

تعیین آکریل آمید در نان‌های مسطح سنتی شهرستان کرمان به روش LC/DAD و مطالعه تاثیر عصاره رزماری بر تشکیل آن

محمد مهدی متقی^{1*}، مهدی سیدین اردبیلی¹، مسعود هنرور¹، میترا مهربانی²، امین باقی‌زاده³

¹ دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات، گروه علوم و صنایع غذایی، تهران، ایران

² دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دانشکده داروسازی، گروه فارماکوگنوزی، کرمان، ایران.

³ دانشگاه بین‌المللی علوم محیطی و فن آوری پیشرفته، کرمان، ایران

تاریخ پذیرش: 1391/5/12

تاریخ دریافت: 1391/1/22

چکیده

در سال 2002، موسسه تحقیقات ملی غذا در کشور سوئد وجود مقادیر بالای آکریل آمید را در غذاهای حرارت دیده سرشار از کربوهیدرات اعلام کرد. این ترکیب شیمیایی توسط آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان به عنوان ترکیب سرطان‌زای احتمالی برای انسان شناخته شده است. این یافته‌ها، نگرانی‌های زیادی را در بین مجامع جهانی بوجود آورد. با توجه به اینکه بیشترین غذای مصرفی مردم ایران را نان تشکیل داده و هم‌چنان به روش‌های سنتی و بیشتر با استفاده از حرارت مستقیم پخت می‌گردد، لذا تعیین میزان آکریل آمید در انواع این ماده‌ی غذایی ضروری به نظر می‌رسد. هدف از این تحقیق مقایسه میزان آکریل آمید در انواع نان‌های سنتی پخت شده در شهرستان کرمان با استفاده از روش LC/DAD و تعیین نان پرخطر از نظر میزان تشکیل آکریل آمید می‌باشد. نتایج حاصل از این پژوهش نشان داد نان لواش دارای کمترین میزان آکریل- آمید تولید شده در بین نان‌های مورد بررسی است و نان تافتون در مقایسه با سایر نان‌ها بیشترین میزان آکریل- آمید را دارد. بعد از نان تافتون نان‌های بربری و سنگک به ترتیب دارای بیشترین میزان آکریل آمید بودند. در ادامه اثر عصاره رزماری در سه غلظت متفاوت 1، 0/1 و 10 درصد بر روی تشکیل آکریل آمید در نوع نان پر خطر (تافتون) بررسی گردید. با توجه به یافته‌های این مرحله بهترین نتیجه در خصوص کاهش میزان تشکیل آکریل آمید، از تأثیر عصاره رزماری با غلظت 1٪ بدست آمد.

واژه‌های کلیدی: آکریل آمید، نان‌های سنتی، LC/DAD، 2- مرکاپتوبنزوئیک اسید، رزماری.

1- مقدمه

آکریل آمید (2- پروپین آمید) یکی از منومرهای صنعتی مهم است که از اواسط دهه 50 میلادی به طور وسیعی با هدف کاربردهای مختلف شیمیایی و محیطی مورد استفاده قرار گرفته است. این ترکیب به عنوان مونومر در سنتز پلی آکریل آمیدها که خود دارای کاربرد گسترده‌ای در صنایع مختلف از جمله پلاستیک سازی، رنگ سازی، کاغذسازی و آرایشی می‌باشند بکار می‌روند. هم چنین از آنها به عنوان عوامل رسوب دهنده در تصفیه آب آشامیدنی، کاهش آلودگی فاضلاب‌ها و پایه جامد در الکتروفورز پروتئین‌ها استفاده می‌شود (4). در اوایل دهه هفتاد به دنبال گزارش ناشی از بروز سرطان‌های غیر معمول بویژه سرطان کبد در بین کارگران کارخانه‌هایی که در معرض یک منومر صنعتی دیگر به نام وینیل کلراید بودند احتمال سرطان‌زایی آن (ترکیب وینیلی) نیز بر حیوانات آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفت و به دنبال آن چندین گزارش در مورد سرطان‌زایی آکریل آمید در انواع موش به چاپ رسید (9، 14). لذا در سال 1994 «آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان»¹ آکریل آمید را به عنوان ترکیب سرطان‌زای احتمالی برای انسان طبقه‌بندی نمود (6). به دنبال آن در آوریل سال 2002 اداره ملی غذای سوئد² و محققین دانشگاه استکهلم متفقاً وجود مقادیر بالای آکریل آمید را در غذاهای حرارت دیده غنی از کربوهیدرات که به صورت سرخ شده و یا طبخ شده در دماهای بالا (بیشتر از 120 درجه سانتی‌گراد) تهیه می‌شدند را اعلام نمودند (4).

این ترکیب طی واکنش‌هایی چون میلارد و از طریق پیش‌سازهایی همچون آکروئین و اسید آکروئیک و یا از طریق تجزیه چربی‌ها در دماهای بالا ایجاد می‌شود (12، 15). از مهمترین ترکیبات کلیدی در تولید آکریل آمید می‌توان قندهای احیا کننده‌ای چون فروکتوز و گلوکز و اسید آمینه آسپاراژین را نام برد (3، 15). در پیدایش آکریل آمید فاکتورهای مختلفی نیز دخالت دارند که از آن جمله می‌توان به ماتریکس غذا، میزان اسیدیته، فعالیت آبی، دما و زمان تخمیر، دما و زمان حرارت‌دهی، نوع آنتی‌اکسیدان مصرفی و شرایط انبارمانی اشاره کرد که با کنترل فاکتورهای ذکر شده تا حدود زیادی می‌توان میزان تشکیل آکریل آمید را در مواد غذایی کاهش داد (20). نان‌های سنتی ایران

که در مقایسه با نان‌های حجیم باید آنها را نازک و مسطح نامید، از قدیم در شهرها و روستاهای ایران به شکل‌های مختلف تهیه و مصرف می‌شده‌اند و هنوز هم در الگوی تغذیه اکثریت مردم به ویژه قشر کم درآمد جامعه نقش قابل توجهی دارند (1). در ایران حدود 60٪ پروتئین و انرژی مورد نیاز روزانه از نان تأمین می‌شود (2)، لذا با توجه به اهمیت و جایگاه نان که یکی از ارزان‌ترین و مهم‌ترین مواد غذایی مورد استفاده انسان می‌باشد، ضرورت برنامه‌ریزی پیرامون کیفیت و سلامت آن بیش از پیش احساس می‌شود (2). تاکنون در ایران تحقیقات قابل توجهی در خصوص اندازه‌گیری میزان آکریل آمید در فرآورده‌های غلات صورت پذیرفته و یا گزارشی در این خصوص ثبت نشده است. در سال 2005 «کمیته مشترک سازمان خواربار جهانی و سازمان بهداشت جهانی برای افزودنیهای مواد غذایی»³ گزارشی مبنی بر میزان متوسط حضور آکریل آمید در غلات و مواد غذایی بر پایه غلات در کشورهای اروپایی منتشر کرد. در انواع نان متوسط محتوای آکریل آمید 446، در انواع شیرینی، کلوچه و کیک 350 و در غلات صبحانه 96 میکروگرم بر کیلوگرم گزارش شده است (7).

در زمینه اعمال روش‌های کاهش آکریل آمید در فرآورده‌های غلات در ایران، تاکنون گزارشی منتشر نشده است. اما در سایر کشورها در مورد استفاده از عصاره‌های گیاهی بررسی‌هایی انجام و گزارشات متعددی منتشر شده است. در خصوص نان و فرآورده‌های نانویی، هدگار⁴ و همکارانش در سال 2007 تاثیر پرواکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌های مختلف بویژه عصاره آبی رزماری (اکلیل کوهی) و عصاره چای سبز را در انواع نان بررسی نمودند. ایشان 57٪ کاهش در میزان آکریل آمید تشکیل شده در نان‌های پخت شده با عصاره رزماری را در مقایسه با نان شاهد گزارش نمودند (5). ژانگ⁵ و همکارانش در سال 2007 در گزارشی کاهش 72 تا 83 درصد در میزان آکریل آمید تشکیل شده در نوعی نان نازک سرخ شده در روغن را به دلیل اضافه کردن عصاره برگ گیاه بامبو و عصاره چای سبز منتشر کردند (24). بنابراین با توجه به مطالعات انجام یافته، کاربرد ترکیبات فلاونوئیدی، فلاوانول‌ها، لاکتون‌ها، اسیدهای فنولیک موجود در برخی عصاره‌های گیاهی باعث کاهش تولید آکریل- آمید می‌گردد. برخی از عصاره‌های گیاهی در غذاهای گوناگون

³ JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives)

⁴ Hedegaard

⁵ Zhang

¹ International Agency for Research on Cancer (IARC)

² Swedish National Food Administration (SNFA)

سولفات آمونیوم که همگی با خلوص بالا^۱ از شرکت مرک^۲ آلمان تهیه گردیدند.

از سیستم دوپمپی HPLC مدل 1200 محصول شرکت Agilent با آشکارساز DAD^۳، مجهز به نمونه بردار اتوماتیک 100 خانه^۴ و آون برای کنترل دمای ستون ZORBAX Eclipse (XDB C18) با مشخصات (4/6mm × 150mm, 5µm)، ساخت Waldbronn آلمان که از طریق نرم افزار Chemstation کنترل و برنامه ریزی می شدند، استفاده گردید.

در مرحله اول جمع آوری نمونه ها به طریق نمونه برداری تصادفی طبقه ای از نوع میدانی و با مراجعه به مناطق تعیین شده و بسته به جمعیت نانوائی ها انجام شد. برای تهیه هر نمونه نان (چهارنوع نان: تافتون، سنگک، لواش و بربری)، از یک نانوائی چهار نان از سه پخت صبح، ظهر و عصر مجموعاً دوازده نان تهیه و به آزمایشگاه منتقل و پس از خشک کردن نمونه ها در دمای محیط (28°C)، با استفاده از دستگاه آسیاب برقی Braun مدل KSM2 به ذرات کوچک (اندازه ذرات حداکثر 1 میلی-متر) تبدیل و مخلوط گردیدند و عملیات آماده سازی 100 گرم نان خشک که نمونه ای مخلوط از هر دوازده نان بود انجام و برای استخراج آکریل آمید مورد استفاده قرار گرفت. در ادامه برای تشخیص تأثیر ترکیب مورد نظر بر کاهش میزان آکریل آمید، گردآوری داده ها در چهارچوب یک طرح کاملاً تصادفی با سه تیمار و پنج تکرار در شرایط آزمایشگاه انجام گردید و پس از اضافه کردن ترکیب مورد نظر به خمیر، خمیرهای تهیه شده به یک نانوائی منتقل و بر اساس شرایط متناسب با شرایط مرحله اول (پخت عادی) پخت صورت گرفت. تمام نمونه ها پس از آسیاب شدن تا زمان انجام عمل استخراج در دمای 4- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

به منظور استخراج و اندازه گیری مقدار آکریل آمید با استفاده از دستگاه LC/DAD از مشتق سازی آکریل آمید با ماده «2-مرکاپتوبنزوئیک اسید»^۵ با شرح ذیل استفاده گردید (8، 13):

5 گرم نمونه نان خشک و آسیاب شده به دقت با ترازوی Mettler 0/0001 گرم مدل Collego 150 ساخت شرکت

فعالیت آنتی اکسیدانی متفاوتی از خود نشان می دهند. طی مطالعات انجام شده مشخص گردید که روغن آویشن و زیره کوهی بعنوان آنتی اکسیدان در هنگام سرخ کردن و پختن مواد غذایی، عمل می کنند. موثرترین ترکیبات آنتی اکسیدانی در این عصاره ها عبارتند از فلاونوئیدها، کارنوزول، کارنوزیک اسید و کافئیک اسید. فلاونوئیدها عوامل مهم کاربردی در غذا هستند که در گیاهان دارویی، سبزیجات و میوه جات به طور قابل ملاحظه ای وجود دارند. فلاونوئیدها دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بالا هستند و اثر حفاظتی قوی در برابر بیماری های قلبی و عروقی، مغزی، سرطان و دیابت از خود نشان می دهند. علاوه بر این فلاونوئیدها ترکیبات مناسبی برای کاهش تشکیل آکریل آمید در مواد غذایی می باشند. انواع بسیاری از گیاهان مانند عصاره چای سبز، رزماری، شیرین بیان به طور گسترده غنی از فلاونوئیدها هستند که به عنوان آنتی اکسیدان در تولید فرآورده های غذایی در سراسر جهان استفاده میشوند (23).

فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره رزماری از حدود 30 سال پیش شناخته شده است و طی این مدت تحقیقات زیادی بر روی این گیاه انجام شد که همگی خاصیت آنتی باکتریایی و آنتی اکسیدانی آن را تأیید کرده اند. مهمترین ماده فعال در عصاره رزماری کارنوزول می باشد. ترکیبات فنولی دیگری مثل اپی رزمانول و ایزو رزمانول همچنین اسید رزمارینیک و اسید کارنوزیک از برگ های رزماری جداسازی شده اند. رزماری به دلیل داشتن ترکیبات قوی آنتی اکسیدان در صنایع دارویی و غذایی مورد توجه می باشد (5). از آنجا که نان در کشور ایران همچنان به روش های سنتی و بیشتر با استفاده از حرارت مستقیم پخت می گردد، محاسبه میزان آکریل آمید در نان های مختلف جهت آگاهی از میزان این ماده ی سرطان زا به منظور بهبود وضعیت غذایی مردم ضروری به نظر می رسد. تاکنون گزارشی در رابطه با بررسی میزان آکریل آمید در نان های تولید شده در مناطق مختلف کشور ارائه نشده است.

2- مواد و روش ها

مواد شیمیایی شامل آکریل آمید، استن، هگزان نرمال، 2-مرکاپتوبنزوئیک اسید، هیدروکسید سدیم، اسید کلریدریک، اتیل استات، گاز N₂، سولفات سدیم، متانل HPLC grade، استونیتریل HPLC grade، اسید استیک، استات سرب (II)،

¹ Extra pure

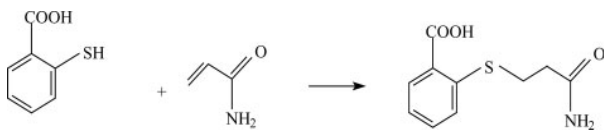
² Merck

³ Diode Array Detector

⁴ Auto sampler

⁵ 2- Mercaptobenzoic Acid

ویال شیشه‌ای مخصوص به منظور تزریق به دستگاه HPLC منتقل گردید.



شکل 1- واکنش 2-مرکاپتو بنزوئیک اسید با آکریل آمید و تهیه مشتق مربوطه

فاز متحرک¹ مخلوطی از استونیتریل و محلول آبی یک گرم در لیتر اسید استیک به ترتیب به نسبت حجمی 20٪ و 80٪ بکار برده شد. تزریق در هر مرحله بطور اتوماتیک با حجم 20 میکرولیتر انجام گردید. سرعت جریان فاز متحرک 0/7 میلی‌لیتر در دقیقه تنظیم شد. ضمناً دمای ستون در 28 درجه سانتی‌گراد ثابت تنظیم گردید. برای تشخیص آنالیت از دو طول موج 238 و 254 نانومتر استفاده گردید.

در ادامه برای تهیه عصاره آبی برگ‌های رزماری (با نام علمی *Rosmarinus officinalis* L. از خانواده نعناع یا Lamiaceae)

به شرح زیر عمل شد:

برگ‌های رزماری از محل کاشت آغاز فصل پاییز شهر کرمان جمع‌آوری گردید و برای یک هفته در سایه در دمای اتاق خشک شد. گیاه آسیاب و از الک زیر عبور داده شد. 100g از گیاه با 500 میلی‌لیتر آب جوش به مدت نیم ساعت دم گردید و سپس با استفاد از قیف بوخنر و کاغذ صافی واتمن شماره 1 صاف گردید. عصاره‌های حاصل بطور جداگانه سرد و پس از فریز شدن، توسط دستگاه فریز درایر Eyela مدل 81 ساخت ژاپن به مدت 24 ساعت کاملاً خشک گردید و به صورت یک توده متخلخل درآمد. عصاره جمع‌آوری شده در ظروف شیشه کاملاً سر بسته در پوششی از ماده‌ی جاذب الرطوبه در یخچال نگهداری شد (11). وزن خشک عصاره فریزداری (لیوفیلیزه) حاصل از دم کرده رزماری، 25٪ وزنی وزنی (%w/w) بدست آمد.

پس از ارزیابی میزان آکریل‌آمید تولید شده در انواع نان‌های مورد بررسی جهت ارزیابی اثرات کاهشی، سه فرمولاسیون از عصاره آبی رزماری در غلظت‌های 0/1، 1 و 10 درصد تهیه و به خمیر نان با بیشترین میزان آکریل‌آمید تولید شده در فرآیند پخت افزوده شده و سپس نان پخته شده در شرایط یکسان و مطابق با مرحله اول، جهت تعیین مقدار آکریل‌آمید مورد ارزیابی قرار

سوئیس توزین و به داخل لوله سانتریفیوژ به حجم 50 میلی‌لیتر که محتوی 25 میلی‌لیتر آب مقطر بدون یون می‌باشد، منتقل گردید. محتوی لوله به مدت 5 دقیقه توسط دستگاه همزن لوله JKA vortex، مدل GENIUS3 ساخت اسپانیا به خوبی هم‌زده شد و سپس به منظور افزایش بازده استخراج به حمام اولتراسونیک ساخت شرکت آبی‌آسا ایران با دمای 30 °C به مدت 20 دقیقه انتقال داده شد. در مرحله بعد لوله مربوط به دستگاه سانتریفیوژ یخچال‌دار مدل U-320R شرکت BOECO ساخت آلمان منتقل و با 3850 دور در دقیقه به مدت 15 دقیقه در دمای صفر درجه سانتی‌گراد رسوب‌گیری گردید. 10 میلی‌لیتر از محلول صاف شده رویی توسط پی‌پت جاب‌دار جدا گردیده و به لوله سانتریفیوژ 50 میلی‌لیتری دیگر وارد شد. سپس قطره قطره محلول هیدرواکسید پتاسیم یک مولار به محتوی لوله اضافه گردید بطوریکه pH نهایی محلول داخل لوله به $8 \pm 0/3$ برسد. آنگاه به منظور انجام فرآیند مشتق‌سازی (شکل شماره 1)، از حدود یک میلی‌لیتر محلول 2-مرکاپتو بنزوئیک اسید استفاده شد (این محلول از انحلال 154 میلی‌گرم 2-مرکاپتو بنزوئیک اسید در 10 میلی‌لیتر سود یک مولار تهیه گردید). در این مرحله pH نهایی محتوی لوله بایستی به حدود 10 برسد. سپس لوله مربوطه با فویل آلومینیوم به منظور حفاظت از تابش نور پوشانیده شده و در حمام اولتراسونیک با دمای 35 °C به مدت 100 دقیقه قرار داده شد (8، 13).

پس از خاتمه فرآیند مذکور از 3 میلی‌لیتر محلول استات سرب II اشباع به منظور حذف باقیمانده معرف مشتق‌سازی استفاده گردید. در ادامه عمل سانتریفیوژ با شرایط 3850 دور در دقیقه به مدت 20 دقیقه و دمای 10 °C انجام گردیده و محلول شفاف روی رسوب جدا و با اسید کلریدریک 5 مولار تارسیدن به pH حدود $1/5 \pm 0/3$ اسیدی شد و دوباره با شرایط فوق سانتریفیوژ گردید.

محلول شفاف رویی به دقت با پی‌پت پاستور جدا و پس از انتقال به یک قیف جدا کننده 25 میلی‌لیتری در سه نوبت و هر بار با 5 میلی‌لیتر اتیل استات عمل استخراج مشتق از محلول آبی انجام گرفت. مجموع محلول‌های آلی حاصل از استخراج در یک لوله آزمایش جمع‌آوری و توسط سولفات سدیم بدون آب آبگیری شدند. سپس حلال آلی در دمای 60 الی 65 درجه سانتی‌گراد تبخیر شده و به لوله آزمایش 800 میکرولیتر (0/8 ml) متانل افزوده شده و پس از انحلال باقیمانده در متانل، محتوی لوله به

¹ Mobile phase

2-مرکاپتوبنزویک اسید می‌تواند آکریل آمید را در طول مدت 3 ساعت با بازده قابل قبول به یک تیواتر² پایدار تبدیل کند، که این تیواتر با حساسیت بالا توسط LC/DAD قابل تشخیص است. اخیراً این روش توسط آزمایشگاه‌های مختلف دنیا با کارایی بین‌المللی (حداقل 50 آزمایشگاه) مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج بسیار خوبی را نشان داد(8).

برای انجام مطلوب فرآیند مشتق‌سازی و بدست آوردن زمان لازم برای انجام واکنش، مطالعاتی بر روی مشتق‌سازی 100 میکروگرم از آکریل آمید استاندارد با استفاده از حمام اولتراسونیک انجام شده و زمانهای 40 تا 130 دقیقه بررسی شده است. نتایج مطالعات تجربی نشان‌دهنده که 100 دقیقه برای کامل شدن واکنش کافی می‌باشد(13). برای بدست آوردن بازده یکسان نحوه‌ی مخلوط کردن رایج در مطالعات مختلف، زمان لازم 3 ساعت ذکر شده است(8). خاصیت حفره‌سازی اولتراسوند(ما-فوق صوت) حباب‌های ریزی در فاز مایع ایجاد می‌کند که با شکستشان انرژی آزاد می‌کنند، که ممکن است فاکتور کلیدی تسریع‌کننده واکنش باشد. انرژی آزاد شده می‌تواند به باز شدن پیوندهای شیمیایی و تسریع کردن واکنش مشتق‌سازی کمک-کند(8). در این تحقیق از زمان 100 دقیقه استفاده شد.

تاثیر میزان واکنشگرها در مشتق‌سازی 100 میکروگرم از آکریل آمید استاندارد با میزان‌های متفاوت 0/2-0/5 میلی‌لیتر از محلول 2-مرکاپتوبنزویک اسید بررسی شده است. نتایج تحقیقات نشان داد برای انجام کامل مرحله مشتق‌سازی نسبت مولی 2-مرکاپتوبنزویک اسید به آکریل آمید باید کنترل گردد و حداقل 17/5 به 1 باشد(8). در این مطالعه نسبت مولی 35 به 1 انتخاب گردید.

تاثیر pH بر روی بازده واکنش مشتق‌سازی در محلول‌هایی با pH 7 تا 14 بررسی شده است. مشاهده شد که مشتق‌سازی به شدت تحت تاثیر pH محلول می‌باشد و بهترین نتیجه و بازده در دامنه pH 8-12 می‌باشد. بنابراین 10 pH بهترین pH برای انجام واکنش است(8). در این تحقیق از محدوده pH فوق استفاده شد. منحنی کالیبراسیون نیز با توجه به تزریق غلظت‌های 15، 25، 50، 100، 500، 750 و 1000 نانوگرم بر گرم ترسیم شد. معادله رگرسیون برای آکریل آمید به صورت $Y=55.098X-581.4$ و ضریب همبستگی $R=0.999$ بدست آمد. LOD و

گرفتند. جهت انجام آزمون آماری داده‌ها، از نرم افزار SPSS ویرایش 15 و مفروضات $\alpha < 0/05$ و $\beta = 0/2$ استفاده شد. آنالیز آماری داده‌های حاصل از مطالعه با استفاده از روش‌های آمار توصیفی و آمار تحلیلی انجام گرفت.

3- نتایج و بحث

در طی سال‌های اخیر راهکارهای بسیار زیادی برای اندازه‌گیری آکریل آمید و همچنین اعمال روش‌هایی برای کاهش آن در مواد-غذایی ابداع و ارائه شده است. بررسی‌ها نشان می‌دهد که اغلب روش‌های تجزیه‌ای گزارش شده، از حساسیت و دقت کافی برخوردار نیستند و تنها روش‌های پیشرفته‌ای همچون LC/MS، GC/MS و LC-MS/MS قادر به ردیابی مقادیر اندک آکریل-آمید می‌باشند. اما بیشتر این روش‌ها در دسترس نبوده و برای به کارگیری آنها به نیروی متخصص و آموزش دیده نیاز است. براساس روش EPA شماره 8316 با استفاده از HPLC با آشکارساز UV در طول موج 193nm برای نمونه‌های آبی، می‌توان به حد تشخیص $10 \mu\text{g/L}$ دست یافت. اما در این طول موج برخی از عوامل مزاحم با ماده مورد نظر تداخل می‌نمایند. ضمن اینکه این روش از حساسیت لازم برای کنترل نتایج با حدود مجاز اعلام شده از طرف مراجع جهانی برخوردار نمی‌باشد. البته براساس روش EPA شماره 8032 استفاده از روش GC-ECD پس از مشتق‌سازی آکریل آمید با برم نیز روشی مفید بوده و نتایج قابل قبولی از کاربرد آن بدست آمده است(21).

در این تحقیق از روش LC-DAD به منظور اندازه‌گیری آکریل آمید استفاده گردید. در این روش از مشتق آکریل آمیدی که از واکنش با 2-مرکاپتوبنزویک اسید (از نظر ساختمان شیمیایی یک تیول است، شکل 1) تهیه شده بود (به منظور افزایش حساسیت اندازه‌گیری)، استفاده گردید(8،13).

کاملاً مشخص می‌باشد که ترکیبات نوکلئوفیل مانند تیول‌ها¹ می‌توانند با بانده دوگانه آکریل آمید واکنش بدهند. این موضوع حاکی از آن است که این قابلیت واکنش‌دهی در مقابل تیول‌ها می‌تواند برای اندازه‌گیری کمی مقدار بسیار اندک آکریل آمید توسط دستگاه‌های اندازه‌گیری کمی (در حد ppb) استفاده گردد(8).

² Thioether

¹ Thiols

دمای پخت در هر نان و تاثیر آن بر تشکیل آکريل آميد بررسی نگردیده است، اما ميزان رطوبت نان‌های مختلف و تاثیر بر ميزان آکريل آميد توليد شده در آن‌ها بررسی، و مشخص گردید که نان‌ها با رطوبت بیشتر، آکريل آميد کمتری داشتند. احتمالاً ميزان رطوبت نان در کاهش ميزان دمای منتقل شده به نان و در نتیجه تشکیل آکريل آميد نقش مهمی ایفا می‌کند.

در مطالعه ژانک و همکاران پیشنهاد شده است که افزایش اسیدیته فرآورده خام غذایی قبل از پخت می‌تواند سبب کاهش توليد آکريل آميد شود (10). در مطالعه ما با افزایش اسیدیته (کاهش pH) نیز ميزان آکريل آميد کاهش قابل توجهی نشان داد. افزایش اسیدیته (کاهش pH) یکی از راه‌های کاهش واکنش میلارد در زمانی است که بروز این واکنش نامطلوب بشمار می‌رود. در واکنش تخریب استریکر¹، تشکیل یک باز شیف² مرحله ابتدایی انجام واکنش بشمار می‌رود، برای این اساس در مرحله اول افزایش نوکلئوفیلی گروه α -آمین آسپاراژین به کربن کربونیلی مثبت شده گروه دی‌کربونیل رخ داده و به دنبال آن نیتروژن ترکیب پروتون از دست داده و اکسیژن پروتون را به سمت خود می‌کشد. این احتمال وجود دارد که با افزایش اسیدیته محیط از افزایش نوکلئوفیلی آمین آزاد غیرپروتونه (NH_2^-) به گروه کربونیل جلوگیری شده و از بدین طریق تشکیل آکريل آميد کاهش یابد (10).

تایمن و همکاران در سال 2003 دریافتند که افزودن رزماری با غلظت 1٪ به خمیر می‌تواند سبب کاهش تشکیل آکريل آميد به میزان 60٪ گردد (17). این مطالعه با مطالعه ما همخوانی داشت زیرا در مطالعه ما با افزودن رزماری با غلظت 1٪ به خمیر ميزان آکريل آميد 63٪ کاهش یافت.

در مطالعه تارکه³ و همکارانش نشان داده شد که مقادیر متوسطی از آکريل آميد (حدود 50-5 ppb) در مواد غذایی غنی از پروتئین یافت می‌شود، در حالی که در مواد غذایی غنی از کربوهیدرات مقادیر بسیار بالاتری از آکريل آميد (حدود 150-4000 ppb) یافت می‌شود، علاوه بر این در مواد غذایی خام یا حرارت داده نشده آکريل آميد وجود ندارد (18).

LOQ به ترتیب 13/8 و 16/6 بدست آمد و محدوده خطی روش بین 15 تا 2000 نانوگرم بر گرم و حد تشخیص 15 نانوگرم بر گرم می‌باشد. جداول 1 و 2 نتایج مربوط به اندازه‌گیری مقدار آکريل آميد در نان‌های مورد مطالعه را نشان می‌دهد.

کروماتوگرام‌های بدست آمده برای محصولات مشتق‌سازی شده آکريل آميد استاندارد قابل اعتماد بوده و می‌توان گفت که تشخیص آکريل آميد با وجود سایر مواد تداخلی ندارد. طول موج‌های بکار برده شده 238 نانومتر و 254 نانومتر بودند که بیشترین جذب در طول موج 254 نانومتر مشاهده گردید (شکل 2).

چون در این تحقیق کل حجم نان پخته شده به عنوان نمونه، مورد استفاده قرار گرفته و در اکثر مطالعات انجام شده توسط محققین سایر کشورها، پوسته نان‌ها، مورد آزمون قرار گرفته است لذا در تحقیق ما پارامترهایی نظیر دمای نان حین پخت در داخل تنور، ضخامت نان و مدت زمان قرارگیری در معرض حرارت بر نتایج حاصل بسیار موثر بوده است.

بدیهی است در نان‌های مورد مطالعه، نان لواش با ضخامت تقریبی 2-3 میلی‌متر، نان بربری با ضخامت تقریبی 20-25 میلی‌متر، نان سنگک با ضخامت تقریبی 5-15 میلی‌متر و نان تافتون با ضخامت تقریبی 3-7 میلی‌متر واکنش مختلفی در برابر ميزان و مدت حرارت دریافتی از خود نشان داده‌اند (اندازه‌گیری توسط ترمومتر مادون قرمز Sinometer مدل MS 6530). دمای هر نان در داخل تنور با دما و درجه حرارت داخل تنور به لحاظ وجود رطوبت در نان و ضخامت نوع نان فرق می‌کند. به عنوان مثال دمای نان لواش داخل تنور به طور متوسط 125، بربری 150، سنگک 137 و تافتون 138 درجه سانتی‌گراد بود. ضمناً زمان پخت این نان‌ها به طور متوسط برای نان لواش 22، سنگک 360، بربری 385 و تافتون 160 ثانیه بود.

با توجه به این پارامترها نان تافتون در کل بیشترین ميزان آکريل آميد و نان لواش کمترین ميزان آکريل آميد را دارا می‌باشند. با بررسی نتایج به دست آمده برای هر نان، افزایش ميزان حرارت و مدت زمان پخت بر ميزان تشکیل آکريل آميد اثر مثبت داشته است.

در مطالعه استادلر و همکاران در سال 2002 مشخص شد که در دمای ثابت با افزایش رطوبت ميزان آکريل آميد توليدي افزایش می‌یابد (15). در تحقیق حاضر افزایش رطوبت با ثابت نگه‌داشتن

¹ Strecker degradation reaction

² Schiff base

³ Tareke

آمید می‌گردد. ستدلر و همکاران در سال 2004، نشان دادند که

ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در گیاهان دارویی توانایی بلوکه کردن واکنش‌های زنجیره‌ای اتواکسیداسیون چربی‌ها، رادیکال‌های آزاد و شلاته کردن فلزات موثر در اکسیداسیون چربیها را دارا می‌باشند (23، 24). ترکیبات فنلی موجود در گیاهان دارویی قادر به متوقف کردن فرایند اکسیداسیون آکروئین و در نتیجه کاهش ایجاد آکريل آميد می‌باشند. قابل ذکر است که تولید آکروئین از تجزیه لیپیدها آغاز گشته و اکسیداسیون اسیدهای چرب را توسعه می‌دهد (23). این ترکیبات با ترکیبات نیترونی واکنش داده و موجب بلوکه کردن آنها و جلوگیری از شرکت آنها در فرایند های منجر به تشکیل آکريل آميد یا ترکیبات واسطه موثر می‌گردند. از طرف دیگر تحقیقات نشان داده است که افزایش میزان آنتی‌اکسیدان‌های فوق به بیشتر از 1٪ منجر به افزایش میزان تولید آکريل آميد می‌گردد که دانشمندان دلایل این امر را به ویژگی‌های ذاتی آنتی‌اکسیدان‌ها نسبت داده و از این پدیده به عنوان «پارادوکس آنتی‌اکسیدان‌ها» نام می‌برند (24).

4- نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد یکی از بهترین روش‌های اندازه‌گیری آکريل آميد در فرآورده‌های نانویی استفاده از کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) و آشکارساز DAD می‌باشد. مشتق 2-مرکاپتوبنزویسک اسید آکريل آميد در مقایسه با آکريل آميد، حساسیت بیشتری در استفاده از این روش نشان داد.

نتایج این تحقیق نشان داد استفاده از عصاره رزماری در کاهش میزان آکريل آميد تولید شده در فرآورده‌های نانویی بسیار موثر است. بدیهی است اطلاع رسانی دقیق و افزایش آگاهی مصرف‌کنندگان و به ویژه آموزش پرسنل نانویی‌ها در خصوص استفاده صحیح از این قبیل ترکیبات، نقش موثری در بهبود کیفیت نان تولیدی دارد.

فرناندز و همکاران در سال 2003 نشان دادند که افزودن مخلوط فلاونوئیدی به چیپس سیب‌زمینی نیز سبب کاهش آکريل افزودن فلاونوئید ممکن است از تبدیل آکروئین به آکريلیک اسید و در نهایت تولید آکريل آميد جلوگیری کند (16)، این نتایج با مطالعات واتم در سال 2003 (19) و یایلان در سال 2004 (22) همخوانی داشت.

بررسی اثر عصاره رزماری در سه غلظت متفاوت، بهترین میزان تاثیر از عصاره رزماری با غلظت 1٪ بدست آمد و بطور متوسط در مقدار آکريل آميد تولید شده به میزان 63٪ کاهش رخ داد (جدول 3).

رزماری یا اکلیل کوهی به دلیل داشتن ترکیبات قوی آنتی‌اکسیدان در صنایع دارویی و غذایی مورد توجه بوده است. مطالعات انجام گرفته در سال‌های اخیر نشان داده‌اند که بهره‌گیری از ترکیبات فلاونوئیدی، فلاوانول‌ها، لاکتون‌ها، اسیدهای فنولیک موجود در برخی عصاره‌های گیاهی و همچنین استفاده از اسیدهای آلی و کاهش pH مانند استفاده از اسیدسیتریک و استفاده از بعضی از اسیدهای آمینه خصوصاً گلیسین می‌تواند باعث کاهش تولید آکريل آميد گردد. در عین حال بسیاری از مطالعات که بر روی حیوانات صورت پذیرفته حاکی از اثرات ضد سرطانی پلی‌فنول‌ها می‌باشد. علاوه بر این تانن‌های موجود در بسیاری از مواد غذایی گیاهی هم اثرات ضد سرطانی و ضد جهش‌زایی نشان داده‌اند (23). نتایج تحقیقات دانشمندان نشان داد که آنتی-اکسیدانهای گیاه بامبو و گیاه چای سبز در غلظت‌های مختلف، از خود اثرات بازدارندگی و تشدیدکنندگی متفاوتی نشان می‌دهند. به این صورت که در غلظت‌های 0/002، 0/01، 0/1 درصد اثر بازدارندگی بر تشکیل آکريل آميد و در غلظت‌های 1، 2/5 و 4/5 درصد اثر تشدیدکنندگی دارند (24).

مکانیسم عمل دوگانه آنتی‌اکسیدان‌های را می‌توان به صورت زیر بیان کرد:

جدول 1- میانگین مقدار آکریل آمید تولید شده در نان‌های مورد مطالعه (ppb)

نوع نان	میانگین (± انحراف استاندارد)	بیشینه	کمینه	تعداد نمونه
تافتون	145/87 ± 1/43	161	132	30
بربری	135/04 ± 1/05	142	119	30
سنگک	86/68 ± 0/88	95	77	30
لواش	26/43 ± 0/34	28	18	30

جدول 2- میانگین مقدار آکریل آمید تولید شده در نان‌های مورد مطالعه (AUC¹)

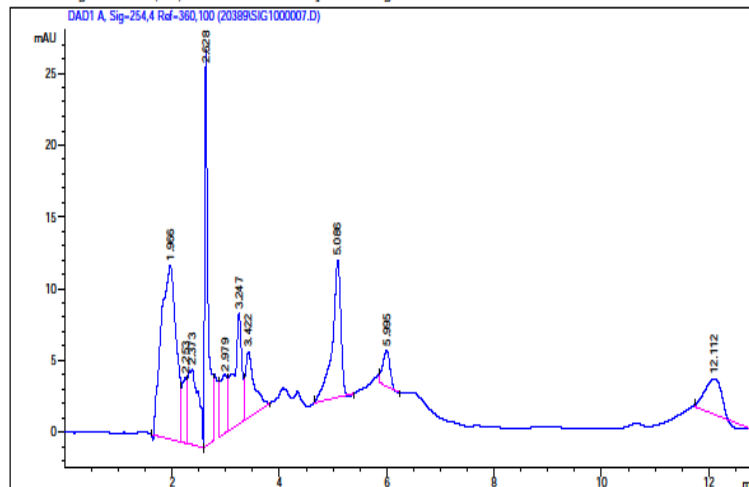
نوع نان	میانگین (± انحراف استاندارد)	بیشینه	کمینه	تعداد نمونه
تافتون	7455/53 ± 78/92	8290	6691	30
بربری	6859/13 ± 57/94	7259	5997	30
سنگک	4194/60 ± 48/70	4679	3671	30
لواش	875/30 ± 19/07	984	423	30

جدول 3- میانگین سطح زیرمنحنی آکریل آمید تشکیل شده در نان تافتون با توجه به اثر عصاره رزماری با سه غلظت مختلف

عصاره مورد استفاده	غلظت (%)	میانگین (± انحراف استاندارد)	بیشینه	کمینه	تعداد نمونه
	0/1	3454/8 ± 58/2	3702	3083	10
رزماری	1	2612/6 ± 46/3	2848	2401	10
	10	3210/2 ± 41/2	3464	3033	10

¹ Area Under the Curve

Acq. Operator : dr motaghi
 Acq. Instrument : Instrument 1 Location : Vial 1
 Injection Date : 6/10/2010 3:40:44 PM Inj Volume : 20 µl
 Acq. Method : C:\CHEM32\1\METHODS\TESTMER.M
 Last changed : 6/10/2010 3:39:30 PM by dr motaghi
 Analysis Method : C:\CHEM32\1\METHODS\TESTMER.M
 Last changed : 6/10/2010 3:54:56 PM by dr motaghi



شکل 2- کروماتوگرام حاصل از تزریق مشتق تهیه شده از تاثیر 2-مرکاپتوبنزوئیک اسید بر محلول آبی شاهد با حضور آکریل آمید استاندارد (غلظت 500ppb) به دستگاه LC/DAD. (Rt=5.086)

9. Johnson, K A, Gorzinski, S J, Bodner, K M, Campbell, R A, Wolf, C H, Friedman, M, and Mast, R W. 1986. Chronic toxicity and oncogenicity study on acrylamide incorporated in the drinking water of Fischer 344 rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*; 85: 154-168.
10. Jung, M Y, Choi, D S, and Ju, J W. 2003. A Novel Technique for Limitation of Acrylamide Formation in Fried and Baked Corn Chips and in French Fries. *Journal of Food Science*; 68(4): 1287-1290.
11. List, P H, and Schmidt, P C. 1989. *Phytopharmaceutical technology*. ed, Heyden & Son Limited, London: 207-209.
12. Mottram, D S, Wedzicha, B L, and Dodson, A T. 2002. Acrylamide is formed in Maillard reaction. *Nature*; (419): 448-449
13. Shi, Z, Zhang, H, and Zhao, X. 2009. Ultrasonic-assisted precolumn derivatization - HPLC determination of acrylamide formed in Radix Asparagi during heating process. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*; 49: 1045-1047.
14. Smith, E A, Prues, S L, and Oehme, F W. 1997. Environmental degradation of acrylamides II. Effects of environmental (outdoor) exposure. *Ecotoxicology and Environmental Safety*; 37: 76-91.
15. Stadler, R, Blank, I, Varga, N, Robert, F, Hau, J, Guy, P A, Robert, M C, and Riediker, S. 2002. Acrylamide from Maillard reaction products. *Nature*; 419: 449-450.
16. Stadler, R H, Robert, F, Riediker, S, Varga, N, Davidek, T, Devaud, S, Goldmann, T, Hau, J, and Blank, I. 2004. In-Depth mechanistic study on the

5- منابع

- 1- ایزدبار، ج و سمیعی، م. 1372. گندم، آرد، نان، هسته خودکفایی. تحقیقات صنایع آردو نان. تهران، ص 111.
- 2- میرفخرایی، ف. 1372. گزارش نهایی طرح بررسی میزان علل ضایعات نان در خانواده‌ها و دکاکین شهر تهران. انستیتو تغذیه و صنایع غذایی کشور تهران
3. Becalski, A, Lau, B P, Lewis, D, and Seaman, S W. 2003. Acrylamide in foods: occurrence, sources, and modeling. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*; 51: 802-808.
4. Friedman, M. 2003. Chemistry, biochemistry, and safety of acrylamide. A review. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*; 51: 4504-4526.
5. Hedegaard, R, Granby, K, Frandsen, H, Thygesen, J, and Skibsted, L. 2008. Acrylamide in bread: Effect of prooxidants and antioxidants. *European Food Research and Technology*; 227(2): 519-525.
6. International Agency on Research on Cancer. 1994. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks of some industrial chemicals to humans: Acrylamide. vol vol. 60 Lyon, France: 389-433
7. JECFA. 2005. Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. 1-47
8. Jezussek, M, and Schieberie, P. 2003. A new LC/MS - method for the quantitation of acrylamide based on a stable isotope dilution assay and derivatization with 2-mercaptobenzoic acid. Comparison with two GC/MS methods *Journal of Agriculture and Food Chemistry*; 51: 7866-7871.

- formation of Acrylamide and other vinylogous compounds by the Maillard reaction. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*; 52: 5550-5558.
17. Taeymans, D, Ashby, P, Blank, I, Gonde, P, Van Eijck, P, Lalljie, S P D, Lingnert, H, Lindblom, M, Matissek, R, Muller, D, and O'Brien, J. 2004. A review of acrylamide: an industry prespective on research, analysis, formation and control. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*; 44: 323-347.
18. Tareke, E, Rydberg, P, Karlsson, P, Eriksson, S, and Tornqvist, M. 2002. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*; 50: 4998-5006.
19. Vatter, D A, and Shetty, K. 2003. Acrylamide in food: a model for mechanism of formation and its reduction. *Innovative Food Science & Emerging Technologies* 4: 331-338.
20. Weisshaar, R, and Gutsche, B. 2002. Formation of acrylamide in heated potato products-model experiments pointing to asparagine as precursor. *Deutsche Lebensmittel-Rundschau*; 98(11): 397-400.
21. Wenzl, T, De la Calle, M B, and Anklam, E. 2003. Analytical methods for the determination of acrylamide in food products: a review. *Food Additives and Contaminants*; 20(10): 885-902.
22. Yaylayan, V A, Locas, C P, Wnorowski, A, and O'Brien, J. 2004. The role of creatine in the generation of N-methylacrylamide: A new toxicant in cooked meat. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 52(17): 5559-5565.
23. Zhang, Yu and Zhang, Y. 2008. Effect of natural antioxidants on kinetic behavior of acrylamide formation and elimination in low-moisture asparagine-glucose model system. *Food Engineering*; 85: 105-115.
24. Zhang, Y. 2007. Study on reduction of acrylamide in fried bread sticks by addition of antioxidant of bamboo leaves and extract of green tea. *Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition*; 16(1): 131-136.