

تشخیص مالت قلبی با استفاده از شاخص مالتوترئوز در پودرمالت، عصاره مالت و پودر عصاره مالت به روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا و آشکارسازی ضریب شکست

فائزه شیرخان^۱، بهروز اکبری آدرگانی^{۲*}، مریم سلامی^۳

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم داروئی،

تهران، ایران

۲- دانشیار مرکز تحقیقات آزمایشگاهی غذا و دارو، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران

۳- استادیار پردیس کشاورزی دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه تهران، کرج، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۶/۰۸/۰۵ تاریخ پذیرش: ۹۶/۱۰/۲۷)

چکیده

مالت، محصول جوانه زدن طبیعی جو و دارای ارزش غذایی بالا و کاربردهای فراوان در صنایع غذایی و دارویی است. با توجه به کاربرد گسترده مالت و ضرورت توجه به ماهیت و اصل بودن آن، این تحقیق با هدف تشخیص مالت قلبی در انواع ترکیبات مالت با استفاده از شاخص مالتوترئوز به روش کروماتوگرافی و آشکارسازی ضریب شکست انجام شد. ۱۳ نمونه تیمار شامل پودرمالت، عصاره مالت و پودر عصاره مالت از سطح عرضه در شهر تهران به طور تصادفی جمع آوری و همراه با سه نمونه کنترل که در شرایط کنترل شده در کارخانه تولید شده بود مورد آزمایش قرار گرفت. عملیات جداسازی کربوهیدرات ها در سامانه کروماتوگرافی و تعیین غلظت مالتوترئوز توسط آشکارساز ضریب شکست انجام شد. نتایج نشان داد که میانگین غلظت مالتوترئوز در پودر مالت 0.04 ± 0.034 ، عصاره مالت 0.05 ± 0.030 و در پودر عصاره مالت 0.02 ± 0.030 گرم در لیتر می باشد. نتایج آزمون آماری نشان داد که بین میانگین قند مورد اندازه گیری در سه گروه و بین میانگین غلظت آن در هر گروه و میانگین غلظت متناظر آن در نمونه کنترل اختلاف معنی داری وجود ندارد ($p < 0.05$) ماهیت مالت در نمونه ها از طریق مطابقت زمان بازداری بیک محلول استاندارد مالتوترئوز با بیک متناظر در هریک از نمونه ها با موفقیت انجام شد و مشخص شد که سامانه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا با آشکارسازی ضریب شکست می تواند با شناسایی و اندازه گیری مالتوترئوز در یک میانگین زمان آنالیز $3/404$ دقیقه در تشخیص ماهیت تخمیری و غیرتقلبی بودن نمونه مالت موثر باشد.

کلید واژگان: پودر مالت، عصاره مالت، پودر عصاره مالت، مالتوترئوز، کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا

* مسئول مکاتبات: analystchemist@yahoo.com

۱- مقدمه

تقلبات مواد غذایی به واسطه شناسایی مواد و ترکیبات در حالت طبیعی و بدون تقلب در مقایسه با مواد غذایی مشکوک است. بنابراین مشخصات مواد طبیعی موجود در انواع مواد غذایی از قبل باید به وسیله ضوابط قانونی مشخص شود و برای آنها حداقل و حداکثری تعیین گردد [۱]. از آنجا که مالت و فرآورده های آن بعنوان مواد اولیه و یا بصورت مستقیم مورد استفاده قرار می گیرند و کاربردهای فراوانی در صنایع غذایی دارند لذا توجه به سلامت و ایمنی آن ضروری است. مالت، در واقع غلات جوانه زده ای است که منبع مناسبی از انواع کربوهیدرات ها، پروتئین ها، ویتامین های گروه ب و املاح معدنی می باشد [۲]. بخش اعظم مالت برای تهیه نوشیدنی های الکلی و غیرالکلی به کار برده می شود ولی مقادیر قابل توجهی از آن نیز در سایر صنایع غذایی مورد استفاده قرار می گیرد [۳]. از مالت در صنعت برای تولید محصولاتی نظیر شیرینی ها، بیسکوئیت ها، محصولات نانوائی، شربت عصاره مالت، غلات صبحانه، سرکه ی مالت و نوشیدنی های مالتی استفاده می شود [۴]. در بین غلات مختلف، جو از امتیاز بالاتری نسبت به سایر غلات برخوردار است [۵]. جو با نام علمی *Hordeum Vulgar* به علت وجود پوسته و ترکیبات شیمیایی خاص، تغییرات مطلوبی طی جوانه زنی پیدا کرده و دارای ویژگی های مطلوب تری نسبت به سایر غلات برای مالت سازی است [۶] و به علت وجود ترکیبات شیمیایی، تغییرات مطلوب طی جوانه زنی و وجود پوسته که نقش حفاظت از جوانه را طی حمل و نقل بر عهده دارد، دارای ویژگی های مطلوب تری نسبت به سایر غلات در زمینه مالت سازی است [۷]. از مهم ترین عوامل برتری مالت جو نسبت به سایر غلات می توان به فعالیت آمیلولیتیک مناسب، تسریع فرایند صاف شدن عصاره و افزایش مقدار ازت کل محلول ورت اشاره نمود [۸]. بعلاوه مالت جو منبعی از آنزیم های هضم کننده نشاسته به خصوص آلفا و بتا آمیلازهاست [۹]. فرآورده های مالت نیز در اثر فعالیت آنزیمی غلاتی همچون گندم، چاودار و جو حاصل می شوند [۱۰]. وجود کربوهیدرات در مالت یکی از فاکتورهای شیمیایی بسیار مهم در صنعت مالت سازی است [۱۱]. گلوکز، فروکتوز، ساکارز و قندهای با درجه پلیمریزه بالا مانند مالتوز و مالتوترئوز از مهم ترین قندهای تخمیری در مالت هستند [۱۲]. مالتوز که قند مالت یا

قند جوانه جو نیز نامیده می شود. یک قند کاهنده دی ساکاریدی است که به ندرت در فرآورده های غذایی به طور طبیعی وجود دارد [۱۳و۱۴]. این قند عامل طعم خاص مالت است و ماده غذایی خوبی برای میکروارگانیسم ها در فرایند تخمیری محسوب می شود و چون یک قند احیاکننده است از این نظر در فرایند قهوه ای شدن میلارد شرکت می کند [۱۵]. دانه های در حال رویش، آنزیمی به نام دیاستاز تولید می کنند که نشاسته را برای استفاده گیاه تازه به مالتوز تبدیل می نماید [۱۶]. مالتوترئوز دومین قند تخمیری بعد از مالتوز است که توسط آنزیم های گوارشی آلفا آمیلاز در نشاسته تولید می شود [۱۷] و به دلیل ماهیت منحصر به فرد و خواص ویژه کاربرد های بالقوه وسیعی در صنایع غذایی، دارویی و شیمیایی دارا است [۱۸]. مالتوترئوز توسط مخمر ساکارومایسس سروزیه در نشاسته هیدرولیز شده و به مالتوز و مالتوترئوز متابولیزه می شود [۱۷]. تعیین کربوهیدرات برای کنترل فرآیند و ارزیابی کیفیت در بسیاری از مواد غذایی و آشامیدنی مورد نیاز است [۱۹]. تعیین و شناسایی کربوهیدرات ها با روشهایی از جمله روش های شیمیایی، کروماتوگرافی، تیتراسیون، کالیمتری، گراویمتری، آنزیمی، دی گلوکز/ فروکتوز و بسیاری از روش های فیزیکی از قبیل پلاریمتری، مادون قرمز، چگالی، ضریب شکست، رفاکتومتری و... انجام می شود که برای اندازه گیری نوع و غلظت قندها استفاده می شوند [۲۰و۲۱]. کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا یکی از روش های امید بخش و کاربردی برای آنالیز ساکاریدهاست [۲۱]. تجزیه و تحلیل به روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا روش سریع، گزینشی و راحت است [۲۲] و نقش مهمی در تعیین کربوهیدرات ها، به خصوص کربوهیدرات های تخمیری ایفا می کند [۲۳]. بسیاری از روش های تشخیص ماهیت مواد غذایی بویژه آنهایی که بر اساس تکنیک کروماتوگرافی هستند برپایه بکارگیری آشکارسازهای مختلف استوارند و برای این منظور بکار می روند [۲۴]. آشکارساز ضریب شکست یکی از عمومی ترین آشکارسازها جهت شناسایی کربوهیدرات ها است [۲۵-۲۷]. امروزه تولید انواع نوشیدنی های برپایه آب، شکر و اسانس همراه با برخی فرایندهای حرارتی مرسوم شده است. از طرف دیگر با توجه به ارزش غذایی بالای مالت، برخی از عرضه کنندگان محصولات خود را با بکارگیری این ماده تولید می کنند که بسیار مفید و مغذی خواهد بود. با توجه به وجود

شاخص مالتوتروز در نمونه های مالت (پودر، عصاره و پودر عصاره) و اندازه گیری آن به روش کروماتوگرافی مایع و آشکارسازی ضریب شکست می باشد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱- نمونه های مورد مطالعه

نمونه های پودر مالت، عصاره مالت و پودر عصاره مالت به تعداد ۱۳ عدد از برندهای مختلف به صورت سه تکرار از هر یک از مراکز عمده عرضه مواد غذایی در سطح شهر تهران طی پاییز سال ۱۳۹۴ بصورت تصادفی جمع آوری و به آزمایشگاه منتقل و تا زمان انجام آزمون در دمای ۴ °C نگهداری شدند. همچنین از هر گروه از نمونه های مورد مطالعه، سه نمونه که در شرایط مشابه و کنترل شده در کارخانه تولید شده بود بعنوان نمونه های کنترل نمونه برداری و به روش مشابه مورد آزمایش قرار گرفت. در جدول ۱ مشخصات نمونه های مورد مطالعه ارائه شده است.

محموله های متعدد وارداتی و تولید داخل در سطح عرضه در قالب مالت و فرآورده های وابسته و از طرف دیگر غیرقابل تشخیص اصل بودن آنها از روی شکل ظاهری که گاهی با عرضه به صورت مخلوط آب و شکر همراه با یک پروسه حرارتی دیده شده است و افزودن شربت قند یا شکر به عنوان یک راه ساده برای افزایش غلظت و قوام محصول انتخاب شده [۲۸] روش های تشخیصی موجود هر یک از نظر زمان آزمون، اطمینان تشخیص، هزینه ها و غیراختصاصی بودن آزمون با مشکلاتی مواجه هستند لذا ورود مالت های غیر اصل، شبه مالت و مالت های تقلبی وارداتی از یک طرف و عدم شناخت کافی نسبت به آن ها از طرف دیگر باعث بروز مشکلاتی در نظارت و پایش مالت شده است. لذا مسأله اصلی در این ماده غذایی استفاده از مالت های تقلبی به جای مالت اصل و عدم تمایز بین محصولات می باشد. با توجه به ماهیت تخمیری مالت و تولید مالتوتروز به عنوان دومین قند مالت و هزینه بالای تولید آن، استفاده از آن برای سودجویان مقرون به صرفه نمی باشد. بررسی های انجام شده نشان می دهد تاکنون هیچ گونه مطالعه و بررسی در زمینه تشخیص اصل بودن مالت با شاخص مالتوتروز به روش کروماتوگرافی و ضریب شکست انجام نشده است. هدف تحقیق حاضر بررسی تقلبات مالت با

Table 1 Specification of the studied malt

No.	Sample	Sample code
1	Malt powder	BM ₁
2	Malt Extract Powder	BM ₂
3	Malt Extract	BM ₃
4	Malt Extract	SA ₁
5	Malt Extract	SE ₃
6	Malt Extract	SS ₄
7	Malt powder	BP
8	Malt Extract Powder	YP
9	Malt Extract Powder	BR
10	Malt Extract	ME
11	Malt Extract Powder	GP
12	Malt Extract	BH
13	Malt Extract	MA

۲-۲- مواد و تجهیزات

تحقیق شامل ترازوی دیجیتال (Sartorius، چین)، دستگاه تولید کننده آب دیونیزه (Elga، آمریکا)، دستگاه اولتراسوند (Fritsch، آلمان)، سانتریفوژ (Heraeus، آلمان) و دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (Waters، آمریکا) بود.

حلال استونیتریل با درجه خلوص HPLC از شرکت مرک آلمان و استاندارد مالتوتروز با خلوص بیش از ۹۹/۵ درصد از شرکت سیگما آمریکا تهیه شد. تجهیزات مورد استفاده در

۲-۳- آماده سازی نمونه و محلول های

استاندارد

آماده سازی نمونه: پیش آماده سازی نمونه با هدف استخراج کربوهیدرات ها از آن مطابق استاندارد MEBAK انجام گرفت (۲۹) بدین منظور که ۱/۵ گرم از نمونه مالت توسط ترازو توزین و ۸/۵ میلی لیتر آب مقطر به آن اضافه شد. نمونه های رقیق شده به مدت ۱۵ دقیقه در دستگاه سونیکیتور قرار گرفت و سپس با استفاده از کاغذ صافی واتمن صاف شدند و جهت آماده سازی نمونه ها برای تزریق به دستگاه کروماتوگرافی، محلول های صاف شده به مدت ۱۵ دقیقه با دور ۳۰۰۰ در دقیقه سانتریفوژ شدند، سپس ۱ میلی لیتر از محلول جمع آوری شده شامل آنالیت با استفاده از سرنگ از فاز آبی جدا و ۵۰۰ میکرولیتر از محلول رویی با سرنگ برداشته و از فیلترسرسرنگی با قطر منافذ ۰/۴۵ میکرون عبور داده شد و در نهایت ۵۰ میکرولیتر نمونه صاف شده به دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا تزریق شد.

تهیه محلول های استاندارد: جهت تهیه محلول های استاندارد مالتوترئوز، محلول مادر به غلظت ۵۰ میلی گرم در میلی لیتر از آنالیت، در آب دیونیزه تهیه شد و با رقیق سازی مناسب، سری محلول های استاندارد کاری تهیه گردید. برای ساخت محلول استاندارد مالتوترئوز، مقدار ۵۰ میلی گرم از استاندارد به دقت توزین، در بالن ژوژه ۵۰ میلی لیتر ریخته و با مخلوط آب- استونیتریل (۸۰:۲۰) به حجم رسانده شد. از این محلول محلول های استاندارد در غلظت های ۴۰، ۲۰، ۶۰ و ۸۰ میلی گرم در لیتر تهیه شد سپس جهت تزریق به ویال های دستگاه کروماتوگرافی منتقل گردید.

۲-۴- روش آزمون

دستگاه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا شامل یک پمپ و نمونه بردار اتوماتیک Dionex و آشکارساز ضریب شکست Shodex ساخت کشور ژاپن جهت شناسایی کربوهیدرات ها و ستون پر شده آمینی فاز معکوس با ابعاد ۲۵۰ × ۴/۵ میلی متر و اندازه ذرات ۵ میکرولیتر بود. برای تهیه فاز متحرک از محلول ۸۰:۲۰ (آب: استونیتریل) با سرعت جریان ۱ میلی لیتر

در دقیقه، استفاده شد. حجم تزریق ۵۰ میکرولیتر در حالت ایزوکراتیک و دمای ستون در ۳۰ °C تنظیم شد.

۲-۵- تجزیه و تحلیل آماری

از نرم افزار اکسل تحت ویندوز XP برای رسم منحنی کالیبراسیون و جهت محاسبه میانگین داده ها و آزمون آماری از نرم افزار SPSS نسخه ۲۰ استفاده شد. برای تجزیه و تحلیل نتایج از آمار توصیفی و استنباطی استفاده شد و داده ها به صورت میانگین \pm انحراف معیار ارائه شدند. برای بررسی نتایج از آزمون تجزیه و تحلیل آنالیز واریانس (ANOVA) استفاده شد و تفاوت معنی دار در سطح ($p < 0/05$) در نظر گرفته شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- نتایج تعیین کیفی و کمی مالتوترئوز

جهت تعیین کیفی مالتوترئوز در نمونه های مالت از محلول استاندارد خالص این کربوهیدرات برای تعیین زمان بازداری آن استفاده شد. سپس در کروماتوگرام حاصل از نمونه های مالت در سامانه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا پیک مالتوترئوز با پیک متناظر آن در کروماتوگرام استاندارد مقایسه شد. در شکل ۱ نمونه کروماتوگرام مربوط به آنالیز محلول استاندارد تهیه شده در غلظت ۴۰ میلی گرم بر لیتر از قند مالتوترئوز و کروماتوگرام محلول استخراجی یک نمونه مالت نشان داده شده است. همانطور که در شکل (A) مشاهده می شود میانگین زمان بازداری مالتوترئوز در نمونه کروماتوگرام مربوط به آنالیز محلول استاندارد مالتوترئوز (۳/۳۸۳ دقیقه) بود که قابل مقایسه با مقدار میانگین آن برای نمونه مالت (۳/۵۶۱ دقیقه) می باشد از این مقیاس متناظر برای شناسایی کیفی مالتوترئوز و اثبات اصل بودن نمونه های مالت مورد مطالعه استفاده شد که نتایج این بررسی نشان داد تمام نمونه های مورد مطالعه شامل پودر مالت، عصاره مالت و پودر عصاره مالت دارای پیک شاخص مالتوترئوز در کروماتوگرام خود بودند.

در بخش آنالیز کمی برای تعیین غلظت مالتوترئوز در نمونه های تیمار و کنترل از روش رگرسیون و رسم نمودار

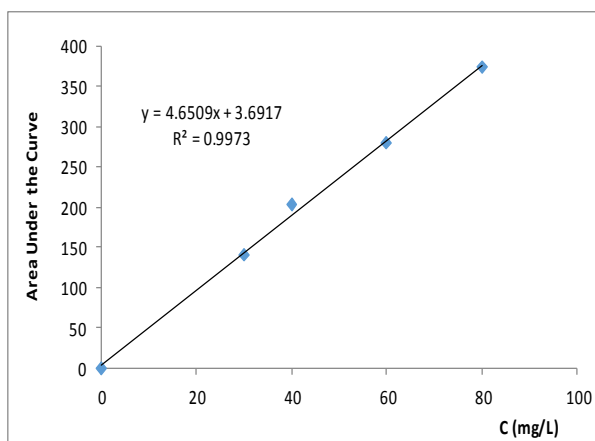


Fig 2 Calibration curve to determine the concentration of maltotriose in malt samples

۲-۳- نتایج مقایسه میانگین غلظت مالتوتروز در

نمونه های مالت

در شکل ۳ غلظت مالتوتروز در تمام نمونه های مالت مورد مطالعه به صورت مقادیر میانگین همراه با مقادیر انحراف استاندارد مربوطه ارائه شده اند. نتایج حاصل از مقایسه میانگین غلظت مالتوتروز در نمونه های مالت نشان می دهد که بیشترین مقدار میانگین مربوط به نمونه پودر مالت (BM₁) و کمترین مقدار میانگین مربوط به نمونه عصاره مالت (MA) می باشد.

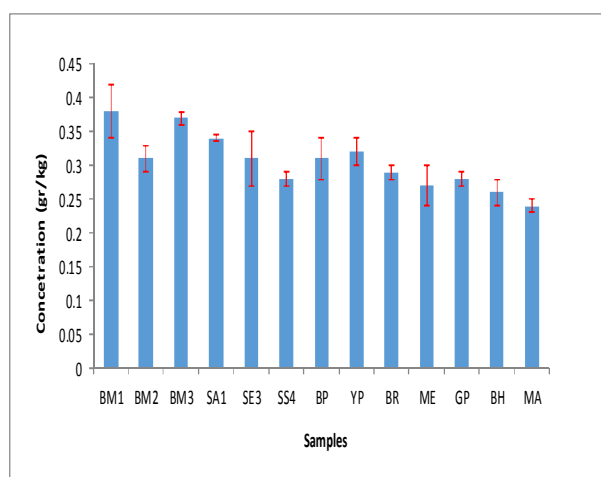


Fig 3 Comparison of mean values of maltotriose in concentration malt samples (g/kg)

کالیبراسیون استفاده شد و در پایان با استفاده از منحنی کالیبراسیون غلظت مالتوتروز تعیین گردید و بر حسب میلی گرم برگرم گزارش شد. منحنی کالیبراسیون حاصل از تزریق سطوح مختلف محلول های استاندارد مالتوتروز در شکل ۲ نشان داده شده است. این منحنی دارای معادله خط $y = 4.6509x + 3.6917$ و ضریب همبستگی $R^2 = 0.9973$ می باشد.

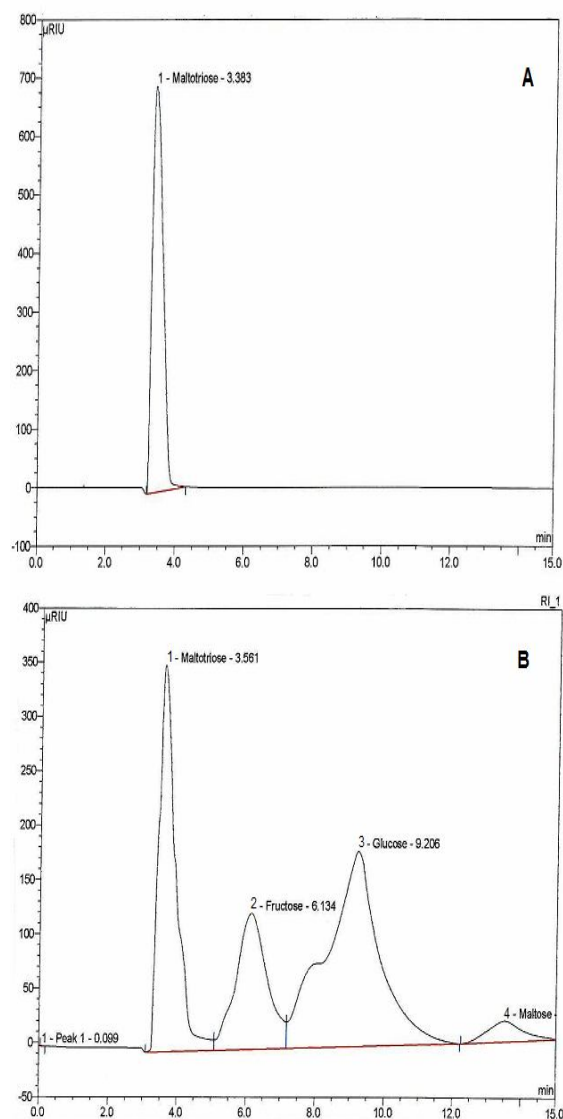


Fig 1 (A) Typical HPLC chromatogram for analysis of standard maltotriose (40 mg/ml) and (B) HPLC chromatogram obtained from injection of 50 µl extracted malt sample solution (1) maltotriose (2) fructose (3) glucose (4) maltose

تفاوت معنی داری بین مقادیر میانگین غلظت مالتوتروز در نمونه ها وجود ندارد ($p < 0.05$).

۳-۴- نتایج حاصل از آزمون آماری

مقایسه مقادیر میانگین غلظت مالتوتروز با نرم افزار SPSS با استفاده از آزمون ANOVA انجام گرفت. در فرض صفر آزمون، فرض گردید که میانگین غلظت مالتوتروز در تمام نمونه ها یکسان و در فرض یک فرض شد که دست کم میانگین غلظت مالتوتروز در دو گروه با هم متفاوت باشند. نتایج این بررسی در جدول ۳ ارائه شده نشان می دهد که $p > 0.05$ و بنابراین فرض صفر پذیرفته شد و میانگین غلظت مالتوتروز در تمام نمونه ها با هم اختلاف معنی داری ندارند.

۳-۳- نتایج میانگین غلظت مالتوتروز برحسب

نوع مالت

در جدول ۲ نتایج میانگین غلظت مالتوتروز در انواع مالت به صورت مقایسه ای ارائه شده است.

Table 2 Comparison of mean concentration of maltotriose in a various malt sampl

Sample	Mean \pm standard deviation (g / kg)
Malt powder	0.34 \pm 0.04 ^a
Malt Extract	0.30 \pm 0.05 ^a
Malt Extract Powder	0.30 \pm 0.02 ^a

No significant difference in the level ($p < 0.05$). a

بر اساس نتایج مندرج در این جدول و مقایسه میانگین غلظت مالتوتروز در نمونه های مختلف مالت مشاهده می شود که

Table 3 The result of statistical analysis of variance (ANOVA) for comparison of mean concentration of maltotriose in various malt samples

Samples		Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Concentration E	Between Groups	.001	3	.000	1.867	.483
	Within Groups	.000	1	.000		
	Total	.001	4			
Concentration P	Between Groups	.010	3	.003	4.200	.341
	Within Groups	.001	1	.001		
	Total	.011	4			
Concentration PE	Between Groups	.001	3	.000	.450	.767
	Within Groups	.001	1	.001		
	Total	.002	4			

Malt Extract, P: Malt Powder, PE: Malt Extract Powder

آمده با نتایج تحقیق ژورکوا [۳۰] با میزان ضریب همبستگی ۰/۹۹۹۹ همخوانی دارد.

۳-۶- میانگین غلظت مالتوتروز در انواع مالت

بر اساس نتایج آزمون آماری آنالیز واریانس بین غلظت مالتوتروز در نمونه های مختلف مالت در سطح اطمینان ۹۵ درصد اختلاف معنی داری وجود ندارد ($p < 0.05$) (جدول ۲). همچنین یافته های حاصل از این تحقیق حاکی از آن است که میزان غلظت مالتوتروز در نمونه های مالت در دامنه ۰/۲۴ تا ۰/۳۸ گرم در کیلوگرم می باشد این در حالی است که در

۳-۵- بررسی محلول های استاندارد مالتوتروز

مطابق شکل ۲ آنالیز داده های حاصل از تزریق محلول های استاندارد مالتوتروز تا غلظت ۸۰ میلی گرم در لیتر به سامانه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا نشان می دهد که این داده ها رابطه منطقی میان الگوی همبستگی منحنی و خطی بودن پاسخ آشکارساز ضریب شکست با غلظت مالتوتروز وجود دارد. ضمن اینکه مقدار ضریب همبستگی $r^2 = 0.9973$ بدست

یافته آفرلی دارد که این تفاوت مربوط به استفاده از نوع آشکارساز و فاز متحرک مورد استفاده می باشد.

Table 4 Comparison of maltotriose retention time in the chromatographic system in a variety of malt products in the other studies

Sample	Retention time (min)	Refrence
Beer	18.8	[27]
Beer	22.21	[31]
Non-alcoholic beer	8-9	[33]
Wort	15.3	[34]
Wort+Cereals	12	[35]

۳-۹-آزمون تشخیصی برای مالت تقلبی

اندازه گیری کربوهیدرات ها یکی از آزمون های ساده و موثر جهت تشخیص تقلبات مالت است. با توجه به تحقیقات گسترده در حوزه ترکیبات قندی موجود در مواد غذایی در حاضر مهم ترین روش برای آنالیز کربوهیدرات ها استفاده از کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا می باشد لذا تعیین شاخص کربوهیدراتی برای مشخص کردن مالت طبیعی در موارد افزودن سایر ترکیبات می تواند مناسب باشد. با مشاهده مطالعات محققین جهت انتخاب روش آزمون نیز می توان به این نتیجه رسید که استفاده از روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا به عنوان روش مطلوب و کارآمد با مطالعات محققین همخوانی دارد. در جدول ۵ پژوهش های محققین با روش های دستگاهی ارائه شده است. تفاوت در ارزیابی هایی که در کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا وجود دارد بدلیل تفاوت در نوع آشکارساز آن می باشد. در برخی از مطالعات از قبیل مطالعه فلورایدی و همکاران از آشکارساز پراکندگی نور تبخیری [۱۲] و یا نوگیرا و همکاران از آشکارساز ضریب شکست [۳۱] جهت ارزیابی کربوهیدرات استفاده شده است. با توجه به اینکه آشکارسازهای ضریب شکست یکی از آشکارسازهای عموم هستند در این تحقیق جهت ماهیت طبیعی مالت مورد استفاده قرارگرفت. نتایج ارائه شده با این روش توسط میلک در سال ۲۰۰۷ در دو نمونه ورت [۳۳] در مقایسه با نتایج پژوهش حاضر همخوانی داشت و با مطالعه یوریک [۳۲] در دامنه منطقی از داده ها قرار دارد.

مطالعه ای دیگر که توسط کورتاسرو در سال ۲۰۰۴ انجام شده میزان مالتوتروز ۰/۲۶ گرم در لیتر در نمونه های آبجو بدون الکل و ۰/۲۳ گرم در لیتر در نمونه های آبجو کلاسیک بوده است [۲۴]. در مطالعه ای دیگر که در سال ۲۰۰۵ توسط نوگیرا انجام شده مقدار مالتوتروز ۱/۳ گرم در لیتر [۳۱] و در تحقیقی که در سال ۲۰۰۹ توسط یوریک انجام شده مقدار آن در نمونه های آبجو و ورت ۰/۵۵ گرم در لیتر گزارش شده است [۳۲]. مقایسه مقادیر حاصل از پژوهش حاضر نشان می دهد با توجه به اینکه نمونه های مورد مطالعه در تحقیق از نوع پودر یا عصاره بودند و نمونه های سایر مطالعات در نوشیدنی ها و آبجو گزارش شده لذا تفاوت در این نتایج بدلیل تفاوت در نوع فرآورده و رقیق شدن مالتوتروز در نمونه های نوشیدنی می باشد.

۳-۷-بررسی کروماتوگرام های حاصل از

سامانه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا

با مقایسه کروماتوگرام حاصل از پیک کروماتوگرام استاندارد مالتوتروز با کروماتوگرام یک نمونه مالت در شکل ۱ می توان به بررسی تقلبات مالت با مقایسه این دو پیک پرداخت. زمان بازداری کروماتوگرام حاصل از نمونه مالت و محلول در دامنه منطقی و یکسان با هم قرار دارد لذا نمونه مورد آزمون از نظر سلامت و طبیعی بودن با شاخص مالتوتروز تعیین شده مطابقت دارد و هر دو پیک در بازه زمانی ۳ تا ۴ دقیقه قرار دارد.

۳-۸-تعیین زمان بازداری

زمان بازداری یک شاخص مهم در کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا محسوب می شود و در این تحقیق میانگین زمان بازداری در پیک استاندارد مالتوتروز غلظت های مختلف ۳/۴۰۴ دقیقه می باشد. با بررسی زمان بازداری مالتوتروز در نمونه های غذایی در مطالعات محققین در جدول ۴ مشاهده می شود که در سطح ۰/۰۵ اختلاف معناداری با زمان بازداری نمونه های مالت وجود دارد که بدلیل روش و نوع نمونه غذایی مورد مطالعه می باشد بصورتیکه زمان بازداری در پیک استاندارد مالتوتروز در سال ۲۰۱۴ طبق گزارش آفرلی ۸ دقیقه می باشد [۲۷]. لذا زمان بازداری پیک مالتوتروز در تحقیق حاضر تفاوت معنی داری با پیک مالتوتروز در

Table 5 Other reported methods for instrumental analysis of maltotriose

Sample	Test method	Carbohydrates studied	Reference
Drinking	HPLC	glucose, fructose, sucrose, maltose, lactose, raffinose	[25]
Beer	HPLC	mannose, maltose, maltotriose, maltotetraose, maltopentose, maltohexaose, maltoheptaose	[27]
Juice (apple juice)	HPLC	glucose, fructose, sucrose, sorbitol, ethanol, glycerol	[36]
Beverages	HPLC	glucose, fructose, lactose, maltose, sucrose	[37]
Instant coffee	HPLC	arabinose, galactose, glucose, mannose, fructose, ribose, xylose	[38]
Baby food	HPLC	glucose, galactose, sucrose, maltose	[39]
Honey	GC	multiple carbohydrates	[40]
Juice (pomegranate juice)	LC	glucose, fructose, sucrose	[41]
Milk	HPLC	glucose, mannose, galactose, fructose	[42]

HPLC: High Performance Liquid Chromatography GC: Gas Chromatography LC: Liquid Chromatography

processing, standards and test methods).
Tehran: Food & drug laboratory research center.

- [2] ISIRI. (2003). Cereal and cereal products: Malt and malt extract. Standard 6960.
- [3] Azizi M.H, Hadian Z. (2011). Cereal & products technology. Tehran: Agricultural Extension and Education Publications.
- [4] Arab American F, Elhamirad A.H, Ghodse vali A.R, Armin M. (2012). Evaluation of the effect of malting process on physicochemical characteristic in two barley varieties in Golestan province. Innovation in food science and technology. *Journal of Science and technology*. 4, 3(3): 88-89.
- [5] Ghodsvali A.R, Arabamerian F, Bakhshabadi H. (2014). A study on malting characteristic of three cereal seeds: barley, wheat and triticale. Innovation in food science and technology *Journal of Science and technology*. 5, 4(18): 25-32.
- [6] Ghasemi Damavandi S, Ghodsvali AR, Fazeli F, Mohammadi M. (2013). Qualitative and quantitative characteristics of barley malt during the period of soaking and germination. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*. 7(5): 213-220.
- [7] Bakhshabadi H, Mirzaei H, Ghods Vali A.R, Ziiaifar A, Idani E, Mohammadi M. (2012). Effects of steeping and germination time on qualitative and quantitative characteristics of malt extract obtained from barley (line EBYT-88-20). *Journal of Research and Innovation in Food Science and Technology*. 1(2): 129-138.

۴- نتیجه گیری

شناسایی کربوهیدرات مالتوتروز در انواع نمونه های مالت با میانگین زمان آنالیز ۳/۴۰۴ دقیقه محاسبه شد. از مجموعه نتایج حاصل از این تحقیق و تحقیقات به عمل آمده پیشین می توان نتیجه گرفت که مقدار مالتوتروز در انواع مالت پرمصرف تهیه شده در شهر تهران در یک میزان و میانگین منطقی از نظر سطح مقادیر قرار دارد لذا پیشنهاد می شود مطالعات بیشتری در زمینه شناسایی مالتوتروز در مواد غذایی تخمیری صورت پذیرد و با توجه به عدم وجود استاندارد جهت ماهیت و اصالت مالت به سایر محققین پیشنهاد می شود در تدوین استاندارد در این زمینه و بررسی جوانب آن اقدامات پژوهشی انجام گردد.

۵- سپاسگزاری

این مقاله حاصل از پایان نامه کارشناسی ارشد رشته مهندسی صنایع غذایی دانشگاه آزاد واحد علوم دارویی می باشد و مراتب تقدیر و تشکر خویش را از کارشناسان آزمایشگاه افزودنی های غذا در آزمایشگاه های مرجع کنترل غذا و دارو و سرکار خانم دکتر صارم نژاد استادیار دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی ابراز می نمایند.

۶- منابع

- [1] Akbari-adergani B, Shir Khan F. (2016). Malt and malt products (principle of

- meter. *Int. J. Chem. Environ.* 24 (2): 270-274.
- [21] Kakita H, Kamishima H, Komiya K, Kato Y. (2002). Simultaneous analysis of monosaccharides and oligosaccharides by high-performance liquid chromatography with post column fluorescence derivatization. *Journal of Chromatography A.* 961: 77-82.
- [22] Plaga A, Stumpf J, Fiedle H.P. (1989). Determination of carbohydrates in fermentation processes by high-performance liquid chromatography. *Applied Microbiology Biotechnology.* 32: 45-49.
- [23] Ferreira I, Martins F. (2007). Carbohydrate content of Lager and ale beer. *Alimentaco Humana.* 13(1): 26-30.
- [24] Cortacero-Ramirez S, Segura-Corretero A, Cruces-Blanco C, Hernaiz-bermu desdecastro M, Fernandez-cutierrez A. (2004). Analysis of carbohydrates in beverages by capillary electrophoresis with precolumn derivatization and UV detection. *Food Chemistry.* 84: 471-476.
- [25] Wei Y, Ding M. (2000). Analysis of carbohydrate in drinks by high-performance liquid chromatography with a dynamically modified amino column and evaporative light scattering detection. *Journal of chromatography A.* 904: 113-117.
- [26] Cendezo-hoyos L, Perez lopez E, Ruperz P. (2015). Improved evaporative light scattering detection for Carbo -hydrate analysis. *Food Chemistry.* 180: 265-271.
- [27] Afrelli G, Sartini E. (2014). Characterisation of brewpub beer carbohydrates using by high-performance anion exchange chromatography coupled with pulsed amperometric detection. *Food Chemistry.* 142: 152-158.
- [28] Bodgan P, Kordialike-bogacka E. (2017). Alternatives to malt in brewing. *Trend in food science & technology.* 65: 1-9.
- [29] MEEBAK. (2000). Revision of malt extract standard, Determination of fermentable sugars.
- [30] Jurkova M, Cejka P, Steba K, Olsovska J. (2014). Determination of total carbohydrate content in beer using its pre-colum enzymatic cleavage and HPLC-IR Method. *Food Anal.* 7(8): 1677-1689.
- [31] Nogueira L, Silva F, Ferreira I, Trugo L.C. (2005). Separation and quantification of beer Carbohydrates by high performance liquid chromatography with evaporative light
- [8] Maghsoudlou Y, Kashiri M, Aghajani N. (2012). Effect of malting on physicochemical properties of barleys variety (Sahra) and applicability of using unmalted barley as an adjunct. *JFST.* 9 (36): 97-107.
- [9] Aghajanian N, Khashaninezhad M, Kadivar M, Hosseoni S.H. (2009). Effect of temperature on the physicochemical properties of the type of dryer and malt from barley cultivars. *Journal of Agricultural Sciences and Natural Resources.* 16 (3):147-157.
- [10] Codex (1985). Codex Standard for wheat flour. Codex Standard; 152: 1-3.
- [11] Kashiri M, Maghsoudlou Y, Kashaninejad M. (2009). Effect of malting on physicochemical properties of two wheat varieties (Kohdasht, Zaghos). *J. Agric. Sci. Natur. Resour.* 16(Special 2): 1-10.
- [12] Floridi S, Miniati E, Montanari L, Fantozzi P. (2001). Carbohydrate determination in wort and beer by HPLC-ELSD. *De Monatsschrift Fur Brauwissen Chaft.* 9(10): 209-215.
- [13] Rastmanesh R. (2007). A pocket guide to clinical nutrition & diet therapy. Tehran: *Marzedanesh.*
- [14] Kathleen M, Escott S, Raymond J. (2012). Krause's Food and the nutrition care proces, Translated by: Dorosti motlagh A, Topchian O, Daneshi M, Yosefinejad A. Tehran: Jafari.
- [15] Fatemi H. (2000). Food chemistry.
- [16] Mahan L.K, Escott S. (2005). Krauses food, nutrition and diet therapy. Translated by: Sadeghi Makki R. Tehran: Teymor -zadeh.
- [17] Stamluk B.U, Alres Jr S.L, Hollatze C, Zastrow C.R. (2006). Improvement of maltotriose fermentation by saccharomyces cervisia. *Applied Microbiology.* 43: 370-376.
- [18] Karmakar M, Rani Ray R. (2011). A maltotriose producing thermo stable amylase from bacillus SP KR11. *Microbiology and biotechnology research.* 1(3): 91-99.
- [19] Castellari M, Staitini E, Spinabelli U, Riponi C. (2001). Determination of carboxylic acid, carbohydrates, glycerol, ethanol and 5-HMF in beer by high-performance liquid chromatography and uv-refractive index double detection. *Journal of Chromatographic Science.* 39: 235-238.
- [20] Anyika L.C, Okonkwo S.I, Ejike E.N. (2012). Comparative analysis of monosaccharide and disaccharide using different instrument refractometer and Polari

- medicine using on-line dialysis for sample preparation. *Food chemistry*. 53: 105-110.
- [38] Bernal J.L, Delnozal M.J, Toribio L, Del Alamo M. 1996. HPLC analysis of carbohydrates in wines and instant coffee using anion exchange chromatography coupled to pulsed amperometric detection. *J. Agric. Food Chem.* 44: 507-510.
- [39] Ferria I, Gomes A, Ferreira M. (1998). Determination of sugars and some other compounds infant formula follow-up milk and human milk by HPLC-UV/RI. *Carbohydrate polymers*. 37: 225-229.
- [40] Fuente E, Ruiz-matute A.I, Valencia R.M, Sanz J, castro I.M. (2011). Carbohydrate Composition of Spanish unifloral honey. *Food chemistry*. 129: 1483-1489.
- [41] El-sayed M, Salih A, Musbah B, Mohammed A, Mohammed H. (2014). Liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS) Method for the determination of sugars in fresh pomegranate fruit juices. *Der Pharma Chemica*. 6(5): 320-333.
- [42] Le parc A, Lee H, Chen K, Barile D. (2014). Rapid quantification of functional carbohydrates in food products. *Food and Nutrition Science*. 5: 77-78.
- scattering detection. *Journal of chromatography A*. 207-210.
- [32] Eurich M, Chair L, Barber K, Butter field K.X. (2009). Wort and beer fermentable and total carbohydrate measured by high performance liquid chromatography. *American Society of Brewing Chemist Inc.* 256-261.
- [33] Meilk M. 2007. Worts analysis report, Rmit university. *Melborn food Chemistry*. 1-12.
- [34] Patel G, Ingledew M. (1973). Trend in wort carbohydrate utilization. *Applied Microbiology*. 26 (3): 349-353.
- [35] Hodzic Z, Banjanin B, Sadadinoviz J. (2008). Fermentable carbohydrates determination in different worts by HPLC-RI. *Journal of Engineering Analysis of Faculty of Engineering Hune*. 105-110.
- [36] Gomis B, Alvarez M.D, Alonso J.J, Vallina A. (1989). Determination of sugars and alcohols in apple juice and cider by high performance liquid chromatography. *J of Chromatography A*. 25(8): 701-706.
- [37] Green way G, Kometa N. (1995). The determination of sugars in beverages and

Detection of Adulteration in Malt by Maltotriose Index in Malt Powder, Malt Extract & Malt Extract Powder by High-Performance Liquid Chromatography Coupled with Refractive Index Detection

Shirkhan, F. ¹, Akbari-adergani, B. ^{2*}, Salami, M. ³

1. MS.c of Food Sciences & Technology, Faculty of Advanced Sciences & Technology, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University, Tehran -Iran (IAUPS)
2. Associate professor of food and drug laboratory research center, food and drug organization, ministry of health and medical education, Tehran, Iran
3. Assistant professor Department of Food Science and Engineering, College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Karaj, Iran

(Received: 2017/10/27 Accepted:2018/01/16)

Malt is a natural juice barley product with high nutritional value and many uses in the food and pharmaceutical industries. Since Malta and its products are used as raw materials or as a final product, it is necessary to pay attention to its nature and adulteration. The aim of this study was to determine the adulteration of malt in malt samples using the using maltotriose index with chromatography and of refractive index detection. Thirteen samples of malt including powder, malt extract and malt extract powder from the supply level in Tehran city were randomly collected and analyzed. The dissolution of the sample with an ultrasound apparatus and the isolation and identification of carbohydrates in the chromatographic system and determination of malteotheosis by the refractive index detector was performed. The results show that the average concentrations of maltotriose in powder malt 0.34 ± 0.04 , the malt extract 0.30 ± 0.05 and malt extract powder 0.30 ± 0.02 grams per liter. The results of the statistical test showed that there was no significant difference between the mean of the measured glucose in the three groups ($p < 0.05$). The nature of malt in the samples analyzed by standard solution peak retention times and maltotriose match with the corresponding peak in each of the samples was successful. The results show that using high performance liquid chromatography system to detect refractive index can be analyzed in a time of 3/404 minutes maltotriose by identifying and measuring the nature and originality of fermented malt realized.

Keywords: Malt Powder, Malt Extract, Malt Extract Powder, Maltotriose, High Performance Liquid Chromatography

*Corresponding Author E-Mail Address: analystchemist@yahoo.com