Archive of SID

مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال هشتم، شماره 2، تابستان 1392، صفحات 190-181

اندازه‌گیری سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم در نمونه‌های دوغ عرضه شده در شهر تهران با روش HPLC

همایون وصال[1] ، سید امیرمحمد مرتضویان[2]، عبدالرضا محمدی[3]، سعیده اسمعیلی[4]

1- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، کمیته تحقیقات دانشجویان، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

2- نویسنده مسئول: دانشیار گروه صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران، پست الکترونیکی: mortazvn@sbmu.ac.ir

3- استادیار گروه صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی،دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

4-کارشناس آزمایشگاه صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 92/6/2 تاریخ پذیرش: 92/8/1

چکیده

سابقه و هدف: دوغ محصول تخمیری سالم و سلامت بخش است که به عنوان یک نوشیدنی ملی ایران محسوب می‌شود. با توجه به اهمیت ملی دوغ و مصرف روزافزون این نوشیدنی تخمیری سلامت‌بخش و استفاده از نگهدارنده‌های سوربات و بنزوات به منظور افزایش ماندگاری و کاهش بار میکربی در دوغ، لزوم مطالعاتی به منظور تعیین استاندارد و حدود مجاز این افزودنی‌ها در این فرآورده لبنی تخمیری حائز اهمیت است. هدف از این مطالعه، اندازه‌گیری سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم در نمونه‌های دوغ عرضه شده در سطح تهران می‌باشد.

مواد و روش‌ها: به منظور اندازه‌گیری سطوح نگهدارنده‌های سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم در دوغ، ابتدا عوامل موثر بر استخراج سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم (pH نمونه استخراجی، حجم حلال استخراجی، میزان محلول کارز و سرعت سانتریفوژ) بهینه سازی و از روش ارقام شایستگی معتبرسازی گردیدند. بدین منظور، حدود 90 آنالیز بر روی نمونه دوغ تهیه شده در آزمایشگاه انجام گردید. سپس، تعداد 60 نمونه دوغ از نوع بدون گاز گرمادیده در 3 ماه متوالی فصل تابستان از سطوح بازار جمع آوری و میزان سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم با دستگاه HPLC مورد اندازه‌گیری قرار گرفت. به منظور تجزیه و تحلیل داده ها از نرم افزار SPSS 16 استفاده گردید.

یافته‌ها: نتایج تحقیق نشان داد دوغ‌های صنعتی معروف عرضه شده در شهر تهران در فصل تابستان (تیر، مرداد و شهریور) از نظر مقدار غلظت سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم، تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. بیشترین غلظت سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم به ترتیب 267/8 و 49/3 میلی‌گرم بر کیلوگرم و کمترین غلظت این نگهدارنده‌ها به ترتیب 8/2 و 4/6 میلی‌گرم بر کیلوگرم در نمونه‌های دوغ اندازه‌گیری گردید.

نتیجه‌گیری: علیرغم عدم وجود حد استاندارد برای مصرف نگهدارنده‌های سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم در دوغ، این نگهدارنده‌ها در دوغ‌های مصرفی شهر تهران استفاده می‌شوند. تحقیق حاضر می‌تواند گامی مؤثر برای تدوین استاندارد و تعیین حدود مجاز مصرف نگهدارنده‌های سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم محسوب شود.

واژگان کلیدی: سوربات پتاسیم- بنزوات سدیم- دوغ- کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا

• مقدمه

مواد افزودنی از جمله موادی هستند که بطور عمدی در فرآیند تولید موادغذایی افزوده شده تا از تغییرات نامطلوب و فساد ناشی از میکروارگانیسم‌ها جلوگیری و باعث افزایش ماندگاری مواد غذایی می‌شوند (2، 1). امروزه به دلیل طیف گسترده استفاده از مواد افزودنی درصنایع غذایی، بررسی اثرات آنها بر سلامت مصرف‌کنندگان حایز اهمیت است. به دلیل امکان آلودگی مواد غذایی، وجود نگهدارنده‌ها مانند بنزوات و سوربات برای کنترل رشد میکربی و افزایش ماندگاری ضروری است (6- 3). مکانیزم اثر نگهدارنده‌های سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم به منظور جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌ها بدین گونه است که بنزوئیک اسید از فعالیت باکتریایی جلوگیری نموده و سوربیک اسید به عنوان

www.SID.ir

Archive of SID

یک ماده ضدقارچی در کپک و مخمر مصرف می‌شود (7,5). بنزوات در pH پایین و اسیدی شدن محیط داخل سلولی از مهم‌ترین عوامل مهار رشد و تکثیر مخمر و کپک است. سلول‌های مخمر و کپک برای رشد و تکثیر نیاز به ATP دارند. اسیدی شدن محیط داخل سلولی آنزیم فسفوفروکتوکیناز که در چرخه تولید ATP نقش دارد، غیر فعال می‌کند. این موضوع سبب افزایش تقریبی در غلظت ADP (Adenosine diphosphate) و افزایش نسبی در غلظت AMP (Adenosine monophosphate) می‌گردد و در نهایت رشد و تکثیر مخمر و کپک کاهش یافته یا متوقف می‌شود (8). سوربات با مهار آنزیم‌های دهیدروژناز در اکسیداسیون اسیدچرب، عمل خود را انجام می‌دهد. همچنین آنزیم‌های دارای سولفیدریل محل اثر سوربات در میکروارگانیسم‌ها است. سوربات با مهار آنزیم‌های حاوی سولفیدریل باعث جفت نشدن فسفوریلاسیون اکسیداتیو می‌گردد. مهار کاتالاز در کپک‌ها روش دیگر فعالیت سوربات در نظر گرفته شده که در نتیجه آن با افزایش هیدروژن پراکسید در سلول عمل می‌کند (9). میزان مصرف بنزوئیک اسید و سوربیک اسید و نمک‌های حاصل از آنها به عنوان مواد نگهدارنده در مواد غذایی توسط سازمان‌های تنظیم مقررات بین المللی و ملی تعیین می‌شود و مصرف آنها در غلظت بسیار کم توصیه شده است. مقدار نگهدارنده‌های مجاز اسید بنزوئیک و اسید سوربیک و نمک‌های سدیم و پتاسیم در نوشابه گازدار به ترتیب بیشینه 150 mg/kg و 500 است (10). مطالعات اخیر، نشان می‌دهد که بنزوئیک اسید و اسید سوربیک در نوشیدنی‌های بدون گاز بیش از ADI(Acceptable daily intake) برای مصرف کنندگان بر پایه استاندارد بین المللی مصرف شده است (11). ADI برای سوربات و بنزوات به ترتیب 25 و 5 bw mg/kg اعلام شده است (12). به جهت مصرف مواد نگهدارنده و مواد افزودنی، توسط EU (European Union) قوانین سختی برای ایمنی و سلامتی انسان مطرح شده است (13). از عوارض مصرف این گونه مواد به صورت اثرات پوستی مانند جوش، کهیر و درماتیت تماسی گزارش شده است (14). در مصرف بنزوئیک اسید می‌توان تاثیرات زیان‌آور مانند تنگی نفس، تشنج، خارش و متابولیک اسیدی حتی در دز پایین حاصل از مصرف آن را مشاهده نمود (15).

دوغ یک محصول لبنی تخمیری است که از مقبولیت و مصرف بالا در ایران برخوردار بوده و میزان مصرف سرانه، تولید صنعتی و صادرات آن در سال‌های اخیر رشد قابل توجه داشته است. مقبولیت دوغ نه فقط به عنوان فرآورده‌ای با ویژگی‌های حسی مطلوب، بلکه به عنوان نوشیدنی تخمیری سالم و سلامت بخش با مقدار تولید 800000 تن در سال 91، سبب شده است که به عنوان نوشیدنی ملی ایران پذیرفته شود (16، 1). از این رو ایمنی و سلامت این فرآورده بسیارحائز اهمیت است. بنزوئیک اسید و اسید سوربیک نگهدارنده‌هایی هستند که به منظور افزایش ماندگاری و کاهش بار میکربی به دوغ اضافه می‌شوند.

چند روش تجزیه‌ای جهت اندازه‌گیری مواد نگهدارنده گزارش شده است که می‌توان به کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، کروماتوگرافی گاز و اسپکتروفوتومتری یونی اشاره نمود (19-17، 7). HPLC به عنوان یک روش ساده، سریع و قابل اعتماد جهت جداسازی و اندازه‌گیری هم‌زمان و تعیین کمیت بنزوئیک اسید و سوربیک اسید در زمان کوتاه با نتایج قابل قبول است (23-20، 9). تا کنون هیچ تحقیقی به منظور تعیین سطوح این نگهدارنده‌ها در دوغ انجام نشده است. لذا برآن شدیم برای اولین بار در ایران غلظت این نگهدارنده‌ها را در این فرآورده مهم لبنی تخمیری اندازه گیری نمایم تا زمینه جهت مطالعات آتی به منظور تعیین استاندارد و حدود مجاز این نگهدارنده‌ها در این فرآورده مهم فراهم گردد و زمینه را برای نگارش استاندارد ملی با عنوان "روش اندازه‌گیری سوربات و بنزوات در دوغ"فراهم می‌نماید.

• مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی و استانداردها: هیدروکسید سدیم با خلوص 98/5 دراز Acros بلژیک، کشت آغاز گر ماست (استارتر CH1) از HANSEN آلمان و هگزا سیانوفرات-پتاسیم با خلوص بیش از 98 درصد از Panreac اتحادیه اروپا، استات روی با خلوص بیش از 98 درصد، بنزوات سدیم و سوربات پتاسیم از Dae Jung کره جنوبی، سایر مواد شیمیایی استفاده شده در انجام آزمایشات از شرکت Merck تهیه گردید. محلول استاندارد مخلوط با غلظت 100mg/L سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم تهیه شد. همچنین، دوغ‌های صنعتی با برندهای تجاری معروف از مناطق مختلف شهر تهران خریداری و به آزمایشگاه منتقل شدند. محلول‌های تهیه شده تا مدت استفاده در دمای اتاق نگهداری شدند.

دستگاه HPLC : دستگاه HPLC مدل CECIL با ستون C_{18}، 250mm× 4/6 mm - 5µm ساخت انگلستان بود.

www.SID.ir

Archive of SID

جداسازی بنزوات و سوربات با بافر استات (pH=3/6) و استو نیتریل با نسبت (1 :1) به عنوان فاز متحرک، طول موج 235nm، سرعت جریان 1/2 mL/min، میزان حجم تزریق L µ 20 انجام شد.

نمونه‌ها: 20 نمونه از دوغ‌های صنعتی معروف عرضه شده در شهر تهران در فصل تابستان (تیر، مرداد و شهریور) از مناطق مختلف شهر تهران خریداری و به آزمایشگاه منتقل و تا آنالیز در دمای 4°C نگهداری شدند.

روش تولید نمونه دوغ در آزمایشگاه: به منظور تهیه دوغ، از شیر باز ساخته بدون چربی (Milk solid- Not fat) استفاده شد. شیر بدون چربی مورد فرآیند گرمایی (85°C به مدت زمان 30 min) قرار گرفت. سپس تا دمای 45°C سرد گردید. آماده‌سازی باکتری‌های ماست مطابق با دستورالعمل شرکت سازنده انجام گرفت. در مرحله بعد باکتری‌های ماست به شیر اضافه شد. شیر مایه خورده در دمای 45°C در گرمخانه قرار گرفت. عمل تخمیر تا رسیدن نمونه به pH نهایی4/2 ادامه یافت. بعد از این مرحله نمونه به یخچال منتقل شد. طی عمل تخمیر، نمونه هر 30min تا رسیدن به pH نهایی مورد اندازه گیری قرار گرفت.

فرآیند استخراج سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم از دوغ: به منظور استخراج سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم، 2mL دوغ و 6 mL هیدروکسید سدیم 0/1 مولار را به یک فالکن 50 mL منتقل کرده سپس کاملاً همگن نموده، تا استخراج بنزوات سدیم و سوربات پتاسیم به درون فاز آبی به خوبی انجام شود. 1 mL اسید سولفوریک 0/5 مولار، 1 mL استات روی و 1 mL پتاسیم هگزاسیانوفرات به آن اضافه شد. بعد از همگن کردن و انجام سانتریفوژ، فاز شفاف فوقانی را جدا کرده و از صافی 0/2 µm فیلتر عبور داده و 20 µL از فاز فوقانی حاصل به دستگاه تزریق شد. در نهایت سطح زیر پیک نشان دهنده مقدار سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم است.

طراحی آزمون‌های بهینه سازی عوامل موثر دراستخراج سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم: بهینه-سازی متغیرهای مورد نظر شامل: pH نمونه استخراجی (در سه سطح 7، 9 و 12)، حجم حلال استخراجی (در چهار سطح 6 mL، 8، 10 و 12) ، میزان محلول کارز (در سه سطح 0/5 mL، 1 و 2) و سرعت سانتریفوژ (در چهار سطح 154 g، 617، 1389 و 2469) بود. سطوح برای دمای محلول نمونه 30-50 °C، زمان استخراج 4-20 min ، سرعت همزن به مدت 10 min سانتریفوژ به دست آمد و با انجام این آزمایشات، نقاط بهینه تعیین شد. داده‌ها با استفاده از نرم افزار SPSS V.16.0 و با آزمون-Kruskal Wallisمورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

معتبرسازی و تعیین ارقام شایستگی روش اندازه‌گیری برای استخراج سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم: برای رسم منحنی کالیبراسیون و تعیین محدوده خطی بودن، از محلول‌های آبی استاندارد سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم در غلظت‌های 4، 10، 20، 50، 100، 500 و 1000 میلی‌گرم در لیتر تهیه شد. در این مرحله نسبت سطح زیر پیک سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم به استاندارد داخلی به عنوان سطح زیر پیک نسبی در نظر گرفته شد. برای تکرار پذیری، از یک نمونه دوغ پنج بار با روش ارائه شده استخراج و به دستگاه تزریق شدند (میزان دقت براساس انحراف استاندارد نسبی بیان شد). جهت تعیین درصد بازیافت نسبی، محلول استاندارد با غلظت 12 میلی‌گرم در لیتر به دو نمونه دوغ به‌صورت دستی اضافه شد و به دستگاه تزریق شد. حد تشخیص با استفاده از رابطه $LOD=\frac{3Sy/x}{m}$ و حد اندازه‌گیری با استفاده از رابطه $LOQ=\frac{10Sy/x}{m}$ محاسبه شد ($\frac{1}{5}Sy/x$انحراف استاندارد شاهد برای هر پیک آنالیت در کروماتوگرافی معادل با مقدار تفاضل حد بالایی و پایینی نویزهای اطراف پیک آن آنالیت است).

آزمون اندازه‌گیری مقدار سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم درنمونه‌های دوغ تهیه شده از بازار تهران: برای اندازه‌گیری مقدار سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم مطابق روش فرآیند استخراج سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم از دوغ استخراج انجام شد. نمونه‌ها به دستگاه HPLC تزریق شدند. سطح زیر پیک مربوط به هر یک از ترکیبات سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم محاسبه شد.

بررسی آماری نتایج و تجزیه و تحلیل داده‌ها: داده‌های مربوط به اندازه‌گیری سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم به صورت میانگین و انحراف معیار گزارش شد و با آزمون Kruskal-Wallis مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. -*p* value کمتر از 0/05 معنی‌دار در نظر گرفته شده است. تجزیه و تحلیل با استفاده از نرم افزار SPSS V.16.0 انجام شد.

• یافته‌ها

نتایج بهینه سازی عوامل موثر دراستخراج سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم: از آنجا که موقعیت نقطه بهینه

www.SID.ir

Archive of SID

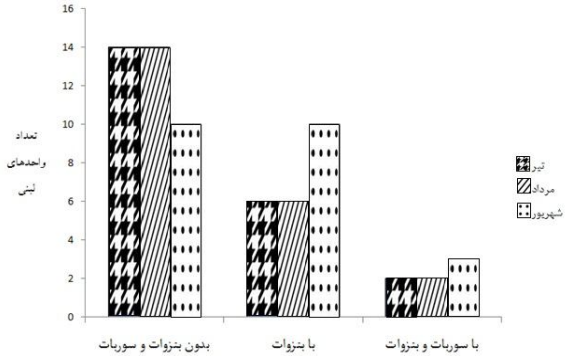
قبل از انجام آزمایش‌های مربوط به روش سطح پاسخ معلوم نیست، برتری با طرحی است که دقت برآورد مشابهی را در تمام جهات تامین کند. بر این اساس مؤثرترین پارامترهای موثر بر کارآیی شامل حجم کارز، سرعت سانتریفوژ، حجم محلول استخراجی و pH است. نتایج تحقیق نشان داد که افزایش حجم محلول کارز تا حد 1 میلی‌لیتر سبب افزایش کارآیی استخراج به مقدار ماکزیمم گردید و پس از آن ثابت ماند. همچنین با افزایش سرعت سانتریفوژ، کارآیی استخراج افزایش یافت و پس از 1389 g تقریباً ثابت می‌ماند. به علاوه، افزایش حجم حلال استخراجی تا حد 6 میلی‌لیتر سبب افزایش کارآیی استخراج گردید و حجم‌های کمتر از 6 میلی‌لیتر کارآیی استخراج کمتری داشتند. افزایش pH تا حد 12 سبب افزایش کارآیی استخراج گردید و سپس به یک مقدار ماکزیمم رسید.

نتایج معتبر سازی عوامل موثر دراستخراج سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم: نتایج حاصل از معتبرسازی و ارقام شایستگی در دوغ در جدول 1 نشان داده شده است.

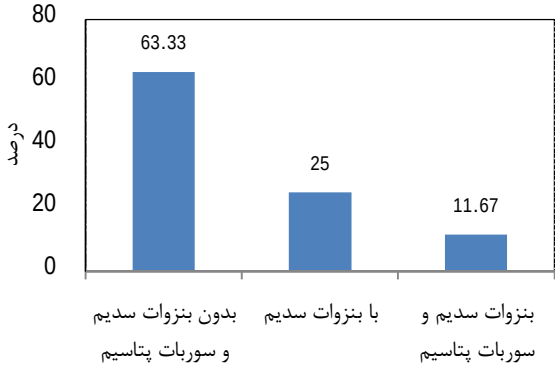
جدول1. ارقام شایستگی روش پیشنهادی

آنالیت	R^2	Linear Range	Recovery	LOD	LOQ	RSD
بنزوات سدیم	0/995	4-1000	65	1/18	3/55	4/08
سوربات پتاسیم	0/990	4-1000	80	1/22	3/67	4/40

نتایج بررسی وجود سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم در نمونه‌های دوغ عرضه شده در شهر تهران: با توجه به اینکه مقدار این ترکیبات در نمونه‌های دوغ متفاوت بود، ابتدا براساس وجود یا عدم وجود سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم تقسیم بندی شدند. در هر سه ماه وجود همزمان هر دو ماده با هم در نمونه‌های دوغ کم و وجود بنزوات سدیم بیشتر بود. آنچه مشاهده گردید، نسبت زیاد نمونه‌های دوغ فاقد این مواد است. در تیر ماه، 30 درصد (6 مورد) از نمونه-های دوغ دارای بنزوات سدیم بودند که از این تعداد، 10درصد (2 مورد) دارای سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم بود. در مرداد ماه، نمونه‌های دارای بنزوات سدیم 30 درصد (6 مورد) و از این تعداد، نمونه‌های دارای هر دو نگهدارنده 10 درصد (2 مورد) مشاهده شد. در شهریور ماه، نمونه‌های دارای بنزوات سدیم 50 درصد (10 مورد) و از این تعداد نمونه‌های دارای سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم 15 درصد (3 مورد) را نشان داد. داده‌ها حاکی از این است که تعداد نمونه‌های فاقد بنزوات سدیم در فصل تابستان 30 درصد (6 مورد) و تعداد نمونه‌های فاقد سوربات پتاسیم در این فصل 80 درصد (17 مورد) بود. مورد سوربات پتاسیم به تنهایی در هیچ یک از نمونه‌ها مشاهده نگردید (شکل1). نتایج بدست آمده نشان می‌دهد که 36/67 درصد از 60 نمونه دوغ تهیه شده در شهر تهران دارای سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم بودند که بر خلاف قوانین استاندارد ملی ایران و مغایر با فرمول ساخت محصول است. به صورت تفکیک شده 7 واحد لبنی (11/67 درصد) دارای سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم، 15واحد لبنی (25 درصد) دارای بنزوات و 38 واحد لبنی (63/3 درصد) فاقد سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم در فصل تابستان بودند (شکل2).



شکل 1. وضعیت نمونه‌های دوغ عرضه شده از نظر وجود یا عدم وجود سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم در فصل تابستان



شکل2. تعداد کارخانه‌های لبنی مورد بررسی بر حسب درصد بنزوات سدیم و سوربات پتاسیم

www.SID.ir

Archive of SID

جدول 2 نشان می‌دهد نمونه‌های دوغ از نظر میانگین غلظت سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم در سه ماه مورد بررسی نسبت به یکدیگر تفاوت معنی‌داری نداشتند (p<0/05). همچنین جدول 3 میانگین غلظت سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم را در نمونه‌های دوغ نشان می‌دهد. بیشترین مقدار بنزوات سدیم 49/3 میلی‌گرم در کیلوگرم در نمونه دوغ با کد 7 و بیشترین مقدار سوربات پتاسیم 267/8 میلی‌گرم در کیلوگرم در نمونه دوغ با کد 10 بود. نمونه دوغ با کد 2 دارای کمترین مقدار بنزوات سدیم 4/6 میلی‌گرم در کیلوگرم و نمونه دوغ با کد 16 دارای کمترین مقدار سوربات پتاسیم 8/2 میلی‌گرم در کیلوگرم بود.

جدول2. میانگین و انحراف معیار غلظت بنزوات سدیم و سوربات پتاسیم درانواع دوغ عرضه شده به تفکیک ماه

مواد نگهدارنده	ماه	تعداد نمونه	میانگین غلظت (mg/kg)	انحراف معیار	حداقل غلظت	حداکثر غلظت	p-value
بنزوات سدیم	تیر	6	358/56	270/54	132/20	809/50	0/364
	مرداد	6	384/01	182/16	158/50	601/90	
	شهریور	10	231/24	58/19	144/60	299/80	
سوربات پتاسیم	تیر	3	5749/80	4887/03	140/60	9089	0/153
	مرداد	2	9468/20	5/37	9464/40	9472	
	شهریور	2	5455/50	4328/41	2394/40	8515/70	

p-value کمتر از 0/05 معنی‌دار در نظر گرفته شده است.

جدول 3. میانگین غلظت سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم 20 برند کارخانجات لبنی به تفکیک ماه

کد	غلظت بنزوات سدیم (mg/kg)			غلظت سوربات پتاسیم (mg/kg)			میانگین غلظت بنزوات سدیم در سه ماه(mg/kg)	میانگین غلظت سوربات پتاسیم در سه ماه (mg/kg)
	تیر	مرداد	شهریور	تیر	مرداد	شهریور		
1	4/9	0	0	0	0	0	1/63	0
2	4/6	0	0	0	0	0	1/53	0
3	0	0	0	0	0	0	0	0
4	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	5/5	9/5	0	0	0	5	0
6	0	0	0	0	0	0	0	0
7	49/3	28/7	0	0	0	0	26	0
8	0	0	0	0	0	0	0	0
9	0	0	5	0	0	0	1/66	0
10	21/8	22	5/4	267/8	240	220	16/41	242/6
11	0	6	0	0	0	0	2	0
12	0	0	6	0	0	0	2	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	7/8	0	0	0	2/6	0
15	0	0	10	0	0	0	3/33	0
16	0	18/5	7/7	0	0	8/2	8/73	2/73
17	5/3	0	10/5	0	0	0	5/26	0
18	21	24	8/6	267/6	128	257	17/86	217/53
19	0	0	10	0	0	0	3/33	0
20	0	0	0	0	0	0	0	0

www.SID.ir

Archive of SID

نتایج تحقیق نشان داد غلظت سوربات پتاسیم در برندهای دوغ بررسی شده در شهر تهران در فصل تابستان اختلاف معنی‌داری داشتند (P<0/05) (جدول4). درحالی‌که اختلاف معنی‌داری در میانگین غلظت بنزوات سدیم در برندهای مورد بررسی مشاهده نگردید (جدول5).

جدول4، میانگین و انحراف معیار غلظت سوربات پتاسیم در 20 برند دوغ‌های صنعتی معروف عرضه شده در شهر تهران

تعداد برند	میانگین غلظت	انحراف معیار	حداقل غلظت	حداکثر غلظت	*p*
1	0	0	0	0	
2	0	0	0	0	
3	0	0	0	0	
4	0	0	0	0	
5	0	0	0	0	
6	0	0	0	0	
7	0	0	0	0	
8	0	0	0	0	
9	0	0	0	0	
10	242/5	23/9	220	267/6	<0/001
11	0	0	0	0	
12	0	0	0	0	
13	0	0	0	0	
14	0	0	0	0	
15	0	0	0	0	
16	2/7	4/7	0	8/2	
17	0	0	0	0	
18	217/6	77/7	128	267/8	
19	0	0	0	0	
20	0	0	0	0	

جدول5، میانگین و انحراف معیار غلظت بنزوات سدیم در 20 برند دوغ‌های صنعتی معروف عرضه شده در شهر تهران

تعداد برند	میانگین غلظت	انحراف معیار	حداقل غلظت	حداکثر غلظت	*p*
1	1/63	2/82	0	4/9	
2	1/53	2/65	0	4/6	
3	0	0	0	0	
4	0	0	0	0	
5	5	4/76	0	9/5	
6	0	0	0	0	
7	26	24/76	0	49/3	
8	0	0	0	0	
9	1/66	2/88	0	5	
10	16/4	9/52	5/4	22	0/055
11	2	3/46	0	6	
12	2	3/46	0	6	
13	0	0	0	0	
14	2/6	4/5	0	7/8	
15	3/33	5/77	0	10	
16	8/73	9/29	0	18/5	
17	5/26	5/25	0	10/5	
18	17/86	8/16	8/6	24	
19	3/33	5/77	0	10	
20	0	0	0	0	

www.SID.ir

Archive of SID

• بحث

بر اساس روش بکار گرفته شده در این تحقیق و نتایج حاصل از کروماتوگرافی مایع با کارآیی بالا، می‌توان نتیجه گیری نمود که این نوع کروماتوگرافی می‌تواند با طراحی صحیح و مناسب روشی سریع، دقیق و ساده در دسترس باشد. همچنین HPLC روشی است که برای جداسازی و اندازه‌گیری سوربیک اسید و بنزوئیک اسید کاربرد دارد (25-22). با توجه به این که مقدار مصرف روزانه دوغ در ایران و همچنین مقدار دریافت سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم از سایر منابع غذایی در رژیم روزانه مشخص نیست. بنابراین نمی‌توان میزان دریافت روزانه واقعی این مواد نگهدارنده را گزارش کرد.

طبق مطالعات انجام شده توسط Dong و همکاران (2006) وجود این دو نوع نگهدارنده در نوشیدنی‌های مختلف گزارش شده است (23). Pylypiw و همکاران در سال 2000 میزان سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم را در مواد مختلف غذایی از جمله آب‌میوه‌ها، سس سویا، پنیر خامه‌ای و کره بادام زمینی اندازه‌گیری کردند و نتایج تحقیق نشان داد که سطوح مختلف این نگهدارنده‌ها در مواد غذایی موجود می‌باشند (22).

بعلاوه نتایج مطالعات حاجی‌محمودی و همکاران (1390) بر روی 8 نمونه دوغ نشان داد که 62/5 درصد نمونه‌ها دارای بنزوات سدیم و 50 درصد نمونه‌ها دارای سوربات پتاسیم بودند (26). همچنین تحقیق یزدانیان و همکاران (1385) بر روی 43 نمونه دوغ نشان داد نگهدارنده سوربات پتاسیم به مقدار 15/57 درصد در نمونه‌ها گزارش شدند (27). مطابق استاندارد ملی ایران به شماره (2453) در مورد "ویژگی های دوغ و روش آزمون"، تولید کننده مجاز به استفاده هر دو نگهدارنده نمی‌باشد و حد مجازی در مورد مصرف این نگهدارنده‌ها در دوغ مشخص نیست. از این رو امید است، نتایج تحقیق حاضر، زمینه را برای مطالعات آتی در تدوین استاندارد فرآهم نماید.

بهینه سازی عوامل موثر در استخراج سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم: عوامل موثر بر کارآیی این روش شامل حجم محلول کارز، حجم حلال استخراجی، pH و سرعت سانتریفوژ می‌باشند. با حجم محلول کارز تا حد 1 mL سبب ترسیب کامل مزاحمت‌ها و پروتئین می‌شود. افزایش سرعت سانتریفوژ در حد 1389 g سبب افزایش کارآیی استخراج شده و پس از 1389 g تقریباً ثابت می‌ماند. نتایج حاصل از استخراج سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم با حجم‌های استخراجی مختلف نشان دهنده آن است که افزایش حجم استخراجی سبب کاهش غلظت سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم در محلول استخراج نهایی می‌شود و در نتیجه سطح زیر پیک و کارآیی استخراج کاهش می‌یابد، بنابراین 6 میلی‌لیتر حجم حلال استخراجی مناسب می‌باشد و حجم‌های کمتر از آن غیر قابل کاربرد است. نتایج نشان داد افزایش pH تا حد 12 کارآیی استخراج را افزایش می‌دهد. زیرا در pH قلیایی سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم به فرم یونی در آمده و انحلال پذیری در آب افزایش یافته اما در pHاسیدی فرم مولکولی سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم غالب شده و انحلال‌پذیری این ترکیبات در محلول استخراجی کاهش می‌یابد و کارآیی استخراج کند می‌گردد. بنابر این در pH =12 بیشترین پاسخ به دست آمد.

غلظت سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم در برندهای دوغ‌های صنعتی معروف عرضه شده در شهر تهران: با بررسی به عمل آمده بر روی غلظت سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم در نمونه دوغ‌های صنعتی عرضه شده در شهر تهران مشخص گردید که مصرف بنزوات سدیم نسبت به سوربات پتاسیم در واحدهای لبنی بیشتر است. تعداد واحدهای لبنی از نظر مصرف بنزوات سدیم در شهریور ماه نسبت به ماه‌های تیر و مرداد در فصل تابستان افزایش قابل ملاحظه‌ای نشان می‌دهد. افزایش مقدار بنزوات سدیم در نمونه هایی دوغ‌های موجود در سطح بازار می‌تواند به دلیل بالا بودن درجه حرارت در این فصل و عدم رعایت اصول بهداشتی باشد. با توجه به این که در مورد مقدار مصرف بنزوات سدیم و سوربات پتاسیم اطلاعات دقیقی در دسترس نیست و عوامل آلودگی از جمله مواد اولیه، فرآیند تولید، شدت و احتمال آلودگی ثانویه مشخص نیست، اما در تعداد نمونه‌های بررسی شده مصرف غیر مجاز مواد نگهدارنده برخلاف ضوابط جاری و استانداردهای مربوطه و فرمولاسیون اعلام شده در پروانه ساخت بیانگر مصرف بنزوات سدیم و سوربات پتاسیم در دوغ است.

نتایج تحقیق حاضر نشان داد که در اکثر دوغ‌های مورد بررسی سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم به منظور جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌ها مصرف می‌شوند، درحالی که حد مجازی برای مصرف آنها در نظر گرفته نشده است. از این رو امید است تحقیق حاضر قدمی برای تدوین استاندارد و

www.SID.ir

Archive of SID

تعیین حدود مجاز مصرف این مواد نگهدارنده‌ها در دوغ گردد. همچنین رعایت اصول بهداشتی در واحدهای لبنی می‌تواند در کاهش احتمال وقوع مخاطره موثر باشد و اجرای مؤثر سیستم تجزیه و تحلیل خطر و کنترل نقاط بحرانی (HACCP) و شیوه ساخت مناسب (GMP) و شیوه بهداشت مناسب (GHP) در واحدهای لبنی برای ارتقاء سطح بهداشت و رعایت اصول بهداشت مواد غذایی در تولید یا فرآوری محصول می‌تواند درکاهش احتمال وقوع مخاطره حائز اهمیت باشد. به علاوه مؤسسات و مراجع دولتی در قبال ایمنی غذا در صنایع غذایی و ارائه محصول سالم به جامعه مسئول بوده و چنانچه نواقصی در اجرای سیستم یا موارد عدم انطباق مشاهده نمودند، برخورد قانونی، در مورد واحد-های تولیدی اتخاذ می‌نمایند.

سپاسگزاری

این مقاله استخراج شده از پایان‌نامه‌ی دانشجویی شعبه‌ی بین‌الملل دانشگاه علوم‌پزشکی شهید بهشتی است. بدین وسیله از معاونت محترم آموزشی انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، به خاطر حمایت‌های انجام شده تشکر و قدردانی می‌شود.

• References

1. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Doogh-Specifications and test method. ISIRI no2453. 2nd revision, Karaj: ISIRI: 1998 [in Persian].
2. Abraham J, Millstone E. Food additive controls: Some international comparisons. Food Policy 1989; 14(1): 43-57.
3. G.El-Ziney M. GC-MS analysis of benzoate and sorbate in Saudi dairy and food products with estimation of daily exposure. J Food Tech 2009; 7 (4): 127-34.
4. De Mendonça AJG, Vaz MIPM, de Mendonça DIMD. Activity coefficients in the evaluation of food preservatives. Innov Food Sci Emerg Technol 2001; 2(3): 175-9.
5. Rangan C, Barceloux DG. Food Additives and Sensitivities. Disease-a-Month 2009; 55(5): 292-311.
6. Smith J. Food additives user's handbook. Translated by Lame H. Tehran: Islamic Azad University Scientific Publication Center. p. 155-7 [in Persian].
7. Lino CM, Pena A. Occurrence of caffeine, saccharin, benzoic acid and sorbic acid in soft drinks and nectars in Portugal and subsequent exposure assessment. Food Chem 2010; 121(2): 503-8.
8. Krebs HA, Wiggins D, Stubbs M, Sols A, Bedoya F. Studies on the antifungal action of benzoate. Bio J 1983; 214: 657-663.
9. Buazzi MM, Marth EH. Mechanism in the inhibition of Listeria monocytogenes by potassium sorbate. Food Microbiol 1991; 8, 249-56.
10. Institute of Standards and Industrial Research of Iran, Doogh-Specifications and test method. ISIRI no1250. 2nd revision, Karaj: ISIRI: 1998 [in Persian].
11. Soubra L, Sarkis D, Hilan C, Verger PH. Dietary exposure of children and teenagers to benzoates, sulphites, butylhydroxyanisol (BHA) and butylhydroxytoluen (BHT) in Beirut (Lebanon). Regul Toxicol Pharm 2007; 47(1): 68-77.
12. Institute of Standards and Industrial Research of Iran. food preservatives ISIRI no950. 2nd revision, Karaj: ISIRI 1997 [in Persian].
13. Saad B, Bari MDF, Saleh MI, Ahmad K, Talib KHM. Simultaneous determination of preservatives (benzoic acid, sorbic acid, methylparaben and propylparaben) in foodstuffs using high-performance liquid chromatography. J Chrom A 2005; 1073(1-2): 393-7.
14. Zengin N. The evaluation of the genotoxicity of two foodpreservatives: sodium benzoate and potassium benzoate. Food Chem Toxicol 2011; 49: 763-9.
15. Qi P, Hong H, Liang X, Liu D. Assessment of benzoic acid levels in milk in China. Food Cont 2009; 20(4): 414-8.
16. Codex alimentarius commission CX/NEA 09/5/8. Fifth Session.2009; Project Document for a Regional Standard for Doogh
17. Costa ACO, Perfeito LS,Tavares MFM, Micke GA. Determination of sorbate and benzoate in beverage samples by capillary 24 electrophoresis-Optimization of the method with inspection of ionic mobilities. J Chrom A 2008; 1204(1): 123-7.
18. Tfouni SAV, Toledo MCF. Determination of benzoic and sorbic acids in Brazilian food. Food Cont 2002; 13(2): 117-123.
19. Tang YM. Wu A. Quick method for the simultaneous determination of ascorbic acid and sorbic acid in fruit juices by capillary zone electrophoresis. Talanta 2005; 65(3): 794-8.
20. Zhang XY. Simultaneous rapid determination of eight food additives in foods by reversed-phase

www.SID.ir

Archive of SID

high performance liquid chromatography. Se Pu 2000; 18(6):539-42.

21. Guarino CH, Fuselli F, Mantia A, Longo L. Development of an RP-HPLC method for the simultaneous determination of benzoic acid, sorbic acid, natamycin and lysozyme in hard and pasta filata cheeses. Food Chem 2011. 127(3); 1294-9.

22. Pylypiw HM, Grether MT. Rapid high-performance liquid chromatography method for the analysis of sodium benzoate and potassium sorbate in foods. J Chrom A 2000. 883(1-2); 299-304.

23. Dong CH, Mei Y, Chen L. Simultaneous determination of sorbic and benzoic acids in food dressing by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. J Chrom A 2006; 1117(1): 109-14.

24. Sariri R, Ghafori H. Determination of sodium benzoate infood packaging by HPLC. Biosci J 2010; 4 (4): 37-45[in Persian].

25. ISO 9231. First edition. 2008; Milk and milk products-Determination of the benzoic and sorbic acid contents.

26. Haji Mahmoudi M, Zamani F, Shams Ardakani MR, Esmaeili F, Shanshin M. Determination of sorbate and benzoate in Drinks samples consumed in Tehran market by HPLC. 83rd conference of new achivements in medicine and paramedicine, 2011 Oct. 15-16, Esfehan, Iran [in Persian].

27. Yazdanyan G, Bakherad Z, Rashidi M, Khazri M. Quantification of potassium sorbate in dairy products and its effect as a preservative in yeast control.Mashad university of medical sciences, 2006, Mashad, Iran [in Persian].

www.SID.ir

Archive of SID

Potassium sorbate and sodium benzoate levels in doogh samples consumed by the Tehran market measured using high performance liquid chromatography

Vesal H[1], Mortazavian AM[2], Mohammadi AR[3], Esmaeili S[4]*

1- *M.Sc Student in Food Science and Technology, Students' Research Committee, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

2- *Associate prof, Dept.of Food Science and Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*
Email: mortazvn@sbmu.ac.ir

3- *Assistant prof, Dept.of Food Science and Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

4- *M.Sc in Food Science and Technology, Dept.of Food Science and Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran*

Received 24 Aug, 2013 **Accepted 23 Oct, 2013**

Background and Objective: Doogh is a fermented dairy product that is a national beverage in Iran. Considering the national importance of doogh and increased consumption in the population, the use of preservatives (sorbate and benzoate) to extend the shelf life of the product and reduce the microbial load should be controlled to guarantee the health of consumers. This study determined the amount of potassium sorbate and sodium benzoate in the doogh distributed in the city of Tehran.

Materials and Methods: Factors affecting the potassium sorbate and sodium benzoate extraction from doogh (pH of the sample, the extraction solvent volume, amount of Carrez solution and speed of centrifuge) were optimized. Approximately 90 experiments were analyzed in the laboratory to optimize the effective parameters for extraction efficiency. Then 60 non-carbonated heated doogh samples were selected from the Tehran market during the summer season. The samples were analyzed using high performance liquid chromatography (HPLC) for 3 consecutive summer months after optimization. The data was analyzed with SPSS V.16.0.

Results: The method proposed in this study was significantly less time-consuming than other techniques. It had the advantages such as acceptable accuracy, precision and elimination of interruptions in the samples. The results show there was no significant difference ($p<0.05$) between potassium sorbate and sodium benzoate in the samples supplied in Tehran during the summer. There were significant differences between samples ($p>0.05$) for potassium sorbate and the means of samples were not significantly different ($p<0.05$) for sodium benzoate. Samples 10 and 7 showed maximum potassium sorbate and sodium benzoate concentrations of 267.8 and 49.3 mg/kg, respectively. Samples 16 and 2 showed minimum concentration values of 8.2 and 4.6 mg/kg, respectively.

Conclusion: Although there is a limited consumption rate for potassium sorbate and sodium benzoate in doogh, these preservatives are used in most doogh distributed in Tehran. The results of this study can be effective for standardization of a limited consumption rate for potassium sorbate and sodium benzoate in this product.

Keywords: Potassium sorbate, Sodium benzoate, Doogh, High performance liquid chromatography

www.SID.ir