مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال دوم، شماره۴، زمستان ۱۳۸۶ ، صفحات ۴۰-۲۷

مقایسه روش‌های کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، نقطه انجماد و کلرآمین T برای اندازه‌گیری میزان آبکافت لاکتوز شیر

آرمان سعید آبادیان[۱]، سلیمان عباسی[۲]، محمدحسین عزیزی[۳]، رضا روحانی[۴]

۱- کارشناس ارشد علوم و صنایع غذایی
۲- نویسنده مسئول: استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشکده تربیت مدرس پست الکترونیکی: sabbasifood@modares.ac.ir
۳- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس
۴- کارشناس بخش تحقیق و توسعه کارخانه لبنیات پاستوریزه پاک

تاریخ دریافت: ۸۶/۳/۲۰ تاریخ پذیرش: ۸۶/۹/۲۱

چکیده

سابقه و هدف: در حال حاضر برای تعیین درجه آبکافت لاکتوز شیر، روش‌های متعددی وجود دارد، ولی برخی از این روش‌ها با وجود دقت بالا، به دلیل گران بودن، چندان قابل استفاده نیستند. در این پژوهش، برای یافتن روشی مناسب و ارزان‌قیمت، کارایی روش‌های کروماتوگرافی مایع، نقطه انجماد و کلرآمین T برای اندازه‌گیری میزان آبکافت لاکتوز شیر، مورد مقایسه و بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: در این پژوهش، مقدار لاکتوز شیر پس چرخ و میزان آبکافت لاکتوز، پس از ۴ ساعت تیمار با آنزیم بتا-گالاکتوزیداز، توسط روش‌های کروماتوگرافی مایع، نقطه انجماد و کلرآمین T اندازه‌گیری شد.

یافته ها: بیشترین تاثیر آنزیم در ۲ ساعت اول بود و مقدار لاکتوز شیر، پس از دو ساعت به کمتر از ۰/۵ درصد رسید. در روش کروماتوگرافی، درصد انحراف معیار نسبی (%RSD) سطوح زیر پیک بعد از ۲ ساعت، بیش از ۴۰ درصد بود و نتیجهٔ تکرارپذیری پس از ۲ ساعت، چندان مطلوب نبود. در روش نقطه انجماد هم، پس از ۲ ساعت روند نزولی نقطه انجماد کاهش، میزان تغییرات کمتر بود و در کل، نقطه انجماد بعد از ۴ ساعت، کاهشی معادل ۰/۲۷۴ °C- داشت. به طوری که به ازای ۱ درصد آبکافت لاکتوز، نقطه انجماد ۰/۰۰۲۸ °C کاهش یافت. در ضمن، ارتباط خطی خوبی بین نقطه انجماد و آبکافت لاکتوز در آبکافت های بالای ۸۸ درصد مشاهده نشد. در روش کلرآمینT نیز با افزایش آبکافت لاکتوز، میزان تیوسولفات سدیم مصرفی، کاهش یافت و این روند بعد از ۲ ساعت کُند شد. به‌طور کلی، در مراحل ابتدایی آبکافت (۶۰ دقیقه اول) میزان لاکتوزِ اندازه‌گیری شده توسط سه روش، تقریبا مشابه بود، ولی پس از این مدت، میزان لاکتوز تعیین شده توسط روش کلرآمینT با دو روش دیگر، اندکی اختلاف داشت.

نتیجه‌گیری: با توجه به وجود ضریب تعیین بسیار خوب (r^2=۰/۹۹۷۶) بین دو روش نقطه انجماد و کروماتوگرافی مایع، استفاده از روش نقطه انجماد به‌عنوان روشی بسیار مناسب، ساده، دقیق و کم‌هزینه برای ارزیابی درصد لاکتوز و آبکافت شیرهای تیمار شده با آنزیم توصیه می‌شود. در ضمن، روش کلرآمین T روش نسبتا دقیقی برای تعیین میزان لاکتوز در شیرهای تیمار نشده تشخیص داده شد.

واژگان کلیدی: آبکافت لاکتوز، نقطه انجماد، کلرآمین T، بتا-گالاکتوزیداز، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (**HPLC**)

• مقدمه

امروزه، در اغلب کشورها تولید شیرهای کم‌لاکتوز یا بدون لاکتوز امکان‌پذیر است. برای این منظور، اغلب از روش افزودن آنزیم آزاد یا آنزیم تثبیت شده استفاده می‌شود (۱). مشکل این است که متاسفانه برای توقف تیمار آنزیمی برای دستیابی به حد مشخصی از آبکافت، روش دقیق و سریعی وجود ندارد. به طوری‌که امروزه از روش‌های مختلف اندازه‌گیری لاکتوز برای ارزیابی میزان آبکافت استفاده می‌شود. این روش‌ها را می‌توان به چهار گروه شیمیایی، آنزیمی، دستگاهی و فیزیکی تقسیم‌بندی کرد. روش کلرامینT، رنگ‌سنجی با فنل، یدومتری و

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-15]

احیای مس از روش‌های شیمیایی هستند (۲). در روش آنزیمی که در نوع خود نسبتاً حساس و آسان است، مقدار لاکتوز بر مبنای فرایند اکسیداسیون و احیاء تعیین می‌شود (۳). از روش‌های دستگاهی نسبتاً دقیق نیز می‌توان روش‌های کروماتوگرافی گازی (GC) و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) را نام برد که در ۲۰ سال اخیر برای ارزیابی کمّی و کیفی لاکتوز و سایر تک قندی‌های شیر مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۴). این روش‌ها گرچه نسبتاً مناسب هستند، ولی به علت پرهزینه بودن، استفاده از آن‌ها در بیشتر کارخانه‌های شیر در ایران و جهان، عملی و معقول نیست. به‌همین دلیل، استفاده از روش‌های فیزیکی، مانند اندازه‌گیری نقطه انجماد برای ارزیابی کمّی لاکتوز و میزان آبکافت آن پیشنهاد شده است (۵).

اساس عمل اندازه‌گیری نقطه انجماد، قانون رائولت است و می‌توان گفت که حضور لاکتوز به‌عنوان ماده حل شونده می‌تواند مطابق این قانون سبب کاهش نقطه انجماد شود. ولی از آنجا که شیر یک محلول پیچیده و حاوی مواد حل شونده قندی و انواع نمک است، به همین دلیل ممکن است حضور آن‌ها نیز به نوبه خود، این ویژگی فیزیکی را تحت تأثیر قرار دهد (۶). در ضمن، Chen و همکاران از نقطه انجماد برای تعیین درجه آبکافت لاکتوز استفاده کرده‌اند (۷). شاید بتوان از این روش به‌عنوان یک روش سریع، آسان و کم‌هزینه برای ارزیابی لاکتوز شیر و میزان آبکافت آن استفاده کرد.

به همین منظور، در پژوهش حاضر، کارایی، دقت و صحّت روش نقطه انجماد، به عنوان روشی ساده و کم‌هزینه با نتایج روش کلرآمین T به‌عنوان یک روش شیمیایی استاندارد و روش HPLC به عنوان روشی دقیق، اما پرهزینه، مورد مقایسه قرار گرفت تا شاید بتوان روش مناسبی برای ارزیابی لاکتوز در شیر کم‌چرب توصیه کرد.

• مواد و روش‌ها

محلول‌ها و مواد: آنزیم بتا-گالاکتوزیداز (3000LAU/ml) از شرکت نوونوردیسک (NovoNordisk, Denmark)، حلال استونیتریل و آب دیونیزه با درجه HPLC از شرکت کالدون (Caledon, Georgetown, Canada) تیوسولفات سدیم، کلرامین T، یدات پتاسیم، استات روی، اسید کلریدریک، پودر نشاسته، اتانول با خلوص ۹۹/۸ درصد، پودر اسید اگزالیک، لاکتوز منوهیدرات، D (+) گلوکز منوهیدرات و D(+) گالاکتوز از شرکت Merck تهیه شدند. برای صاف کردن محلول‌ها از صافی‌های سرسرنگی به قطر ۱۰mm و غشای نایلونی یا تفلونی با منافذی به قطر ۰/۴۵µ (Resprep, Germany) استفاده شد. در ضمن، نمونه‌های شیرِ پس‌چرخ پاستوریزه شده (چربی کمتر از ۰/۵ درصد، پروتئین ۴/۵ درصد و pH حدود ۶/۷) از شرکت لبنیات پاک تهران تهیه شد.

دستگاه‌ها: دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا متشکل از دو دستگاه پمپ مدل ۶۰۰ ، قسمت تزریق مدل ۷۷۲۵، آشکارساز ضریب شکست مدل ۲۴۱۴، ستون کربوهیدرات با ابعاد ۴/۶mm ×۲۵۰ و اندازه ذرات ۵µ و پیش‌ستون از نوع C_{18} با ابعاد ۴/۶mm ×۲۰ (Waters, Ireland) بود. در ضمن، برای تعیین نقطه انجماد از دستگاه کرایواستار با دقت ۰/۰۰۵ سانتی‌گراد (Cryostar Funke Gerber, Germany) استفاده شد.

تیمار آنزیمی نمونه‌های شیر: برای این منظور، ابتدا ۳ لیتر شیر کم‌چرب را پاستوریزه کرده، سپس با سرد کردن آن تا دمای ۳۸/۹°C به ازای هر لیتر شیر، مقدار ۱/۵ گرم آنزیم بتا گالاکتوزیداز به آن افزوده شد. پس از انتقال شیر به لوله‌های آزمایش، لوله‌ها به گرمخانهٔ ۳۷/۹°C منتقل شد. در فاصله‌های زمانی مشخص (۱۵، ۳۰، ۴۵ دقیقه و ۱، ۱/۵، ۲، ۳ و ۴ ساعت) سه عدد لوله حاوی شیرِ آنزیم‌زنی شده در دمای ۷۸°C به‌مدت ۱۰ دقیقه

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-15]

پاستوریزه شد. سپس نقطه انجماد هر یک از نمونه‌ها در سه تکرار توسط روش نقطه انجماد و مقدار لاکتوز آن‌ها توسط روش‌های کلرآمینT و کروماتوگرافی با کارایی بالا تعیین شد.

روش‌های اندازه‌گیری لاکتوز شیر:

روش نقطه انجماد: از نمونه‌ی شیرهای پس‌چرخ و کم‌لاکتوزِ پاستوریزه شده، هر کدام ۲ml داخل لوله مخصوص دستگاه کرایواستار ریخته شد. پس از قرار دادن لوله در داخل دستگاه، آن را روشن کرده تا دما به زیر صفر درجه برسد. سپس نقطه انجماد نمونه شیر توسط دستگاه، تعیین و از روی صفحه نمایشگر عدد مربوط به نقطه انجماد قرائت شد (۳).

روش کلرآمین T: مقادیر مشخصی از پودر لاکتوز، گلوکز و گالاکتوز را به دقّت وزن کرده و پس از انتقال به بالن ژوژه، مقداری آب افزوده هم زده شدند. در صورت حل نشدن، چند دقیقه در حمام اولتراسونیک قرار داده شدند تا حل شوند. پس از حل شدن کامل، با آب به حجم رسانده و به این ترتیب محلول‌های استاندارد لاکتوز، گلوکز و گالاکتوز با غلظت‌های ۴ و ۵ درصد تهیه شدند. سپس از محلول ۴ درصد (با رقیق‌سازی) محلول‌هایی با غلظت ۲، ۱، ۰/۵ و ۰/۲۵ درصد تهیه شدند. همچنین، محلول‌های ترکیبی ۴ درصد قند با نسبت‌های مختلف از ترکیب سه قند (لاکتوز، گلوکز و گالاکتوز) و دو قند (لاکتوز-گلوکز، لاکتوز-گالاکتوز و گلوکز-گالاکتوز) تهیه شدند. سپس مقدار قند این محلول‌ها و نمونه‌های شیر تیمار شده و تیمار نشده، مطابق روش استاندارد کلرآمین T اندازه‌گیری شد (۲).

روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا:

روش تهیه محلول‌های استاندارد لاکتوز، گلوکز و گالاکتوز: مقادیر مشخصی از پودر لاکتوز، گلوکز و گالاکتوز به دقت توزین و پس از انتقال به بالن ژوژه، مقداری محلول آب و استونیتریل (۵۰ :۵۰) به آن‌ها افزوده و هم زده شد. در صورت حل نشدن، چند دقیقه در حمام اولتراسونیک قرار داده شدند تا حل شوند. پس از حل شدن کامل، با محلول آب و استونیتریل به حجم رسانده و به این ترتیب، محلول استاندارد مادر لاکتوز، گلوکز و گالاکتوز با غلظت‌های ۴ و ۵ درصد تهیه شدند. سپس با رقیق‌سازی، محلول‌هایی با غلظت ۲، ۱، ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱۲۵، ۰/۰۶۲۵ و ۰/۰۳۱۲۵ درصد تهیه شدند. در ضمن، محلول‌های استاندارد لاکتوز، گلوکز و گالاکتوز، هم به‌صورت مخلوط سه قند و هم به‌صورت تنها (جداگانه) تهیه شدند. در نهایت، برای تهیه منحنی استاندارد لاکتوز، گلوکز و گالاکتوز محلول‌ها با غلظت‌های مختلف هر کدام در ۳ تکرار به دستگاه کروماتوگرافی مایع تزریق شدند.

روش استخراج لاکتوز شیر: مقدار ۱۲/۵ml از نمونه‌های شیر، توسط پیپت، داخل بالن ژوژه‌های ۲۵ میلی‌لیتری منتقل شدند. سپس مقدار ۰/۶۲۵ml محلول آبی اسید اگزالیک (۵ درصد وزنی/حجمی) و ۶/۲۵ml اتانول برای رسوب دادن پروتئین‌های شیر به آن‌ها افزوده شده و پس از تکان دادن به‌مدت ۵ دقیقه با آب به حجم رسانده شدند. پس از ۱۰ دقیقه، مایع بالاییِ شفاف شده را توسط سرنگ داخل لوله‌های آزمایش ریختیم و پس از سانتریفوژ کردن به‌مدت ۱۵ دقیقه، نمونه‌های شفاف شده به وسیله صافی‌های سرسرنگی صاف شدند (۸). در نهایت، نمونه‌ها توسط سرنگ ۵۰ میکرولیتری به قسمت تزریق دستگاه کروماتوگرافی مایع تزریق شدند.

تاثیر عملیات استخراج و صاف کردن روی میزان لاکتوز محلول‌های استاندارد:

الف) روش اول: ابتدا مقادیر مشخصی از لاکتوز، توزین شد و سپس هر یک از آن‌ها به داخل بالن ژوژه‌های ۲۵ میلی‌لیتری جداگانه انتقال داده شد و پس از اضافه کردن ۱۲/۵ml محلول آب و استونیتریل (۵۰:۵۰) آن‌ها را به‌خوبی هم زده شدند تا کاملاً حل شوند. سپس مقدار

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-15]

۰/۶۲۵ml محلول آبی اسید اگزالیک (۵ درصد وزنی/حجمی) و ۶/۲۵ml اتانول به هر یک از آن‌ها اضافه شد. پس از ۵ دقیقه تکان دادن با آب به حجم رسانده شد. پس از ۱۰ دقیقه، چند میلی‌لیتر از هر محلول توسط سرنگ برداشته و پس از صاف کردن با صافی سرسرنگی به دستگاه تزریق شدند.

ب) روش دوم: در این روش نیز مقادیر مشخصی از لاکتوز، توزین و هر یک از آن‌ها به داخل بالن ژوژه‌های ۲۵ میلی‌لیتری انتقال داده شد. سپس ۱۲/۵ml محلول آب و استونیتریل (۵۰ : ۵۰) به آن‌ها اضافه کرده و خوب هم زده شدند تا کاملاً حل شوند. در صورت عدم حل شدن، بالن ژوژه‌ها چند دقیقه در حمام اولتراسونیک قرار داده شدند و با محلول آب و استونیتریل به حجم رسانده شدند. سپس توسط سرنگ، مقداری از هر محلول برداشته و به‌وسیله صافی سرسرنگی صاف شد. در نهایت، محلول‌ها هر کدام در ۳ تکرار به دستگاه کروماتوگرافی مایع تزریق شدند.

شرایط کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا: به‌منظور جداسازی و شناسایی قندها از فاز متحرک (استونیتریل : آب) با نسبت‌های ۸۰ :۲۰، ۷۵ : ۲۵، ۷۰:۳۰ و ۶۵ : ۳۵ و سرعت‌های ۰/۸ و ۱ میلی‌لیتر در دقیقه استفاده شد. در ضمن، حجم تزریق نمونه‌ها ۱۵ میکرولیتر، دمای آشکارساز ۴۰°C و دمای ستون در حد دمای آزمایشگاه بود (۹، ۸، ۴).

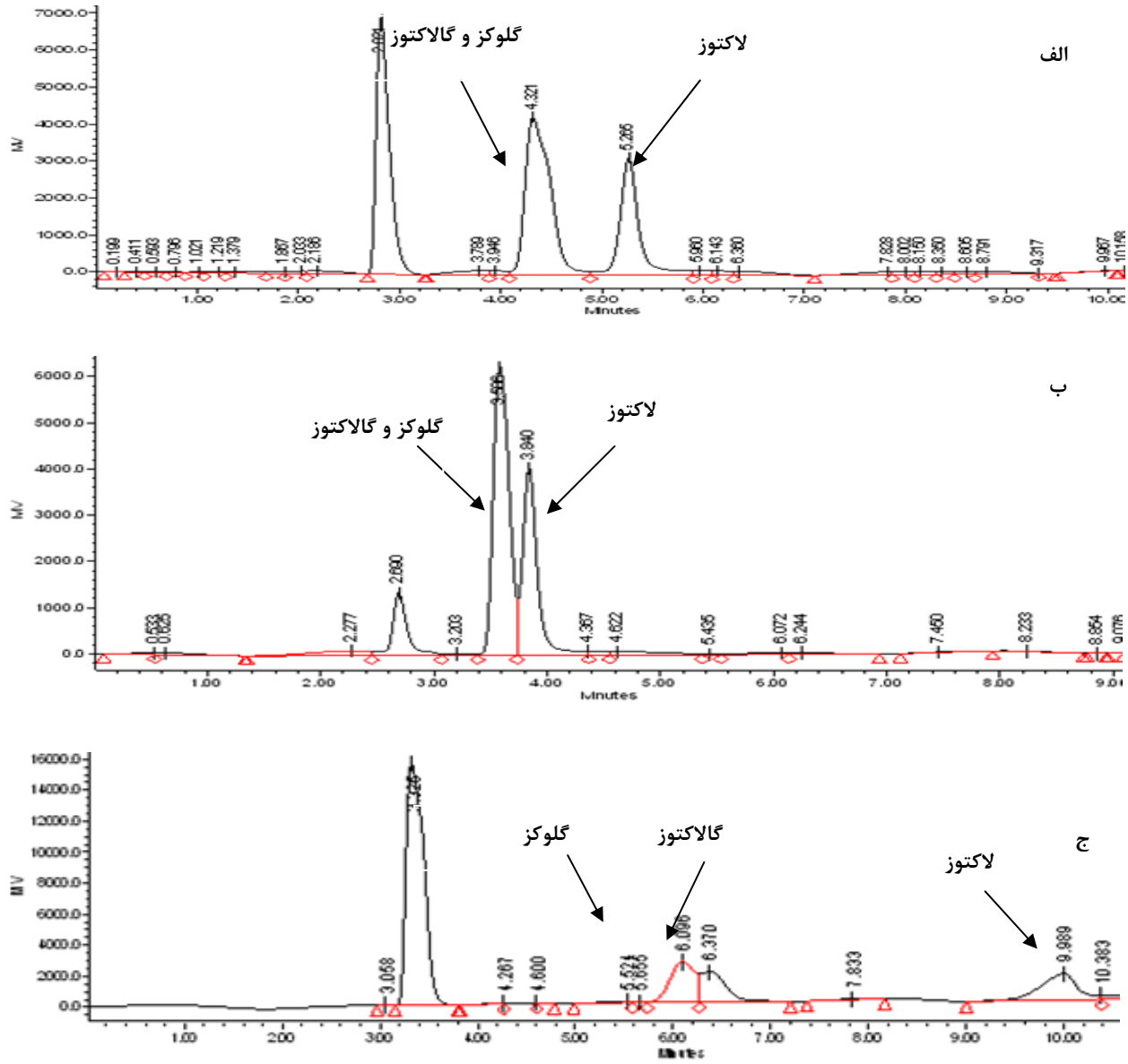
محاسبه‌های آماری: پس از تعیین نقطه انجماد نمونه‌های شیر در سه تکرار، عیارسنجی نمونه‌های شیر و محلول‌های آبی لاکتوز، گلوکز وگالاکتوز به روش کلرآمین T و تزریق محلول‌های لاکتوز، گلوکز و گالاکتوز و نمونه‌های شیر به دستگاه کروماتوگرافی، اطلاعات حاصل، مورد تجزیه و تحلیل آماری قرار گرفت. میانگین، انحراف معیار و درصد انحراف معیار نسبی برای داده‌ها تعیین و نمودار هر یک از آن‌ها توسط نرم افزار Excel رسم شد.

• یافته‌ها

ارزیابی کارایی روش کروماتوگرافی مایع: قبل از تزریق محلول‌های استاندارد و نمونه‌ها به دستگاه کروماتوگرافی، ابتدا نسبت‌های مختلف فاز متحرک و سرعتِ جریان آن مورد بررسی قرار گرفت. تغییر شرایط کروماتوگرافی، تاثیر زیادی روی جداسازی قندها داشت (شکل ۱). مثلاً نسبت استونیتریل:آب (۸۰:۲۰) و سرعت جریان ۱ml برای محلول‌های استاندارد تا حدودی مناسب بود. اما این نسبت برای جداسازی قندها در شیرِ پس‌چرخِ تیمار شده با آنزیم بتا-گالاکتوزیداز، چندان مناسب تشخیص داده نشد. زیرا جداسازی پیک‌های دو قندِ گلوکز و گالاکتوز از یکدیگر امکان‌پذیر نبود و زمان‌های خروج این دو قند، نزدیک به هم بود. در نتیجه، پیک‌های آن‌ها با یکدیگر، هم‌پوشانی و تداخل داشتند در ضمن، مدت زمان خروج قندها از ستون، نسبتاً طولانی بود. در سایر موارد نیز نتایج مشابهی مشاهده شد.

نخستین مرحله در ارزیابی کمّی قندها به روش HPLC تهیه منحنی استاندارد است. با توجه به داده‌های اولین ستون سمت راست جدول۱ ، منحنی استاندارد محلول لاکتوز تهیه شد. معادله این منحنی به‌صورت y= ۰/۰۲۴۴ x - ۰/۰۹۹۵ و ضریب تعیین (r^2) بین غلظت لاکتوز با سطح زیر پیک معادل ۰/۹۹۸۵ محاسبه شد که مقدار بسیار مناسبی بود و در محدوده غلظتی ۰/۵ تا ۵ درصد لاکتوز، با افزایش غلظت لاکتوز میزان سطح زیر پیک نیز با تناسب بسیار مناسبی افزایش یافت. برای محاسبه میزان لاکتوز در شیر می‌توان از معادله رگرسیون چنین نموداری استفاده کرد.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-15]



شکل ۱- کروماتوگرام‌های محلول‌های استاندارد لاکتوز، گلوکز و گالاکتوز تهیه شده در سرعت جریان ml/min ۱ و نسبت‌های مختلفی از استونیتریل:آب الف) ۳۰:۷۰ ب) ۳۵:۶۵ ج) ۲۰:۸۰

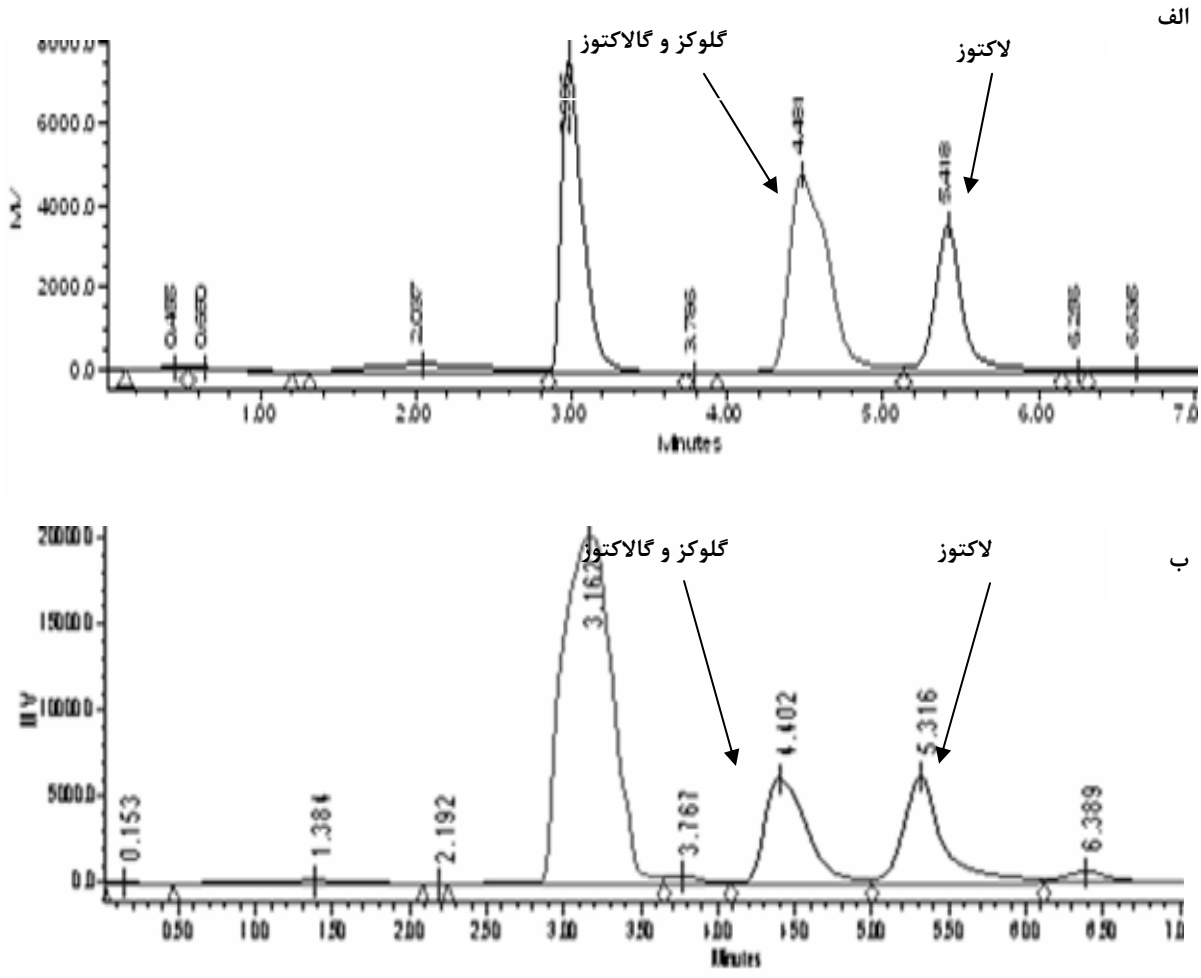
جدول ۱-تاثیر تیمارهای مختلف روی میزان بازیابی محلول استاندارد لاکتوز اندازه‌گیری شده به روش HPLC

لاکتوز (درصد)	سطح زیر پیک بر حسب میلیون (µv×sec)			میانگین سطح زیر پیک (میلیون)	انحراف معیار (میلیون)	درصد انحراف معیار نسبی (%RSD)
	محلول استاندارد لاکتوز تیمار نشده	محلول استاندارد لاکتوز استخراج و صاف شده	محلول استاندارد لاکتوز صاف شده			
۰/۱۲۵	۸/۵±۴/۵	۱۱±۴/۶	۷±۵/۳	۸/۸	۴/۸	۵۴/۵
۰/۲۵	۱۱±۵/۶	۱۳±۵/۵	۹±۳/۴	۱۱	۴/۸۳	۴۳
۰/۵	۲۴ ± ۲	۲۳/۵ ± ۳	۲۲/۵ ± ۲/۵	۲۳/۳۶	۲/۵	۱۰/۷
۱	۴۶/۹ ± ۱/۵	۴۲/۲۵ ± ۲/۸۶	۴۳/۵ ±۲/۵	۴۳/۹۶	۲/۲۸	۵/۲
۲	۹۲/۱ ± ۴	۸۴/۷۵ ± ۵/۵	۸۵/۹ ± ۴/۱	۸۷/۵۸	۴/۵	۵/۱
۴	۱۶۹/۷ ± ۳/۲	۱۶۹/۳ ± ۴/۹۶	۱۶۶/۲۷ ± ۵/۷	۱۶۸/۴۳	۴/۶	۲/۷
۵	۲۰۶ ± ۳	۲۰۰/۷ ± ۳/۸	۱۹۹/۷۵ ± ۴/۲	۲۰۲/۱۵	۳/۶	۱/۷۸

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-15]

برای بررسی تاثیر مدت زمان تیمار با آنزیم بتا-گالاکتوزیداز روی میزان لاکتوز شیر، نمونه‌های شیرِ پاستوریزه پس چرخ، مطابق روش گفته شده در قبل از تیمار استفاده شد. سپس لاکتوز آن‌ها استخراج و مقدار آن به‌کمک HPLC تعیین شد. سپس سطح زیر پیک هر یک از نمونه‌ها، از روی کروماتوگرام مربوطه، رسم شد. نتایج در جدول ۲ آورده شده است. در ضمن، در شکل ۲ نمونه‌هایی از کروماتوگرام محلول استاندارد لاکتوز، گلوکز و گالاکتوز و شیر تیمار شده با آنزیم ارائه شده است.

با توجه به داده‌های جدول۲ در فاصله‌های زمانی مشخص (۱۵، ۳۰، ۴۵ دقیقه، ۱، ۱/۵ و ۲ ساعت) سرعت عمل آنزیم بتا-گالاکتوزیداز روی آبکافت لاکتوز، بسیار سریع بود. سرعت عمل و فعالیت آنزیم بعد از ۲ ساعت به‌طور چشمگیری کاهش یافت و بیشترین تاثیر آنزیم در ۲ ساعت اولیه بود. در ضمن، با استفاده از معادله منحنی استاندارد لاکتوز، شیر پاستوریزهٔ بدون آنزیم (تیمار نشده) حاوی ۴/۹ درصد لاکتوز بود که پس از تیمار با آنزیم بتا-گالاکتوزیداز و سپری شدن ۲ ساعت، مقدار لاکتوز آن به کمتر از ۰/۵ درصد و میزان آبکافت لاکتوز در حدود ۸۸ درصد بود. بعد از این مدت، روند آبکافت لاکتوز بسیار کند شد.



شکل ۲- نمایش کروماتوگرام‌های الف) استاندارد لاکتوز، گلوکز و گالاکتوز ب) شیر پس‌چرخ تیمارشده توسط آنزیم بتا- گالاکتوزیداز، به مدت۳۰ دقیقه

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-15]

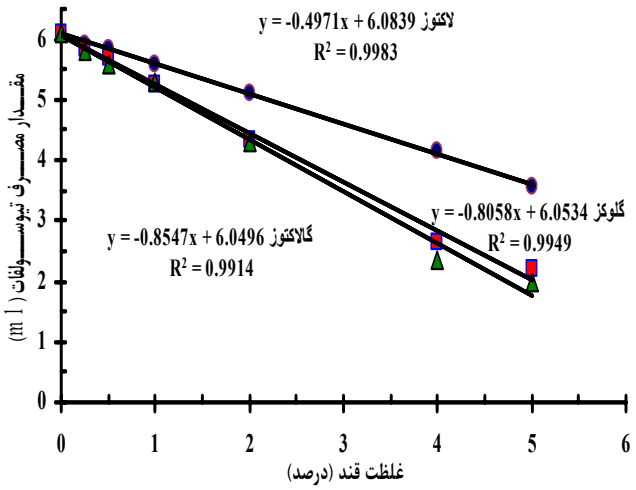
جدول ۲- تاثیر طول مدت تیمار آنزیمی روی میزان لاکتوز نمونه‌های شیر پس‌چرخ اندازه‌گیری شده با روش HPLC

مدت زمان تیمار با آنزیم (دقیقه)	سطح زیر پیک برحسب میلیون (µv× sec) لاکتوز	%RSD	گلوکز و گالاکتوز	لاکتوز (درصد)	آبکافت لاکتوز (درصد)
پاستوریزه ۰	۲۰۵±۱۳/۳	۶/۶۵	-	۴/۹	۰
۱۵	۱۵۴±۹/۷	۶/۲	۷۶±۷/۳	۳/۶۵	۲۵/۵
۳۰	۱۰۳±۱۲/۷	۱۲/۳	۱۱۵±۹/۷	۲/۴۲	۵۰/۶
۴۵	۷۳±۱۱/۳	۱۵/۴	۱۰۷±۱۰/۷	۱/۶۸	۶۵
۶۰	۶۴/۲±۱۰/۱	۱۵/۵	۱۳۵±۱۰	۱/۴۶	۷۰/۶
۷۵	۵۰/۴±۷/۳	۱۴/۶	۱۴۹±۹/۳	۱/۱۲	۷۷/۵
۹۰	۳۲±۸/۵	۱۸/۱	۱۷۹±۱۱/۵	۰/۶۹	۸۵/۹
۱۲۰	۲۸±۷/۵	۲۶/۷	۱۸۲±۱۰/۵	۰/۵۸	۸۸
۱۸۰	۱۶/۵±۶/۱	۳۶	۱۹۰±۹/۱	۰/۳۱	۹۳/۶
۲۱۰	۱۴±۵/۵	۳۹	۱۹۵±۱۰/۵	۰/۲۴	۹۵
۲۴۰	۱۳/۳±۵/۴	۴۰	۱۹۸±۹/۴	۰/۲۲	۹۵/۵
۲۷۰	۱۲±۵/۵	۴۵	۱۹۹±۱۰/۵	۰/۱۹	۹۶

ارزیابی کارایی روش نقطه‌ی انجماد: با استفاده از نقطه انجماد، مقدار لاکتوز موجود در شیر و میزان درصد آبکافت لاکتوز در نمونه‌های تیمار شده با آنزیم تعیین شد. با توجه به داده‌های جدول ۳ بین درجه نقطه انجماد و میزان لاکتوز، رابطه مستقیمی مشاهده شد. به طوری که کاهش نقطه انجماد در مراحل اولیه، سریع بود و منحنی، شیب تندی داشت؛ ولی پس از ۲ ساعت، روند نزولیِ نقطهٔ انجماد کم شد. به عبارت دیگر، فعالیت آنزیم در مراحل اولیه، بسیار سریع و قابل ملاحظه بود، ولی پس از ۲ ساعت کاهش یافت. در ضمن، نقطه انجماد نمونه‌های شیر تیمار شده، کاهشی معادل ۰/۲۷۴ ^{o}C- در مدت ۴ ساعت نشان داد.

ارزیابی کارآیی روش کلرآمین T : برای بررسی صحت و ارزیابی عملکرد روش کلرآمین T برای اندازه‌گیری میزان لاکتوز شیر تیمار شده با آنزیم، ابتدا محلول‌های آبی لاکتوز، گلوکز و گالاکتوز با غلظت‌های مختلف تهیه شد و سپس میزان تیوسولفات سدیم مصرفی برای غلظت‌های مختلف قندها تعیین شد. با توجه به مقدار تیوسولفات سدیم مصرفی، منحنی هر یک از قندها رسم شد. آن گاه با استفاده از معادله هر منحنی، میزان تیوسولفات مصرفی برای هر غلظتی از قند و برعکس به دست آمد.

با توجه به شکل ۳ بین غلظت سه قند لاکتوز، گلوکز و گالاکتوز با میزان تیوسولفات سدیم مصرفی، ضریب تعیین خوبی وجود داشت. نکتهٔ جالب اینکه میزان مصرف تیوسولفات سدیم در غلظت‌های مشابه توسط تک‌قندی‌ها (گلوکز و گالاکتوز) تقریباً معادل نصف تیوسولفات سدیم مصرفی توسط دوقندی‌ها (لاکتوز) بوده در ضمن، در غلظت‌های بالا میزان مصرف تیوسولفات توسط گالاکتوز، اندکی کمتر از گلوکز بود.



شکل ۳- نمایش ارتباط مصرف تیوسولفات سدیم با غلظت قندهای لاکتوز (●)، گلوکز (■) و گالاکتوز (▲)

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-15]

جدول ۳- تاثیر طول مدت تیمار آنزیمی روی نقطه انجماد و میزان لاکتوز نمونه‌های شیر پس چرخ

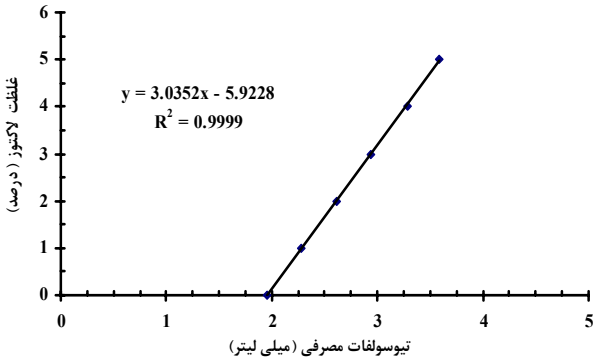
مدت تیمار با آنزیم (دقیقه)	نقطه انجماد (°C)	لاکتوز (٪)	آبکافت لاکتوز (٪)
۰ (شاهد)	-۰/۵۴۳۶±۰/۰۰۳۵	۴/۹۹	۰
۱۵	-۰/۶۲۱۲±۰/۰۰۲۳	۳/۵۸	۲۷/۳
۳۰	-۰/۶۹۳۵±۰/۰۰۳۴	۲/۳۵	۵۲
۴۵	-۰/۷۲۳۴±۰/۰۰۲۸	۱/۸۲	۶۳
۶۰	-۰/۷۴۶۶±۰/۰۰۳۲	۱/۴۱	۷۱/۲
۷۵	-۰/۷۶۱۰±۰/۰۰۲۹	۱/۱۶	۷۶/۷
۹۰	-۰/۷۸۲۷±۰/۰۰۲۰	۰/۷۸	۸۴/۵
۱۲۰	-۰/۷۹۴۳±۰/۰۰۳۰	۰/۵۷	۸۸/۵
۱۸۰	-۰/۸۰۵۰±۰/۰۰۲۳	۰/۳۸	۹۲
۲۱۰	-۰/۸۰۷۸±۰/۰۰۳۷	۰/۳۳	۹۳/۳
۲۴۰	-۰/۸۱۵۸±۰/۰۰۲۳	۰/۲۹	۹۴
۲۷۰	-۰/۸۱۷۱±۰/۰۰۲۳	۰/۲۴	۹۵

پس از بررسی محلول‌های آبی تکی حاوی لاکتوز، گلوکز و گالاکتوز، محلول‌های حاوی ۴ درصد از ترکیب دو نوع قند لاکتوز-گلوکز، لاکتوز-گالاکتوز و گلوکز-گالاکتوز بررسی شد. همان‌گونه که در جدول ۴ مشاهده می‌شود، در محلول‌هایی که حاوی لاکتوز زیاد بودند، عدد عیارسنجی (مقدار تیوسولفات سدیم مصرفی) با عدد حاصل از معادله منحنی شکل ۳ اختلاف کمتری داشت و با کاهش میزان لاکتوز محلول، این اختلاف نیز بیشتر شد. همچنین، در محلول‌های حاوی گلوگز و گالاکتوز، میزان اختلاف عدد حاصل از عیارسنجی، نسبت به عدد محاسبه شده، اندکی بیشتر بود. این مسئله احتمالاً بیانگر آن است که روش کلرآمین T برای محلول‌های لاکتوز، مناسب‌تر از سایر قندهاست.

در ضمن، در محلول‌های حاوی دو قند گلوگز+گالاکتوز، با افزایش یا کاهش هر یک از قندها، عدد عیارسنجی نسبت به محلول‌های حاوی لاکتوز، به میزان کمی (حدود ۰/۳ml) تغییر کرد. به بیان دیگر، میزان تیوسولفات سدیم مصرفی توسط تک‌قندی‌ها کمتر از دوقندی‌ها (احیاکننده) بود و این مسئله در محلول‌های آبیِ حاوی یک قند، نسبت به محلول‌های آبیِ حاوی دو قند، واضح‌تر بود. در جدول ۴ مشاهده می‌شود که مقدار تیوسولفات سدیم مصرفی توسط محلول‌های آبی حاوی دو قند لاکتوز-گلوکز در غلظت مشابه (لاکتوز) با محلول‌های آبی دو قند لاکتوز-گالاکتوز، کمی بیشتر بود.

این مسئله نیز بیانگر اختلاف اندک گلوکز و گالاکتوز در فرایند واکنش کلرآمین T است.

پس از بررسی محلول‌های آبی دوتایی، محلول‌های سه‌تایی بررسی شدند نتایج محلول‌های ۵ درصد سه قند (لاکتوز+گلوکز+گالاکتوز) در جدول ۵ نشان داده شده است. در این محلول‌ها نیز در اثر افزایش غلظت لاکتوز، عدد حاصل از عیارسنجی با عددِ محاسبه شده از طریق معادله‌های شکل ۳ بیشتر هم‌خوانی داشت، ولی با کاهش لاکتوز و افزایش میزان گلوکز و گالاکتوز، میزان هم‌خوانی این دو عدد (عیارسنجی و محاسبه شده) کم شد.



شکل ۴- ارتباط میزان مصرف تیوسولفات سدیم برحسب لاکتوز در محلول حاوی ۵ درصد از سه نوع قند مختلف

همچنین، برای به دست آوردن غلظت لاکتوز در شیر بدون تیمار و نمونه‌های شیر پس‌چرخ تیمار شده با آنزیم بتا-گالاکتوزیداز با استفاده از معادله‌های شکل۳ ، مقدار عدد عیارسنجی برای نسبت‌های مختلف سه قند در

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-15]

غلظت ۵ درصد محاسبه و سپس نمودار مربوط به مقدار کاهش لاکتوز، طی آبکافت آنزیمی در مقابل میزان مصرف تیوسولفات سدیم رسم شد. همان‌طور که در شکل۴ مشاهده می‌شود، در این نمودار، محور عمودی براساس میزان تغییرات لاکتوز بر مبنای ۵ درصد در نظر گرفته شد. به‌طوری‌که با کاهش مقدار لاکتوز، میزان دو قند گلوکز و گالاکتوز به همان اندازه افزایش داشت. سرانجام، با استفاده از معادله شکل ۴ میزان لاکتوز شیرهای تیمار شده با آنزیم تعیین شد.

در این مرحله، ابتدا با استفاده از معادله لاکتوز در شکل ۳ میزان لاکتوز موجود در شیر پس‌چرخ (بدون تیمار) تعیین شد سپس با استفاده از معادله شکل ۴ میزان لاکتوز موجود در شیرهای تیمار شده مشخص شد. نتایج حاصل از اندازه‌گیری لاکتوز شیر پاستوریزه (بدون تیمار) و شیرهای تیمار شده با آنزیم بتا-گالاکتوزیداز در جدول ۶ نشان داده شده است. در ضمن، عدد عیارسنجی آب مقطر توسط تیوسولفات سدیم در حدود ۶/۱ml بود.

جدول ۴- ارتباط میزان مصرف تیوسولفات سدیم با غلظت قندها در محلول‌های حاوی دو نوع قند مختلف

محلول قند (۴ درصد) (L/Glu+Ga/Glu)		۴+۰	۳/۵+۰/۵	۳+۱	۲+۲	۱+۳	۰/۵+۳/۵	۰+۴
لاکتوز+گالاکتوز	عیار سنجی	۴/۱۵	۳/۹	۳/۷	۳/۳۵	۲/۷	۲/۵۵	۲/۳۵
	محاسبه‌ای	۴/۰۹	۳/۹۳	۳/۷۵	۳/۳۹	۳/۰۴	۲/۸۶	۲/۶۳
لاکتوز+گلوکز	عیار سنجی	۴/۱۵	۳/۹۵	۳/۸۵	۳/۴	۲/۹	۲/۷	۲/۶۵
	محاسبه‌ای	۴/۰۹	۳/۹۵	۳/۸	۳/۵	۳/۱۸	۳/۰۳	۲/۸۳
گلوکز+گالاکتوز	عیار سنجی	۲/۶۵	۲/۶	۲/۵	۲/۴۵	۲/۴	۲/۳۵	۲/۳۵
	محاسبه‌ای	۲/۸۷	۲/۸۵	۲/۸۱	۲/۷۷	۲/۷۳	۲/۷	۲/۶۲

جدول ۵- ارتباط میزان مصرف تیوسولفات سدیم با غلظت قندها در محلول‌های حاوی سه نوع قند مختلف

محلول قند (۵ درصد)		۰+۲/۵+۲/۵ L+Glu+Ga	۱+۲+۲ L+Glu+Ga	۲+۱/۵+۱/۵ L+Glu+Ga	۳+۱+۱ L+Glu+Ga	۴+۰/۵+۰/۵ L+Glu+Ga	۵+۰+۰ L+Glu+Ga
لاکتوز+گلوکز+گالاکتوز	عیار سنجی	۱/۷۸	۲/۱	۲/۴	۲/۸	۳/۱۵	۳/۵۵
	محاسبه‌ای	۱/۹۵	۲/۲۸	۲/۶۱	۲/۹۴	۳/۲۸	۳/۵۹

جدول ۶- تاثیر طول مدت تیمار آنزیمی روی مقدار تیوسولفات سدیم مصرفی و میزان آبکافت لاکتوز شیرهای تیمار شده با آنزیم بتا-گالاکتوزیداز

مدت زمان تیمار با آنزیم (دقیقه)	تیوسولفات سدیم مصرفی (میلی‌لیتر)	لاکتوز (درصد)	آبکافت لاکتوز (درصد)
پاستوریزه ۰	۳/۵۵	۵/۰۹	۰
۱۵	۳/۲	۳/۸	۲۵/۳
۳۰	۲/۸۵	۲/۷	۴۶
۴۵	۲/۶۵	۲/۱۲	۵۸/۳
۶۰	۲/۵۵	۱/۸۲	۶۴/۲
۷۵	۲/۵	۱/۷	۶۶/۶
۹۰	۲/۴۵	۱/۵۱	۷۰/۵
۱۲۰	۲/۴	۱/۴	۷۲/۵
۱۸۰	۲/۳	۱/۰۵	۷۹/۴
۲۱۰	۲/۳	۱/۰۵	۷۹/۴
۲۴۰	۲/۲	۰/۷۵	۸۵/۲
۲۷۰	۲/۱۵	۰/۶	۸۶/۳

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-15]

• بحث

درباره با روش کروماتوگرافی و تاثیر تغییر نسبت و سرعت فاز متحرک (نسبت حلال‌ها به‌صورت ۳۵:۶۵ ، ۳۰:۷۰ ، ۲۵:۷۵ و ۲۰:۸۰ و سرعت فاز متحرک ۱ و ۰/۸ میلی‌لیتر در دقیقه) روی کیفیت جداسازی قندها باید یادآور شد که تغییر شرایط کروماتوگرافی روی جداسازی قندها تاثیرات متفاوتی داشت. در نهایت، با توجه به مناسب بودن کیفیت جداسازی پیک‌ها و زمان بازداری قندها، نسبت استونیتریل:آب (۳۰:۷۰) و سرعت جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه برای جداسازی قند محلول‌های استاندارد و نمونه‌ها به‌عنوان شرایط مناسب انتخاب شد و اندازه‌گیری لاکتوز نمونه‌ها در این شرایط انجام پذیرفت.

درباره با مقایسه تاثیر انجام عملیات استخراج و صاف کردن روی محلول‌های استاندارد لاکتوز (جدول ۱) می‌توان گفت که انجام این تیمارها تغییر چشمگیری در سطح زیر پیک غلظت‌های مشابه ایجاد نکرد، یعنی اِعمال تیمارهای مختلف روی غلظت اندازه‌گیری شدهٔ محلول‌های استاندارد لاکتوز، تاثیر چندانی نداشت. همان‌گونه که ملاحظه می‌شود، با کاهش غلظت لاکتوز از ۵ به ۰/۱۲۵ درصد، میزان درصد انحراف نسبی (%RSD) از ۱/۷۸ به ۵۴/۵ درصد افزایش یافت و این یافته‌ها نشانگر ناتوانی روش HPLC برای اندازه‌گیری و تعیین مقدار لاکتوز در غلظت‌های کمتر از ۰/۵ درصد است. لازم به گفتن است که کمترین مقدار قابل شناسایی لاکتوز (Detection Limit) با روش کروماتوگرافی در حدود ۰/۰۳۱ درصد تعیین شد.

سایر پژوهشگران هم نتایج مشابهی گزارش کرده‌اند. Chavez-Servin و همکاران (۹) گزارش کردند برای جداسازی قندهای شیر با روش HPLC مخلوط استونیتریل:آب به نسبت ۲۵:۷۵ مخلوط مناسبی بود، لاکتوز در دامنه غلظتی ۰/۲تا ۱/۵ درصد با سطح زیر پیک، ارتباط خطی خوبی داشت و ضریب تعیین آن در حدود ۰/۹۹۸ بود. همچنین، به دلیل درصد انحراف معیار نسبی مناسب، روش از تکرار پذیری مناسبی برخودار بود و کمترین مقدار غلظت لاکتوزِ قابل شناسایی حدود ۰/۰۲۵ درصد و میزان بازیابی لاکتوز در حدود ۹۳ تا ۹۸ درصد گزارش شد.

با توجه به نتایج ارائه شده در جدول ۲ نیز می‌توان چنین استنباط کرد که آبکافت لاکتوز در مدت ۲ ساعت به بیشترین مقدار خود می‌رسد، با افزایش مدت زمان، روند آبکافت لاکتوز به شدت کاهش می‌یابد و درصد انحراف معیار نسبی سطح زیر پیک‌ها، در غلظت‌های پایین لاکتوز بیش از ۳۰٪ و سطوح زیر پیک برای نمونه‌های بالای ۲ ساعت از دقت بالایی برخوردار نبوده و تکرارپذیری آن‌ها چندان مطلوب نیست. بنابراین، شاید بتوان گفت که روش کروماتوگرافی مایع برای غلظت‌های پایین‌تر از ۰/۵ درصد لاکتوز، چندان قابل اعتماد نیست، ولی برای غلظت‌های بالا مطمئن و قابل اعتماد است.

در روش اندازه‌گیری نقطه انجماد نیز غلظت لاکتوز با نقطه انجماد، رابطه مستقیمی داشت و با کاهش غلظت لاکتوز، نقطه انجماد هم کاهش پیدا کرد. در ضمن، معادله منحنی به صورت $y = ۰/۰۵۷۲x - ۰/۸۲۷۸$ و میزان ضریب تعیین (r^2) بین غلظت لاکتوز و نقطه انجماد معادل ۰/۹۹ محاسبه شد که با استفاده از این معادله می‌توان در شیرهای تیمار شده، به ازای هر درصد از غلظت لاکتوز، نقطه انجماد و به ازای نقطه انجماد، غلظت لاکتوز را به دست آورد. همچنین، زمانی‌که نقطه انجماد حدود $-۰/۷۹°C$ بود، میزان لاکتوز در شیر تیمار شده به کمتر از ۰/۵ درصد رسید و در غلظت‌های پایین‌تر از ۰/۵ درصد، ارتباط خطی خوبی وجود نداشت. به بیان دیگر، ارزیابی غلظت‌های پایین لاکتوز (کمتر از ۰/۵درصد) با روش نقطه انجماد نیز چندان دقیق نیست.

همچنین، نقطه انجماد با آبکافت لاکتوز، رابطه عکس داشت که با استفاده از نقطه انجماد و ارتباط آن با مقدار لاکتوز می‌توان میزان درصد آبکافت لاکتوز را به دست آورد. میزان ضریب تعیین (r^2) بین آبکافت لاکتوز و نقطه انجماد نیز معادل ۰/۹۹ بود که با استفاده از معادله این منحنی می‌توان به‌ازای هر درصد از آبکافت لاکتوز، سرعت کاهش نقطه انجماد شیر تیمار شده را به دست آورد. براساس همین معادله، به‌ازای ۱ درصد آبکافت لاکتوز، نقطه انجماد شیر $۰/۰۰۲۸°C$ کاهش یافت. به عبارت دیگر، به ازای آبکافت ۱ درصد از لاکتوز شیر پس‌چرخ، نقطه انجماد

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-15]

آن ۰/۰۵۶°C افت داشت. همچنین، در آبکافت کمتر از ۸۸ درصد، ارتباط خطی بسیار خوبی، بین نقطه انجماد و آبکافت لاکتوز وجود داشت. ولی با افزایش میزان آبکافت، این ارتباط کم شد.

Nijplels و همکاران گزارش کردند که نقطه انجماد محلول آبی لاکتوز را می‌توان به کمک رابطه $\Delta T = -\frac{XK}{M}$ به دست آورد. ΔT: کاهش نقطه انجماد، X غلظت ماده حل شونده، K ضریب ثابت کرایواستار معادل ۱/۸۶ و M وزن مولکولی ماده حل شونده است. آن‌ها گزارش کردند که با توجه به این رابطه، در اثر آبکافت کاملِ محلول ۵ درصد لاکتوز، نقطه انجماد آن ۰/۲۷۳°C- کاهش یافت (۱۰). Baer و همکاران (۵) نیز از روش اندازه‌گیری نقطه انجماد برای تعیین آبکافت لاکتوز آب پنیر به عنوان روشی سریع استفاده کردند. آن‌ها گزارش کردند که به ازای آبکافت ۱ درصد از لاکتوز آب پنیر و محلول ۵ درصد لاکتوز، نقطه انجماد آن‌ها به‌ترتیب ۰/۰۴۳۷۴ و ۰/۰۴۲۵۸ درجه سانتی‌گراد کاهش یافت (۵). در پژوهشی هم که توسط Kreft و همکاران روی تاثیر آبکافت لاکتوز در کاهش نقطه انجماد انجام گرفت، گزارش شد که آبکافت ۱۰۰٪ لاکتوز باعث کاهش نقطه انجماد در حدود۲۸۱ میلی هرتووت یا ۲۵۰ میلی‌سانتی‌گراد شد (۱۱). در پژوهش‌های انجام شده توسط سایر پژوهشگران هم نتایج مشابهی گزارش شده است. به‌طوری‌که Vasiljevic و همکاران گزارش کردند، بیشترین تاثیر آنزیم بتا-گالاکتوزیداز با غلظت ۱ درصد در دمای ۶۵°C و زمان ۱/۵ تا ۲ ساعت بوده و با افزایش غلظت آنزیم، سرعت فعالیت آن بیشتر شده است. در ضمن، میزان تغییرات نقطه انجماد شیر، حاوی ۱ درصد آنزیم بتا-گالاکتوزیداز در دمای ۳۷°C در حدود ۲۷۰ میلی‌هرتووت در مدت ۸ ساعت بوده است. آن‌ها ضریب تعیین بین نقطه انجماد و درصد آبکافت لاکتوز را در حدود ۰/۹۹۶۶ گزارش کردند (۱۲).

در روش کلرآمین T لاکتوز به‌عنوان یک دو قندی احیا کننده، به وسیله کلرآمین T اکسیده می‌شود، سپس اضافی کلرآمین T با افزودن یدور پتاسیم، اکسید می‌شود و تولید یُد می‌کند. در پایان، مقدار یُد به روش عیارسنجی با محلول تیوسولفات سدیم اندازه‌گیری می‌شود. در نتیجه، اختلاف بین نمونه آزمایشی و نمونه شاهد (آب)، مقدار کلرآمین مصرف شده و در نتیجه مقدار لاکتوز موجود در شیر را نشان می‌دهد. البته لازم به گفتن است که امروزه از این روش به عنوان یک روش استاندارد برای اندازه‌گیری لاکتوز شیر تیمار نشده استفاده می‌شود. ولی برخی فعالان بخش صنعت از این روش برای تعیین میزان آبکافت نیز استفاده می‌کنند که میزان صحت نتایج آن‌ها جای تعمق دارد. به همین دلیل، در این پژوهش سعی شد کارایی این روش، مورد آزمایش قرار گیرد. با توجه به یافته‌های این بررسی مشاهده می‌شود که روش کلرآمین، روش مناسبی برای تعیین لاکتوز شیر بوده، ولی با افزایش آبکافت لاکتوز، به دلیل افزایش غلظت تک‌قندی‌ها و نظر به تفاوت واکنش‌پذیری آن‌ها با کلرآمین، میزان مصرف تیوسولفات سدیم، روند غیرمتعارف داشته و در نتیجه، برآورد میزان لاکتوز در چنین سامانه پیچیده‌ای با چنین روشی به‌سادگی ممکن نیست. این یافته‌ها بیانگر این واقعیت هستند که روش کلرآمین T بیشتر برای محلول‌های لاکتوز، مناسب است و چون طی آبکافت لاکتوز در نمونه‌های شیر، میزان گلوکز و گالاکتوز افزایش می‌یابد، این روش، فاقد دقت کافی است.

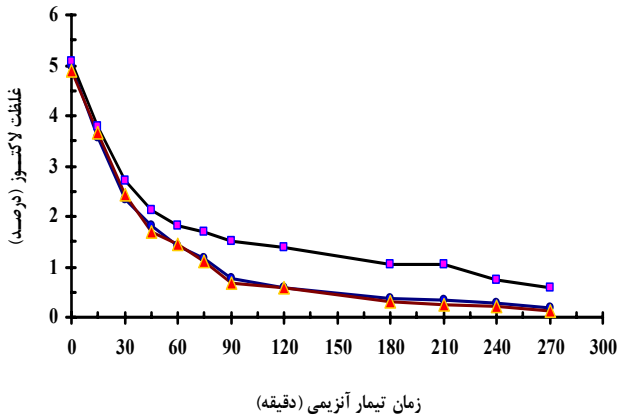
البته Macara و Hilton برای تشخیص میزان لاکتوز شیر و فراورده‌های لبنی، روش کلرآمین T را پیشنهاد و گزارش کردند که روش کلرآمین نسبت به روش یدومتری به علت طولانی بودن زمان واکنش، دقیق‌تر و کنترل آزمایش، آسان‌تر است(۱۳). بعدها Fine نیز روش یدومتری و کلرآمین T را از روش‌های مناسب برای تشخیص میزان لاکتوز شیر معرفی کرد و عنوان کرد که نتایج حاصل از دو روش، اختلاف بسیار اندکی با هم دارند، به طوری که میزان خطا برای غلظت‌های ۴ الی ۶ درصد لاکتوز در حد پایینی بود (۱۴). امروزه، روش کلرآمین به عنوان یک روش استاندارد برای اندازه‌گیری لاکتوز شیر توسط سازمان‌های استاندارد و فدراسیون بین‌المللی فراورده‌های شیر، مورد استفاده بوده، ولی نتایج یافته‌های پژوهش حاضر نشان می‌دهد که دقت این روش برای شیرهای تیمار شده با آنزیم، کمتر از شیرهای تیمار نشده است.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-15]

حال با توجه با بحث‌های مطرح شده در رابطه با کارایی هرکدام از سه روش مورد آزمون در این پژوهش به بررسی میزان همبستگی روش‌ها پرداخته می‌شود. همان‌گونه که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، ارتباط خوبی بین میزان لاکتوزِ اندازه‌گیری شده توسط روش کروماتوگرافی مایع در شیرهای تیمار شده توسط آنزیم بتا-گالاکتوزیداز با میزان لاکتوز محاسبه شده توسط روش نقطه انجماد وجود داشت. این دو روش از نظر سنجش میزان لاکتوز شیر، تفاوت چندانی نسبت به هم نداشتند. این موضوع، بیانگر ارتباط تنگاتنگ و قابل اعتماد بین این دو روش است.به بیان دیگر، از روش نقطه انجماد می‌توان به عنوان یک روش قابل اعتماد برای اندازه‌گیری میزان لاکتوز یا تعیین میزان آبکافت آن استفاده کرد. در ضمن، میزان لاکتوز اندازه‌گیری شده توسط روش نقطه انجماد، اندکی کمتر از روش کروماتوگرافی مایع بود که این موضوع ممکن است به دلیل تشکیل چندقندی‌ها طی فرایند آبکافت آنزیمی لاکتوز و تداخل آن‌ها باشد.

همچنین، لاکتوز اندازه‌گیری شده توسط کلرآمین T در شیرهای تیمار شده با آنزیم، نسبت به دو روش نقطه انجماد و روش کروماتوگرافی مایع کمتر بود که علت این موضوع نیز ممکن است مربوط به حساسیت ناکافی روش کلرآمین T به غلظت‌های پایین لاکتوز و حضور قندهای دیگر باشد. در مراحل ابتدایی آبکافت لاکتوز (۶۰ دقیقه اول) میزان لاکتوز اندازه‌گیری شده توسط سه روش، نزدیک به هم بودند، ولی پس از سپری شدن این مدت، میزان لاکتوز تعیین شده توسط روش کلرآمین با دو روش دیگر، اختلاف اندکی را نشان داد (شکل۵).

با توجه به یافته های این بررسی مشاهده شد که در روند تغییرات آبکافت لاکتوز نیز هر دو روش نقطه انجماد و کروماتوگرافی مایع شباهت فراوانی با هم داشتند، ولی درصد آبکافتِ لاکتوزِ اندازه‌گیری شده توسط روش کلرآمین T اندکی کمتر از دو روش قبلی بود و حداکثر میزان اختلاف آبکافت لاکتوز در یک زمان مشابه (۲۱۰ دقیقه) در حدود ۱۵ درصد بود؛ در حالی که این اختلاف برای دو روش نقطه انجماد و کروماتوگرافی حدود ۲ درصد بود.



شکل ۵- نمایش میزان لاکتوز اندازه‌گیری شده شیرهای تیمار شده با آنزیم بتا-گالاکتوزیداز با استفاده از سه روش نقطه انجماد ● روش کلرآمین T ■ و روش کروماتوگرافی مایع (▲)

Jeon و Saunders گزارش کردند که طی آبکافت آنزیمی لاکتوز در دمای ۳۷°C و مدت ۴ ساعت، درصد آبکافت لاکتوزِ اندازه‌گیری شده با روش نقطه انجماد، کمتر از روش کروماتوگرافی مایع بود. این اختلاف در حدود ۲/۹ تا ۶/۷ درصد (آبکافت لاکتوز) بود. آن‌ها علت این تفاوت را به تشکیل چندقندی‌ها طی فرایند آبکافت لاکتوز در شیر و میزان تشکیل چندقندی‌ها را به منبع و مقدار آنزیم، غلظت سوبسترا، دما و زمان عملکرد آنزیم نسبت دادند (۱۵).

برای مقایسه میزان کارایی سه روش اندازه‌گیری غلظت لاکتوز شیر، میزان ضریب تعیین روش‌ها به صورت نمودارهای دوتایی رسم شد. همان‌گونه که در شکل ۶ مشاهده می‌شود، میزان ضریب تعیین دو روش نقطه انجماد–کلرآمین T و کروماتوگرافی مایع–کلرآمین T حدود ۰/۹۸۹ و برای دو روش نقطه انجماد–کروماتوگرافی مایع در حدود ۰/۹۹۷ محاسبه شد که این میزان، ارتباط خوب این روش‌ها را نشان می‌دهد.

در ضمن، با توجه به شکل ۶ (نمودارهای الف و ب) مشاهده می‌شود که برای لاکتوز در غلظت‌های پایین‌تر از ۲ درصد، همبستگی کمی بین غلظت‌های لاکتوز در دو روش نقطه انجماد–کلرآمین T و دو روش کروماتوگرافی مایع–کلرآمین T وجود دارد، در حالی که در شکل ۶ (نمودار ج) در غلظت‌های بالاتر از ۰/۵ درصد لاکتوز، ارتباط نسبتاً خوبی بین دو روش نقطه انجماد–کروماتوگرافی مایع برقرار بود. یعنی هر دو روش، (نقطه انجماد و کروماتوگرافی

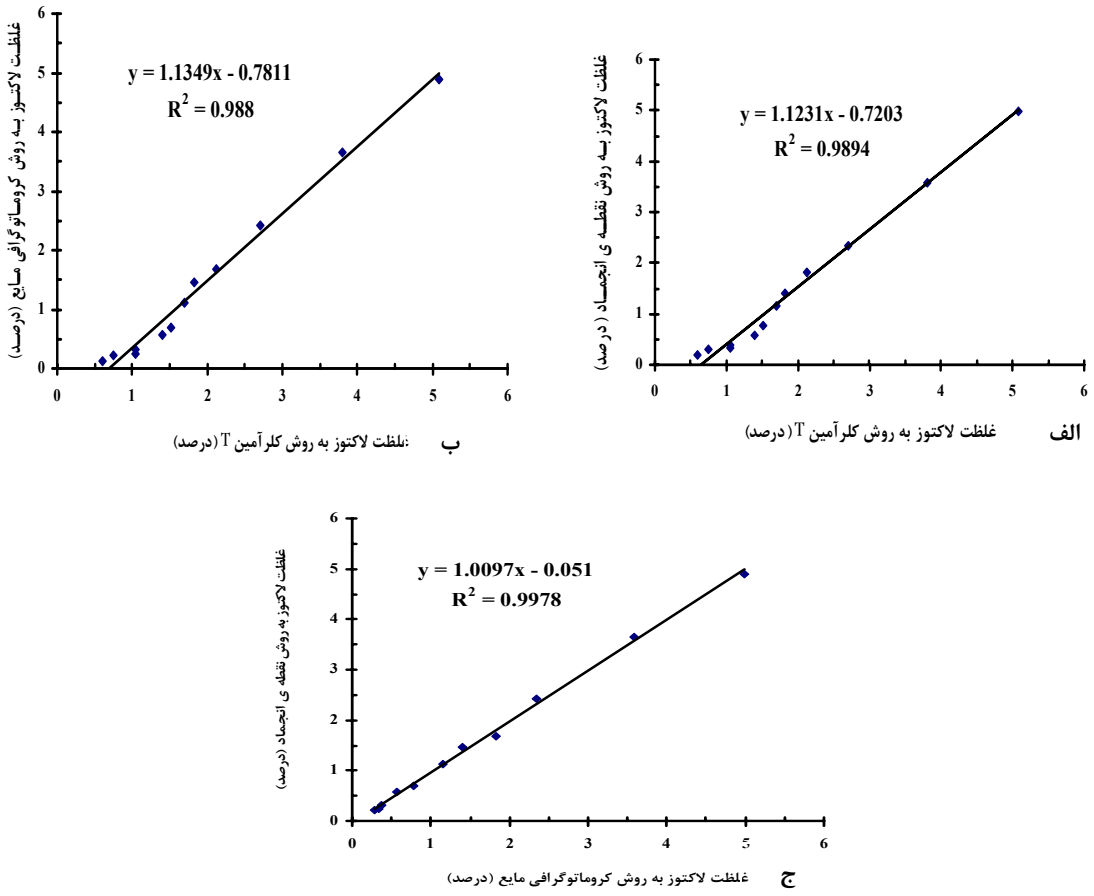
[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-15]

مایع) روش‌های مناسب و قابل اطمینانی برای اندازه‌گیری لاکتوز شیر در دامنه ۰/۵ الی ۵ درصد هستند، ولی روش کلرآمین فقط در غلظت‌های بالای لاکتوز (۲ تا ۵ درصد) روش مناسبی است.

Nijplels و همکاران از دو روش آنزیمی و روش اندازه‌گیری نقطه انجماد برای تعیین میزان لاکتوز شیر و شیرهای تیمار شده با آنزیم بتا-گالاکتوزیداز استفاده کردند و میزان ضریب تعیین دو روش را حدود ۰/۹۹۴ اعلام کردند (۱۰). Kwak و Jeon هم برای سنجش میزان لاکتوز شیرهای تیمار شده با آنزیم بتا-گالاکتوزیداز از روش‌های کروماتوگرافی مایع و آنزیمی استفاده کردند. آن‌ها گزارش کردند که هر دو روش، نتایج مشابهی برای میزان لاکتوز شیر نشان دادند و در روش کروماتوگرافی مایع، میزان لاکتوزِ اندازه‌گیری شده، اندکی بیشتر از روش آنزیمی بود.

همچنین، روش کروماتوگرافی مایع برای اندازه‌گیری لاکتوز شیر نسبت به روش آنزیمی، روش نسبتاً مناسبی بود و دقت عمل و صحت فراوانی داشت (۴).

با توجه به یافته‌های بررسی حاضر می‌توان نتیجه‌گیری کرد که به‌دلیل وجود ضریب تعیین بسیار خوب، بین یافته‌های حاصل از سه روش مورد بحث ، از روش اندازه‌گیری نقطه انجماد به‌عنوان یک روش ساده، سریع، کم‌هزینه، دقیق و قابل اعتماد برای اندازه‌گیری کمّی لاکتوز، تعیین مقدار آبکافت لاکتوز در شیر به ویژه هنگام تهیه شیر کم‌لاکتوز و مشخص کردن زمان توقف تیمار آنزیمی استفاده کرد. همچنین، روش کلرآمین T برای تعیین میزان لاکتوز شیرِ بدون تیمار، مناسب و برای شیرهای تیمار شده با آنزیم در غلظت‌های بالاتر لاکتوز، مناسب تشخیص داده شد.



شکل ۶- نمایش میزان همبستگی نتایج اندازه‌گیری لاکتوز توسط روش‌های مختلف

الف) روش نقطه انجماد در مقابل روش کلرآمین T ب) روش کروماتوگرافی مایع در مقابل روش کلرآمین T

ج) روش کروماتوگرافی مایع در مقابل روش نقطه انجماد

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-15]

• References

۱. عباسی، سلیمان. شیمی و فناوری شیر و فراورده‌های آن. درس‌نامه، دانشگاه تربیت مدرس،۱۳۸۶.

۲. سیروین اس جیمز، شیمی تجزیه مواد غذایی. ترجمه، خسروشاهی اصل اصغر. ارومیه: دانشگاه ارومیه. ۳۱۵ ص، ۱۳۷۶.

3. Zadow JG. Whey and Lactose Processing. London: Elsevier Applied Science. 1992.

4. Kwak HS, Jeon IJ. Comparison of high performance liquid chromatography and enzymatic method for the measurement of lactose in milk. *J. Food Sci*, 1988; 53: 975–976.

5. Baer RJ, Frank JF, Loewenstein M. Freezing point measurement of lactose hydrolysis in acid whey and lactose solutions. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, 1980; 63: 587–590.

6. Marshall R T, Goff HD, Hartel R W. Ice Cream. 6 td ed. Kluwer Academic and Plenum, New York, USA, 2003.

7. Chen S L Y, Frank J F, Loewenstein M. Estimation of lactose hydrolysis by freezing point measurement in milk and whey substrates treated with lactases from various microorganisms. *Journal of Association of Official Analytical Chemists*, 1981; 64: 1414–1419.

8. Ferreira IMPLVO, Gomes AMP, Ferreira MA Determination of sugars and some other compounds in infant formulae, Follow-up milks and human milk by HPLC-UV/RI. *Carbohydrate Polymers*, 1998; 37: 225–229.

9. Chavez-Servin JL, Castellote AI, Lopez-Sabater AC. Analysis of mono-and disaccharides in milk-based formulae by high-performance liquid chromatography with refractive index detection. *Journal of Chromatography*, 2004; 1043: 211–215..

10. Nijplels HH, Evers PH, Novak G, Ramet JP. Application of cryoscopy for the measurement of enzymatic hydrolysis of lactose. *J. Food Sci*, 1980; 45: 1684–1687.

11. Kreft M, Jelen P. Stability and activity of β-galactosidase in sonicated cultures of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* 11842 as affected by temperature and ionic environments. *J. Food Sci*, 2001; 65: 1364–1368.

12. Vasiljevic T, Jelen P. Lactose hydrolysis in milk as affected by neutralizers used for the preparation of crude β-galactosidase extracts from *Lactobacillus bulgaricus* 11842. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2002; 3: 175–184.

13. Hilton CL, Macara FIC. The determination of aldose sugars by means of chloramine- T, with special reference to the analys of milk products. The Analyst, 52, 668.

14. Fine J. The iodimetric method of determining lactose in milk. *J. Biochem*, 1932; 37: 569–572.

15. Jeon IJ, Saunders SR. Effect of oligosaccharide formation on the cryoscopic measurements of enzymatic hydrolysis of lactose in dairy products. *J. Food Sci*. 1980; 51: 245–246.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-15]