

بررسی اثر استفاده از شیرین کننده آسه سولفام K بر ماندگاری و پایداری حرارتی آسپارتام در نوشابه رژیمی نوع کولا

نعیمه خزایی، محمد جوکی*، امیرحسین الهامی راد، حمید توکلی پور و سعید محمدزاده**

*نگارنده مسئول، نشانی: شهرقدس، دانشگاه آزاد اسلامی، باشگاه پژوهشگران جوان، ص.پ. ۳۷۴-۳۷۵۱۵، تلفن: ۴۶۸۴۲۹۳۵ (۰۲۱).
پیم نگار: m.jouki@yahoo.com
** به ترتیب کارشناس ارشد علوم و صنایع غذایی باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس؛ کارشناس ارشد علوم و صنایع غذایی باشگاه پژوهشگران جوان دانشگاه آزاد اسلامی واحد شهر قدس؛ استادیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه آزاد اسلامی واحد سبزوار و مدیر واحد تحقیقات و توسعه (R&D) شرکت زمزم ایران
تاریخ دریافت: ۹۰/۲/۱۹؛ تاریخ پذیرش: ۹۰/۱/۱۸

چکیده

در این بررسی تأثیر استفاده از شیرین کننده آسه سولفام K بر ماندگاری آسپارتام در نوشابه رژیمی نوع کولا ارزیابی شده است. از آنجا که آسه سولفام K پایداری مطلوبی در دماهای بالا دارد، در این بررسی اثر استفاده از مخلوط دو شیرین کننده بر پایداری حرارتی آسپارتام در نوشابه رژیمی نوع کولا نیز بررسی شد. به این منظور نوشابه کولای حاوی دو شیرین کننده با نسبت وزنی ۱:۱ فرموله شد و پس از آزمون‌های کنترل کیفی به همراه نوشابه حاوی آسپارتام به تنهایی، به عنوان شاهد، به مدت ۶ ماه در سه دمای یخچال (۴ درجه سلسیوس)، محیط (۲۵ درجه سلسیوس)، و آون (۴۰ درجه سلسیوس) قرار داده شدند. غلظت آسپارتام باقی مانده در نوشابه، هر ۱۵ روز یک بار با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی یونی با کارایی بالا اندازه‌گیری شد. نتایج آماری به دست آمده ماندگاری بهتر آسپارتام را در نوشابه‌های رژیمی حاوی آسه سولفام K نشان داد. معادلات سینتیکی برای واکنش تجزیه آسپارتام از نوع معادلات مرتبه اول نوشته شد و نتایج زمان نیمه عمر آسپارتام با استفاده از معادلات سینتیکی، ماندگاری بهتر آن را در نوشابه‌های حاوی آسه سولفام K تأیید کرد. انرژی اکتیواسیون واکنش تجزیه آسپارتام از طریق نوشتن معادلات آرنیوس محاسبه شد؛ مقدار این انرژی در نوشابه فاقد آسه سولفام K بیشتر بود که به نوبه خود تأثیر شدیدتر دما بر واکنش تجزیه آسپارتام و افزایش پایداری حرارتی آسپارتام را در مخلوط با آسه سولفام K نشان می‌دهد.

واژه‌های کلیدی

آسپارتام، آسه سولفام K، پایداری حرارتی، کروماتوگرافی یونی با کارایی بالا، نوشابه کولا

مقدمه

شیرین کننده می‌تواند ویژگی‌های کیفی و پایداری فرآورده نهایی را اصلاح و تنظیم کند (Lame, 2001). آسپارتام یک ترکیب دی‌پپتیدی است با ۱۸۰ تا ۲۲۰ مرتبه شیرین‌تر از ساکارز. طعم شیرین آسپارتام را به طور تصادفی در سال ۱۹۶۵، جیمز شلاتر^۱، شناخت (Altschul, 1993). آسپارتام، یکی از افزودنی‌های غذایی

گسترش مجموعه وسیع شیرین کننده‌ها، مزایایی برای صنایع غذایی دارد، زیرا به دلیل ویژگی‌های فردی^۱، هر یک از آنها در موارد ویژه‌ای قابل استفاده خواهد بود. به علاوه، امکان استفاده از دو یا چند شیرین کننده در یک فرآورده نیز همواره وجود دارد. مخلوط چند شیرین کننده بهتر از یک

و ساز در بدن انسان را دارند و بنابراین عبارت "شیرین کننده غیرمغذی" توصیف مناسبتری برای آسپارتام است و عبارت "مصنوعی و غیرمغذی" را بدین وسیله عوض می کند.

برخی محدودیت‌های پایداری آسپارتام از ماهیت شیمیایی آن به عنوان متیل استواستپارتیل فنیل آلانین دی پیتید ناشی می شود (Altschul, 1993). پایداری آسپارتام در صورت حل شدن تابعی از سه فاکتور اولیه یعنی زمان، دما و pH است.

استفاده از مخلوط آسپارتام با سایر شیرین کننده‌ها به جای مصرف آن به تنهایی، باعث اصلاح فرایند و پایداری آن و ایجاد تعادل در طعم می شود. استفاده همزمان از دو شیرین کننده به دلیل وجود سینرژی در طعم، موجب کاهش مصرف نهایی شیرین کننده و کاهش قیمت نهایی محصول می شود (Lame, 2001).

آسه سولفام K یک نمک پتاسیم مشتق شده از اسید استواستیک است که به علت قابلیت انحلال و پایداری مناسب در محیط‌های آبی، شیرین کننده بسیار مطلوبی برای نوشابه‌های غیرالکلی است. آسه سولفام K با غلظت مشابه، در مواد غذایی و نوشابه‌های اسیدی، کمی شیرینی بیشتری نسبت به مواد غذایی و نوشابه‌های خنثی ایجاد می کند. شدت شیرینی این نمک در نوشیدنی‌های گرم کاهش نمی یابد (Dwivedi, 1978). همچنین در pH نوشابه‌ها، یعنی در pH برابر ۳ و بالاتر، طی مدت چند ماه هیچ گونه هیدرولیزی در آن ایجاد نمی شود.

پژوهش‌های زیادی در زمینه بررسی ایمنی غذایی آسه سولفام وجود دارد، ولی در هیچ یک از آنها واکنش زیان آوری این ماده در بدن انسان دیده نمی شود. کمیته مشترک متخصصان FAO/WHO در زمینه افزودنی‌های غذایی (JECFA)، در سال ۱۹۸۳ مقدار مجاز مصرف روزانه این ترکیب را بین صفر و ۹ گرم، به ازای هر کیلوگرم وزن بدن مشخص کرده است. بر پایه یافته‌های کمیته مذکور،

است که به طور کامل بررسی شده است. دانشمندان با تجزیه و تحلیل واکنش‌های نامطلوب و اطلاعات بالینی به این نتیجه رسیدند که آسپارتام به طور قابل توجهی بی خطر است. ولی نوشته‌های آگاهی دهنده مناسب روی بسته بندی فرآورده‌های حاوی آسپارتام، برای مبتلایان به بیماری فنیل کتونوری^۱ ضروری است، زیرا کنترل مقدار فنیل آلانین در رژیم غذایی این بیماران لازم خواهد بود (Bakal et al., 2006). از آسپارتام به عنوان شیرین کننده سر سفره^۲ استفاده می شود. این ماده در تهیه نوشیدنی‌های گازدار، فرآورده‌های غلات صبحانه، غلات آماده مصرف، انواع ژلاتین، پودینگ، آب میوه، فرآورده‌های لبنی تخمیری نیز به کار می رود.

آسپارتام فاقد پس طعم فلزی است و پس از هیدرولیز شدن به اجزای سازنده اش، فنیل آلانین و آسپارتیک اسید متابولیز می شود. اداره نظارت بر مواد غذایی و دارویی آمریکا (FDA) مصرف ۵۰ میلی گرم آسپارتام به ازای هر کیلوگرم وزن بدن را در روز مجاز دانسته است (Francis et al., 2000). مطالعه مروری در خصوص ایمنی آسپارتام و متابولیت‌های آن بیانگر ایمن بودن آسپارتام است. این تأیید مبتنی است بر تحقیقات روی حیوانات آزمایشگاهی و انسان (شیرخواران، کودکان و نوجوانان، زنان شیرده و مبتلایان به دیابت) و مصرف آسپارتام به میزانی بیش از آنچه به طور معمول مردم مصرف می کنند (Butchko et al., 2002).

آسپارتام در حالت خشک به صورت پودری کریستالی شکل، سفید، بدون بو، و دارای طعم شیرین است. انحلال پذیری آنها در آب کم (۱ درصد) و در چربی‌ها و روغن‌ها انحلال ناپذیر است (Burdock et al., 1996). از قندهایی که به تازگی مورد تأیید قرار گرفته اند، آسپارتام به لحاظ اینکه از مشتقات دو اسید آمینه است، توصیف طبیعی تری را به دست آورده است. این مواد قابلیت سوخت

1- Phenylketonuria

2- Table Top Sweetener

سینتیک واکنش تجزیه آسپارتام در محدوده pH خنثی نشان دادند که تجزیه آسپارتام می‌تواند با استفاده از سینتیک واکنش‌های مرتبه اول محاسبه شود (Tsubell *et al.*, 1991).

برای تعیین مرتبه واکنش با استفاده از نتایج تجربی، روش‌های مختلفی وجود دارد. این روش‌ها شامل قرار دادن نتایج تجربی در معادلات سرعت واکنش، روش نیمه‌عمر، و روش سرعت اولیه است. در روش قرار دادن نتایج تجربی در معادلات سرعت واکنش، چنانچه غلظت واکنش‌دهنده (a) در زمان‌های مختلف (t) در اختیار باشد، از طریق جایگزینی نتایج تجربی در معادلات سرعت مختلف می‌توان مرتبه واکنش را معلوم کرد. به عنوان مثال، در واکنش‌های مرتبه صفر، بر طبق معادله $a = a_0 - k_0 t$ نمودار a بر حسب t یک خط راست است.

در واکنش‌های مرتبه اول، بر طبق معادله $\ln a = \ln a_0 - k_1 t$ نمودار $\ln a$ بر حسب t یک خط راست است.

در واکنش‌های مرتبه دوم، بر طبق معادله $\frac{1}{a} = \frac{1}{a_0} + k_2 t$ نمودار $\frac{1}{a}$ بر حسب t یک خط راست است.

همچنین، در مطالعه‌ای جهت بررسی تجزیه آسپارتام در محلول‌های بافرسفات-سیترات و در pHهای برابر ۲، ۴، ۶، ۷، ۸، ۱۰، ۱۲ و بررسی محصولات به دست آمده از تجزیه، از دستگاه HPLC فاز معکوس استفاده شد (Pattanaargson *et al.*, 2001).

امروزه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا^۳ یا HPLC جهت تجزیه و شناسایی طیف وسیعی از مواد به کار گرفته می‌شود در حالی که حساسیت تشخیص نیز بیلیون‌ها برابر افزایش یافته است.

در حال حاضر از آسپارتام در انواع نوشیدنی‌های رژیمی از جمله نوشابه‌های کولا به عنوان شیرین کننده

آسه سولفام هیچ‌گونه اثر جهش‌زایی^۱، سرطان‌زایی^۲ و سمی ندارد. آسه سولفام K در بدن تحت تأثیر واکنش‌های سوخت و ساز قرار نمی‌گیرد و بدون تغییر و به سرعت و به طور کامل دفع می‌شود، در نتیجه فاقد ارزش انرژی‌زایی و مناسب بیماران مبتلا به مرض قند است (Lame, 2001).

مخلوط آسه سولفام K با سایر شیرین‌کننده‌ها، به ویژه آسپارتام و سیکلامات، طعم کاملاً مطلوبی به وجود می‌آورد (Lame, 2001). بنابراین می‌توان از آن به صورت مخلوط با یک شیرین‌کننده دیگر در نوشابه‌های غیرالکلی استفاده کرد و طعم مطلوبی نیز به دست آورد. استفاده از آسه سولفام K در قوانین شیرین‌کننده‌های غذایی ۱۹۸۳ مجاز شناخته شد (von Rymon Lipinski, 1985). آسه سولفام تقریباً ۲۰۰ مرتبه شیرین‌تر از ساکارز است (Emerton, 2003).

مالک و همکاران در سال ۲۰۰۲ تحقیقی جهت بررسی پایداری سه شیرین‌کننده مصنوعی در نوشابه گازدار با طعم لیمو انجام دادند. سه شیرین‌کننده قوی آسپارتام، آسه سولفام K و سوکرالوز، یکی یکی و در غلظت تعیین شده معادل شیرینی ساکارز و در شرایط pH کنترل شده به نوشابه گازدار با طعم لیمو اضافه شدند (Malik *et al.*, 2002). نوشابه‌ها برای ۶۰ روز در دمای ۴، ۲۷ و ۳۷ درجه سلسیوس نگهداری شدند و غلظت شیرین‌کننده از دست رفته نیز با HPLC تعیین شد. مقدار کاهش آسپارتام از همه بیشتر و در حدود ۲۹/۵ برآورد شد. در حالی که کاهش سوکرالوز از همه کمتر و در پایان ۶۰ روز نگهداری در ۳۷ درجه سلسیوس ۱/۹ درصد بود. در مورد آسه سولفام K، مقدار کاهش ۶/۱ درصد به دست آمد. بنابراین سوکرالوز از سایر شیرین‌کننده‌ها پایدارتر است (Malik *et al.*, 2002).

سویل و همکاران در سال ۱۹۹۱ در تحقیقی جهت مطالعه

1- Mutagenic effect

3- High Performance Liquid ChromatographHy

2- Carcinogenic effect

آزمون‌های کنترل کیفی به منظور بررسی تطابق مشخصات این نوشابه با استاندارد نوشابه‌های کولای تولید شده با شیرین‌کننده‌های متداول اجرا شد (Anon, 1995). این آزمون‌ها شامل اندازه‌گیری pH، اسیدیته، خاکستر، و دانسیته بودند.

نوشابه حاوی دو شیرین‌کننده، سپس به همراه نوشابه شاهد (حاوی اسپارتام) به تعداد مورد نیاز تولید و به مدت ۶ ماه در سه دمای یخچال (۴ درجه سلسیوس)، محیط (۲۵ درجه سلسیوس)، و آون (۴۰ درجه سلسیوس) انبارگذاری شدند.

غلظت اسپارتام هر ۱۵ روز یک بار با استفاده از دستگاه HPLC (کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا) اندازه‌گیری شد.

دستگاه HPLC شامل پمپ، دتکتور UV visible تنظیم شده برای طول موج ۲۱۰-۲۰۰ نانومتر و ستون با ابعاد ۴/۶×۲۵۰ میلی‌متر، از نوع vertex column [with integrated pre-column] و شامل ماده پرکننده Nucleosil-120c 18, 10 میکرومتر بود. اسپارتام و آسه‌سولفام K از کمپانی نوتراسوتیت و سایر مواد شامل بنزوات‌سدیم، فسفات دی‌هیدروژن مونوپتاسیم، هیدروکسید پتاسیم، هیدروکسید سدیم، استونیتریل، و اسید فسفریک از کمپانی Merck تهیه شدند. از آب بدون یون تولید شده در دستگاه تولید آب بدون یون متعلق به کمپانی Bibby sterling LTD استفاده شد.

واکنشگرهای لازم برای آزمون اندازه‌گیری غلظت اسپارتام با دستگاه HPLC عبارت بودند از:
۱- برای محلول‌سازی از آب بدون یون یا آب دو بار تقطیر استفاده شد.

۲- بخش متحرک A: ۲/۷۲ گرم فسفات دی‌هیدروژن مونو پتاسیم (KH_2PO_4) با آب به حجم ۱۰۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد (محلول ۰/۰۲ نرمال). پس از آن با کمک pH مترویدروکسیدپتاسیم (KOH) ۰/۰۱ نرمال pH آن روی ۵ تنظیم و در یک شیشه پاک و دربسته نگهداری شد. و

استفاده می‌شود. تجزیه اسپارتام در این نوشابه‌ها با گذشت زمان موجب تلخ شدن تدریجی محصول و کاهش قابلیت پذیرش آن می‌شود به طوری که در عمل پس از ۲ ماه طعم تلخی در این نوشابه‌ها ظاهر می‌شود. بنابراین افزایش احتمالی زمان ماندگاری اسپارتام در صورت استفاده از قندی چون آسه‌سولفام K و همچنین احتمال افزایش پایداری حرارتی آن در دماهای بالاتر، در این تحقیق مورد بررسی قرار گرفته است. به این منظور نوشابه دارای مخلوط دو شیرین‌کننده اسپارتام و آسه‌سولفام K و نوشابه حاوی اسپارتام به تنهایی، به عنوان شاهد، تولید شدند و سه دما جهت انبارگذاری نمونه‌ها در نظر گرفته شد: دمای یخچال (۴ درجه سلسیوس)، دمای محیط (۲۵ درجه سلسیوس)، و دمای آون (۴۰ درجه سلسیوس). زمان انتخاب شده برای عملی کردن این بررسی و تعیین زمان ماندگاری^۱ نمونه‌های جدید، ۴ ماه در نظر گرفته شد.

مواد و روش‌ها

در این تحقیق با توجه به مقدار مصرف اسپارتام در نوشابه‌های رژیمی، ابتدا مقادیر شیرین‌کننده‌ها برای نوشابه‌های دارای یک یا دو نوع شیرین‌کننده محاسبه شد. مقدار مصرف اسپارتام در نوشابه‌های رژیمی ۰/۵۲ گرم در لیتر است. با توجه به اینکه دو شیرین‌کننده اسپارتام و آسه‌سولفام K در نسبت ۱:۱ دارای حداکثر برهمکنش‌های مولکولی هستند (Smith, 1991)، و در نتیجه حداکثر طعم شیرینی در این نسبت حاصل می‌شود، این نسبت برای فرموله کردن نوشابه‌های حاوی دو شیرین‌کننده مورد استفاده قرار گرفت. وزن مولکولی اسپارتام ۲۹۴/۳۱ و وزن مولکولی آسه‌سولفام K، ۲۰۱/۲۴ است. بنابراین، نوشابه‌ها با به‌کارگیری نسبت وزنی ۴۰:۶۰، اسپارتام: آسه‌سولفام K فرموله شده و با وزن کل ۰/۵۲ گرم به نوشابه‌ها اضافه شدند. در این تحقیق نمونه دارای اسپارتام، نمونه A، و نمونه دارای مخلوط دو شیرین‌کننده، نمونه B نامیده شد.

ابتدا ۱۰ میکرولیتر از محلول ذخیره (۱ میلی گرم آسپارتام در ۱ میلی لیتر بخش متحرک A) با استفاده از سرنگ مخصوص تزریق و پس از آن سطح زیر منحنی آن را به دست آورده شد.

سپس به عنوان نمونه ۱۰ میکرولیتر از محلول نمونه را تزریق کرده و سطح زیر منحنی آن تعیین شد. سطوح به دست آمده در رابطه ۱ قرار گرفت:

$$V = \frac{50 \times \text{سطح زیر منحنی}}{\text{سطح زیر منحنی محلول استاندارد}} \quad (1)$$

V معادل حجم لازم از محلول ذخیره برای تهیه ۵۰ میلی لیتر محلول استاندارد با غلظتی مشابه غلظت آسپارتام در نمونه بر حسب میلی گرم در لیتر (به حجم رسیده با بخش متحرک A) است.

و سرانجام با استفاده از رابطه ۲ غلظت محلول استاندارد برای هر یک از نمونه‌ها به دست آمد:

$$C_{st} = \frac{C \times V}{50} \quad (2)$$

که در آن، C_{st} = غلظت استاندارد بر حسب میلی گرم در لیتر، C = غلظت محلول ذخیره، و V = مقدار محاسبه شده در بخش قبل است.

پس از محاسبات لازم، غلظت محلول استاندارد برای نوشابه شاهد ۲۰ ppm و برای نوشابه‌های دارای آسه سولفام ۱۰ ppm در نظر گرفته شد. جهت ساخت این استانداردها به ترتیب زیر عمل شد:

۱- یک دهم گرم (۰/۱ گرم) آسپارتام (از همان آسپارتام استفاده شده در ساخت نوشابه‌ها) در بالن ژوژه ۱۰۰ سی سی با استفاده از بخش A ساخته شده به حجم رسانده و رقیق شد.

سرانجام برای تهیه بخش متحرک A، ۹۷۰ میلی لیتر از آن با ۳۰ میلی لیتر استونیتریل مخلوط (محلول ۳+۹۷) و سپس با استفاده از دستگاه فیلتراسیون شیشه‌ای متصل به خلأ و کاغذ صافی، صاف و بدون گاز شد.

۳- بخش متحرک B: ۲/۷۲ گرم فسفات دی هیدروژن مونو پتاسیم (KH_2PO_4) با آب به حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر رسانده شد و به کمک pH سنج و افزودن قطره‌های ریز اسید فسفریک ۵ درصد (با سرنگ یا پیپت پاستور) pH آن به ۳/۵ رسید. و سرانجام برای تهیه بخش متحرک B، ۸۰۰ میلی لیتر آن با ۲۰۰ میلی لیتر استونیتریل مخلوط (محلول ۸۰+۲۰) و سپس با استفاده از دستگاه فیلتراسیون شیشه‌ای متصل به خلأ و کاغذ صافی صاف و بدون گاز شد.

۴- محلول ذخیره آسپارتام ۱ میلی گرم در میلی لیتر در بخش متحرک A (Anon, 1997).

تعیین غلظت استانداردها

برای تعیین غلظت ماده با HPLC لازم است ابتدا غلظت استاندارد تهیه شده از همان ماده جهت تزریق به HPLC تعیین شود. سطح زیر منحنی این استاندارد باید به سطح زیر منحنی نمونه مورد نظر نزدیک باشد (Zhu et al., 2005). بنابراین، برای نمونه شاهد یک مرتبه غلظت استاندارد و برای نمونه دارای آسه سولفام (که نصف غلظت آسپارتام شاهد را دارا داشت) نیز یک مرتبه غلظت استاندارد تعیین شد.

این آزمون مطابق روش استاندارد ۴۳۹۰ ایران انجام (Anon, 1997) و غلظت استانداردها برای هر یک از دو نمونه مذکور به طور جداگانه محاسبه شد.

به این منظور ۵ میلی لیتر نوشابه رژیمی گازگیری شده به عنوان نمونه در ۱۰۰ میلی لیتر از بخش متحرک A رقیق و با دستگاه فیلتراسیون شیشه‌ای متصل به پمپ خلأ و کاغذ صافی، صاف شد.

۲- یک میلی لیتر (۱ میلی لیتر) از محلول بالا در بالن ۵۰۰ سی سی با استفاده از بخش A ساخته شده به حجم رسانده شد.
 ۳- یک دهم میلی لیتر (۰/۱ میلی لیتر) از محلول قسمت ۱ با استفاده از نمونه گیر برداشته شده و در بالن ۵۰ سی سی با استفاده از بخش A به حجم رسانده و رقیق شد.
 محلول ساخته شده در قسمت ۲ استاندارد ۲۰ ppm و محلول ساخته شده در قسمت ۳ استاندارد ۱۰ ppm بود.

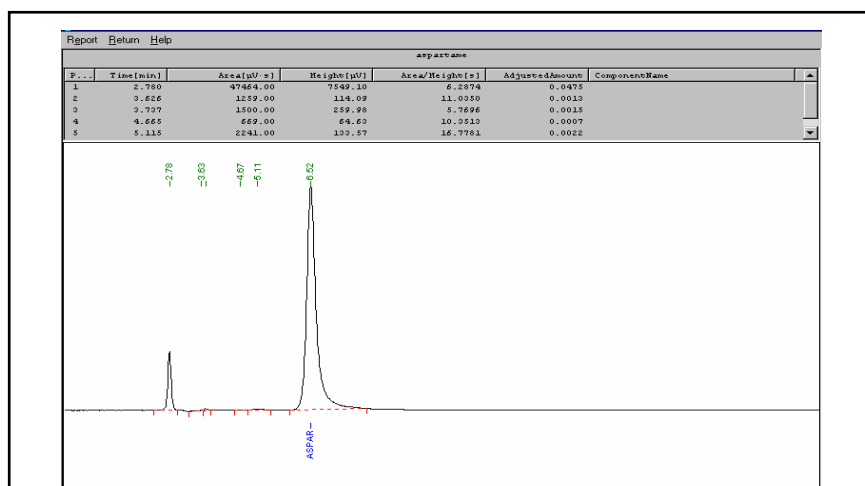
تعیین غلظت نمونه‌ها
 نوسابه‌ها ابتدا به دقت گازگیری شدند. پس از آن، ۵ میلی لیتر نوشابه رژیمی گازگیری شده در ۱۰۰ میلی لیتر از بخش متحرک B رقیق شد. نمونه‌ها قبل از تزریق شدن به دستگاه باید فیلتر می شدند. برای این منظور از کاغذ صافی دارای قطر منافذ ۰/۴۵ میکرومتر استفاده شد. کاغذ صافی در نگهدارنده فیلتر^۱ یا همان سر سرنگی قرار گرفت. نمونه‌ای که از طریق این فیلتر صاف شد با استفاده از سرنگ ۵۰ میلی لیتری مخصوص دستگاه HPLC از فیلتر عبور داده شد. تزریق با دقت و در شرایطی انجام شد که سرنگ حتی الامکان خالی از حباب هوا و محلول کاملاً صاف بود. زمان دستگاه برای ۲۰ دقیقه تنظیم شد. سرعت جریان^۲ برای اجرای این آزمایش در دستگاه HPLC برابر ۱

میلی لیتر بر دقیقه بود. از دتکتور UV visible و طول موج نانومتر استفاده و سطح زیر منحنی نمونه‌ها تعیین شد. در زمان تولید نمونه‌ها و پیش از سپری شدن زمان، مقدار آسپارتام نمونه‌ها بلافاصله با توسط دستگاه HPLC اندازه گیری شد و این نتایج به عنوان غلظت اولیه مبنای نتیجه گیری قرار گرفت.

در هر یک از زمان‌های آزمون، ابتدا ۱۰ میکرو لیتر از محلول استاندارد تهیه شد. برای هر یک از نمونه‌ها تزریق شد و سطح زیر منحنی آن به دست آمد. پس از تعیین سطح زیر منحنی استانداردها و نمونه‌ها مقدار آسپارتام موجود در یک لیتر نمونه در هر یک از زمان‌های آزمون، از رابطه ۳ (برحسب میلی گرم) محاسبه شد:

$$S_2 \times C_{st} / S_1 \quad (3)$$

که در آن،
 C_{st} = غلظت محلول استاندارد به میلی گرم در لیتر؛
 S_1 = سطح زیر منحنی استاندارد؛ و S_2 = سطح زیر منحنی نمونه است.
 هر یک از آزمون‌ها سه تکرار داشت. نمونه پیک رسم شده با دستگاه HPLC برای محلول استاندارد، در شکل ۱ نمایش داده شده است.

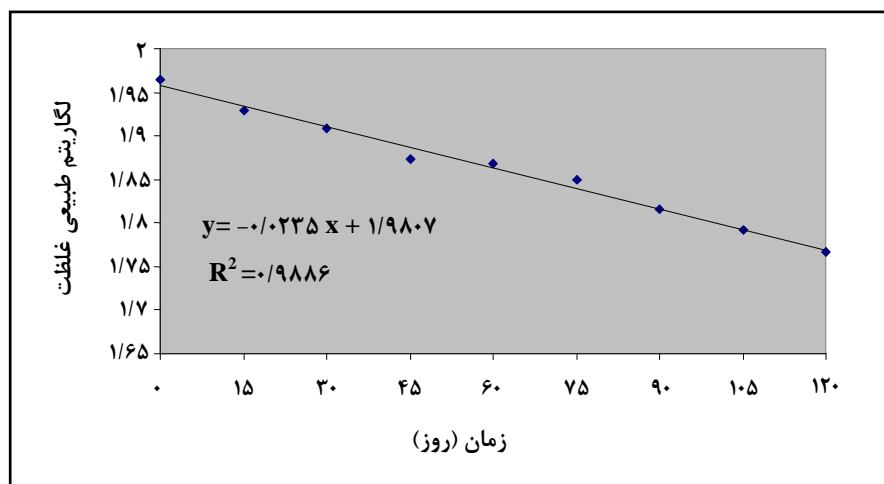


شکل ۱- پیک رسم شده با دستگاه HPLC برای محلول استاندارد.

تعیین مرتبه واکنش

پس از تعیین غلظت آسپارتام در فواصل زمانی ۱۵ روزه، جهت تعیین مرتبه واکنش تجزیه آسپارتام، از روش قرار دادن نتایج تجربی به دست آمده از بررسی دو نمونه مورد آزمایش در معادلات سرعت واکنش استفاده شد. در این روش، معادله خط برای سه مرتبه صفر، اول، و دوم رسم و معادله دارای ضریب رگرسیون بالاتر به عنوان مرتبه واکنش انتخاب شد (Elhami rad, 2006).
برای بررسی معادلات مرتبه صفر، مقادیر غلظت

آسپارتام (a) بر حسب زمان (در هر یک از فواصل ۱۵ روزه) در یک نمودار رسم شدند.
برای بررسی معادلات مرتبه اول، مقادیر لگاریتم طبیعی غلظت (Lna) بر حسب زمان در یک نمودار رسم شدند و معادله خط بررسی شد. برای بررسی معادلات مرتبه دوم، مقادیر عکس غلظت، (1/a) بر حسب زمان در یک نمودار رسم شدند و معادله خط بررسی شد. نمونه‌های از نمودارهای تعیین مرتبه واکنش در شکل ۲ نشان داده شده است.



شکل ۲- تغییرات لگاریتم طبیعی غلظت آسپارتام در طول زمان در نمونه A.

مدت زمانی است که غلظت یک ماده به نصف مقدار اولیه می‌رسد). این زمان، زمان نیمه‌عمر ماده مورد نظر (آسپارتام) در هر نمونه و در هر دمای آزمون بود. پس از بررسی ماندگاری آسپارتام در نمونه‌ها، وابستگی واکنش تجزیه آسپارتام به دما بررسی شد. وابستگی واکنش تجزیه آسپارتام به دما با معادله آرنیوس شرح داده می‌شود (رابطه ۵):

$$K = K_0 \exp(-Ea/RT) \quad (5)$$

پس از به دست آوردن نتایج تا پایان ۴ ماه، سینتیک واکنش تجزیه آسپارتام از طریق معادلات درجه اول (رابطه ۴) بررسی شد. که در آن C غلظت آسپارتام پس از گذشت زمان t، C₀ غلظت اولیه آسپارتام، و K ثابت سرعت واکنش تجزیه آسپارتام است.

$$\ln C = \ln C_0 - Kt \quad (4)$$

با قرار دادن مقدار غلظت اولیه در معادله سینتیکی مرتبه اول، که برای واکنش تجزیه آسپارتام انتخاب شده بود، زمان نیمه‌عمر محاسبه شد (نیمه‌عمر، که در آن،

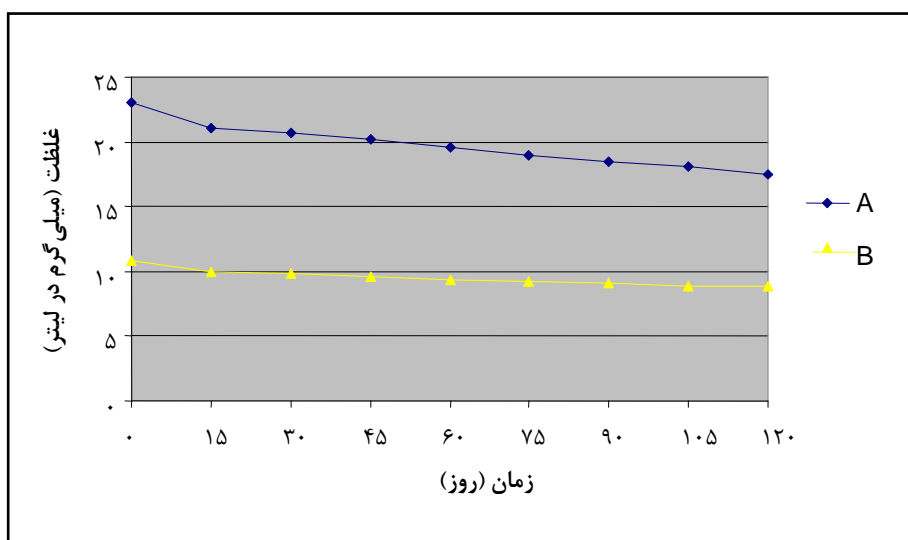
بررسی جدول های تجزیه واریانس نشان می دهد که از نظر غلظت آسپارتام باقیمانده در محصول، بین دو نمونه شاهد و نمونه حاوی آسه سولفام K در هر یک از زمان های اجرای آزمون در سطح ۱ درصد اختلاف معنی داری وجود دارد. همچنین بررسی جدول های مقایسه میانگین نشان می دهد که نمونه حاوی آسه سولفام در همه زمان های اجرای آزمون به طور معنی داری غلظت بالاتر آسپارتام را نسبت به نمونه شاهد دارد. جدول ۲ مقایسه میانگین غلظت آسپارتام دو نمونه را در پایان ماه چهارم نشان می دهد.

جدول ۲- جدول مقایسه میانگین غلظت آسپارتام دو نمونه در پایان ماه چهارم

نمونه	غلظت آسپارتام
A	۱۶/۲۱۰۸
B	۱۸/۲۳۵۴

*میانگین های دارای حروف مشابه اختلاف معنی داری ندارند (دانکن $\alpha=0.05$).

مطابق این نتایج، ماندگاری آسپارتام در حضور آسه سولفام K به طور معنی داری افزایش یافته است. رسم نمودارهای روند تغییرات غلظت آسپارتام با زمان در دماهای ثابت برای دو نمونه A و B همچنین نشان می دهد که غلظت آسپارتام برای نمونه های A و B با گذشت زمان کاهش می یابد، اما این روند کاهشی برای نمونه A شدت بیشتری دارد تا برای نمونه B (شکل ۴).



شکل ۴ - نمودار روند تغییرات غلظت آسپارتام در دمای ۴ درجه سلسیوس.

معادلات سینتیکی مرتبه اول برای هر یک از نمونه ها در هر یک از دماها نوشته شدند. مقادیر ثابت سرعت واکنش (K) به دست آمده، بالاتر بودن سرعت واکنش تجزیه آسپارتام را در نمونه های فاقد آسه سولفام در دماهای ثابت

نشان می‌دهد. مقایسه نیمه‌عمر نمونه‌های A و B، زمان ماندگاری بیشتر را نمونه‌های حاوی آسه‌سولفام تأیید می‌کند. جدول ۳ مقادیر ثابت سرعت واکنش تجزیه آسپارتام را در دو نمونه نشان می‌دهد: معادلات سینتیکی تجزیه آسپارتام از نوع مرتبه اول و زمان نیمه‌عمر آسپارتام در نمونه‌ها.

جدول ۳- نتایج سینتیکی به‌دست آمده برای نمونه‌ها

نیمه عمر (ماه)	معادله سینتیکی	ثابت سرعت واکنش (در ماه)	نمونه
۸	$\ln C = 3/1354 - 0/305 t$	۰/۳۰۵	A1
۵	$\ln C = 3/1354 - 0/468 t$	۰/۴۶۸	A2
۱	$\ln C = 3/1354 - 0/2294 t$	۰/۲۲۹۴	A۳
۹	$\ln C = 1/9643 - 0/235 t$	۰/۲۳۵	B1
۷	$\ln C = 1/9643 - 0/285 t$	۰/۲۸۵	B2
۲	$\ln C = 1/9643 - 0/1616 t$	۰/۱۶۱۶	B۳

محاسبه شد و نتایج تحلیل‌های آماری، مشاهده شد که افزایش دما در تمام نمونه‌ها موجب افزایش مقدار ثابت واکنش، که به معنای افزایش سرعت واکنش است، و کاهش زمان نیمه‌عمر آسپارتام شده است. در عین حال در نمونه‌های حاوی آسه‌سولفام (نمونه B) در دماهای مشابه در مقایسه با نمونه شاهد، مطابق جدول ۳، زمان نیمه‌عمر آسپارتام افزایش و ثابت سرعت واکنش تجزیه کاهش یافته است. این نتایج نشان‌دهنده اثر آسه‌سولفام بر افزایش پایداری حرارتی آسپارتام است. برای نوشتن معادلات آرنیوس با جایگزینی K از رابطه ۴ در رابطه ۵ رابطه زیر به دست می‌آید.

$$\ln C/C_0 = K_0 \exp(-E_a/RT)t \quad (7)$$

مقدار محاسبه شده انرژی اکتیواسیون (E_a) و K_0 برای نمونه A و B در جدول ۴ نمایش داده شده است.

جدول ۵، معادلات آرنیوس نوشته شده برای نمونه‌ها را در دماهای مختلف نشان می‌دهد. هر چه انرژی اکتیواسیون بیشتر باشد تغییر دمای کمتری مورد نیاز است تا ترکیبی

سایر تحقیقات نیز نشان داده که می‌توان شیرین‌کننده‌ای مانند ساخارین را همراه با آسپارتام، به کار برد که مخلوط مذکور پایداری بیشتری نسبت به آسپارتام تنها خواهد داشت (Lame, 2001). وجود هم‌افزایی در طعم شیرین‌کننده‌ها موجب شده که افزایش ماندگاری شیرین‌کننده‌ها در مخلوط نیز به خاصیت هم‌افزایی موجود بین آنها نسبت داده شود (Walters, 1993).

افزایش سرعت واکنش تجزیه آسپارتام با افزایش دما، با بررسی افزایش ثابت سرعت واکنش در نمونه‌های نگهداری شده در دماهای ۴، ۲۵ و ۴۰ درجه سلسیوس، مشاهده شد. محققان دیگر نیز تحقیقاتی جهت بررسی تجزیه آسپارتام در محلول به عنوان تابعی از دما (۷۰-۱۰۰ درجه سلسیوس) در محدوده pH خنثای نوشیدنی‌های اسپتیک بر پایه شیر انجام دادند و نتیجه آزمایش‌ها از دست رفتن معنی‌دار آسپارتام در طول نگهداری و سرعت بیشتر تجزیه آسپارتام در دماهای بالاتر را نشان داد. تجزیه آسپارتام در این مطالعه با استفاده از سینتیک واکنش‌های مرتبه اول محاسبه شد (Tsubell et al., 1991).

در این تحقیق نیز با توجه به زمان نیمه‌عمر آسپارتام در نمونه‌ها که با استفاده از معادلات سینتیکی مرتبه اول

حضور شیرین کننده های پایدارتر به دست آمده است (Frank et al., 1989).

به دلیل پایداری آسه سولفام، می توان آن را با روش افشانه ای^۱ خشک یا از آن در تولید پودر نوشابه های فوری^۲ استفاده کرد (Emerton, 2003). بنابراین، نتیجه گیری می شود که استفاده از آسه سولفام K در مخلوط با آسپارتام موجب پایداری حرارتی این شیرین کننده شده است.

خاص با سرعت بالاتری تخریب شود (Altschul, 1993). بنابراین مطابق جدول ۴، پائین تر بودن

انرژی اکتیواسیون در مورد نمونه حاوی آسه سولفام نمایانگر این مطلب است که آسپارتام در این نمونه پایداری حرارتی بیشتری دارد.

در سایر تحقیقات نیز که اندرکنش های مخلوط های دوتایی انواع شیرین کننده های مختلف بررسی شده، نتایج مشابهی در خصوص افزایش پایداری حرارتی آنها در

جدول ۴ - مقادیر K₀ و انرژی اکتیواسیون برای نمونه ها

نمونه	معادله آرنیوس
A1	$\ln C / 23 = 365857/8 \exp (-16/5) t$
A2	$\ln C / 23 = 365857/8 \exp (-15/34) t$
A3	$\ln C / 23 = 365857/8 \exp (-14/6) t$
B1	$\ln C / 7/13 = 97929/2 \exp (-15/5) t$
B2	$\ln C / 7/13 = 97929/2 \exp (-14/4) t$
B3	$\ln C / 7/13 = 97929/2 \exp (-13/71) t$

جدول ۵ - معادلات آرنیوس نمونه های مختلف

نمونه	ثابت آرنیوس (عکس زمان)	انرژی اکتیواسیون (کیلوژول بر مول)
A	365857/8	B
B	97929/2	AA*

نتیجه گیری

تجزیه آن می شود، در حضور آسه سولفام K کاهش می یابد. این موضوع با نوشتن معادلات آرنیوس و محاسبه انرژی اکتیواسیون برای دو نمونه حاوی آسه سولفام و فاقد آسه سولفام مشخص می شود که نشان دهنده افزایش پایداری حرارتی آسپارتام در حضور آسه سولفام K است. بنابراین، علاوه بر دستیابی به طعم ملایم در این نوع نوشابه ها می توان تاریخ مصرف آنها را افزایش و شدت تجزیه آسپارتام را در دمای محیط کاهش داد. بر اساس نتایج این تحقیق پیشنهاد می شود که

بر اساس یافته های حاصل از این تحقیق و بررسی نتایج می توان به این نتیجه رسید که استفاده از شیرین کننده آسه سولفام K همراه با آسپارتام در نوشابه رژیمی نوع کولا موجب بهبود خواص مرتبط با پایداری آسپارتام در pH نوشابه کولا می شود، به طوری که پایداری آسپارتام از حدود از ۲ ماه به بیش از ۴ ماه افزایش پیدا می کند و تلخ شدن محصول که قابلیت پذیرش آن را کاهش می دهد، به تأخیر می افتد. همچنین، اثر افزایش

تغییرات پایداری آسپارتام در حضور آسه‌سولفام K در **قدردانی**
محیط سایر نوشیدنی‌های رژیمی به منظور جلوگیری از این طرح با حمایت شرکت زمزم ایران اجرا شده
تلخ شدن این محصولات و افزایش زمان ماندگاری آنها است. بدین‌وسیله از این شرکت محترم قدردانی
بررسی شود.

مراجع

- Altschul, A. M. 1993. Low Calorie Foods Handbook. Marcel Dekker.
- Anon. 1995. Carbonated Soft Drinks – Specifications. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. ISIRI No. 1250. (in Farsi)
- Anon. 1997. Determination of Aspartame in Diet Product with HPLC Method. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. ISIRI No. 4390. (in Farsi)
- Bakal, A. and Cash, P. 2006. Sweetening the Pot. ABIC International Consultants Inc.
- Burdock, G. A. and Roton, B. 1996. Encyclopedia of Food and Color Additives. CRC Press.
- Butchko, H. H., Stargel W. W., Comer C. P., Mayhew D. A., Benninger C., Blackburn G. L., de Sonnevile L. M., Geha, R. S., Hertelendy, Z., Koestner, A., Leon, A. S., Liepa, G. U., McMartin, K. E., Mendenhall, C. L., Munro, I. C., Novotny, E. J., Renwick, A. G., Schiffman, S. S., Schomer, D. L., Shaywitz, B. A., Spiers, P. A., TepHly, T. R., Thomas, J. A. and Trefz, F. K. 2002. Aspartame: Rewiew of Safety. Regul. Toxicol. Pharmacol. 35(2): S1-S93.
- Dwivedi, B. K. 1978. Low Calorie and Special Dietary Foods. CRC Press.
- Elhami rad, A. H. and Yavarmanesh. M. 2006. Basic of kinetic reaction in foods. Beyhagh. 5, 14-37. (in Farsi)
- Emerton, V. 2003. Essential Guide to Food Additives. Leatherhead Food International.
- Francis, F. J. 2000. Encyclopedia of Food Science and Technology. John Wiley & Sons Inc.
- Frank, R. A., Mize, S. J. S. and Carter, R. 1989. An Assessment of Binary Mixture Interaction for Nine Sweeteners. Chem. Senses. 14, 621-632
- Lame, H. 2001. Guide of Using of Food Additives. Islamic Azad University Pub. (in Farsi)
- Malik, A., Jeyarani, T. and Raghvan, B. 2002. A Comparison of Artificial Sweeteners' Stability in a Lime-Lemon Flavored Carbonated Beverage. J. Food Quality. 25, 75-82.
- Pattanaargson, S., Chuapradit, C. and Srisukphoraruk, S. 2001. Aspartame Degradation in Solutions at Various pH Conditions. J. Food Sci. 66(6): 808-809.
- Smith, J. 1991. Food Additives Users Handbook. Newyork Blackie.
- Tsoubell, M. N. and Labuza, T. P. 1991. Accelerated Kinetic Study of Aspartame Degradation in the Neutral pH Range. J. Food Sci. 56(6): 1671-1675.
- von Rymon Lipinski, G. W. 1985. The new intense sweetener Acesulfame K. Food Chem. 16, 259-269.
- Walters, E. 1993. High Intensity Sweetener Blends. Food Product Design.

بررسی اثر استفاده از شیرین کننده آسه سولفام...

Zhu, Y., Guo, Y., Ye, M. and James, F. S. 2005. Separation and Simultaneous Determination of Four Artificial Sweeteners in Food and Beverages by Ion Chromatography. J. Chromatogr. A. 1085(1): 143-146



Effect of Acesulfame K on Stability and Thermal Resistance of Aspartame in Diet Cola

**N. Khazaei, M. Jouki^{*}, A. H. Elhami Rad, H. Tavakolipour and
S. Mohammad Zadeh**

^{*} Corresponding Author: Academic Member, Agricultural Azad University, Young Researchers Club, P. O. Box: 37515-374, Shahr-e-qods. Iran. E-Mail: m.jouki@yahoo.com

Received: 9 May 2011, Accepted: 28 January 2012

This study assessed the effect of acesulfame K on the stability of aspartame in diet cola. Since acesulfame K is resistant to high temperatures, the effect of a blend of two sweeteners on its thermal resistance in diet cola was also studied. A cola containing two sweeteners (1:1 weight ratio) was prepared and, after quality control testing, was stored at temperatures of 4, 25 and 40 °C for 6 months. The concentration of aspartame remaining was measured every 15 days using high performance liquid chromatography. Statistical results showed better stability of aspartame in cola containing acesulfame K. The kinetic equations of aspartame decomposition represented a first order reaction; aspartame half-life results also confirmed this result. The amount of activation energy was greater in cola without acesulfame K and indicated the greater effect of temperature on aspartame decomposition in this sample.

Keywords: Acesulfame K, Aspartame, Cola, High performance liquid chromatography, Thermal resistance