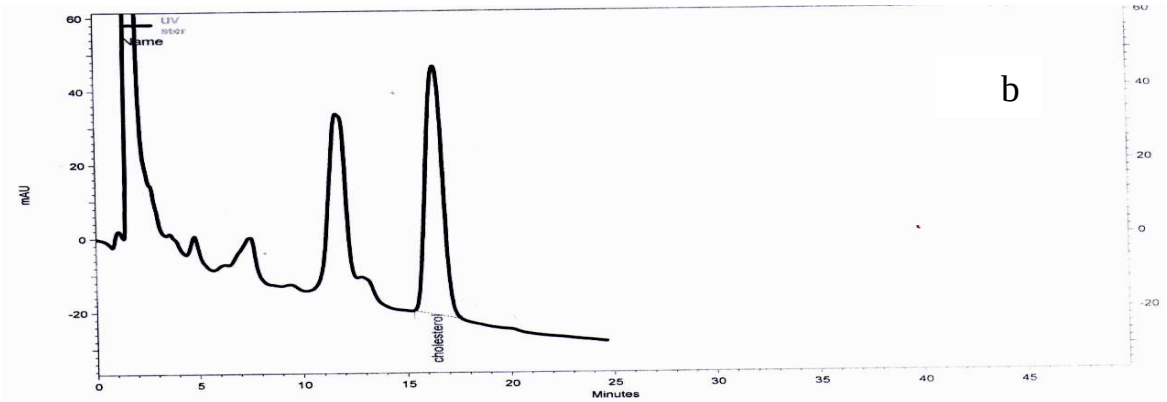


Fig 2 Chromatogram of adulterated butter oil (a) and pure butter oil (b)

تکنیک کروماتوگرافی گازی مجهز به آشکار ساز یونیزاسیون شعله یکی از روش‌هائی است که به صورت متداول برای آنالیز فیتواسترول‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد که دلیل آن هزینه پائین، حساسیت بالا و سهولت انجام است. اما یکی از دشواری‌هائی که در این زمینه وجود دارد، فرایند استخراج بسیار پیچیده، خالص سازی و مشتق سازی می‌باشد. علاوه بر این مشکلاتی از قبیل شویش همزمان برخی از ترکیبات وجود دارد. یکی از برتری‌های HPLC بر GC در زمینه‌ی آنالیز استرول‌ها، شرایط ملایم‌تر کاری می‌باشد به طوریکه از ستونی با دماهای پائین‌تر استفاده می‌شود و در واقع شرایط تشخیص غیر تخریبی خواهد بود. در برخی مواقع، نظیر استفاده از نمونه‌های هموژن نظیر روغن‌های گیاهی، تزریق مستقیم روغن با خالص سازی اندک امکان پذیر خواهد بود. با این وجود نمونه‌های دارای ماتریکس پیچیده، بایستی با استفاده از روش-هائی نظیر کروماتوگرافی لایه نازک جهت حذف مزاحمت‌ها آماده سازی گردند. بنابراین در برخی موارد کاربرد HPLC به دلیل پیچیدگی ماتریکس نمونه، محدود می‌گردد و به نوع و غلظت استرول‌ها و نوع کاربرد (جداسازی تهیه‌ای یا تجزیه‌ای) ارتباط خواهد داشت [١١].

اگرچه اثرات مفید استرول‌های گیاهی در کاهش اثرات زیان بار کلسترول در بدن و هم چنین پیشگیری از سرطان روده شناخته شده است و غنی سازی فرآورده‌های لبنی با این گروه از ترکیبات عملگر جدیداً مورد توجه محققین حوزه غذا قرار گرفته است، اما بایستی توجه داشت یکی از حقوق اصلی مصرف کنندگان آگاهی کامل از ترکیب غذاهای مصرفی می-باشد. افزودن روغن‌های گیاهی در کنار اثرات مفید ذکر شده، می‌تواند به دلیل حضور برخی ترکیبات مضر (مثل اسیدهای چرب اشباع) اثرات زیانباری را متوجه مصرف کنندگان نماید. لذا مراجع قانونی موظف هستند قوانینی را در زمینه کنترل انواع تقلبات در فرآورده‌های غذائی نظیر لبنیات وضع نمایند. میزان محتوای کلسترول چربی شیر در محدوده mg/100g ١٧٦/٨-٢٦٤/٨ گزارش شده است [١٢]. گر چه میزان کلسترول در نمونه‌های کره در این تحقیق بسیار بالاتر از محدوده گزارش شده برای کره می‌باشد، اما به دلیل حضور فیتواسترول‌ها می‌توان تقلب در این فرآورده‌ها را تصدیق کرد.

برای اولین بار کاتز و کنی [١٣] از روش کروماتوگرافی گازی- مایع را برای تعیین پروفایل استرولی چربی شیر و تشخیص تقلب در این فرآورده استفاده کردند. آنها توانستند

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-20]

غلظت‌های ۱٪ روغن ذرت، پنبه دانه، سویا و بادام زمینی را با حضور بتاسیتو استرول ردیابی نمایند و تقلب با روغن نارگیل و آفتاب گردان در سطح ۲٪ تشخیص داده شد. هم چنین به دلیل حضور بتا سیتو استرول در امولسیفایرهای تجاری، نمونه-های بستنی حاوی روغن ذرت، پنبه دانه، سویا و بادام زمینی در سطح ۲/۵-۲٪ و روغن‌های نارگیل و آفتاب گردان در سطح ۵-٤٪ تشخیص داده شدند.

در بررسی دیگری اعتبار سنجی ١٦ نمونه کره با بررسی پروفایل تری گلیسیرید، توکوفرول، اسید چرب و استرولی آنها انجام گرفت. جهت شناسائی استرول‌ها از کروماتوگرافی مجهز به آشکارساز جرمی استفاده شد. میزان کلسترول نمونه‌های کره بین ۲۲۹/۵ mg/100g تا ۲٦۸/۸ متغیر بود. از بین نمونه‌های مورد بررسی، در ۲ نمونه مقدار کلسترول به طور معناداری پائین و حدود ۲۱٦/٦ mg/100g و ۱۷۸/۸ بود. در کل میزان کلسترول شیر بین ۳۸۲/٤-۲۰٤/۳ mg/100g متغیر است. در این دو نمونه بتاسیتواسترول تشخیص داده شد و میزان آن در این دو نمونه ۱۲/٦ mg/100g و ۲۷/۸ بود [۱۳].

در بررسی انجام شده توسط آلنسو و همکاران [۵]، امکان استفاده از کروماتوگرافی گازی برای تفکیک روغن‌های گیاهی، چربی شیر و مخلوط چربی شیر و روغن‌های گیاهی مورد بررسی قرار گرفت. درصد بازیافت بتا سیتواسترول از روغن-های گیاهی ۹۲/٦ تا ۹۵/۸ درصد متغیر بود. هم چنین این محققین با استفاده از کروماتوگرافی گازی به خوبی توانستند روغن پالم موجود در چربی شیر را در دو سطح ۵ و ۱۰درصد با استفاده از پروفایل استرولی تشخیص دهند. پروفایل استرولی روغن پالم شامل کلسترول، کمپسترول، استیگمااسترول و بتاسیتواسترول بود که تمامی این استرول‌ها در کروماتوگرام مربوط به مخلوط چربی‌ها قابل تشخیص بود.

۳-۲- پروفایل اسید چرب فرآورده‌های لبنی

پروفایل اسیدهای چرب نمونه‌های کره و ماست به ترتیب در جداول ۳ و ٤ نشان داده شده است. اسیدهای چرب عمده در نمونه‌های کره تقلبی حاوی اسید اولئیک و اسید لینولئیک می-باشند. این در حالی است که میزان اسیدهای چرب C4:0، C6:0، C8:0، C10:0، C12:0، C14:0، C16:1 و C20:0 به طور قابل ملاحظه‌ای کمتر از مقادیر این اسیدها در نمونه‌های کره غیر تقلبی می‌باشد. هم چنین از نظر درصد اسیدهای میریستیک، پالمتیک و استئاریک اختلافی بین نمونه-های تقلبی و غیر تقلبی مشاهده نشد.

پروفایل اسید چرب نمونه‌های ماست تقلبی و غیر تقلبی در جدول ٤ نشان داده شده است. میانگین غلظت اسیدهای کاپریک، کاپروئیک، کاپریک، لوریک، میریستیک، میریستولئیک، پالمتیک و پالمیتولئیک به طور قابل ملاحظه‌ای در نمونه ماست غیر تقلبی بیشتر از ماست تقلبی می‌باشد. این در حالی است که در نمونه ماست تقلبی مقادیر قابل توجهی اسیدهای چرب غیر اشباع نظیر اسیدهای اولئیک و لینولئیک و نیز اسید آراشیدیک وجود داشت. از نظر مقدار اسید استئاریک اختلافی بین نمونه-های تقلبی و غیر تقلبی مشاهده نشد.

Table 3 Fatty acid composition of butter samples

Fatty acid(%) \ Sample	1*	2	3	4*	5	6*	7*	8*	**	***
C4:0	0.4 ± 0.1	0.44 ± 0.2	0.38 ± 0.2	4.6 ± 0.3	0.4±0.2	3.97 ± 0.1	4.2 ± 0.3	0.51 ± 0.2	0.426	4.25
C6:0	0.61 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.6 ± 0.1	2.8 ± 0.2	0.71±0.1	2.36 ± 0.2	2.45 ± 0.2	0.7 ± 0.1	0.624	2.53
C8:0	0.61 ± 0.1	0.5 ± 0.2	0.6 ± 0.1	2.8 ± 0.2	0.71 ± 0.1	2.36 ± 0.2	2.45 ± 0.1	0.3 ± 0.1	0.54	2.53
C10:0	0.9 ± 0.2	0.9 ± 0.2	0.87 ± 0.2	1.91 ± 0.2	0.9 ± 0.2	2.0 ± 0.2	2.17 ± 0.2	0.9 ± 0.2	0.894	2.02
C12:0	0.9 ± 0.2	0.9 ± 0.2	0.87 ± 0.1	3.2 ± 0.2	1.6 ±0.1	3.1 ± 0.13	3± 0.3	1.7 ± 0.1	1.194	3.1
C14:0	3.5 ± 0.2	3 ± 0.2	3.1 ± 0.2	8.1 ± 0.2	4.1 ± 0.2	7.6 ± 0.2	7.9 ± 0.2	3.2 ± 0.2	3.38	7.86
C14:1	1.5 ± 0.1	1.2 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.5 ± 0.2	1.2 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.3 ± 0.1	1.3	1.36
C16:0	31 ± 0.5	30 ± 0.6	32.8 ± 0.6	33.1 ±0.5	32.1 ± 0.5	32 ± 0.5	31 ± 0.5	33.2 ± 0.6	31.82	32.03
C16:1	0.37 ± 0.1	0.38 ±0.1	0.4 ± 0.1	4.8 ± 0.2	0.65 ± 0.1	5.2 ± 0.3	5.2 ± 0.3	0.5 ± 0.1	0.46	5.06
C18:0	9.11 ± 0.4	8.9 ± 0.3	8.12 ± 0.3	7.9 ± 0.3	7 ±0.3	7.4 ± 0.4	7.52 ± 0.4	8.1 ± 0.3	8.24	7.60
C18:1	47 ± 0.8	40 ± 0.7	44 ± 0.9	20 ± 0.5	41 ± 0.9	21.2 ±0.5	23.3 ± 0.5	43.38 ± 0.9	43.07	21.5
C18:2	23 ± 0.6	20 ± 0.5	22 ± 0.5	3 ± 0.3	21 ± 0.6	3.1 ± 0.2	3.8 ± 0.2	23.9 ± 0.4	21.98	3.3
C20:0	0.6 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.01	0.61 ± 0.01	0.05 ±0.01	0.6 ± 0.2	0.6 ± 0.2	0.06 ± 0.1	0.05	0.6

Values are average ± standard deviation.
* Adulterated samples contain plant oil.
** Average of fatty acid content in adulterated samples.
*** Average of fatty acid content in non-adulterated samples.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-20]

پروفایل اسید چرب تعیین شده با روش‌های کروماتوگرافی گازی یکی از روش‌های متداول برای اعتبار سنجی فرآورده‌های لبنی از قبیل شیر، پنیر، کره، ماست و غیره می‌باشد. به دلیل حساسیت و تکرار پذیری بالا، کروماتوگرافی گازی به یکی از تکنیک‌های متداول برای آنالیز ترکیبات فرار فرآورده‌های لبنی تبدیل شده است [١٤].

Table 4 Fatty acid content of yoghurt samples

Sample / Fatty acid(%)	1*	2*	3*	4*	5	**
C4:0	0.6 ± 0.1	0.4± 0.1	0.52 ± 0.1	0.39 ± 0.1	1.5 ± 0.2	0.47
C6:0	0.35 ± 0.1	0.41 ± 0.1	0.38 ± 0.1	0.42 ± 0.2	0.9 ± 0.1	0.39
C8:0	0.18 ± 0.1	0.21 ± 0.1	0.22 ± 0.1	0.17 ± 0.1	0.8 ± 0.1	0.19
C10:0	0.55 ±0.2	0.48 ±0.2	0.44 ± 0.2	0.4 ± 0.1	2.3 ± 0.2	0.46
C12:0	0.74 ± 0.2	0.69 ± 0.2	0.66 ± 0.2	0.77 ±0.2	3.6 ± 0.3	0.71
C14:0	3.1 ± 0.3	2.8 ± 0.3	3.11 ± 0.3	2.9 ± 0.2	11.6 ± 0.4	2.97
C14:1	0.5 ± 0.1	0.45 ± 0.1	0.48 ± 0.1	0.5 ± 0.1	0.7 ± 0.2	0.48
C16:0	28.9 ± 0.9	25.7 ± 0.6	24.8 ± 0.7	25.6 ± 0.7	34.9 ± 0.9	26.25
C16:1	0.75 ± 0.2	0.66 ± 0.2	0.68 ± 0.2	0.6 ± 0.2	1.2 ± 0.2	0.67
C18:0	8.6 ±0.5	7.5 ± 0.2	8.1 ± 0.5	7.9 ± 0.4	8.42 ± 0.3	8.025
C18:1	42.77 ±0.9	39.5 ± 0.5	38.4 ± 0.6	37.1 ± 0.6	29.41 ± 0.8	39.44
C18:2	20.1 ± 0.8	21.2 ± 0.7	21.1 ± 0.5	20.9 ± 0.4	3.22 ± 0.2	20.82
C20:0	1.6 ± 0.3	1.42 ± 0.2	1.51 ± 0.2	1.48 ± 0.2	0.25 ± 0.1	1.5

Values are average ± standard deviation.
* Adulterated samples contain plant oil.
** Average of fatty acid content in adulterated samples.

همانطور که در جدول ٣ مشاهده می‌شود، در صد اسیدهای چرب کوتاه زنجیر اشباع در نمونه‌های کره حاوی چربی‌های گیاهی به طور قابل ملاحظه‌ای کمتر از نمونه‌های کره غیر تقلبی می‌باشد. در بررسی انجام شده توسط پارک و همکاران [١٥] نمونه‌های کره، روغن‌های گیاهی، چربی خوک و چربی گاو با تعیین پروفایل اسید چرب به وسیله‌ی کروماتوگرافی گازی به خوبی از یکدیگر تفکیک شدند. اسیدهای چرب میریستیک، پالمتیک، استئاریک، اولئیک و لینولئیک به عنوان اسیدهای چرب مارکر معرفی شدند. نتایج این بررسی نشان داد پروفایل اسید چرب کره غیر تقلبی حاوی مقادیر زیادی اسید میریستیک، اسید پالمتیک، اسید استئاریک و مقادیر ناچیزی اسید لینولئیک می‌باشد که نتایج این تحقیق را تائید می‌نماید. همانطور که مشاهده می‌شود درصد اسید میریستیک در نمونه-های تقلبی و غیر تقلبی به ترتیب ٣/٣٨ و ٧/٨٦ درصد و در مورد اسید لینولئیک ٢١/٩٨ و ٣/٣ درصد می‌باشد که حضور روغن‌های گیاهی در نمونه‌های کره را تائید می‌نماید. برخی از محققین نیز گزارش کرده‌اند تعیین پروفایل اسید چرب به تنهائی ابزار مناسبی برای اعتبار سنجی نمونه‌های لبنی محسوب نمی‌شود. به عنوان مثال در بررسی صورت گرفته توسط سوها و همکاران [١٦] کارائی پروفایل اسید چرب در جداسازی نمونه‌های چربی شیر مخلوط شده با پالم اولئین، روغن پالم و روغن نارگیل از چربی شیر خالص مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد، میزان کلسترول در نمونه‌های حاوی چربی گیاهی به طور معنی داری کمتر از چربی خالص شیر است. هم چنین میزان بتاسیتواسترول به عنوان فیتواسترول شاخص در کره خالص صفر درصد بود اما در کره مخلوط شده با روغن-های گیاهی این میزان بیشتر از ١/٥ درصد گزارش شد. نتایج این بررسی نشان داد پروفایل اسید چرب و استرول هیچ یک به تنهائی شاخص مناسبی برای اعتبار سنجی نمونه‌های کره تلقی نمی‌شوند. هم چنین محققین دیگری گزارش کرده‌اند از آنجا که ترکیب اسید چرب شیر از تنوع و تغییرپذیری بالائی برخوردار است، ترکیب اسید چرب ابزار مناسبی برای اعتبار سنجی و تشخیص تقلبات در چربی شیر نمی‌باشد [١٢].

تعیین پروفایل اسید چرب نمونه‌های ماست تهیه شده از شیر گاو نشان دهنده حضور درصد بالائی از اسید کاپریک، اسید میریستیک، اسید پالمتیک، اسید استئاریک و اسید لینولئیک بود [٩]. درصد اسیدهای چرب اشباع کل در این نمونه‌ها ٧٢/٠٧ درصد، اسیدهای چرب تک غیر اشباعی ٢٤/٥٩ درصد و اسیدهای چرب چند غیر اشباعی ٣/٢٦ درصد بود. نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد درصد اسیدهای چرب تک غیراشباعی در

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-20]

نمونه‌های ماست تقلبی ٤٠/٥٨ درصد و اسیدهای چرب چند غیر اشباعی ٣٩/٤٤ درصد می‌باشد که این مقادیر بسیار بالاتر از مقادیر این اسیدهای چرب در ماست غیر تقلبی یعنی ٣١/٣ درصد و ٢٩/٤١ درصد می‌باشد. با توجه به مقدار مجاز استرولها حداکثر ٥ درصد و کلسترول حداقل ٩٥ درصد در استاندارد ملی شماره های ١٦٢ و١٢٥٤ کره و روغن حیوانی به ترتیب، تقریبا ٢٥ درصد از ٧٣ نمونه (شیر، ماست، کره و روغن حیوانی) حاوی روغن گیاهی بودند.

٤- نتیجه گیری کلی

نتایج حاصل از این بررسی نشان داد، تکنیک‌های کروماتوگرافی می‌توانند جهت تشخیص تقلب در فرآورده‌های لبنی در آزمایشگاه‌ها مورد استفاده قرار گیرند. این تکنیک‌ها علاوه بر تائید تقلب، می‌توانند جهت کمی سازی میزان تقلب نیز مورد توجه قرار گیرند. با توجه به شیوع روز افزون چنین تقلباتی در صنایع غذائی کشور به ویژه صنایع لبنیات، استفاده از تکنیک‌های کروماتوگرافی و تحلیل نتایج حاصل از آن با روش‌های دقیق آماری و شیمی سنجی می‌تواند به کاهش تقلبات کمک شایانی بنماید.

٥- منابع

[1] Schieber, A, 2008, Introduction to food authentication. In: D, Sun, editor. Modern techniques for food authentication. 1th ed. Elsevier. Inc; 1-17.

[2] Kamal, M., Karoui, R., 2015, Analytical methods coupled with chemometric tools for determining the authenticity and detecting the adulteration of dairy products: A review, Trend in Food Science and Technology, 46 (1), 27-48.

[3] Ntakatsane, P., Liu, X. M., Zhou, P., 2013, Rapid detection of milk fat adulteration with vegetable oil by fluorescence spectroscopy, Dairy Science, 96, 2130–2136.

[4] Kamm, W., Dionisi, F., Hischenhuber, C., Schmarr, H., Engel, K., 2002, Rapid detection of vegetable oils in milk fat by on-line LC-GC analysis of β-sitosterol as marker, European Journal of Lipid Science and Technology, 104, 756–761.

[5] Alonso, L., Fontecha, J., Lozada, L., Juárez, M., 1997, Determination of mixtures in vegetable Oils and milk fat by analysis of sterol fraction by gas chromatography, Journal of the American Oil Chemists' Society, 74, 131-135

[6]. Borkovcova, I., Janoušková, E., Dračková, M., Janštová, B., Vorlová, L., 2009, Determination of Sterols in Dairy Products and Vegetable Fats by HPLC and GC Methods, Czech Journal of Food Science, 27, 217-219.

[7]. AOAC, 1990, Official Method of Analysis. Cholesterol in Foods. Association of Official Analytical Chemists, 15th ed, Washington, DC., USA.

[8]. ISO, 1999, Animal and vegetable fats and oils - Determination of individual and total sterols contents – gas chromatographic method. Geneva, Switzerland.

[9]. Serafeimidou, A., Zlatanos, S., Kritikos, G., Tourianis, A., 2013, Change of fatty acid profile, including conjugated linoleic acid (CLA) content, during refrigerated storage of yogurt made of cow and sheep milk, Journal of Food Composition and Analysis, 31, 24–30.

[10]. Cserháti, T., Forgács, E., Deyl, Z., Miksik, I., 2005, Chromatography in authenticity and traceability tests of vegetable oils and dairy products: A review, Biomedical Chromatography, 19, 183-190.

[11]. Abidi, S. L., 2001, Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils. Journal of Chromatography A, 935, 173-201.

[12]. Derewiaka, D., Sosinska, E., Obiedzinski, M., Krogulec, A., Czaplicki, S., 2011, Determination of the adulteration of butter, European Journal of Lipid Science and Technology, 113, 1005–1011.

[13] Katz, I., Keeney, M., 1967, Rapid method for isolation of unesterified sterols and its application to detection of milk fat adulteration with vegetable oils, Journal of Dairy Science, 50, 1764-1768.

[14] Kamal, M., Karoui, R., 2015, Analytical methods coupled with chemometric tools for determining the authenticity and detecting the adulteration of dairy products: A review, Trends in Food Science and Technology, 46, 27-48.

[15] Park, J. M., Kim, N. K., Yang, C. Y., Moon, K. W., Kim, J. M., 2014, Determination of the authenticity of dairy products on the basis of fatty acids and triacylglycerols content using GC analysis,

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-20]

Korean Journal of Food Science, 34, 316-324.

[16]. Soha, S., Mortazavian, A. M., Piravi-Vanak, Z., Mohammadifar, M. A., Sahafar, H., Nanvazadeh, S., 2015, Adequacy of the measurement capability of fatty acid compositions and sterol profiles to determine authenticity of milk fat through formulation of adulterated butter, Recent Patent on Food Nutrition and Agriculture, 7(2), 134-40.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-20]

Detection of vegetable oils in industrial dairy products of Kermanshah using chromatography methods

Raftani Amiri, Z. [1*] , Salmani, S. [2, 3]

1. Corresponding author and associate Professor, Department of Food Science and Technology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, Sari, Iran
2. Ph.D. student, Department of Food Science and Technology, Sari Agricultural Sciences and Natural Resources University, sari, Iran
3. Laboratory control of food, beverage and cosmetic, Food and Drug Department, Kermanshah university of medical sciences, Kermanshah, Iran

(Received: 2016/02/20 Accepted: 2016/06/14)

Widespread use of milk and dairy product has caused to increase adulteration especially by manufacturers, aimed to gain more profits. One of the most common adulterations in this context is the addition of vegetable oils with low price for increasing profitability. In this study, 73 samples of dairy products including milk, yogurt, butter and ghee was bought randomly from 23 supermarket of Kermanshah city. To detect adulteration, the sterol and fatty acids profile of samples was determined after fat extraction, by liquid and gas chromatography techniques. After the chromatography, the existence of plant sterols like as β- sitosterol and stigma sterol was established in 33% of yoghurt, 26% of butter, 25% of ghee and 13% of milk samples. Yoghurt samples contained the highest β- sitosterol and stigmasterol and ghee samples showed the lowest amount of phytosterols. Also, fatty acid profiles of yoghurt and butter samples showed high amount of polyunsaturated fatty acid like as linoleic acid and low amount of myristic acid in these samples, respectively that confirm the presence of vegetable oil in traditional dairy product. It can therefore be concluded that sterol and fatty acids measurement are appropriate tools to verify the authenticity of the milk fat in dairy product. The results showed that almost 25% of 73 samples (milk, yogurt, butter, ghee) had vegetable oils.

Keywords: Adulteration, Sterols, Dairy product, Chromatography

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-20]

*Corresponding Author E-mail Address: zramiri@gmail.com