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

محمد مهدی متقی[1*]، مهدی سیدین اردبیلی[1]، مسعود هنرور[1]، میترا مهربانی[2]، امین باقی‌زاده[3]

[1] دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات ، گروه علوم وصنایع غذایی، تهران، ایران
[2] دانشگاه علوم پزشکی کرمان، دانشکده داروسازی، گروه فارماکوگنوزی، کرمان، ایران.
[3] دانشگاه بین المللی علوم محیطی و فن آوری پیشرفته، کرمان، ایران

تاریخ دریافت: 1391/1/22 تاریخ پذیرش: 1391/5/12

چکیده

در سال 2002، موسسه تحقیقات ملی غذا در کشور سوئد وجود مقادیر بالای آکریل‌آمید را در غذاهای حرارت دیده سرشار از کربوهیدرات اعلام کرد . این ترکیب شیمیایی توسط آژانس بین المللی 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 آکریل‌آمید در انواع این ماده‌ی‌غذایی ضروری به نظر می‌رسد. هدف ازاین تحقیق مقایسه میزان آکریل‌آمید در انواع نان‌های سنتی پخت شده در شهرستان کرمان با استفاده از روش LC/DAD و تعیین نان پر خطر از نظر میزان تشکیل آکریل‌آمید 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 آکریل‌آمید بودند. در ادامه اثر عصاره رزماری در سه غلظت متفاوت 0/1، 1 و 10 درصد بر روی تشکیل آکریل‌آمید در نوع نان پر خطر(تافتون) بررسی گردید. با توجه به یافته‌های این مرحله بهترین نتیجه در خصوص کاهش میزان تشکیل آکریل‌آمید، از تأثیر عصاره رزماری با غلظت 1% بدست آمد.

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

* مسوول مکاتبه: motaghi.mehdi@gmail.com

1- مقدمه

آکریل‌آمید (2- پروپن‌آمید) یکی ازمنومرهای 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 آکریل‌آمیدها که خود دارای کاربرد گسترده‌ای در صنایع مختلف از جمله پلاستیک سازی، رنگ‌سازی، کاغذسازی و آرایشی می‌باشند بکار می‌روند. هم‌چنین 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 درمعرض یک منومر صنعتی دیگر به نام وینیل‌کلراید بودند احتمال سرطان‌زایی آن (ترکیب وینیلی) نیز بر حیوانات آزمایشگاهی مورد بررسی قرارگرفت و به دنبال آن چندین گزارش در مورد سرطان‌زایی اکریل‌آمید در انواع موش به چاپ رسید(9،14). لذا درسال 1994 «آژانس بین‌المللی تحقیقات سرطان»[1] آکریل‌آمید را به عنوان ترکیب سرطان‌زای احتمالی برای انسان طبقه‌بندی نمود(6). به دنبال آن در آوریل سال 2002 اداره ملی غذای سوئد[2] و محققین دانشگاه استکهلم متفقاً وجود مقادیر بالای آکریل‌آمید را در غذاهای حرارت دیده غنی از کربوهیدرات که به صورت سرخ شده و یا طبخ شده در دماهای بالا (بیشتر از120درجه سانتی‌گراد) تهیه می‌شدند را اعلام نمودند(4).

این ترکیب طی واکنش‌هایی چون میلارد و از طریق پیش‌سازهایی همچون آکرولئین و اسید آکرولئیک و یا از طریق تجزیه چربی‌ها در دماهای بالا ایجاد می شود(12،15). از مهمترین ترکیبات کلیدی در تولیدآکریل‌آمید می‌توان قندهای احیا کننده‌ای چون فروکتوز و گلوگز و اسیدآمینه آسپاراژین را نام برد(3،15). در پیدایش آکریل‌آمید 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 آکریل‌آمید را در موادغذایی 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 موادغذایی 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 آکریل‌آمید در فرآورده‌های غلات صورت نپذیرفته 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 آکریل‌آمید در غلات و مواد غذایی بر پایه غلات در کشورهای اروپایی منتشر کرد. در انواع نان متوسط محتوای آکریل‌آمید 446، در انواع شیرینی، کلوچه و کیک 350 و در غلات صبحانه 96 میکروگرم بر کیلوگرم گزارش شده‌است(7).

در زمینه اعمال روش‌های کاهش آکریل‌آمید در فرآورده‌های غلات در ایران، تا کنون گزارشی منتشر نشده‌است. اما در سایر کشورها در مورد استفاده از عصاره‌های گیاهی بررسی‌هایی انجام وگزارشات متعددی منتشر شده‌است. در خصوص نان و فرآورده‌های نانوایی، هدگارد[4] و همکارانش در سال 2007 تاثیر پرواکسیدان‌ها و آنتی‌اکسیدان‌های مختلف بویژه عصاره آبی رزماری(اکلیل کوهی) و عصاره چای‌سبز را در انواع نان بررسی نمودند. ایشان 57% کاهش در میزان آکریل‌آمید تشکیل شده در نان‌های پخت شده با عصاره رزماری را در مقایسه با نان شاهد گزارش نمودند(5). ژانگ[5] و همکارش در سال 2007 در گزارشی کاهش 72 تا 83 درصد در میزان آکریل‌آمید تشکیل شده در نوعی نان نازک سرخ شده در روغن را به دلیل اضافه کردن عصاره برگ گیاه بامبو و عصاره چای‌سبز 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 آکریل‌آمید می‌گردد. برخی از عصاره‌های گیاهی در غذاهای گوناگون

[1] International Agency for Research on Cancer (IARC)
[2] Swedish National Food Administration (SNFA)
[3] JECFA(Joint Expert Committee on Food Additives)
[4] Hedegaard
[5] Zhang

فعالیت آنتی‌اکسیدانی متفاوتی از خود نشان می‌دهند. طی مطالعات انجام شده مشخص گردید که روغن آویشن و زیره‌کوهی بعنوان آنتی‌اکسیدان در هنگام سرخ کردن و پختن مواد غذایی، عمل می‌کنند. موثرترین ترکیبات آنتی اکسیدانی در این عصاره‌ها عبارتند از فلاونوئیدها، کارنوزول، کارنوزیک اسید وکافئیک اسید. فلاونوئیدها عوامل مهم کاربردی در غذا هستند که در گیاهان دارویی، سبزیجات و میوه‌جات به طور قابل ملاحظه‌ای وجود دارند. فلاونوئیدها دارای فعالیت آنتی اکسیدانی بالا هستند و اثر حفاظتی قوی در برابر بیماریهای قلبی و عروقی، مغزی، سرطان و دیابت از خود نشان می‌دهند. علاوه بر این فلاونوئیدها ترکیبات مناسبی برای کاهش تشکیل آکریل‌آمید در موادغذایی می‌باشند. 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 فرآورده‌های 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 آنتی‌باکتریایی وآنتی‌آکسیدانی آن را تأیید کرده‌اند. مهمترین ماده فعال درعصاره رزماری کارنوزول می‌باشد. ترکیبات فنولی دیگری مثل اپی رزمانول و ایزو رزمانول همچنین اسید رزمارینیک و اسید کارنوزیک از برگ‌های رزماری جداسازی شده‌اند. رزماری به دلیل داشتن ترکیبات قوی آنتی‌اکسیدان در صنایع دارویی و غذایی مورد توجه می‌باشد (5). از آنجا که نان در کشور ایران همچنان به روش های سنتی و بیشتر با استفاده از حرارت مستقیم پخت می‌گردد، محاسبه میزان آکریل‌آمید در نان‌های مختلف جهت آگاهی از میزان این ماده‌ی سرطان‌زا به منظور بهبود وضعیت غذایی مردم ضروری به نظر می‌رسد. تاکنون گزارشی در رابطه با بررسی میزان آکریل‌آمید در نان‌های تولید شده در مناطق مختلف کشور ارائه نشده است.

2- مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی شامل آکریل آمید، استن، هگزان نرمال، 2-مرکاپتوبنزوئیک اسید، هیدروکسید سدیم، اسید کلریدریک، اتیل استات، گاز N_2، سولفات سدیم، متانل HPLC grade، استونیتریل HPLC grade، اسید استیک، استات سرب (II)، سولفات آمونیوم که همگی با خلوص بالا[1] از شرکت مرک[2] آلمان تهیه گردیدند.

از سیستم دوپمپی HPLC مدل 1200 محصول شرکت Agilent با آشکارساز DAD[3]، مجهز به نمونه‌بردار اتوماتیک 100 خانه[4] وآون برای کنترل دمای ستون (ZORBAX Eclipse XDB C18) با مشخصات (4/6mm × 150mm, 5µm)، ساخت Waldbronn آلمان که از طریق نرم‌افزار Chemstation کنترل و برنامه‌ریزی می‌شدند، استفاده گردید.

در مرحله اول جمع‌آوری نمونه‌ها به طریق نمونه‌برداری تصادفی طبقه‌ای از نوع میدانی و با مراجعه به مناطق تعیین شده و بسته به جمعیت نانوایی‌ها انجام شد. برای تهیه هر نمونه نان(چهارنوع نان : تافتون، سنگک، لواش و بربری)، از یک نانوایی چهار نان از سه پخت صبح، ظهر و عصر مجموعاً دوازده نان تهیه و به آزمایشگاه منتقل و پس از خشک کردن نمونه‌ها در دمای محیط (28°C)، با استفاده از دستگاه آسیاب‌برقی Braun مدل KSM2 به ذرات کوچک(اندازه ذرات حداکثر 1 میلی-متر)تبدیل و مخلوط گردیدند و عملیات آماده‌سازی 100 گرم نان خشک که نمونه‌ای مخلوط از هر دوازده نان بود انجام و برای استخراج آکریل‌آمید مورد استفاده قرار گرفت. در ادامه برای تشخیص تأثیر ترکیب مورد نظر بر کاهش میزان آکریل‌آمید، گردآوری داده‌ها 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 نانوایی منتقل و بر اساس شرایط متناسب با شرایط مرحله اول (پخت عادی) پخت صورت گرفت. تمام نمونه‌ها پس از آسیاب شدن تا زمان انجام عمل استخراج در دمای 4- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

به منظور استخراج و اندازه‌گیری مقدار آکریل‌آمید با استفاده از دستگاه LC/DAD از مشتق‌سازی آکریل‌آمید با مادهٔ «2-مرکاپتوبنزوئیک اسید»[5] با شرح ذیل استفاده گردید(13،8) :

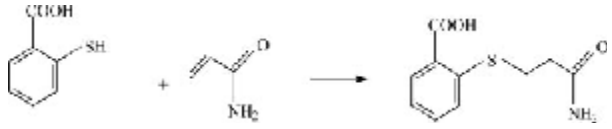
5 گرم نمونه نان خشک و آسیاب شده به دقت با ترازوی 0/0001 گرم مدل Collego150 ساخت شرکت Mettler

[1] Extra pure
[2] Merck
[3] Diode Array Detector
[4] Auto sampler
[5] 2- Mercaptobenzoic Acid

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 IKAvortex، 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 ℃ به مدت 20 دقیقه انتقال داده‌شد. در مرحلهٔ بعد لولهٔ 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 حبابدار جدا گردیده و به لولهٔ 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 0/3 ± 8 برسد. آنگاه به منظور انجام فرآیند مشتق‌سازی (شکل شماره1)، از حدود یک میلی‌لیتر محلول 2-مرکاپتوبنزوئیک‌اسید استفاده شد(این محلول از انحلال 154 میلی‌گرم 2-مرکاپتوبنزوئیک اسید در 10 میلی‌لیتر سود یک مولار تهیه گردید). در این مرحله pH نهایی محتوی لوله بایستی به حدود 10 برسد. سپس لولهٔ مربوطه با فویل آلومینیوم به منظور حفاظت از تابش نور پوشانیده شده و در حمام اولتراسونیک با دمای 35 ℃ به مدت 100 دقیقه قرار داده شد (13،8).

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 تا رسیدن به pH حدود 0/3 ± 1/5 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 بدون‌آب 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 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 متحرک[1] 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 حجم20 میکرولیتر انجام گردید. سرعت جریان فاز متحرک 0/7 میلی‌لیتر در دقیقه تنظیم شد. ضمناً دمای ستون در28 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 زبر 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 1صاف گردید. عصاره‌های حاصل بطور جداگانه سرد و پس از فریزشدن، توسط دستگاه فریز دراير 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 مادهٔ جاذب الرطوبه در یخچال نگهداری شد(11). وزن خشک عصاره فریزداری(لیوفیلیزه) حاصل ازدم 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

[1] Mobile phase

مرحله اول، جهت تعیین مقدار آکریل‌آمید مورد ارزیابی قرار 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 آکریل‌آمید 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 اکریل-آمید می‌باشند. اما بیشتر این روش‌ها در دسترس نبوده و برای به کارگیری آنها به نیروی متخصص و آموزش‌دیده 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 µg/L دست یافت. اما دراین 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 آکریل‌آمید 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 آکریل‌آمید استفاده گردید. در این روش از مشتق آکریل‌آمیدی که از واکنش با 2-مرکاپتوبنزوئیک 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 تیول‌ها[1] می‌توانند با باند دوگانه آکریل‌آمید واکنش بدهند. این موضوع حاکی از آن است که این قابلیت واکنش‌دهی در مقابل تیول‌ها می‌تواند برای اندازه‌گیری کمی مقدار بسیار اندک آکریل‌آمید توسط دستگاه‌های اندازه‌گیری کمی (درحد ppb) استفاده گردد(8).

2-مرکاپتوبنزوئیک‌اسید می‌تواند آکریل‌آمید را در طول مدت 3 ساعت با بازده قابل قبول به یک تیواتر[2] پایدار تبدیل کند، که این تیواتر با حساسیت بالا توسط LC/DAD قابل تشخیص است. اخیراً این روش توسط آزمایشگاه‌های مختلف دنیا با کارایی بین المللی (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 آکریل‌آمید استاندارد با استفاده از حمام اولتراسونیک انجام شده و زمانهای 40 تا 130 دقیقه بررسی شده است. نتایج مطالعات تجربی نشان‌داده که 100 دقیقه برای کامل شدن واکنش کافی می‌باشد(13). برای بدست آوردن بازده یکسان نحوه‌ی مخلوط‌کردن رایج در مطالعات مختلف، زمان لازم 3 ساعت ذکر شده است(8). خاصیت حفره‌سازی اولتراسوند(مافوق صوت) حباب‌های ریزی در فازمایع ایجاد می‌کند که با شکستنشان انرژی آزاد می‌کنند، که ممکن است فاکتور کلیدی تسریع‌کننده واکنش باشد. انرژی آزاد شده می‌تواند به باز شدن پیوندهای شیمیایی و تسریع‌کردن واکنش مشتق‌سازی کمک‌کند(8). در این تحقیق از زمان 100 دقیقه استفاده شد.

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

تاثیر pH برروی 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 12-8 می‌باشد. بنابراین pH 10 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 آکریل‌آمید به صورت $Y=55.098X-581.4$ و ضریب همبستگی $R=0.999$ بدست آمد. LOD و LOQ به

[1] Thiols

[2] Thioether

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

کروماتوگرام‌های بدست‌آمده برای محصولات مشتق‌سازی شده آکریل‌آمیداستاندارد قابل اعتماد بوده و می‌توان گفت که تشخیص آکریل‌آمید 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 (شکل2).

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 بوده‌است.

بدیهی است در نان‌های مورد مطالعه، نان لواش باضخامت تقریبی 3-2 میلی‌متر، نان بربری با ضخامت تقریبی 25-20 میلی متر، نان سنگک با ضخامت تقریبی 15-5 میلی‌متر و نان تافتون با ضخامت تقریبی 7 -3 میلی‌متر واکنش مختلفی در برابر میزان 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 میزان آکریل‌آمید و نان لواش کمترین میزان آکریل‌آمید را دارا می‌باشند. با بررسی نتایج به دست آمده برای هر نان، افزایش میزان حرارت و مدت زمان پخت بر میزان تشکیل آکریل‌آمید اثر مثبت داشته است.

در مطالعه استادلر و همکاران در سال 2002 مشخص شد که در دمای ثابت با افزایش رطوبت میزان آکریل‌آمید تولیدی افزایش می‌یابد (15). در تحقیق حاضر افزایش رطوبت با ثابت نگه‌داشتن دمای پخت در هر نان و تاثیر آن بر تشکیل آکریل‌آمید بررسی نگردیده است، اما میزان رطوبت نان‌های مختلف و تاثیر بر میزان آکریل‌آمید تولید شده در آن‌ها بررسی، و مشخص گردید که نان ها با رطوبت بیشتر، آکریل‌آمید کمتری داشتند. احتمالاً میزان رطوبت نان در کاهش میزان دمای منتقل شده به نان و در نتیجه تشکیل آکریل‌آمید نقش مهمی ایفا می‌کند.

در مطالعه ژانک وهمکاران پیشنهاد شده است که افزایش اسیدیته فرآورده خام غذایی قبل از پخت می‌تواند سبب کاهش تولید آکریل‌آمید شود (10). در مطالعه ما با افزایش اسیدیته (کاهشpH) نیز میزان آکریل‌آمید کاهش قابل توجهی نشان داد. افزایش اسیدیته (کاهش pH) یکی از راه‌های کاهش واکنش میلارد در زمانی است که بروز این واکنش نامطلوب بشمار می رود. در واکنش تخریب استریکر[1]، تشکیل یک باز شیف[2] مرحله ابتدایی انجام واکنش بشمار می‌رود، براین 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 آکریل‌آمید کاهش یابد (10).

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

در مطالعه تارکه[3] و همکارانش نشان داده شد که مقادیر متوسطی از آکریل‌آمید (حدود*ppb*50-5) در مواد غذایی غنی از پروتئین یافت می‌شود، درحالی که در مواد غذایی غنی از کربوهیدرات مقادیر بسیار بالاتری از آکریل‌آمید (حدود*ppb*4000-150) یافت می‌شود، علاوه براین در مواد غذایی خام یا حرارت داده نشده آکریل‌آمید وجود ندارد (18).

فرناندز و همکاران در سال 2003 نشان دادند که افزودن مخلوط فلاونوئیدی به چیپس سیب‌زمینی نیز سبب کاهش آکریل آمید می‌گردد. ستدلر و همکاران در سال 2004، نشان دادند که

[1] Strecker degradation reaction
[2] Schiff base
[3] Tareke

افزودن فلاونوئید ممکن است از تبدیل آکرولئین به آکریلیک اسید و در نهایت تولید آکریل‌آمید 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 آکریل آمید 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، اسیدهای‌فنولیک 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 آکریل‌آمید 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 غلظتهای0/002 ، 0/01، 0/1 درصد اثر بازدارندگی برتشکیل آکریل‌آمید و در غلظتهای 1، 2/5 و 4/5 درصد اثر تشدیدکنندگی دارند (24).

مکانیسم عمل دوگانه آنتی اکسیدان‌های را می‌توان به صورت زیر بیان کرد :

ترکیبات آنتی‌اکسیدانی موجود در گیاهان‌دارویی توانایی بلوکه کردن واکنش‌های زنجیره‌ای اتواکسیداسیون چربی‌ها، رادیکال-های 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 آکرولئین و در نتیجه کاهش ایجاد آکریل‌آمید می‌باشند. قابل ذکر است که تولید آکرولئین از تجزیه لیپیدها آغاز گشته و اکسیداسیون اسیدهای چرب را توسعه می‌دهد (23). این ترکیبات با ترکیبات نیتریتی واکنش داده و موجب بلوکه کردن آنها و جلوگیری از شرکت آنها در فرایند های منجر به تشکیل آکریل‌آمید 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 آکریل‌آمید می گردد که دانشمندان دلایل این امر را به ویژگی‌های ذاتی آنتی اکسیدان‌ها نسبت داده و از این پدیده به عنوان «پارادوکس آنتی اکسیدان‌ها» نام می‌برند(24).

4- نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان‌داد یکی از بهترین روش‌های اندازه‌گیری آکریل‌آمید در فراورده‌های نانوایی استفاده از کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC) و آشکارساز DAD می‌باشد. مشتق 2-مرکاپتوبنزوییک اسید آکریل‌آمید در مقایسه با آکریل‌آمید، حساسیت بیشتری در استفاده از این روش نشان داد.

نتایج این تحقیق نشان داد استفاده از عصاره رزماری در کاهش میزان آکریل‌آمید تولید شده در فراورده‌های نانوایی بسیار موثر است. بدیهی است اطلاع رسانی دقیق و افزایش آگاهی مصرف کنندگان و به ویژه آموزش پرسنل نانوایی‌ها در خصوص استفاده صحیح از این قبیل ترکیبات، نقش موثری در بهبود کیفیت نان تولیدی دارد.

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

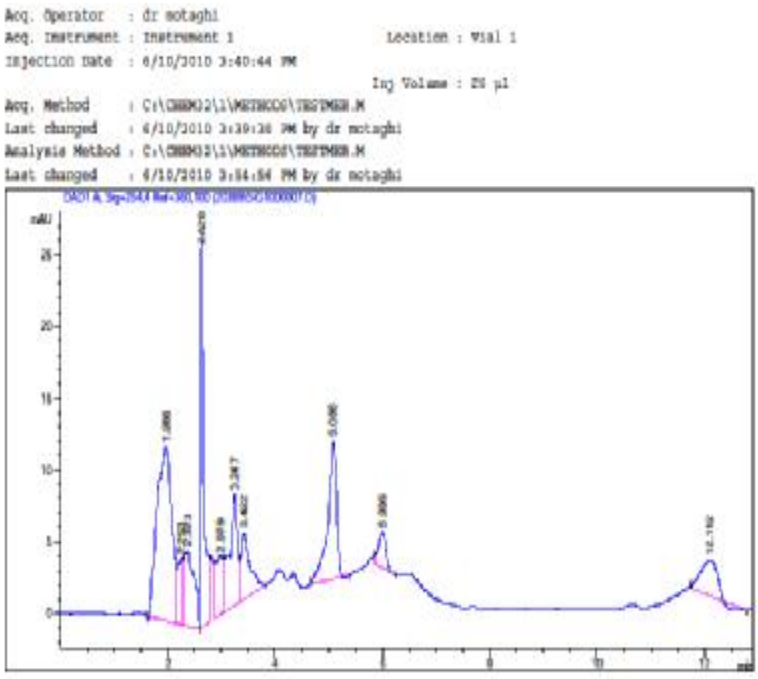
نوع نان	میانگین (±انحراف استاندارد)	بیشینه	کمینه	تعداد نمونه
تافتون	145/87 ± 1/43	161	132	30
بربری	135/04 ± 1/05	142	119	30
سنگک	86/68 ± 0/88	95	77	30
لواش	26/43 ± 0/34	28	18	30

جدول 2- میانگین مقدار آکریل آمید تولید شده در نان‌های مورد مطالعه(AUC[1])

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
رزماری	0/1	3454/8 ± 58/2	3702	3083	10
	1	2612/6 ± 46/3	2848	2401	10
	10	3210/2 ± 41/2	3464	3033	10



شکل 2 - کروماتوگرام حاصل از تزریق مشتق تهیه شده از تاثیر2-مرکاپتوبنزوئیک اسید بر محلول آبی شاهد با حضور آکریل آمید استاندارد(غلظت500ppb)به دستگاه LC/DAD. (Rt=5.086)

[1] Area Under the Curve

5- منابع

1- ایزدبار، ج و سمیعی، م. 1372. گندم، آرد، نان، هسته خودکفایی. تحقیقات صنایع آردو نان. تهران، ص111.

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, andSkibsted, 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, andSchieberie, 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.

9. Johnson, K A, Gorzinksi, S J, Bodner, K M, Campbell, R A, Wolf, C H, Friedman, M, andMast, R W. 1986. Chronic toxicity and oncogenicity study on acrylamide incorportated in the drinking water of Fischer 344 rats. *Toxicology and Applied Pharmacology*; 85: 154-168.

10. Jung, M Y, Choi, D S, andJu, 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, andSchmidt, P C. 1989. Phytopharmaceutical technology. ed, Heyden & Son Limited, London: 207-209.

12. Mottram, D S, Wedzicha, B L, andDodson, A T. 2002. Acrylamide is formed in Miallard 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, andOehme, 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, andRiediker, 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 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, andO'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, andTornqvist, M. 2002. Analysis of acrylamide, a carcinogen formed in heated foodstuffs. *Journal of Agricultural & Food Chemistry*; 50: 4998-5006.

19. Vattem, D A, andShetty, 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, andGutsche, 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, andAnklam, 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, andO'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.