The determination of Aspartame Levels and The Study of its Stability in some Locally Marketed Soft Drinks using High Performance Liquid Chromatography HPLC

Dr. Moufid Yassin[*]
Diana Ali Alkhalil[**]

(Received 4 / 5 / 2020. Accepted 28 / 9 / 2020)

□ ABSTRACT □

In this research, levels of aspartame in locally marketed soft drinks were determined using high performance liquid chromatography - reverse phase (RP-HPLC). The stability of aspartame in these drinks was then evaluated under the conditions of preservation and storage during (one month, three months).

The levels of aspartame in locally manufactured soft drinks ranged between (11.644-15.184) mg / 100 ml, while the levels in imported soft drinks were between (6.379-7.065) mg / 100 ml.

By studying the effect of preservation and storage conditions, a significant decrease in aspartame levels was observed, this decrease ranged between (9.20% -19.79%) during the first month, and after three months the decrease was between (20.29% -40.16%).

Keywords: Aspartame, Soft Drinks, HPLC, Stability, Preservation Conditions, Syrian Standard.

[*] **Professor - Analytical and Food Chemistry Department - Faculty of Pharmacy - Tishreen University, Lattakia, Syria. email: moufeedy@hotmail.com, moufidy@tishreen.edu.sy**

[**] **Postgraduate Student (Master) - Analytical and Food Chemistry Department - Faculty of Pharmacy-Tishreen University, Lattakia, Syria. email: dianaalialkhalil@gmail.com, dianakhalil@tishreen.edu.sy**

تحديد سويات الأسبارتام ودراسة ثباتيته في بعض المشروبات الغازية المسوقة محلياً باستخدام الكرموتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC

د. مفيد ياسين*

ديانا علي الخليل**

(تاريخ الإيداع 4 / 5 / 2020. قُبِل للنشر في 28 / 9 / 2020)

□ ملخّص □

تم في هذا البحث تحديد سويات الأسبارتام في المشروبات الغازية المسوقة محلياً باستخدام الكرموتوغرافيا السائلة عالية الأداء – الطور العكوس (RP–HPLC) ثم تم تقييم ثباتية الأسبارتام في هذه المشروبات ضمن شروط الحفظ والتخزين خلال (شهر، ثلاثة أشهر).

بلغت سويات الأسبارتام في المشروبات الغازية المصنعة محلياً بين (11.644–15.184) ملغ/100 مل، في حين بلغت السويات في المشروبات الغازية المستوردة بين (6.379–7.065) ملغ/100 مل.

بدراسة تأثير شروط الحفظ والتخزين لوحظ حدوث انخفاض معنوي بسويات الأسبارتام تراوح بين (9.20%–19.79%) خلال الشهر الأول وبعد ثلاثة أشهر كان الانخفاض بين (20.29%–40.16%).

الكلمات المفتاحية: الأسبارتام، المشروبات الغازية، HPLC، ثباتية، شروط الحفظ، المواصفة القياسية السورية.

* أستاذ – قسم الكيمياء الغذائية والتحليلية – كلية الصيدلة – جامعة تشرين، اللاذقية، سورية.

email: moufidy@tishreen.edu.sy, moufeedy@hotmail.com

** طالبة دراسات عليا (ماجستير) – قسم الكيمياء الغذائية والتحليلية – كلية الصيدلة – جامعة تشرين، اللاذقية، سورية.

email: dianaalialkhalil@gmail.com, dianakhalil@tishreen.edu.sy

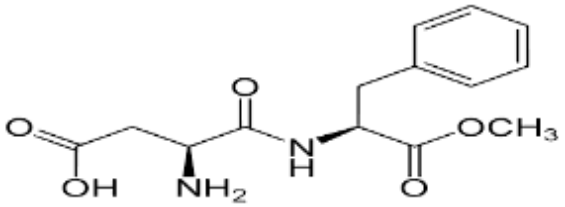
1. مقدمة:

أصبحت المحليات الصناعية مثل الأسبارتام مستخدمة بشكل واسع في العديد من المنتجات الغذائية والمشروبات من أجل التخفيف من حالات البدانة والأمراض الاستقلابية كالسكري المنتشرة بكثرة في وقتنا الحالي (Chang and Yeh 2014)، حيث تعمل كأدوات للتحكم بالسعرات الحرارية عند الفرد، إذ تعتبر كمية قليلة منها كافية لإحداث التأثير المحلي وبالتالي فإنه من الممكن إهمال محتواها الطاقي ((Tandel 2011).

تعد المشروبات الغازية أحد أكثر المنتجات المستخدمة بشكل واسع عالمياً والمشهورة باحتوائها على المحليات الصناعية هي المشروبات الغازية. وهي عبارة عن مشروبات غير كحولية محلاة وحاوية على غاز الكربون، ذات طعم حمضي، وتتميز بسعرها المنخفض، وإعطائها شعوراً بالانتعاش (El-Faki and Eisa 2010).

يعد الأسبارتام من أكثر المحليات الصناعية استخداماً في المشروبات الغازية ويستخدم إما منفرداً أو بالمشاركة مع غيره من المحليات الصناعية مثل الأسيسولفام ك (Serdar and Knežević 2011).

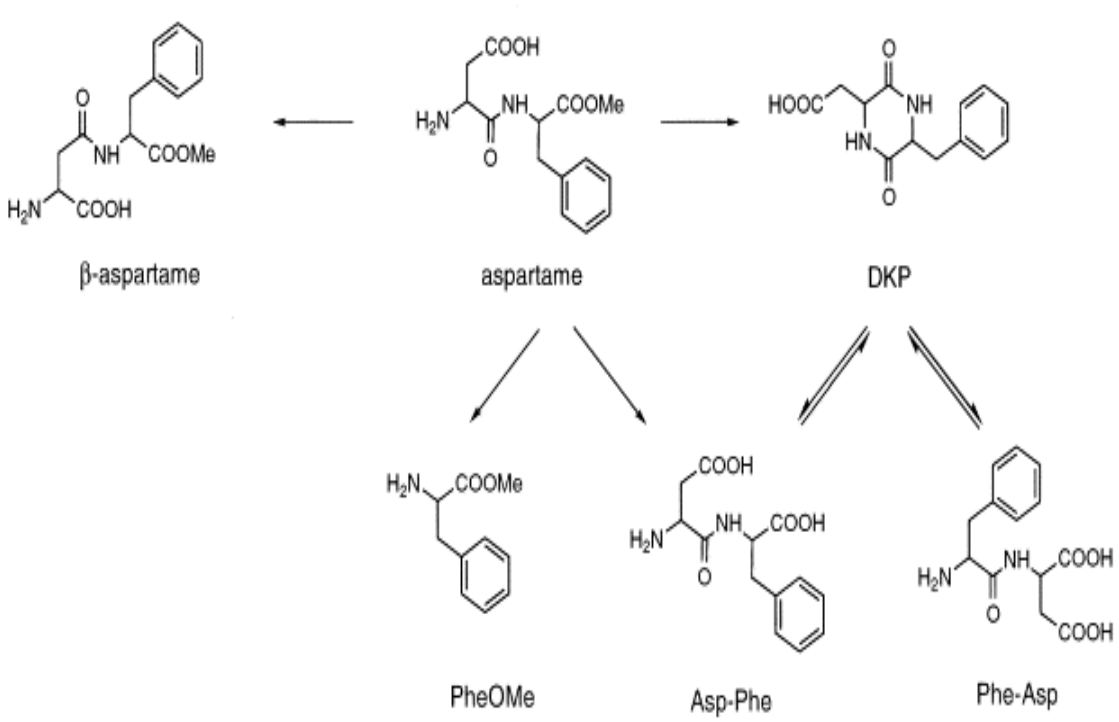
كيمائياً الأسبارتام (Aspartame (ASP عبارة عن استر ميتلي للحمضين الأمينين الفنيل ألانين وحمض الأسبارتيك يملك الصيغة الكيمائية المبينة في الشكل (1). وقد اكتشف الأسبارتام عن طريق الصدفة في عام 1965 من قبل العالم James M. Schlatter (Magnuson, Burdock *et al.* 2007)، وهو يتواجد بشكل بودرة بيضاء، عديمة الرائحة، قدرته المحلية 180-200 ضعف قدرة السكروز، يتواجد تحت الرقم E951 وتحت الأسماء التجارية (Equal, NutraSweet) (Nill 2000)



الشكل (1): الصيغة الكيميائية للأسبارتام (Otman and Bin-Jumah 2019)

يكون الأسبارتام بدرجة ثباتية قصوى في الحالة الصلبة (BELL and LABUZA 1991)، في حين تتعلق ثباتيته في المحاليل المائية كما في حالة المشروبات الغازية التي سندرسها في هذا البحث بشكل رئيسي بدرجة الحرارة ودرجة حموضة الوسط pH، حيث تكون الثباتية أعلى ما يمكن في درجة حرارة الغرفة 25°C ودرجة pH بين (4-5) ويصل نصف العمر الحيوي في هذه الظروف لـ300 يوم (Sun, Han *et al.* 2014)، وفي الظروف القاسية من حرارة أو أوساط حمضية أو قلوية قوية من الممكن أن تتفكك الرابطة البيتيدية وتعطى الحموض الأمينية بشكلها الحر وبالتالي يخسر المنتج الطعم الحلو.

كذلك قد يخضع الأسبارتام لعملية تحلق في شروط الحفظ القاسية أو نتيجة حفظه لفترات طويلة وينتج المركب الضار الـdiketopiperazine الذي يعتقد أن له تأثير مسرطن حيث ارتبط استخدامه مع حدوث سرطان الدم وسرطانات الكبد (Soffritti, Belpoggi *et al.* 2006)، حيث يظهر الشكل (2) المركبات الناتجة عند تفكك الأسبارتام في الظروف المختلفة (BELL and LABUZA 1991).



الشكل(2): المركبات الناتجة عند تفكك الأسبارتام في الظروف المختلفة (BELL and LABUZA 1991)

يخضع الأسبارتام عند الهضم لعملية استقلاب بواسطة الأنزيمين (إستراز وبيتيداز) ونحصل على ثلاثة مكونات هي الفنيل ألانين (50 %) حمض الأسبارتيك (40%) والميتانول (10%) (Singh, Kumar *et al.* 2013).

نظراً للاستخدام الواسع للأسبارتام في وقتنا الحالي فإن فهم التأثيرات الضائرة الناتجة عنه وعن مستقلباته يعتبر موضوعاً أساسياً لذلك تمت مراقبة الأسبارتام المضاف للمنتجات ووضعت حدود لاستخدامه فقد حددت منظمة الغذاء والدواء (FDA: Food And Drug Administration) الحد اليومي المسموح بتناوله من الأسبارتام (ADI:Acceptable Daily Intake) بـ50ملغ/كغ/وزن الجسم/يومياً في حين حددت منظمة الصحة العالمية الـADI للأسبارتام بـ 40 ملغ/كغ/وزن الجسم/يومياً (Butchko and Kotsonis 1991).

كما تمت دراسة أمان استخدام الأسبارتام ومستقلباته (الفنيل ألانين، حمض الأسبارتيك، الميتانول) بشكل متكرر منذ أن تم اكتشافه، حيث لوحظ التراكيز الدموية لمستقلبات الأسبارتام تزداد في الدم بعد استهلاكه بشكل سريع (Goerss, Wagner *et al.* 2000)، مع الأخذ بعين الاعتبار أن المركبات الناتجة عن استقلاب الأسبارتام يمكن الحصول عليها من الغذاء اليومي ويكمن الاختلاف أن الفنيل ألانين، حمض الأسبارتيك والميتانول التي تصل للجسم من مصادر طبيعية تتحرر بنسب مختلفة في الدم، حيث يدخل كل من الفنيل ألانين وحمض الأسبارتيك في تركيب البروتين في المنتجات الطبيعة وبالتالي تزداد تراكيزهما في الدم ببطء خلال عملية الهضم، في حين ترتفع تراكيز الأحماض الأمينة بشكلها الحر في الدم بشكل سريع عند استهلاك المنتجات المحلاة بالأسبارتام، وهذا قد يكون السبب في ظهور التأثيرات الضائرة للأسبارتام، حيث يصل الميتانول الناتج عن استقلاب الأسبارتام مباشرة إلى مجرى الدم، وقد بينت إحدى الدراسات ازدياد تراكيز الميتانول في الدم بعد جرعة تبلغ 40 ملغ/كغ/من وزن الجسم من 3 إلى 6

أضعاف الحد الطبيعي للفرد وهذا قد يؤدي إلى ظهور التأثيرات السمية للفورم ألدهيد وحمض النمل الناتجين عن استقلاب الميتانول في الجسم من سمية عصبية أو أذية للعصب البصري (Španěl, Dryahina *et al.* 2015).

كما يرتبط تناول الأسبارتام نتيجة احتوائه على الاحماض الأمينية بحدوث عدد من الاضطرابات الصحية، وخاصة عند مرضى بيلة الفينيل كيتون (PKU) وهو اضطراب استقلابي ناتج عن طفرة وراثية في جين الأنزيم فينيل ألانين هيدروكسيلاز (PAH) المسؤول عن استقلاب الفينيل ألانين مما يسبب تراكمه (Scriver 1995)، إذ تشكل المستويات العالية من الفينيل ألانين خطرًا على صحتهم وتؤثر على السلوك والمهارات التعليمية وذلك بسبب حدوث تنافس على مستقبلات التربتوفان في الدماغ حيث يعد طليعة لتركيب السيروتونين (Groff and Gropper 2000) وهكذا يجب أن يتجنب هؤلاء المرضى أي مصدر للحمض الأميني الفينيل ألانين في نظامهم الغذائي أو أن يتم تناوله بسويات محددة بدقة (Williams, Mamotte *et al.* 2008).

هذا وقد حددت المواصفة القياسية السورية الحد المسموح به من الأسبارتام في العصائر والمشروبات غير الكحولية بـ600 ملغ/ل (السورية 2006)، كما حددت شركات المشروبات الغازية كمية المحلي E951 المضاف إلى منتجاتها بـ 2% من الحد المسموح به يومياً أي 1.2ملغ/100مل.

تنبع أهمية هذا البحث من الاستخدام الواسع للأسبارتام كمحلي بالإضافة إلى استخدامه بسويات تتجاوز الحد المسموح به مما قد يؤدي إلى ظهور تأثيرات سمية، كما أن عدم مراعاة شروط الحفظ والتخزين قد ينتج عنه تشكل مركبات ضارة بصحة المستهلك.

تهدف هذه الدراسة إلى تحديد سويات الأسبارتام في المشروبات الغازية المسوقة محلياً وذلك باستخدام الكرموتوغرافيا السائلة عالية الأداء والتأكد من مطابقتها للمواصفة القياسية السورية، بالإضافة إلى دراسة تأثير شروط الحفظ والتخزين المتبعة على ثباتية الأسبارتام في هذه المشروبات.

2. طرائق البحث ومواده:

1.2. العينات:

تم جمع 72 عينة عشوائياً خلال عام (2019–2020)، العينات كانت لأربعة أنواع من المشروبات الغازية المحلاة بالأسبارتام ذات علامة تجارية تباع في المحال التجارية في السوق المحلية، النوع الأول (A) كان لمشروب غازي بنكهة الكولا مصنع محلياً. النوع الثاني (B) كان لمشروب غازي بنكهة الليمون مصنع محليا. النوع الثالث (C) كان لمشروب غازي بنكهة الكولا مستورد. النوع الرابع (D) بنكهة الليمون مستورد، يبين الجدول (1) العينات المستخدمة في الدراسة.

الجدول (1): العينات المستخدمة في الدراسة

المنتج	مصدر العينات	الطبخة	عدد العينات	تاريخ الإنتاج /تاريخ انتهاء الصلاحية
A	محلي	الطبخة الأولى	27	P05/05/19 E04/11/19L1
		الطبخة الثانية	27	P04/06/19 E03/01/20L1
B	محلي	الطبخة الأولى	27	P13/03/19 E12/09/19L1
		الطبخة الثانية	27	P04/05/19 E03/11/19L1
C	مستورد	الطبخة الأولى	27	P15/04/19 E14/10/19
		الطبخة الثانية	27	P20/6/19 E19/12/19
D	مستورد	الطبخة الأولى	27	P19/04/19 E18/10/19
		الطبخة الثانية	27	P20/06/19 19/02/20

تم تقسيم كل طبخة إلى ثلاث مجموعات، المجموعة الأولى تمت دراستها مباشرة بعد شرائها من السوق المحلية، أما المجموعة الثانية تمت دراستها بعد شهر، والمجموعة الثالثة بعد ثلاثة أشهر وذلك بعد تعريض العينات إلى شروط حفظ وتخزين تماثل ما تتعرض له أثناء التخزين من حرارة ورطوبة وضوء وغيرها من العوامل حيث تم وضع العبوات على الرف في واجهات المتاجر معرضة لأشعة الشمس خلال فصل الصيف بين درجات حرارة (30–36) درجة مئوية والتي من الممكن أن تؤثر على ثباتية الأسبارتام.

2.2. المواد المستخدمة

أسبارتام عياري نقاوته > 95 % معمل ابن سينا للصناعات الدوائية (دمشق، سوريا)

أسيتونتريل (شركة فيشر، ألمانيا)

ميتانول (Panreacquimica.SA)

3.2. الطرائق التحليلية المستخدمة

طريقة الكرموتوغرافيا السائلة عالية الأداء – الطور العكوس (RP–HPLC)

تم إجراء التحليل في مخبر البحوث البحرية جامعة تشرين باستخدام جهاز HPLC نوع Jasco مكون من مضخة (PU-980 intelligent HPLC-pump) وحاقن يدوي وحجم الحقنة 20µl، ومكشاف uv-970 intelligent uv/vis واستخدم عمود C_{18} ذو الأبعاد (12.5*0.45)cm وحجم الحبيبات 5µm، شروط الفصل: الطور المتحرك المستخدم مزيج من الأسيتونتريل /الماء المقطر (15/ 85 V/V) متساير، وتم إجراء التحليل بمعدل تدفق 1ml/min، وتم ضبط المكشاف على طول موجة 210nm

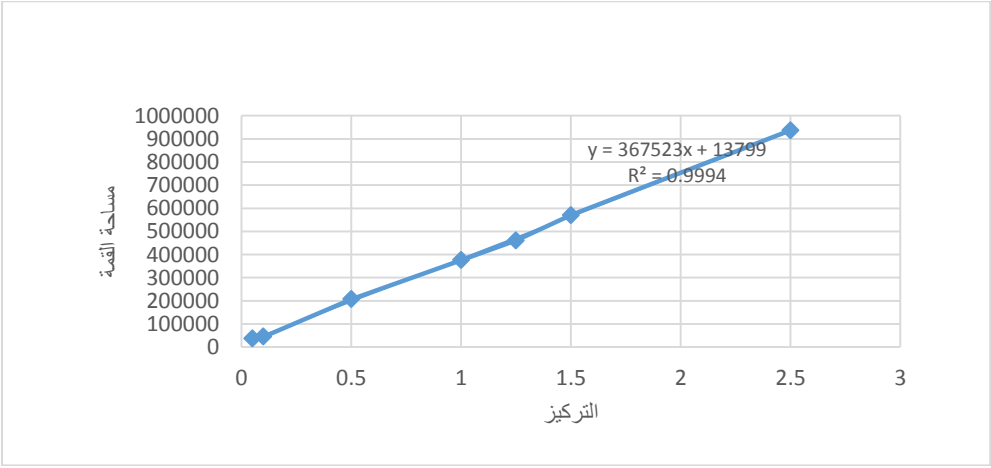
4.2. التحليل الإحصائي

لتحقيق أهداف البحث تم استخدام برنامج الحزمة الإحصائية للعلوم الاجتماعية SPSS V20، حيث عبر عن القيم بدلالة المتوسط ± الانحراف المعياري وتم استخدام اختبار Independent sample t.test عند مستوى دلالة (5%) للدلالة على معنوية الفروق.

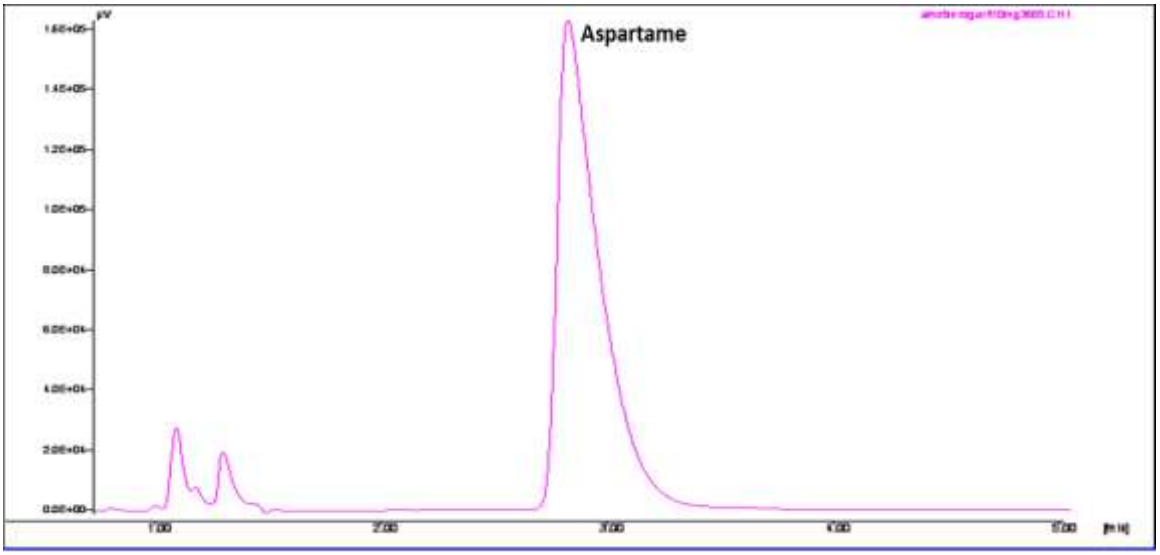
3. النتائج والمناقشة:

1.3. تحديد سويات الأسبارتام في المشروبات الغازية المسوقة محلياً ومدى مطابقتها للمواصفة القياسية السورية

أولاً تم تحضير محلول أم من عياري الأسبارتام بتركيز (10 ملغ/ 100مل)، وذلك بأخذ 10ملغ من العياري وإكمال الحجم إلى 100مل ماء مقطر وميتانول بكميات متساوية، ثم تم تحضير سلسلة عيارية من الأسبارتام ضمن المجال {0.05-2.5} ملغ/10 مل وكانت المعادلة الخطية للسلسلة (y = 367523x + 13799) وكانت قيمة معامل التحديد R^2 =0.999 التي تظهر في الشكل (3)، كما يظهر الشكل (4) الكرموتوغرام المعبر عن الأسبارتام العياري ذو زمن الاحتباس (3min).



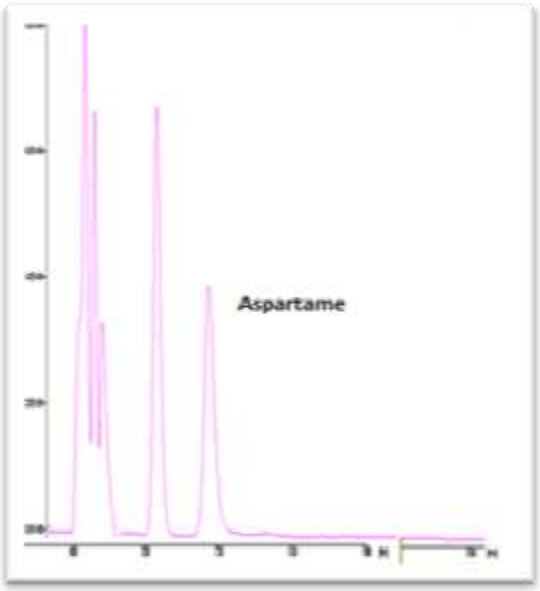
الشكل (3): السلسلة العيارية للأسبارتام المستخدمة في تحديد سوياته في عينات المشروبات الغازية(ملغ/10مل)



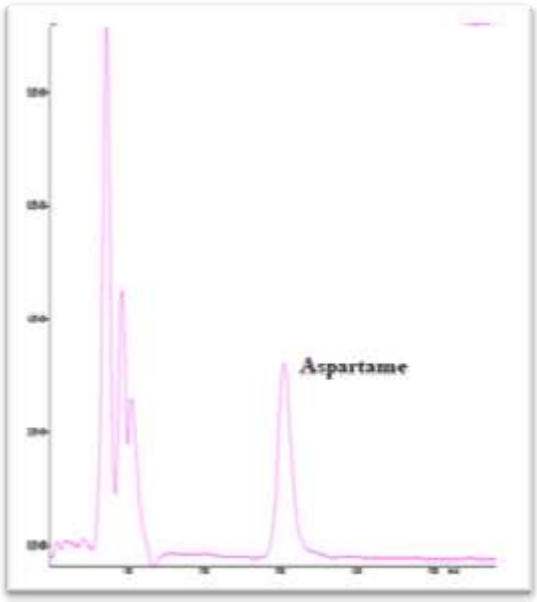
الشكل (4): كروموتوغرام الأسبارتام العياري

تم تحضير العينات للتحليل وذلك بتخليصها من الغاز بوضعها في حمام الأمواج فوق الصوتية لمدة (30min)، من ثم تم أخذ 0.4ml من العينة ووضعها في دورق حجمي سعة 10 مل، ثم تم إضافة 4.8 مل من الميتانول وإكمال الحجم حتى 10 مل بالماء المقطر ثم تم حقن العينة، وظهرت قمة لها زمن احتباس Rt مطابق لزمن احتباس عياري الأسبارتام.

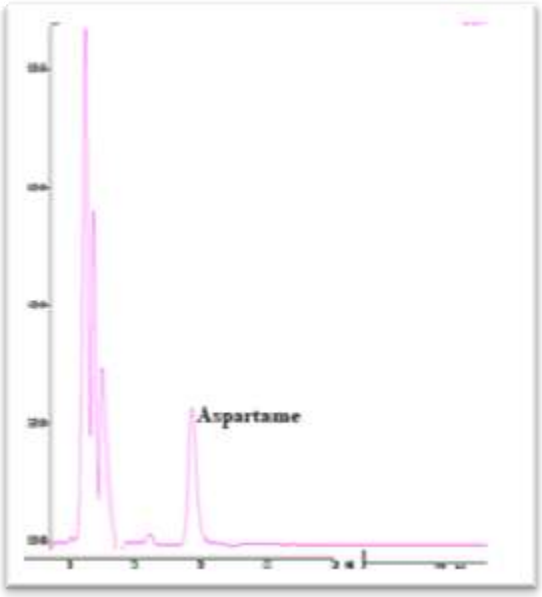
يظهر كل من الشكل (5) و(6) و(7) و(8) الكروموتوغرام المعبر عن الأسبارتام الموجود في عينة من المشروب الغازي (A) والمشروب الغازي (B) والمشروب الغازي (C) والمشروب الغازي (D)على التوالي.



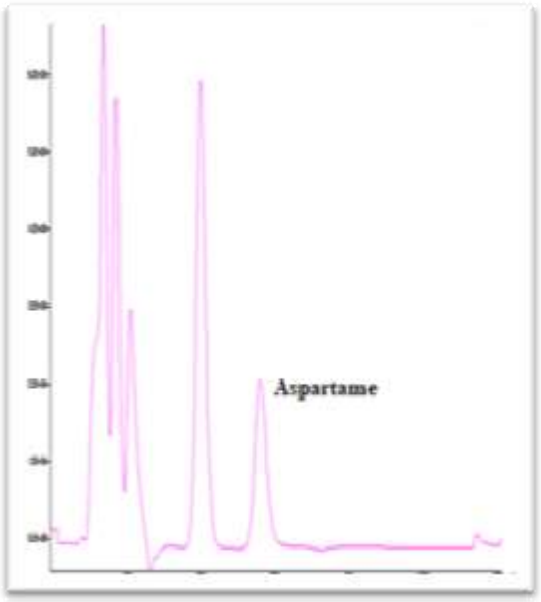
الشكل (5): كروموتوغرام عينة المشروب الغازي A



الشكل (6): كروموتوغرام عينة المشروب الغازي B



الشكل (7): كروموتوغرام عينة المشروب الغازي C



الشكل (8): كروموتوغرام عينة المشروب الغازي D

حسبت سويات الأسبارتام في عينات المشروبات الغازية المسوقة محلياً استناداً للسلسلة العيارية المحضرة (y = 367523x + 13799)، وكان التعبير عن النتيجة بعدد ملي غرامات الأسبارتام في 100 مل من المشروب الغازي، تم التعبير عن سويات الأسبارتام في عينات المشروبات الغازية المسوقة محلياً في الجدول (2) وحسبت بدلالة المتوسط الحسابي ± الانحراف المعياري

الجدول (2): سويات الأسبارتام في عينات المشروبات الغازية المسوقة محلياً

المنتج	الطبخة	العبوة	متوسط سويات الأسبارتام في 3 مكررات لكل عينة mg/100ml	متوسط سويات الأسبارتام في الطبخة الواحدة mg/100ml
A	الأولى	الأولى	15.18	0.12±15.27
		الثانية	15.23	
		الثالثة	15.41	
	الثانية	الأولى	14.96	0.71±14.77
		الثانية	13.98	
		الثالثة	15.37	
B	الأولى	الأولى	12.96	0.16±13.10
		الثانية	13.06	
		الثالثة	13.29	
	الثانية	الأولى	13.58	0.32±13.21
		الثانية	12.96	
		الثالثة	13.10	
C	الأولى	الأولى	6.69	0.17±6.58
		الثانية	6.66	
		الثالثة	6.37	
	الثانية	الأولى	6.65	0.18±6.50
		الثانية	6.29	
		الثالثة	6.55	
D	الأولى	الأولى	6.94	0.05±6.93
		الثانية	6.87	
		الثالثة	6.97	
	الثانية	الأولى	6.92	0.09±6.95
		الثانية	7.06	
		الثالثة	6.87	

نلاحظ من الجدول السابق أن سويات الأسبارتام بلغت في المشروبات الغازية المصنعة محلياً كانت بين (12.96-15.18) ملغ/100 مل، وكان المتوسط 14.09 ملغ/100 مل، في حين تراوحت سوياته في المشروبات الغازية المستوردة بين (6.29-7.06) ملغ/100 مل وكان المتوسط 6.74 ملغ/100مل.من النتائج السابقة لوحظ أن جميع العينات المحلية والمستوردة تحقق شرط المواصفة القياسية السورية كون سويات الأسبارتام فيها أقل من (60 ملغ/100 مل)، لكن كانت أعلى من الحد المصرح به من قبل الشركات المصنعة (1.2 ملغ/100مل) لذلك تم دراسة كون هذا الفرق معنوي باستخدام اختبار Independent sample t.test عند مستوى دلالة (5%) لدلالة على معنوية الفروق والنتائج موضحة في الجدول (3) كما يلي:

الجدول (3): مقارنة بين سويات الأسبارتام في عينات المشروبات الغازية مع التركيز الموضوع على اللصاقة(1.2ملغ/100مل)

العينة	الكمية المصرح بها على اللصاقة	الطبخة	فرق المتوسطات	t.test	p-value	النتيجة	نسبة الارتفاع
A	1.2ملغ/100مل	الطبخة الأولى	14.08	200.22	**0.000	معنوي	%977.54
		الطبخة الثانية	13.57	33.00	**0.001	معنوي	%942.62
B		الطبخة الأولى	11.91	121.36	**0.000	معنوي	%827.04
		الطبخة الثانية	12.02	64.35	**0.000	معنوي	%834.58
C		الطبخة الأولى	5.38	53.07	**0.000	معنوي	%373.73
		الطبخة الثانية	5.30	49.61	**0.000	معنوي	%368.12
D		الطبخة الأولى	5.73	205.95	**0.000	معنوي	%398.05
		الطبخة الثانية	5.76	102.88	**0.000	معنوي	%399.74

نلاحظ من الجدول (3) أن هناك ارتفاع معنوي في سويات الأسبارتام وهذا الاختلاف أعلى في المشروبات المصنعة محلياً حيث راوحت بين (827.04%-977.54%) أما الاختلاف في المشروبات المستوردة كان بين (368.12%-399.74%)

تم استخدام الكرموتوغرافيا السائلة عالية الأداء - الطور العكوس من قبل الباحثين Shinggu D.Y و Joytide Bekab في حساب تراكيز الأسبارتام في بعض المشروبات الغازية المسوقة في السوق المحلية في نيجيريا وكانت القيم تتراوح بين (337.06 ±0.01 _ 525.36±0.02) ملغ/ل وهي لم تتجاوز الحد المسموح به من قبل NAFDAC (المنظمة الوطنية لمراقبة وتطبيق الادوية والأغذية في نيجيريا) المحدد ب 3000 ملغ/ل (Shinggu and Bekab 2018).

وطور العالم Lawrence طريقة للفصل والتحديد الكمي والكيفي للأسبارتام وغيره من المحليات الصنعية المضافة لأغذية الحمية باستخدام الكرموتوغرافيا السائلة العالية الأداء الطور العكوس، حيث تم تمديد المشروبات الغازية ومحليات الطاولة بالطور المتحرك ثم فلترها ثم تحليلها باستخدام عمود C18 بوسط متحرك من الأسيتونتريل والوقاء الفوسفاتي بتفريق متساير، في حين أن الحلويات تم بالبداية استخلاص الأسبارتام منها بواسطة الإيثانول وفلترها ثم

حلها بالطور المتحرك وإخضاعها للتحليل، وتم بهذه الطريقة تحديد 5 أنواع من المحليات من ضمنها الأسبارتام عند طول موجة 200 أو 210 نانومتر كما تم تحديد السكارلوز عند طول موجة 200 نانومتر والسيكلامات تم تعيينها بعد عملية بالاستخلاص بالعمود (Lawrence and Charbonneau 1988).

2.3. تأثير شروط الحفظ والتخزين المتبعة على سويات الأسبارتام

تم دراسة تأثير شروط الحفظ والتخزين المتبعة في السوق المحلية على سويات الأسبارتام على أربعة أنواع من المشروبات الغازية بمعدل طبختين لكل نوع، حيث استخدمت الأنواع والطبخات المذكورة سابقاً، حيث تم محاكاة ظروف التخزين حيث تم وضع العبوات على الرف في واجهات المتاجر معرضة لأشعة الشمس خلال فصل الصيف بين درجات حرارة (30–36) درجة مئوية ثم تمت دراسة سويات الأسبارتام بعد مرور شهر وثلاثة أشهر من الحفظ باستخدام طريقة الـ HPLC المذكورة سابقاً.

أجريت ثلاثة مكررات لكل عبوة وعبر عن النتائج بالمتوسط الحسابي ± الانحراف المعياري وكانت النتائج كما نلاحظ في الجدول (4):

الجدول (4): تأثير شروط الحفظ والتخزين المتبعة على سويات الأسبارتام بعد شهر ثم بعد ثلاثة أشهر في المشروبات الغازية

المنتج	الطبخة	العبوة	متوسط سويات الأسبارتام في الطبخة الواحدة mg/100ml	متوسط سويات الأسبارتام في ثلاثة مكررات لكل عينة بعد شهر أ100mg/ml	متوسط سويات الأسبارتام بعد شهر mg/100ml	متوسط سويات الأسبارتام في ثلاثة مكررات لكل عينة بعد ثلاثة أشهر mg/100ml	متوسط سويات الأسبارتام بعد ثلاثة أشهر mg/100ml
A	الأولى	الأولى	0.12±15.27	13.97	0.34±13.57	11.47	0.44±11.25
		الثانية		13.49		10.74	
		الثالثة		13.30		11.55	
	الثانية	الأولى	0.71±14.77	13.14	0.42±13.32	11.54	0.61±11.41
		الثانية		13.03		10.74	
		الثالثة		13.81		11.96	
B	الأولى	الأولى	0.16±13.10	12.04	0.22±11.90	10.86	0.38±10.44
		الثانية		11.64		10.37	
		الثالثة		12.01		10.10	
	الثانية	الأولى	0.32±13.21	11.60	0.21±11.68	10.37	0.24±10.53
		الثانية		11.92		10.81	
		الثالثة		11.51		10.42	
C	الأولى	الأولى	0.17±6.58	5.07	0.18±5.28	3.94	0.14±4.02
		الثانية		5.36		4.19	
		الثالثة		5.40		3.94	
	الثانية	الأولى	0.18±6.50	5.24	0.17±5.36	3.68	0.20±3.88
		الثانية		5.56		4.09	
		الثالثة		5.28		3.88	
D	الأولى	الأولى	0.05±6.93	5.93	0.20±5.70	4.95	0.11±4.82
		الثانية		5.63		4.76	
		الثالثة		5.53		4.75	
	الثانية	الأولى	0.09±6.95	5.57	0.11±5.56	4.76	0.47±5.30
		الثانية		5.45		5.64	
		الثالثة		5.67		5.50	

ثم تمت مقارنة هذه النتائج مع التركيز الابتدائي للأسبارتام المدروس في الفقرة 1.3. وتم استخدام اختبار ستودنت Student's Test للتحقق من وجود فروق ذات دلالة بين النتائج

الجدول (5): تأثير شروط الحفظ والتخزين لمدة شهر

العينة	الطبخة	فرق المتوسطات	t.test	p-value	النتيجة	نسبة الانخفاض
A	الطبخة الأولى	1.70	6.91	*0.020	معنوي	%11.13
	الطبخة الثانية	1.44	5.61	*0.030	معنوي	%9.75
B	الطبخة الأولى	1.21	8.09	*0.015	معنوي	%9.20
	الطبخة الثانية	1.54	5.59	*0.030	معنوي	%11.63
C	الطبخة الأولى	1.30	6.97	*0.020	معنوي	%19.74
	الطبخة الثانية	1.14	5.51	*0.031	معنوي	%17.49
D	الطبخة الأولى	1.23	10.13	*0.010	معنوي	%17.73
	الطبخة الثانية	1.39	11.82	**0.007	معنوي	%19.97

الجدول (6): تأثير شروط الحفظ والتخزين لمدة ثلاثة أشهر

العينة	الطبخة	فرق المتوسطات	t.test	p-value	النتيجة	نسبة الانخفاض
A	الطبخة الأولى	4.02	16.97	**0.003	معنوي	%26.30
	الطبخة الثانية	3.36	57.71	**0.000	معنوي	%22.71
B	الطبخة الأولى	2.66	8.45	*0.014	معنوي	%20.29
	الطبخة الثانية	2.68	8.77	*0.013	معنوي	%20.29
C	الطبخة الأولى	2.55	25.45	**0.002	معنوي	%38.79
	الطبخة الثانية	2.61	11.61	**0.007	معنوي	%40.16
D	الطبخة الأولى	2.08	43.60	.001	معنوي	%30.00
	الطبخة الثانية	1.65	6.51	.023	معنوي	%23.74

من الجداول (4) و(5) و(6) نلاحظ حدوث انخفاض معنوي بسويات الأسبارتام يزداد بمرور الزمن حيث أنه تراوح بين (9.20%-19.79%) بعد مرور شهر وبين (20.29%-40.16%) بعد ثلاثة أشهر

هذا يتوافق أيضاً مع دراسة تمت في ليبيا درست فيها ثباتية الأسبارتام في المشروبات الغازية ولوحظ حدوث انخفاض في تركيزه إثر الحفظ مدة أسبوعين ثم 4 أسابيع حيث كان الانخفاض في Pepsi Light (4.6%-13.2%) والـCoca Cola Zero (5 %-11.7%) على التوالي (El Attug, Ammar *et al.* 2015).

كذلك قام الباحث Wing Sum Tsang وزملاؤه عام 1985 بتحديد سويات الأسبارتام ونواتج تخربه في المشروبات الغازية المخزنة خلال فترات مختلفة باستخدام الكرموتوغرافيا السائلة عالية الأداء الطور العكوس عند طول موجة

214nm باستخدام طور متحرك isocratic، أظهرت الدراسة أن الأسبارتام غير ثابت في المشروبات الغازية وينخفض تركيزه نتيجة الحفظ الطويل بسبب تعرضه للحلمهة أو التحلق وبالتالي تقل حلاوة المشروب الغازي (Tsang, Clarke *et al.* 1985).

كذلك توافقت هذه النتائج مع دراسة قام بها العالم MALIK عام 2002 درس فيها ثباتية الأسبارتام في المشروبات الغازية المنكهة بالليمون بعد حفظ العينات، وكانت الخسارة بالأسبارتام بمعدل 29% (MALIK, JEYARANI *et al.* 2002)، مما يؤكد أن ثباتية الأسبارتام تتأثر بشروط الحفظ والتخزين والحرارة التي تتعرض لها ضمن المنتجات.

4. الاستنتاجات والتوصيات:

الاستنتاجات:

- أظهر البحث أن سويات الأسبارتام في المشروبات الغازية كان ضمن الحدود الموصى بها في المواصفة القياسية السورية المحددة بـ(60mg/100ml) حيث كان متوسط قيمه في المشروبات الغازية المصنعة محلياً 14.094 mg/100ml وفي المستوردة 6.742 mg/100ml
- تجاوز الأسبارتام في المشروبات الغازية الحد المصرح به من قبل الشركات المصنعة (مخالفة للعنونة) وهذا الأمر يعد خطراً خاصة عند مرضى الPKU
- انخفاض تراكيز الأسبارتام في المشروبات الغازية نتيجة شروط الحفظ والتخزين المتبعة في المتاجر حيث كان الانخفاض متناسب طرداً مع الزمن حيث بلغ بعد شهر (9.20–19.79)% وبعد 3 أشهر (20.29–40.16)% أي لابد من مراعاة شروط الحفظ الموصى بها من أجل الحفاظ على الأسبارتام ضمن المنتجات وحمايته من التخرب.

التوصيات والمقترحات:

توصي الدراسة بإجراء المزيد من الأبحاث وزيادة توعية المستهلك حول أهمية الالتزام بالحد المسموح بتناوله من الأسبارتام لتتجب التأثيرات الضارة المرافقة لاستعماله بسويات مرتفعة، بالإضافة إلى إلزام المصانع بالالتزام بالحدود المسموح بها سواء المذكورة في المواصفات أو على العبوات وتحديد شروط الحفظ والتخزين المثالية حيث الحرارة المثلى للحفظ هي 25°C ودرجة pH بين (4–5) والتوصية بالالتزام بها.

References:

1. BELL, L. N. and T. P. LABUZA (1991). "Aspartame degradation kinetics as affected by pH in intermediate and low moisture food systems." Journal of food science **56**(1): 17-20.
2. Butchko, H. H. and F. N. Kotsonis (1991). "Acceptable daily intake vs actual intake: the aspartame example." Journal of the American College of Nutrition **10**(3): 258-266.
3. Chang, C.-S. and T. S. Yeh (2014). "Detection of 10 sweeteners in various foods by liquid chromatography/tandem mass spectrometry." Journal of food and drug analysis **22**(3): 318-328.
4. El-Faki, A. and E. Eisa (2010). "Physicochemical characteristics of some soft drinks of sudan during shelf life." Journal of Science and Technology **11**(2): 57-62.

5. El Attug, M. N., A. A. Ammar, N. M. Almosrati, L. M. B. Yousef and A. A. El Maremy (2015). "Study of Thermal Degradation of Aspartame in Coca-Cola Zero and Pepsi Light Markted in Libya." American Journal of Food Science and Nutrition **2**(5): 82-88.

6. Goerss, A. L., G. C. Wagner and W. L. Hill (2000). "Acute effects of aspartame on aggression and neurochemistry of rats." Life sciences **67**(11): 1325-1329.

7. Groff, J. L. and S. A. S. Gropper (2000). Advanced nutrition and human metabolism, Wadsworth Publishing Company.

8. Lawrence, J. F. and C. F. Charbonneau (1988). "Determination of seven artificial sweeteners in diet food preparations by reverse-phase liquid chromatography with absorbance detection." Journal of the Association of official analytical chemists **71**(5): 934-937.

9. Magnuson, B., G. Burdock, J. Doull, R. Kroes, G. Marsh, M. Pariza, P. Spencer, W. Waddell, R. Walker and G. Williams (2007). "Aspartame: a safety evaluation based on current use levels, regulations, and toxicological and epidemiological studies." Critical reviews in toxicology **37**(8): 629-727.

10. MALIK, A., T. JEYARANI and B. RAGHAVAN (2002). "A COMPARISON OF ARTIFICIAL SWEETENERS'STABILITY IN A LIME- LEMON FLAVORED CARBONATED BEVERAGE." Journal of food quality **25**(1): 75-82.

11. Nill, A. G. (2000). "The History of Aspartame."

12. Otman, S. and M. Bin-Jumah (2019). "Histopathological Effect of Aspartame on Liver and Kidney of Mice." International Journal of Pharmacology **15**(3): 336-342.

13. Scriver, C. R. (1995). "The hyperphenylalaninemias." The metabolic and molecular bases of inherited disease.

14. Serdar, M. and Z. Knežević (2011). "Determination of artificial sweeteners in beverages and special nutritional products using high performance liquid chromatography." Arhiv za higijenu rada i toksikologiju **62**(2): 169-172.

15. Shinggu, D. and J. Bekab (2018). "Determination and Comparison of Aspartame Levels in Some Selected Soft Drinks Consumed in Mubi, Adamawa State, Nigeria." International Research Journal of Pure and Applied Chemistry: 1-7.

16. Singh, M., A. Kumar and N. Tarannum (2013). "Water-compatible 'aspartame'-imprinted polymer grafted on silica surface for selective recognition in aqueous solution." Analytical and bioanalytical chemistry **405**(12): 4245-4252.

17. Soffritti, M., F. Belpoggi, D. D. Esposti, L. Lambertini, E. Tibaldi and A. Rigano (2006). "First experimental demonstration of the multipotential carcinogenic effects of aspartame administered in the feed to Sprague-Dawley rats." Environmental Health Perspectives **114**(3): 379-385.

18. Španěl, P., K. Dryahina, P. Vicherková and D. Smith (2015). "Increase of methanol in exhaled breath quantified by SIFT-MS following aspartame ingestion." Journal of breath research **9**(4): 047104.

19. Sun, J.-P., Q. Han, X.-Q. Zhang and M.-Y. Ding (2014). "Investigations on the degradation of aspartame using high-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry." Chinese Chemical Letters **25**(9): 1259-1264.

20. Tandel, K. R. (2011). "Sugar substitutes: Health controversy over perceived benefits." Journal of pharmacology & pharmacotherapeutics **2**(4): 236.

21. Tsang, W. S., M. A. Clarke and F. W. Parrish (1985). "Determination of aspartame and its breakdown products in soft drinks by reverse-phase chromatography with UV detection." Journal of Agricultural and Food Chemistry **33**(4): 734-738.
22. Williams, R. A., C. D. Mamotte and J. R. Burnett (2008). "Phenylketonuria: an inborn error of phenylalanine metabolism." The Clinical Biochemist Reviews **29**(1): 31.
23. Syrian, A. a. (2006). "Determination of aspartame levels in non-alcoholic beverages 2654/2006".