

بررسی غلظت بنزوات و سوربات در مواد غذایی مختلف در آذربایجان شرقی

فردین جوانمردی^{a*}، میثم براتی^b، محبوب نعمتی^c، سید رفیع عارف حسینی^d

^a دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.
^b دانشجوی کارشناسی ارشد تغذیه و رژیم درمانی، دانشکده تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.
^c استاد گروه کنترل غذا و دارو، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.
^d دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده تغذیه، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران.

تاریخ دریافت مقاله: ۱۳۹۴/۳/۲۳

تاریخ پذیرش مقاله: ۱۳۹۵/۳/۲۴

چکیده

مقدمه: بنزوات و سوربات برای جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌ها و برای افزایش ماندگاری مواد غذایی در اکثر محصولات غذایی استفاده می‌شوند. هدف از این مطالعه ارزیابی وضعیت آلودگی نمونه‌های مواد غذایی به این دو نگهدارنده با تکنیک میکرواستخراج مایع - مایع پخشی و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا بود. بنابراین در بین اقلام غذایی سعی شد که پرمصرف‌ترین آن‌ها، همچنین مواد غذایی که مصرف بنزوات و سوربات در آن‌ها هم مجاز و هم غیرمجاز می‌باشند انتخاب شوند.

مواد و روش‌ها: هشت نوع ماده غذایی شامل نوشابه (n=۱۵)، آب‌میوه (n=۱۵)، دوغ (n=۱۵)، شیر UHT (n=۱۵)، رب گوجه‌فرنگی (n=۱۵)، سس کچاپ (n=۱۵)، کیک (n=۱۵) و نان صنعتی (n=۹) برای آنالیز بنزوات و سوربات انتخاب شدند. برای آنالیز نمونه‌ها از روش میکرواستخراج مایع - مایع پخشی همراه با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا استفاده گردید. شرایط بهینه‌ای که برای روش میکرواستخراج مایع - مایع پخشی به دست آمده بود شامل: حجم نمونه (۵ میلی‌لیتر)؛ حجم محلول استخراجی (کلروفرم، ۲۵۰ میکرولیتر)؛ حجم محلول پخش شونده (استون، ۱/۲ میلی‌لیتر)؛ مقدار نمک به ازای هر ۵ میلی‌لیتر حجم نمونه (۰/۷۵ گرم) و pH نمونه (۴) بود.

یافته‌ها: از ۱۱۴ ماده غذایی آنالیز شده بنزوات در ۱۰۷ نمونه (۹۳/۸ درصد) و سوربات در ۶۰ نمونه (۵۲/۶ درصد) شناسایی شد. مقدار بنزوات در نمونه‌ها از مقدار کمتر از ۰/۱ تا ۱۵۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر متغیر بود و مقدار سوربات هم در دامنه ۰/۰۸-۲۳۰۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر قرار داشت. در بین نمونه‌های مواد غذایی؛ نمونه‌های نوشابه با مقدار بنزوات ۱۵۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر و مقدار سوربات ۲۳۰۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر بیشترین مقدار را دارا بودند. در مجموع مقدار بنزوات در ۷۴/۱ درصد نمونه‌ها و مقدار سوربات در ۲۴/۹ درصد نمونه‌ها بالاتر از حد مجاز برای این دو نگهدارنده در استاندارد ملی بودند، که در این میان نمونه‌های نوشابه و دوغ بیشترین درصد تقلبات را داشتند.

نتیجه‌گیری: به طور کلی مقدار سوربات و بنزوات در نوشابه‌ها، دوغ‌ها، آب‌میوه‌ها، شیر UHT، رب گوجه‌فرنگی و سس کچاپ بیشتر از حد مجاز استاندارد ملی اما مقدار این دو نگهدارنده در نان‌های صنعتی و کیک‌ها کمتر از حد مجاز استاندارد ملی بودند.

واژه‌های کلیدی: بنزوات، روش میکرواستخراج مایع - مایع پخشی، سوربات، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، مواد غذایی

مقدمه

افزودنی‌های غذایی مواد یا مخلوطی از مواد هستند که جزء اصلی غذا محسوب نمی‌شوند و به غذا به منظور تولید، فرآوری، انبار کردن و بسته بندی اضافه می‌شوند که این اصطلاح شامل آلودگی‌های احتمالی نمی‌شود. این مواد باید به طور مستقیم یا غیرمستقیم جزیی از ماده غذایی گردند و یا ویژگی‌های ماده غذایی را تحت تأثیر قرار دهند (Kritsunankul & Jakmunee, 2011). از جمله این افزودنی‌ها نگهدارنده‌ها هستند که به طور عمدی در فرایند تولید مواد غذایی افزوده شده تا از فساد میکروبی و تغییرات شیمیایی و آنزیمی جلوگیری کرده و باعث افزایش زمان ماندگاری مواد غذایی شوند. بر اساس قوانین سازمان غذا و داروی آمریکا (FDA) افزودنی‌های غذایی فقط در صورتی که به عنوان سالم و بی‌ضرر شناخته شده (GRAS) و بر روی برچسب مواد غذایی مقدار این افزودنی‌ها قید شده باشد، مجاز هستند. به عنوان مثال، سدیم بنزوات تا غلظت ۰/۱ درصد و پتاسیم سوربات تا حدود ۰/۲-۰/۱ درصد مجاز هستند (DeMan, 1999). بنزوات از pH=۲/۵ تا pH=۴/۵ قدرت میکروب‌کشی دارد به همین دلیل بیشتر در مواد غذایی اسیدی مانند نوشابه‌ها، آبمیوه‌ها، دوغ‌ها و غیره استفاده می‌شود. اسید سوربیک و نمک‌های سدیم، پتاسیم و کلسیم آن‌ها هم به طور گسترده در مواد غذایی استفاده می‌شوند و تا pH=۶/۵ قدرت میکروب‌کشی دارند (Tang & Wu, 2007; Tfouni & Toledo, 2002). استفاده از افزودنی‌های غذایی در کشورهای مختلف به وسیله‌ی قوانین مخصوصی محدود می‌شود، بسیاری از کشورها از قوانین^۱ JECFA در مورد ایمنی افزودنی‌های غذایی پیروی می‌کنند بر اساس قوانین JECFA مقدار مصرف افزودنی‌های غذایی که ایمنی بدن را مختل نمی‌کند با اصطلاح حد مجاز مصرف روزانه^۲ بیان می‌شود که به عنوان مقدار ماده افزودنی که روزانه فرد می‌تواند مصرف کند بدون اینکه آسیبی به سلامتی فرد وارد شود تعریف می‌شود. حد مجاز مصرف روزانه برای بنزوئیک اسید و نمک‌های آن ۵-۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و در مورد اسید سوربیک و نمک‌های آن به میزان ۲۵-۰

میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن انسان در نظر گرفته شده است (Pylypiw Jr & Grether, 2000). بنزوات اگر چه از سوی FDA به عنوان نگهدارنده‌ای که در لیست GRAS^۳ قرار دارد اما در اثر مصرف این نگهدارنده عوارض زیان‌آور مانند آسم، تشنج، کهیر و اسیدوز متابولیک حتی در دوزهای پایین را می‌توان مشاهده کرد. همچنین از عوارض دیگر مصرف بنزوات اثرات پوستی مانند کهیر، جوش و درماتیت پوستی نیز گزارش شده است. اما سوربات به دلیل اینکه در بدن قادر است از همان طریقی که اسیدهای چرب متابولیزه می‌شوند تجزیه شود بنابراین همانند اسیدهای چرب در بدن به آب و دی‌اکسیدکربن متابولیزه می‌شود. بنابراین اثرات سمی آن خیلی کمتر از بنزوات می‌باشد. فقط در موارد کمی عدم تحمل ویژه^۴ در اثر مصرف سوربات در انسان مشاهده شده است (Saad et al., 2005; Qi et al., 2009; Mota et al., 2003). در چند سال اخیر هم مطالعات مختلفی انجام شده که اثرات سرطان‌زایی و ژنوتوکسیکی این دو نگهدارنده را بررسی کرده‌اند. هر چند در دوزهای پایین اثرات سرطان‌زایی و ژنوتوکسیکی این دو نگهدارنده پایین است، اما به دلیل استفاده بی‌رویه بنزوات و سوربات در صنایع غذایی کشور ما احتمال خطر این دو نگهدارنده زیاد می‌باشد.

روش معتبر و دقیقی برای اندازه‌گیری این دو نگهدارنده در مواد غذایی برای تضمین کیفیت و ایمنی مواد غذایی لازم و ضروری است. تاکنون روش‌های مختلفی برای اندازه‌گیری بنزوات و سوربات در مواد غذایی گزارش شده است از جمله این روش‌ها می‌توان روش‌های اسپکتروفتومتری (Costa et al., 2008; Lozano et al., 2007; Kakemoto, 1992)، کروماتوگرافی گازی (Gonzalez et al., 1998; Techakriengkrai & Surakarnkul, 2007; Wen et al., 2003; Garcia et al., 2007)، کروماتوگرافی یونی (Chen & Wang, 2001; Costa et al., 2008)، کروماتوگرافی لایه نازک (Thomassin et al., 1997)، الکتروفورز لوله‌ی موئین (Tang & Wu, 2005; Ling et al., 2010) و بیوسنسور (Morales et al., 2002) و غیره

¹ Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives
³ Generally Recognized As Safe

² Acceptable Daily Intake
⁴ Idiosyncratic Intolerance

سس مایونز (Nour *et al.*, 2009)، مربا (Ferreira *et al.*, 2005; Mota *et al.*, 2003; Saad *et al.*, 2005)، خیارشور (Marjan *et al.*, 2011)، مارگارین (Tfouni *et al.*, 2003; Mota *et al.*, 2002; Toledo, 2002)، سرکه (HE *et al.*, 2010; Ulca *et al.*, 2013)، رب گوجه‌فرنگی (Nour *et al.*, 2009) و کیک (Marjan *et al.*, 2011) انجام گرفته بود. بنابراین در این مطالعه سعی شد که هشت نوع ماده غذایی از بین مطالعات انجام شده انتخاب شود، همچنین سعی شد که مواد غذایی پرمصرف و مواد غذایی که مقدار بنزوات و سوربات در آنها هم مجاز و هم غیر مجاز می‌باشند انتخاب شوند.

مواد و روش‌ها

- مواد شیمیایی و استانداردها

سدیم بنزوات، پتاسیم سوربات، کلروفرم، استون، اتانول، تتراکلروکربن و کارز ۱ و ۲ از شرکت Merck تهیه گردید. متانول و استونیتریل از شرکت Duksan pure کره جنوبی تهیه شدند. محلول استاندارد مخلوط با غلظت ۱۰۰ mg/L سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم تهیه شد.

- دستگاه HPLC

دستگاه HPLC مدل Knauer با ستون C₁₈، ۵ μm - ۲۵۰×۴/۶ mm، پمپ ۱۰۰۰-ک، شناساگر UV مدل ۲۵۰۰ و سانتریفوژ با دور ۴۵۰۰ rpm همگی ساخت آلمان بودند. جداسازی بنزوات و سوربات با بافر استات (pH=۴/۲) و استونیتریل با نسبت ۶۰ به ۴۰ به عنوان فاز متحرک، طول موج ۲۵۴ nm، سرعت ۱ mL/min، میزان حجم تزریق ۲۰ μL انجام شد.

- نمونه‌گیری

نمونه‌گیری به تصادف و بر اساس تاریخ‌های تولید مختلف از سوپرمارکت‌ها، فروشگاه‌ها و خرده‌فروش‌های سطح شهر تبریز انجام گرفت. هشت نوع ماده غذایی مختلف شامل نوشابه، آب‌میوه، دوغ، کیک، رب گوجه‌فرنگی، سس کچاپ، نان صنعتی و شیر UHT انتخاب شدند و جمعاً ۱۱۴ نمونه از سطح شهر جمع‌آوری

را نام برد. در بین این روش‌های آنالیز، کروماتوگرافی نتایج بهتری را به ما می‌دهد چون که این دو نگهدارنده در اکثر مواد غذایی با هم اضافه می‌شوند بنابراین روش‌های کروماتوگرافی توانایی شناسایی همزمان این دو نگهدارنده را با قدرت جداسازی بالا دارند. همچنین روش‌های کروماتوگرافی گازی به دلایل مراحل طولانی استخراج و آماده‌سازی و همچنین روش‌های مشتق‌سازی نسبت به روش‌های کروماتوگرافی مایع کارایی کمتری دارند. بنابراین روش‌های کروماتوگرافی مایع به دلیل مراحل آماده‌سازی کمتر و عدم نیاز به مشتق‌سازی به عنوان یک روش معتبر برای اندازه‌گیری بنزوات و سوربات کاربرد دارند (Wen *et al.*, 2007).

به دلیل استفاده‌ی بی‌رویه‌ی بنزوات و سوربات در صنایع غذایی کشور ما احتمال خطر این دو نگهدارنده زیاد می‌باشد. از آنجایی که این دو نگهدارنده در بعضی مواد غذایی مجاز هستند اما این دو نگهدارنده به طور وسیع در اکثر مواد غذایی دیگر نیز به صورت تقلب استفاده می‌شوند و در مواد غذایی مجاز هم بیش از حد مجاز از این نگهدارنده‌ها استفاده می‌شود. بنابراین هدف از این مطالعه اطلاع از وضعیت آلودگی مواد غذایی به بنزوات و سوربات و ارزیابی مقدار دریافتی این دو نگهدارنده در رژیم‌های غذایی و همچنین کشف تقلبات احتمالی در این مورد می‌باشد؛ و تا اینکه در نهایت ما بتوانیم خطری که از طریق این دو نگهدارنده ما را تهدید می‌کند تعیین کنیم. همچنین بهینه‌سازی روش میکرواستخراج مایع - مایع پخشی^۱ برای اندازه‌گیری بنزوات و سوربات در نمونه‌های مختلف مواد غذایی از اهداف دیگر این مطالعه می‌باشد. بنابراین با مروری بر منابع مختلف، مواد غذایی که در آنها مقدار بنزوات و سوربات اندازه‌گیری شده بود جمع‌آوری شدند. که بیشتر مطالعات در لینیات (Qi *et al.*, 2009; Bahremand & Eskandari, 2013; Aydin Yildiz *et al.*, 2012; Akbari-adergani *et al.*, 2013; Vesal *et al.*, 2013; Zamani Mazdeh *et al.*, 2014)، نوشابه (Lino & Tfouni & Toledo, 2002; Pena, 2010; Khosroukhavar *et al.*, 2010; Pan *et al.*, 2005)، آب‌میوه (Tfouni & Toledo, 2002; Mota *et al.*, 2003; Saad *et al.*, 2005) سس کچاپ (Pylypiw Jr & Grether, 2000; Mota *et al.*, 2003)

¹ Dispersive Liquid-Liquid Microextraction (DLLME)

شدند. برای هر یک از مواد غذایی پنج برند مختلف انتخاب شدند و از هر برند سه نمونه با تاریخ‌های تولید مختلف انتخاب شدند. به استثنای نان‌های صنعتی که به دلیل اینکه تعداد برندهای توزیع شده در سطح شهر تبریز کم بود بنابراین در مجموع سه برند از نان‌های صنعتی انتخاب شدند.

- آماده سازی نمونه‌ها

برای آماده سازی نمونه سعی شد از روش‌های موسوم به روش سبز استفاده شود به دلیل اینکه در این روش‌ها از مقدار محلول کمتری استفاده می‌شود یکی از این روش‌ها که در سال‌های اخیر توجه زیادی را به خود جلب کرده روش میکرواستخراج مایع - مایع پخشی است که توسط اسدی و همکاران در سال ۲۰۰۶ ابداع شد و از سال ۲۰۰۶ به بعد مقالات زیادی در این زمینه چاپ شده است.

نمونه‌های نوشابه به دلیل نداشتن ماتریکس پیچیده به آماده‌سازی احتیاج نداشتند؛ و روش میکرواستخراج مایع - مایع پخشی مستقیماً بر روی نمونه‌های نوشابه انجام - گرفت. نمونه‌های دوغ به دلیل داشتن چربی و پروتئین بالا نیاز به آماده سازی طولانی برای حذف چربی و پروتئین داشتند (Kokya et al., 2012). برای این کار ابتدا پنج میلی‌لیتر از نمونه‌ی دوغ انتخاب شد، سپس با سانتریفوژ با دور ۴۵۰۰ سانتریفوژ شد بنابراین چربی و پروتئین آن‌ها در ته لوله جمع شد و مایع بالایی با کاغذ صافی صاف گردید. در مرحله بعد یک میلی‌لیتر از مایع بالایی با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر رقیق شد و در نهایت پنج میلی‌لیتر از این مایع برای انجام مراحل میکرواستخراج مایع - مایع پخشی انتخاب شد (Kamankesh et al., 2013). برای نمونه‌های آب میوه ابتدا یک میلی‌لیتر از نمونه آب میوه با ۱۰ میلی‌لیتر از آب مقطر رقیق شد. برای آب‌میوه‌های صاف مانند انار و انگور نیاز به سانتریفوژ نداشتند، اما برای آب-میوه‌های کدر بعد از رقیق سازی باید به مدت پنج دقیقه سانتریفوژ می‌شدند، سپس پنج میلی‌لیتر از نمونه به لوله‌ای دیگر منتقل می‌شد تا مراحل میکرواستخراج مایع - مایع پخشی روی آن انجام شود (Toledo & Tfouni 2002). برای نمونه‌های شیر ابتدا یک میلی‌لیتر از نمونه‌ها با ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر رقیق می‌شد، بعد یک میلی‌لیتر کارز I و ۱ mL کارز II به نمونه‌های رقیق شده اضافه شد، بعد

به مدت یک دقیقه به وسیله هم‌زن هم زده شد تا اینکه چربی‌ها و پروتئین‌ها رسوب داده شوند. در مرحله بعد به مدت پنج دقیقه با سانتریفوژ با دور ۴۵۰۰، سانتریفوژ گردید. سپس مایع بالایی برداشته شد و با کاغذ صافی صاف گردید بعد پنج میلی‌لیتر از آن به لوله‌ی دیگر منتقل گردید و روش میکرواستخراج مایع - مایع پخشی بر روی آن اجرا شد (Qi et al., 2009). برای نمونه‌های کیک و نان صنعتی ابتدا پنج گرم از کیک یا نان با ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط گردید، و به مدت دو دقیقه هم زده شد تا کاملاً با آب مخلوط شود، بعد با کاغذ صافی صاف گردید. سپس پنج میلی‌لیتر از مایع صاف شده به لوله‌ی دیگر منتقل گردید تا عملیات میکرواستخراج مایع - مایع پخشی بر روی آن انجام شود (Marjan et al., 2011). برای آماده سازی نمونه‌های رب گوجه‌فرنگی و سس کچاپ پنج گرم از نمونه‌های سس کچاپ با ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر مخلوط شدند و سپس ۱۰ میلی‌لیتر از آن برداشته شد و با سانتریفوژ با دور ۴۵۰۰ به مدت پنج دقیقه سانتریفوژ گردید تا مواد جامد محلول در نمونه‌های سس در ته لوله رسوب کند و پنج میلی‌لیتر از مایع بالایی را که صاف شده به لوله‌ی دیگری منتقل گردید تا مراحل میکرواستخراج مایع - مایع پخشی انجام شود (Ulca et al., 2013; Dong et al., 2006).

- طراحی آزمون‌های بهینه‌سازی عوامل موثر در استخراج بنزوات و سوربات

بهینه‌سازی متغیرهای موردنظر شامل: انتخاب بهترین محلول پخش‌شونده (متانول، استون، استونیتریل و اتانول)، انتخاب بهترین محلول استخراج‌کننده (کلروفرم و تتراکلروکربن)، انتخاب بهترین حجم برای محلول پخش-شونده (۰ تا ۲ میلی‌لیتر)، انتخاب بهترین حجم برای محلول استخراج‌کننده (۵۰ تا ۲۵۰ میکرولیتر)، تنظیم pH (۲، ۳، ۴، ۵، ۶)، مقدار نمک (۰، ۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ گرم در ۵ میلی‌لیتر) بودند (Kokya et al., 2012).

- روش میکرواستخراج مایع - مایع پخشی

برای این کار ابتدا برای تمام نمونه‌ها پنج میلی‌لیتر نمونه برداشته شد، سپس pH آن‌ها روی چهار تنظیم شد (البته بعضی از نمونه‌ها مانند نوشابه که احتیاج به آماده-

نرم افزار Excel Microsoft نسخه ۲۰۱۳ گزارش شد.

یافته‌ها

- بهینه‌سازی روش میکرواستخراج مایع - پخشی

جهت بهینه‌سازی این روش چهار محلول به عنوان فاز پخش شونده و دو محلول به عنوان فاز استخراجی انتخاب گردید که محلول‌های پخش شونده شامل استونیتریل، متانول، استون و اتانول و محلول‌های استخراجی شامل کلروفرم و تتراکلروکربن بودند. که در نهایت استون به عنوان محلول پخش شونده و کلروفرم به عنوان محلول استخراجی بهترین راندمان را برای استخراج بنزوات و سوربات داشتند (شکل ۱).

برای انتخاب بهترین حجم محلول پخش شونده غلظت‌های ۰ تا ۲ میلی‌لیتر انتخاب شدند که در نهایت بهترین حجم ۱/۲ میلی‌لیتر انتخاب شد. در غلظت‌های پایین‌تر از ۱/۲ میلی‌لیتر راندمان استون در اختلاط بین فاز کلروفرم و فاز آبی کاهش می‌یافت، بنابراین مهاجرت آنالیت‌های بنزوات و سوربات به داخل کلروفرم بهتر صورت نمی‌گرفت، در نتیجه راندمان استخراج کاهش می‌یافت. اما در غلظت‌های بالای ۱/۲ میلی‌لیتر به دلیل حجم زیاد استون، باعث می‌شد که اختلاط بین استون با فاز آبی زیاد شود در نتیجه حجم زیادی از فاز آبی را با خود حل کند و در نهایت بخشی از فاز آبی در فاز انتهایی کلروفرم جمع شود. این کار هم باعث می‌شد که بنزوات و سوربات حلالیت آن‌ها در فاز آبی زیاد شود و در نتیجه در فاز انتهایی کلروفرم، بنزوات و سوربات کمی جمع شود و هم اینکه حجم فاز انتهایی زیاد می‌شد در نتیجه فاکتور تغلیظ کاهش می‌یافت.

همچنین برای انتخاب بهترین حجم محلول استخراج کننده غلظت‌های ۵۰ تا ۲۵۰ میکرولیتر انتخاب شدند، که در نهایت حجم ۲۵۰ میکرولیتر به عنوان حجم بهینه انتخاب شد. از غلظت ۵۰ تا ۲۵۰ میکرولیتر باز یافت بنزوات و سوربات افزایش می‌یافت، در بیشتر از ۲۵۰ میکرولیتر باز یافت افزایش پیدا نکرد و تقریباً در حد ثابتی باقی ماند.

سازی نداشتند و از آنجایی که pH اولیه خود نمونه‌های نوشابه نزدیک چهار بود بنابراین احتیاج به تنظیم pH نداشتند ولی بقیه‌ی نمونه‌ها بعد از رقیق‌سازی باید pH آن‌ها تنظیم می‌شد، سپس ۰/۷۵ گرم نمک به پنج میلی‌لیتر نمونه‌ی محلول اضافه گردید. سپس ۱/۲ میلی‌لیتر استون و ۲۵۰ میکرولیتر کلروفرم در داخل ویال‌های کوچکی مخلوط می‌شدند و با سرنگ دو میلی‌لیتر به داخل نمونه‌ی محلول با فشار تزریق می‌گردید؛ در این حالت کلروفرم و استون به صورت قطرات ریز در داخل محلول آبی کاملاً پخش می‌شدند در نتیجه استون به صورت یک رابط بین کلروفرم و فاز آبی عمل می‌کرد و باعث استخراج بنزوات و سوربات از فاز آبی به داخل کلروفرم می‌شد. بعد با سانتریفوژ با دور ۴۵۰۰ سانتریفوژ می‌شد تا اینکه کلروفرم در ته لوله جمع شود بعد به ویال‌های دو میلی‌لیتر منتقل می‌شد سپس با گاز ازت خشک می‌شد و در نهایت با ۱۰۰ میکرولیتر از فاز متحرک رقیق می‌گردید و ۲۰ میکرولیتر از آن به دستگاه HPLC تزریق می‌شد.

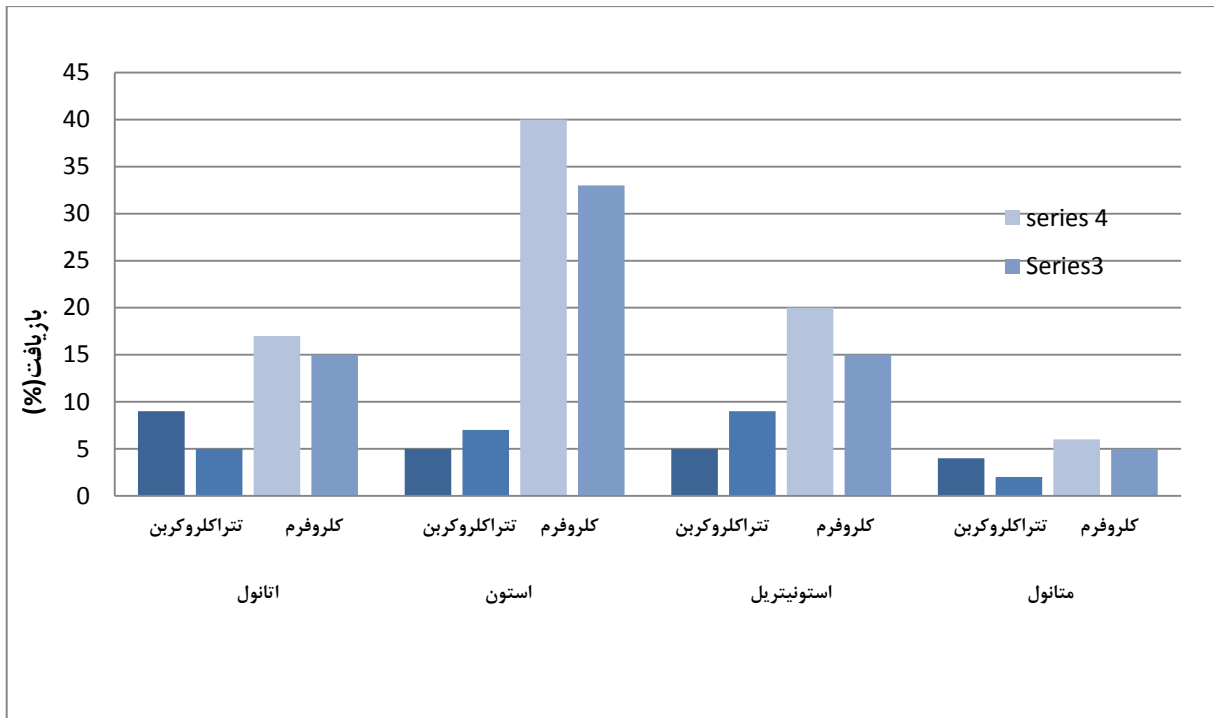
- معتبرسازی^۱ روش اندازه‌گیری برای استخراج بنزوات و سوربات

برای اعتبار روش میکرواستخراج مایع - مایع پخشی از فاکتورهای مختلفی استفاده شد که شامل بازیافت^۲ (سه غلظت ۱۵، ۳۰ و ۴۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر به ماتریکس‌های مختلف مواد غذایی اضافه شد)، محدوده خطی بودن (غلظت‌های ۱، ۵، ۱۰، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰، ۴۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از استاندارد بنزوات و سوربات)، دقت و صحت (غلظت‌های ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۵، ۵۰ و ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر در روزهای مختلف^۳ و در یک روز در ساعت‌های مختلف^۴ به مواد غذایی اضافه شدند و بازیافت آنها محاسبه شد) و حد تشخیص^۵ و حد اندازه‌گیری^۶ بودند.

- تجزیه و تحلیل آماری

داده‌های مربوط به اندازه‌گیری سوربات و بنزوات به صورت میانگین و انحراف معیار و با استفاده از

¹ Method Validation ² Recovery ³ Inter-day ⁴ Intra-day ⁵ Limit of Detection (LOD)=3* Standard deviation/ Slope ⁶ Limit of Quantification (LOQ)=10* Standard deviation/ Slope



شکل ۱- انتخاب بهترین محلول استخراج کننده و پخش شونده برای روش میکرواستخراج مایع - مایع پخشی در شرایط: حجم نمونه، ۵mL؛ حجم محلول پخش شونده، ۱mL؛ حجم محلول استخراج کننده، ۱۰۰mL (بدون در نظر گرفتن شرایط اپتیمم بلکه فقط برای انتخاب جفت محلول مناسب برای مراحل بعد).

گرم میزان بازیافت افزایش چشمگیری داشت از ۰/۷۵ گرم بیشتر کلروفورم در انتهای لوله ته نشین نمی شد بلکه روی سطح مایع جمع می شد و باعث از کنترل خارج شدن آماده سازی نمونه می شد در نتیجه جداسازی کلروفورم را با مشکل مواجه می کرد؛ بنابراین غلظت ۰/۷۵ گرم در هر پنج میلی لیتر به عنوان مقدار نمک اپتیمم برای روش میکرواستخراج مایع - مایع پخشی انتخاب شد.

معتبرسازی روش میکرواستخراج مایع - مایع پخشی

نتایج حاصل از معتبرسازی در نمونه های مختلف مواد غذایی در جدول ۱ نشان داده شده است.

بررسی وجود بنزوات سدیم و سوربات پتاسیم در نمونه های مختلف مواد غذایی

هشت نمونه ی مواد غذایی بعد از آماده سازی اولیه به دستگاه HPLC تزریق شدند و هر نمونه سه بار به دستگاه تزریق شد و در نهایت برای هر نمونه میانگین سه بار

برای تنظیم pH محدوده ی دو تا شش انتخاب شدند چون کلروفورم غیرقطبی است بنابراین بنزوات و سوربات باید به شکل مولکولی درآیند تا بتوانند بیشتر در کلروفورم حل شوند. چون بنزوات و سوربات به ترتیب دارای pKa ۴/۱۹ و ۴/۷۶ هستند؛ باید pH به زیر pKa برده شود تا اینکه قسمت اعظم بنزوات و سوربات به صورت یونیزه نشده در آیند، و قابلیت حل شدن در کلروفورم را داشته باشند. در pH نزدیک چهار، ۶۰ درصد از بنزوات و ۸۶ درصد از سوربات به صورت تفکیک نشده قرار دارند. در pH های پایین تر از چهار یعنی pH نزدیک دو و سه باز هم مقدار بنزوات و سوربات یونیزه شده افزایش می یافت. بنابراین در نهایت pH=۴ به عنوان بهترین pH انتخاب شد.

مقدار نمک (NaCl) از محدوده ی صفر تا یک گرم به ازای هر پنج میلی لیتر نمونه ی محلول انتخاب شدند در حالتی که نمک اضافه نشده بود بازیافت خیلی پایین بود، و این نشان می داد که نمک تأثیر خیلی زیادی روی راندمان بازیافت دارد. بنابراین از غلظت های پایین تا غلظت ۰/۷۵

جدول ۱- نتایج معتبرسازی برای روش میکرواستخراج مایع - مایع پختشی

RSD ^a (%)		LOQ (µg/mL)	LOD (µg/mL)	Mean Recovery ^b (%)	R ²	Concentration range	آنالیت
Intra-day	Inter-day						
۶/۵	۷/۸	۰/۵	۰/۱	۱۰۶	۰/۹۹۹۰	۱-۵۰۰	بنزوات
۵/۲	۷/۱	۰/۳	۰/۰۸	۱۰۱	۰/۹۹۸	۱-۵۰۰	سوربات

^a n=6, ^b n=3

جدول ۲- مقادیر مجاز برای هر یک از مواد غذایی

نمونه‌ها	نگهدارنده‌ها	استاندارد ملی ایران ^۱	کدکس آلیمنتاریوس ^۲	کمیسیون اروپا ^۳
نو شابه	بنزوات	۱۵۰ ppm	۶۰۰ ppm	۱۵۰ ppm
	سوربات	۵۰۰ ppm	۵۰۰ ppm	۳۰۰ ppm
دوغ	بنزوات	غیر مجاز	غیر مجاز	غیر مجاز
	سوربات	غیر مجاز	۱۰۰۰ ppm	غیر مجاز
آب میوه	بنزوات	غیر مجاز	۱۰۰۰ ppm	غیر مجاز
	سوربات	غیر مجاز	۱۰۰۰ ppm	غیر مجاز
شیر UHT ^۵	بنزوات	غیر مجاز	غیر مجاز	غیر مجاز
	سوربات	غیر مجاز	غیر مجاز	غیر مجاز
سس کچاپ	بنزوات	غیر مجاز	غیر مجاز	غیر مجاز
	سوربات	غیر مجاز	غیر مجاز	غیر مجاز
نان صنعتی	بنزوات	غیر مجاز	غیر مجاز	غیر مجاز
	سوربات	۵۰۰ ppm	۱۰۰۰ ppm	۲۰۰۰ ppm
رب گوجه‌فرنگی	بنزوات	غیر مجاز	غیر مجاز	غیر مجاز
	سوربات	غیر مجاز	غیر مجاز	غیر مجاز
کیک	بنزوات	غیر مجاز	غیر مجاز	غیر مجاز
	سوربات	۵۰۰ ppm	۱۰۰۰ ppm	۲۰۰۰ ppm

^۱ <http://www.isiri.org/Portal/Home>

^۲ CODEX S. STAN 192-1995. Codex general standard for food additives Joint FAO/WHO Food Standards Programme, FAO, Rome. 1995.

^۳ Commission E. Commission Regulation (EU) No 1129/2011 of 11 November 2011 amending Annex II to Regulation (EC) No 1333/2008 of the European Parliament and of the Council by establishing a Union list of food additives. Official Journal of the European Union L.

^۴ parts per millions

^۵ Ultra High Temperature

حد مجاز بودند. اما در کیک‌ها هر دو نگهدارنده پایین‌تر از حد مجاز بودند. در نان‌های صنعتی مقدار سوربات شناسایی شده پایین‌تر از حد مجاز استاندارد ملی بود. اما بنزوات در حالی در نمونه‌های نان شناسایی شد که استفاده از بنزوات در نان غیرمجاز می‌باشد. اما مقدار بنزوات و سوربات شناسایی شده در اکثر نمونه‌ها با ادعای روی برچسب هم‌خوانی نداشت. جدول ۳ میزان تقلبات صورت گرفته در نمونه‌های نوشابه، کیک و نان صنعتی را نشان می‌دهد.

تزیق گزارش شد. مقادیر مجاز اعلام شده توسط سازمان استاندارد ملی ایران، کدکس آلیمنتاریوس^۱ و کمیسیون اروپا^۲ برای هر کدام از مواد غذایی آنالیز شده در جدول ۲ نمایش داده شده است. پس از آنالیز مقدار بنزوات و سوربات در نوشابه‌ها، کیک‌ها و نان‌های صنعتی که اضافه کردن این دو نگهدارنده در آن‌ها مجاز می‌باشد، نتایج نشان داد که مقدار بنزوات و سوربات در نمونه‌های نوشابه در سه برند بیشتر از

^۱ CODEX Alimentarius

^۲ European Commission

شکل ۲ کروماتوگرام نمونه‌های مختلف غذایی را نشان می‌دهد.

بحث

روش میکرواستخراج مایع - مایع پخشی که در این مطالعه بهینه شد در مقایسه با روش‌های دیگر که برای آنالیز بنزوات و سوربات به کار رفته بودند دارای مزایای مختلفی بود. از جمله مهم‌ترین این مزایا حجم محلول مصرفی کم، پایین بودن زمان استخراج و حساسیت بالا در این روش در مقایسه با روش‌های دیگر بود (جدول ۵).

در نمونه‌های دوغ، آب‌میوه، سس کچاپ، رب گوجه‌فرنگی و شیر UHT بر اساس استاندارد ملی ایران استفاده از بنزوات و سوربات ممنوع می‌باشد، میزان بنزوات و سوربات یافت شده در این محصولات در جدول ۴ نشان داده شده است. بعضی از این مقادیر ناشی از مقدار بنزوات و سورباتی است که به طور طبیعی در مواد اولیه یا در هنگام تولید و نگهداری ممکن است تولید شده باشد. در بعضی از نمونه‌ها هم مقدار بنزوات و سوربات به صورت تقلب توسط تولیدکنندگان در خارج از محدوده‌ی مجاز استاندارد ملی استفاده شده است. بنابراین در جدول ۴ هر دو عامل با هم در نظر گرفته شده است.

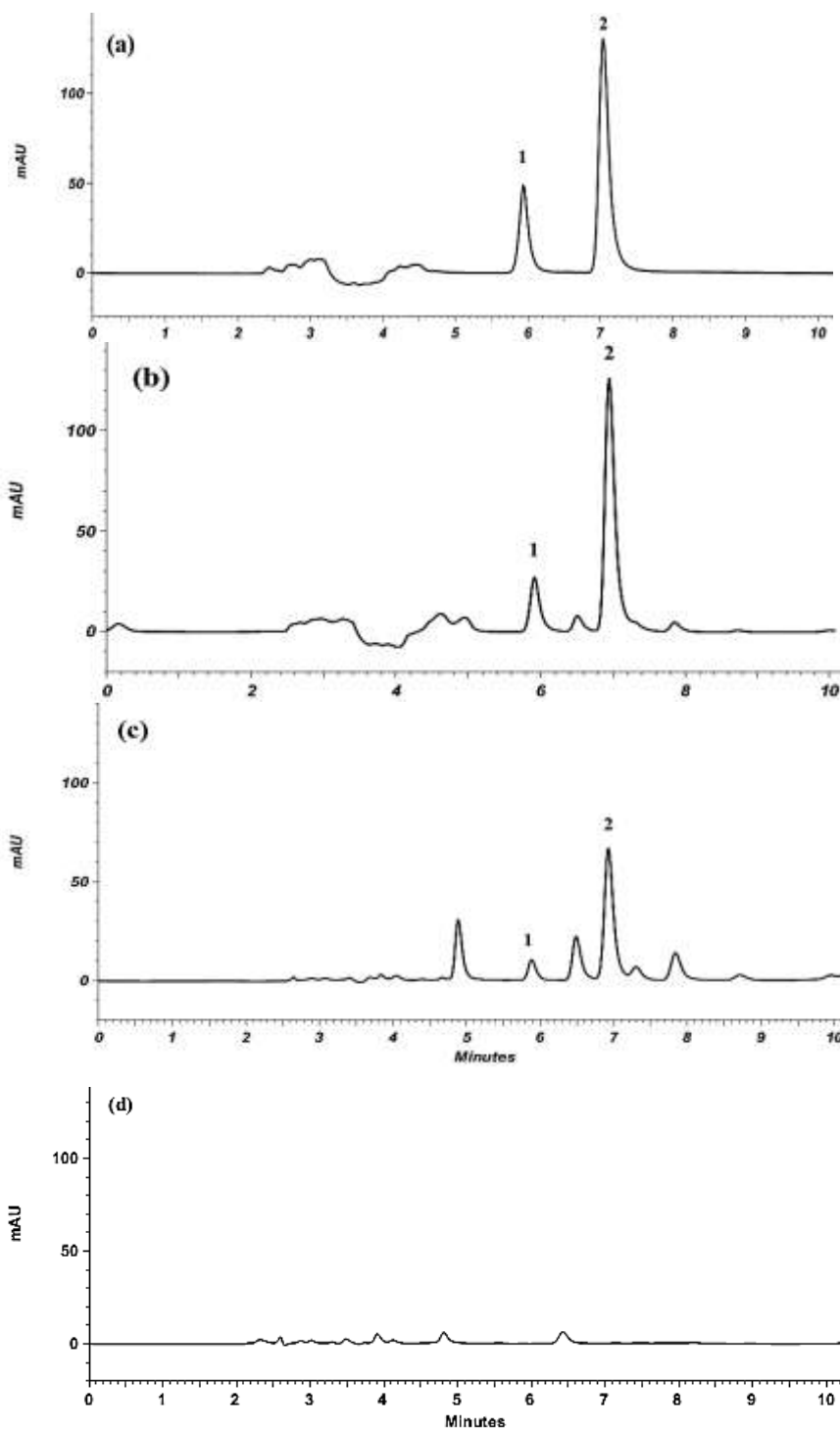
جدول ۳- میزان عدم مطابقت بنزوات و سوربات شناسایی شده با استاندارد ملی و ادعای روی برچسب

نمونه	نگهدارنده	تعداد نمونه	محدوده غلظت شناسایی شده ($\mu\text{g/mL}$)	میانگین غلظت‌ها ($\mu\text{g/mL}$)	انحراف معیار	خارج از محدوده استاندارد ملی (درصد)	درصد نمونه‌های با میزان بنزوات و سوربات بیش از حد مجاز
نوشابه	بنزوات سوربات	۱۵	۳/۵-۱۵۲۰	۶۳۱/۵	۴/۷	۴۰	۱۰۰
کیک	بنزوات سوربات	۱۵	۱۲-۵۴/۷	۳۲/۴	۰/۶	صفر	۱۰۰
نان	بنزوات	۹	۶۷۲/۷-۱۳۶۹	۹۴۶/۷	۸/۵	صفر	۱۰۰
صنعتی	بنزوات سوربات	۹	۴/۷-۲۲۸/۶	۸۵	۲/۲	۱۰۰	۱۰۰
	سوربات		۱۶/۱-۱۵۰۰	۳۴۹/۶	۳/۵	صفر	۱۰۰

۴۴

جدول ۴- میزان بنزوات و سوربات شناسایی شده در مواد غذایی که استفاده از این دو نگهدارنده در آنها ممنوع است

نمونه	نگهدارنده	تعداد نمونه	محدوده غلظت شناسایی شده ($\mu\text{g/mL}$)	میانگین غلظت‌ها ($\mu\text{g/mL}$)	انحراف معیار	درصد نمونه‌ها با میزان بیشتر از حد مجاز نگهدارنده
دوغ	بنزوات سوربات	۱۵	۱۴۳/۵-۴۴۸/۸	۲۳۹	۳/۳	۱۰۰
آب‌میوه	بنزوات سوربات	۱۵	۷۵/۸- غیر قابل تشخیص	۱۳/۴	۲/۴	۲۰
شیر UHT	بنزوات سوربات	۱۵	۹۵/۵- غیر قابل تشخیص	۲۴/۲	۰/۷	۹۳/۳
سس کچاپ	بنزوات سوربات	۱۵	۱۳- غیر قابل تشخیص	۲/۳	۰/۱	۴۶/۶
رب گوجه-فرنگی	بنزوات سوربات	۱۵	۸/۹-۲۸	۱۳/۶	۰/۲	۱۰۰
	سوربات		۴/۴- غیر قابل تشخیص	۱/۴	۰/۱	۵۳/۳
	بنزوات	۱۵	۳۸/۷- غیر قابل تشخیص	۱۳	۰/۹	۷۳/۳
	سوربات		۶۴/۶- غیر قابل تشخیص	۱۰/۸	۱/۵	۲۰
	بنزوات	۱۵	۲۷/۷- غیر قابل تشخیص	۱۶	۰/۹	۸۶/۶
	سوربات		۲/۸- غیر قابل تشخیص	۱/۵	۰/۱	۴۰



۴۵

شکل ۲- نمودار کروماتوگرافی بدست آمده برای نمونه‌های دوغ با: میکرواستخراج مایع - مایع پخشی و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (a) محلول استاندارد، (b) تزریق نمونه‌های دوغ با اضافه کردن استاندارد، (c) نمونه‌های دوغ دارای بنزوات و سوربات، (d) نمونه‌های سس کچاپ فاقد بنزوات و سوربات. ۱. بنزوات و ۲. سوربات.

برای جلوگیری از رشد باکتری‌ها و کپک و مخمرها بود. حداقل مقدار بنزوات و سوربات برای جلوگیری از رشد باکتری‌ها بستگی به جنس و گونه‌ی باکتری‌ها، pH ماده غذایی و سایر فاکتورهای دیگر دارد اما معمولاً بنزوات در

مقادیر بنزوات و سوربات در نمونه‌های نوشابه کاملاً نامتجانس بودند در بعضی از نمونه‌ها مقدار این دو نگهدارنده چند برابر مقدار مجاز بود در حالی که در بعضی دیگر از نمونه‌ها مقدار این دو نگهدارنده پایین‌تر از حد لازم

جدول ۵- مقایسه روش میکرواستخراج مایع - مایع پخششی با دیگر روش‌های آماده‌سازی نمونه

منبع	حجم محلول استخراجی (mL)	زمان استخراج (دقیقه)	^۲ LOD (µg/mL)	^۱ RSD (درصد)	بازیافت (درصد)	آنالیت	ماتریکس	روش
(Wen <i>et al.</i> , 2007)	۱۰ >	۱۲	۱/۲ ۰/۹	۷/۶ ۸	۹۲/۷ ۹۵/۴	بنزوات سوربات	سس	^۳ SPME-HPLC
(Techakriengkrai and Surakarnkul, 2007)	۲ >	۱۵	۰/۲ ۰/۱	۱/۹ ۱/۹	۹۵/۷ ۹۵/۲	بنزوات سوربات	شراب	^۴ SPE-HPLC
(Dong and Wang, 2006)	۱۰ >	۴۰	۰/۰۱ ۰/۰۵	۶/۲ < ۸/۶ <	۹۴ ۹۴/۳	بنزوات سوربات	نوشابه	^۵ HS-SPME-GC
(Saad <i>et al.</i> , 2005)	۲۵ >	۲۳	۰/۵ ۰/۱	۲/۷ ۲/۹	۱۰۶ ۱۰۴	بنزوات سوربات	مواد غذایی مختلف	^۶ LLE-HPLC
(Pylypiw Jr and Grether, 2000)	۱۰ >	۵ >	۱ ۱	- -	۹۶ ۹۳	بنزوات سوربات	آبمیوه	^۷ Filtration-HPLC
(Costa <i>et al.</i> , 2008)	۳۷	۴	۰/۹ ۰/۳	۲/۸ ۲/۵	۹۷/۹ ۹۸/۲	بنزوات سوربات	نوشابه	^۸ LLE-CE
(Ochiai <i>et al.</i> , 2002)	-	۱۲۰	۳/۳ ۰/۲	۲/۴ ۲/۹	۱۰۳ ۹۹	بنزوات سوربات	سس سویا	^۹ SBSE-GC
این مطالعه	۰/۲۵	۲	۰/۱ ۰/۰۸	۷/۱ ۶/۱	۱۰۵ ۱۰۱	بنزوات سوربات	مواد غذایی مختلف	^{۱۰} DLLME-HPLC

^۱. Relative standard deviation

^۲. Limit of detection.

^۳. Solid-phase microextraction- High Performance Liquid chromatography

^۴. Solid-phase sorbent extraction - High Performance Liquid chromatography

^۵. Headspace - solid-phase microextraction- Gas chromatography

^۶. Liquid-liquid extraction- High Performance Liquid chromatography

^۷. Filtration- High Performance Liquid chromatography

^۸. Liquid-liquid extraction- capillary electrophoresis

^۹. Stir-bar sorptive extraction- Gas chromatography

^{۱۰}. Dispersive liquid-liquid microextraction- High Performance Liquid chromatography

نمونه‌های نوشابه در حدود ۳۸۲ ppm بود (Sariri & Ghafouri, 2010).

دوغ یک نوشیدنی بومی در ایران و یک نوشیدنی تخمیری به حساب می‌آید که از مخلوط ماست، آب، نمک، ادویه و باکتری‌های استارتر برای تنظیم pH به دست می‌آید. این محصول دارای مواد مغذی فراوان، خواص درمانی زیاد و همچنین دارای اثرات سلامتی بخش از جمله بهبود هضم لاکتوز، کاهش کلسترول خون و تحریک سیستم ایمنی بدن می‌باشد. طبق استاندارد ایران و مقررات کمیسیون اروپا استفاده از بنزوات و سوربات و هر نوع نگهدارنده در نمونه‌های دوغ ممنوع می‌باشد، این در حالیست که در مطالعه ما مقدار بنزوات زیادی در نمونه‌های دوغ شناسایی شدند. مطالعات زیادی در زمینه‌ی اندازه‌گیری بنزوات و سوربات در نمونه‌های دوغ انجام شده است از جمله می‌توان به مطالعات اسفندیاری و همکاران (۲۰۱۳)،

محدوده‌ی ۲۰-۷۰۰ ppm و سوربات هم در محدوده‌ی ۱۰۰-۱۰۰۰ ppm بیشترین خاصیت ضد کپکی و مخمری را دارند (Jay *et al.*, 2005). مطالعات دیگری هم در زمینه-ی اندازه‌گیری بنزوات و سوربات در نوشابه انجام شده که از آن جمله می‌توان به مطالعه‌ی خسروخاور و همکارانش (۲۰۱۰) اشاره کرد که مقدار بنزوات و سوربات را در نمونه‌های نوشابه در سطح شهر تهران به وسیله HPLC اندازه‌گیری کرده بودند که نتایج این تحقیق نشان داد که مقدار بنزوات و سوربات به ترتیب از محدوده‌ی غیر قابل تشخیص تا ۲۴۷۷ میلی‌گرم بر لیتر و محدوده‌ی غیر قابل تشخیص تا ۳۲۸ میلی‌گرم بر لیتر متغیر بودند (Khosroukhavar *et al.*, 2010). همچنین در مطالعه‌ای دیگر سریری و غفوری (۲۰۱۰) مقدار بنزوات را در مواد غذایی مختلف به وسیله HPLC در سطح شهر رشت اندازه‌گیری کردند که مقدار بنزوات اندازه‌گیری شده در

زمانی و همکاران (۲۰۱۴)، بهره‌مند و همکاران (۲۰۱۳) که میانگین غلظت بنزوات را به ترتیب ۵/۵۸، ۲۱/۳±۲/۷ و ۱۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم گزارش کردند. همچنین میانگین غلظت سوربات در این سه مطالعه به ترتیب برابر غیر قابل تشخیص، ۱۳/۳±۳۹ و ۱۳/۰۷ میلی‌گرم بر کیلوگرم بود؛ که نشان از مقدار پایین بنزوات و سوربات شناسایی شده در این سه مطالعه بود (Bahremand & Eskandari, 2013; Esfandiari et al., 2013, Zamani Mazdeh et al., 2014). همچنین اکبری-ادرگانی و همکاران (۲۰۱۳) اقدام به جمع‌آوری نمونه‌های دوغ در تهران کردند و پس از آنالیز نمونه‌ها مقدار بنزوات را از مینیمم ۱۸/۳ تا ماکزیمم ۲۳۴۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم و مقدار سوربات را از غیر قابل تشخیص تا ۴۹۶۱/۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم گزارش کردند (Akbari-adergani et al., 2013). در مطالعه‌ای دیگر وصال و همکاران (۲۰۱۳) در تهران اقدام به آنالیز نمونه‌های دوغ برای شناسایی غلظت بنزوات و سوربات کردند که نتایج این مطالعه نشان داد که دوغ‌های صنعتی عرضه شده در شهر تهران در فصل تابستان (تیر، مرداد و شهریور) از نظر مقدار سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند. بیشترین غلظت سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم به ترتیب ۲۶۷/۸ و ۴۹/۳ میلی‌گرم بر کیلوگرم و کمترین غلظت این نگهدارنده‌ها به ترتیب ۸/۲ و ۴/۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم در نمونه‌های دوغ اندازه‌گیری شد (Vesal et al., 2013). در مطالعه‌ای دیگر که قلی‌پور و همکاران (۲۰۱۳) در ساری انجام دادند غلظت سوربات پتاسیم را در ۱۰۰ نمونه‌ی دوغ اندازه گرفتند، که نتایج آن‌ها نشان داد که در ۳۲ درصد نمونه‌ها سوربات پتاسیم وجود داشته که ۲۲ درصد نمونه‌ها دارای مقدار سوربات بالای ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و در ۱۰ درصد نمونه‌ها حاوی سوربات پتاسیم کمتر از ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بودند. در حالیکه بالاترین میانگین سوربات پتاسیم محاسبه شده ۳۱۲/۵ ppm بود (Mohammad Gholipour et al., 2013).

در مطالعه‌ی حاضر مقدار بنزوات اندازه‌گیری شده در نمونه‌ها زیاد بود و البته در برخی از مطالعات دیگر نیز میزان سوربات و بنزوات اندازه‌گیری شده تقریباً زیاد است. مقدار بالای بنزوات احتمالاً ناشی از دلایل مختلف می‌باشد که از جمله این دلایل: ۱- در شیر به طور طبیعی حدود

۵۰ ppm هیپوریک اسید وجود دارد که در شرایط تخمیر مقداری از این هیپوریک اسید به اسید بنزوئیک تبدیل می‌شود (بستگی به شرایط تخمیر، نوع استارتر و زمان تخمیر دارد) ۲- از تخریب فنیل آلانین در شرایط تخمیر نیز اسید بنزوئیک تولید می‌شود ۳- از اتوکسیداسیون بنزآلدهید به وسیله‌ی گونه‌هایی از اسیدلاکتیک باکتری‌ها احتمال تولید اسید بنزوئیک وجود دارد (Sieber et al., 1995)، ۴- همچنین اسانس‌های گیاهی که در دوغ‌ها استفاده می‌شوند دارای مقداری بنزآلدهید می‌باشند که می‌توانند به اسید بنزوئیک تبدیل شوند. هر چند که در اثر تمام این موارد بالا بودن مقدار بنزوات چندان قابل توجه نیست، حداکثر مقدار بنزواتی که در شرایط طبیعی ممکن است در دوغ‌ها تولید شود ۴۰ ppm می‌باشد (Organization, 2000)؛ و در حدی نیست که مقدار بنزوات بالای یافته‌های تحقیق حاضر (ماکزیمم ۴۴۸/۸ ppm) را توجیه کند. بنابراین احتمالاً یکی از دلایل اصلی، اضافه کردن بنزوات به صورت دستی در کارخانه-جات مواد غذایی می‌باشد. همچنین مقدار سوربات بالا در بعضی از نمونه‌های مطالعات انجام شده حاکی از استفاده بی‌رویه‌ی این نگهدارنده در نمونه‌های دوغ به عنوان نگهدارنده می‌باشد. در بعضی از مطالعات مذکور غلظت بنزوات و سوربات در حد پایینی قرار داشتند شاید یکی از دلایل آن این باشد که این مطالعات احتمالاً در فصل زمستان انجام شده‌اند و چون تولید کنندگان معمولاً در فصل زمستان به دلیل دمای پایین هوا مقدار نگهدارنده کمتری استفاده می‌کنند ولی در فصل تابستان به دلیل دمای بالای هوا احتمال رشد کپک‌ها و قارچ‌ها افزایش می‌یابد در نتیجه تولید کنندگان برای جلوگیری از فساد محصولات خود از نگهدارنده‌ها استفاده می‌کنند. همچنین شاید یکی دلایل دیگر مقدار کم بنزوات و سوربات در بعضی از مطالعات احتمالاً استفاده از نگهدارنده‌های دیگر مانند ناتامیسین و دی‌استات سدیم در نمونه‌های دوغ باشد. با توجه به تولید بالای دوغ در ایران که تولید سالانه آن در سال ۲۰۱۲، ۸۰۰ هزار تن برآورد شده بود (Vesal et al., 2013) و همچنین با توجه استفاده گسترده بنزوات و سوربات در دوغ‌ها و مصرف بالای آن‌ها در بین جمعیت ایران، معاونت غذا و دارو باید کنترل بیشتری را روی نمونه‌های دوغ اعمال کند.

بر اساس قوانین استاندارد ملی ایران و مقررات کمیسیون اروپا استفاده از سوربات و بنزوات در نمونه‌های آب‌میوه ممنوع می‌باشد. مقدار سوربات در نمونه‌های آب‌میوه که در حد خیلی کمی بود اما مقدار بنزوات در بعضی از نمونه‌ها پایین‌تر از حد فعالیت آنتی‌میکروبی بود که احتمالاً ناشی از مقدار بنزوات طبیعی که در بعضی میوه‌ها یا در بعضی از اسانس‌ها و مواد معطری که به آب-میوه‌ها اضافه می‌شوند می‌باشد. همچنین مقدار کمی بنزوات هم در هوا، خاک، باران، آب‌های سطحی و گازهای خروجی ماشین‌ها یافت می‌شود بنابراین میوه‌ها در مزارع می‌توانند مقادیر هر چند کم بنزوات را از طریق هوا، خاک، باران و آب جذب کنند. اما در بعضی از نمونه‌ها مقدار بنزوات بالاتر بود (ماکزیمم ۹۵/۵ میلی‌گرم بر کیلوگرم) که این مقدار بنزوات نمی‌تواند دلیل طبیعی داشته باشد و احتمالاً دلایل دیگری مانند اضافه کردن دستی بنزوات در کارخانه‌جات مواد غذایی ممکن است در این امر دخیل باشد. در مطالعه دیگر در ایران که سرگیری و غفوری (۲۰۱۰) بر روی نمونه‌های آب‌میوه مخلوط، آب پرتقال و آب سیب انجام داده بودند مقدار بنزوات در نمونه‌های آب‌میوه مخلوط ۷۶ ppm، در نمونه‌های آب پرتقال ۱۰۸ ppm و در نمونه‌های آب سیب ۱۰۲ ppm بود. مقدار بنزوات این مطالعه بیشتر از مطالعه حاضر است. اما در مطالعات دیگری که در کشورهای دیگر انجام شده می‌توان به مطالعه Fernando و همکاران (۲۰۰۳) در پرتغال اشاره کرد که مقدار بنزوات در این مطالعه از غیر قابل تشخیص تا $153 \pm 1/1$ میلی‌گرم بر کیلوگرم و مقدار سوربات از حداقل غیر قابل تشخیص تا حداکثر $210 \pm 5/5$ میلی‌گرم بر کیلوگرم متغیر بود. همچنین در مطالعه‌ای دیگر که Tfouni و همکاران (۲۰۰۲) در برزیل انجام دادند مقدار بنزوات و سوربات را در آب‌میوه‌ها اندازه‌گیری کردند؛ که میانگین بنزوات در نمونه‌های آب‌میوه ۲۷۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم (محدوده‌ی غیر قابل تشخیص تا ۷۲۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و میانگین سوربات ۵۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم (محدوده‌ی غیر قابل تشخیص تا ۴۵۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بود. در مطالعه‌ی دیگری که Marsili و همکاران (۲۰۰۳) در آرژانتین انجام دادند محدوده‌ی میانگین غلظت بنزوات و سوربات را به ترتیب ۴۴۰ تا ۷۶۰ میلی‌گرم بر لیتر و ۲۳۰ تا ۷۱۰ میلی‌گرم بر لیتر گزارش کردند.

شواهد نشان می‌دهد که اسید آسکوربیک در حضور کاتالیزور فلزات واسطه با بنزوات واکنش می‌دهد و ماده‌ی سرطان‌زایی به نام بنزن تولید می‌شود. در نتیجه‌ی عمل کاتالیزورهای فلزی، اکسیژن و هیدروژن پراکسید احیا می‌شوند و رادیکال‌های هیدروکسیل تولید می‌شوند که می‌توانند اسید بنزوئیک را دکربوکسیله کنند و در نتیجه بنزن تولید شود؛ که این شرایط در آب‌میوه‌ها ممکن است به وجود بیاید با توجه به اینکه در آب‌میوه‌ها اسید آسکوربیک وجود دارد و اسید بنزوئیک هم یا در حد طبیعی یا به مقدار زیادی وجود دارد بنابراین احتمال تولید بنزن وجود دارد هرچند بنزن تولیدی در این شرایط کم می‌باشد اما با توجه به اینکه آب‌میوه‌ها در کشور ما مصرف بالایی دارند بنابراین احتمال دریافتی بنزن افزایش می‌یابد.

استفاده از بنزوات و سوربات در نمونه‌های شیر ممنوع می‌باشد. مقدار سوربات در نمونه‌های شیر در حد خیلی جزئی بود که ناشی از همان مقدار طبیعی اسید سوربیک است که در شیر وجود دارد؛ اما مقدار بنزوات شناسایی شده بیشتر از سوربات بود اما مقدار آن پایین‌تر از حد فعالیت آنتی‌میکروبی بود. دلایل مختلفی برای مقدار بنزواتی که در شیر شناسایی شده وجود دارد از جمله: ۱- یکی از منابع احتمالی سدیم بنزواتی است که در غذای حیوانات یا در داروهای تجویزی حیوانات به منظور نگهداری استفاده می‌شود که باقیمانده‌ی بنزوات ممکن است در شیر پیدا شود ۲- مقداری هیپوریک به طور طبیعی در شیر وجود دارد شاید در هنگام نگهداری شیر UHT اگر اسیدلاکتیک باکتری‌ها حضور داشته باشند مقداری از هیپوریک را به اسید بنزوئیک تبدیل کنند. مطالعات کمی در زمینه‌ی اندازه‌گیری بنزوات و سوربات در شیر انجام شده در مطالعه‌ای که Qi و همکاران (۲۰۰۹) در چین انجام دادند مقدار بنزوات را در انواع مختلف شیر پاستوریزه، شیر UHT، پودر شیر و فرمولاسیون کودک آنالیز کردند که نتایج حاصل نشان می‌دهد که مقدار بنزوات در شیر پاستوریزه $3/3 \pm 3/6$ (محدوده‌ی ۸/۸-۵/۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، شیر UHT $2/2 \pm 2/4$ (محدوده‌ی ۱۳-۰/۶۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، پودر شیر 23 ± 49 (محدوده‌ی ۱۱۰-۱۹ میلی‌گرم بر کیلوگرم) و فرمولاسیون کودک 20 ± 36 (محدوده‌ی ۸۸-۱۱ میلی‌گرم بر کیلوگرم) بود. اگر چه مقدار بنزوات شناسایی شده در نمونه‌های شیر بالا نبودند اما با

توجه به مصرف رو به گسترش شیر در ایران و با توجه به اینکه قسمت اعظم مصرف کنندگان شیر در ایران کودکان و نوجوانان هستند این مقدار کم هم شاید بتواند مشکلاتی را برای این قشر از جامعه ایجاد کند.

بیشترین مقدار بنزوات شناسایی شده در نمونه‌های رب گوجه‌فرنگی ۲۷/۷ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود؛ که نشان از مقدار پایین این نگهدارنده در نمونه‌های رب گوجه‌فرنگی بود. البته در خیلی از نمونه‌ها مقدار بنزوات پایین‌تر از حد فعالیت آنتی‌میکروبی بود. مطالعات کمی در زمینه اندازه‌گیری بنزوات و سوربات در نمونه‌های رب گوجه‌فرنگی انجام شده است. در یکی از این مطالعات Nour و همکاران (۲۰۰۹) در رومانی مقدار سوربات و بنزوات را در نمونه‌های رب گوجه‌فرنگی اندازه گرفتند نتایج حاصل از این مطالعه نشان می‌دهد که مقدار بنزوات از حداقل ۳۴۸/۰۶ تا حداکثر ۴۷۲/۵۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم دچار نوسان بود همچنین مقدار سوربات از ۲۹۱/۷۲ تا ۴۲۰/۳۲ میلی‌گرم بر کیلوگرم دچار تغییر بود.

به دلیل pH بالای آرد (pH=۵) و به دلیل اینکه سوربات تا pH=۶/۵ قدرت میکروب‌کشی دارد، بنابراین بیشتر از سوربات به عنوان نگهدارنده در نان و به طور کلی در محصولات نانوائی استفاده می‌شود. مقدار سوربات بالای شناسایی شده در نان‌های صنعتی احتمالاً ناشی از مقدار سورباتی باشد که به آرد مصرفی برای افزایش زمان ماندگاری نان در کارخانه‌جات تولید نان‌های صنعتی اضافه می‌شود یا اینکه احتمالاً ناشی از سورباتی باشد که با پروپیونیک اسید به دانه‌های غله اضافه می‌کنند و به صورت مرطوب نگهداری می‌کنند در این حالت اسیدهای مذکور به آرامی تجزیه شده و از رشد کپک‌ها و باکتری‌ها جلوگیری می‌کند. از طرفی این اسیدها باعث متوقف شدن فعالیت حیاتی دانه‌های غله نیز می‌شوند بدین ترتیب که قوه نامیه بذر را از بین می‌برد. بنابراین ممکن است باقیمانده‌ی اسید سوربیک در آرد باقی بماند. مقدار بنزوات شناسایی شده در نمونه‌های نان احتمالاً ناشی از بنزویل پراکسیدی باشد که به عنوان یکی از عمده‌ترین مواد رنگبر در صنایع آرد سازی اضافه می‌شود که در اثر استفاده از بنزویل پراکسید ممکن است مقادیر اسید بنزویک در آرد باقی بماند. بخاطر اینکه بنزوات تا pH=۴/۵ قدرت میکروب‌کشی دارد و pH آرد نیز بالای ۴/۵ می‌باشد بنابراین احتمال اینکه بنزوات به صورت

دستی به آرد نانوائی اضافه شود خیلی کم می‌باشد. شواهدی وجود دارد که اسید سوربیک در ۳/۵-۴/۲ pH با نیتريت واکنش می‌دهد و ترکیب سرطان‌زایی به نام ۲-methylpyrrol-۲-dinitro-۱,۴ (DNMP) تولید می‌کند؛ که این نظریه به وسیله Giri و Banerjee در سال ۱۹۸۶ مطرح شد که رژیم غذایی حاوی اسید سوربیک و نیتريت را به موش آزمایشگاهی دادند که منجر به ترکیبات ژنوتوکسیک در موش شده بود. با توجه به اینکه ما در این مطالعه نان همبرگر و نان‌های ساندویچی را هم آنالیز کردیم که مقدار سوربات آن‌ها خیلی بالا بود و این نان‌ها همراه با فرآورده‌های گوشتی مصرف می‌شوند که حاوی نیتريت می‌باشند احتمال واکنش سوربات با نیتريت در pH مناسب معده وجود دارد بنابراین احتمال تشکیل ماده سرطان‌زای DNMP وجود دارد. از آنجایی که در کشور ما معمولاً با ساندویچ‌های حاوی فرآورده‌های گوشتی نوشابه یا دوغ مصرف می‌شود، و از طرف دیگر فرآورده‌های گوشتی حاوی نیتريت بالا هستند در صورتی که با نوشابه یا دوغ‌های حاوی سوربات مصرف شوند احتمال تشکیل این ماده‌ی سرطان‌زا در بدن وجود دارد. بنابراین با توجه اینکه استفاده از این سه قلم ماده غذایی شامل نوشابه، دوغ و نان با فرآورده‌های گوشتی زیاد است بنابراین باید مقدار سوربات این نمونه‌ها با دقت بیشتری کنترل شود. همچنین با توجه به اینکه نان جزو غذاهای عمده و روزمره می‌باشد و اهمیت زیادی در سبب غذایی خانوارها دارد بنابراین باید برنامه‌های کنترلی دقیقی برای کنترل مقدار سوربات نان‌های صنعتی هم انجام گیرد.

طبق قوانین استاندارد ملی ایران و همچنین قوانین کمیسیون اروپا و استاندارد کدکس استفاده از بنزوات و سوربات به عنوان نگهدارنده در سس کچاپ ممنوع می‌باشد. مقدار بنزوات فقط در نمونه‌های یک برند (ماکزیمم ۳۸/۷ ppm) بالا بود در بقیه‌ی نمونه‌ها پایین‌تر از حد فعالیت آنتی‌میکروبی بودند و مقدار سوربات هم فقط در نمونه‌های یک برند (ماکزیمم ۶۴/۶ ppm) شناسایی شد در بقیه‌ی نمونه‌ها مقدار سوربات پایین‌تر از حد تشخیص بود. مقدار بنزوات شناسایی شده ممکن است ناشی از بنزواتی باشد که به طور طبیعی در مواد اولیه مانند گوجه‌فرنگی یا ادویه‌جاتی که استفاده می‌شود باشد. اما مقدار بسیار زیاد سوربات در یکی از نمونه‌ها احتمالاً مربوط به استفاده از

منابع مهم دریافتی بنزوات و سوربات در ایران محسوب شوند. ولی نمونه‌های شیر UHT، سس کچاپ، رب گوجه‌فرنگی و آب میوه مقدار بنزوات و سوربات کمی داشتند، ولی با این وجود ممکن است برای افراد حساس مانند کودکان و بزرگسالان خطرناک باشند. در مجموع مقدار بنزوات در ۷۴/۱ درصد نمونه‌ها و مقدار سوربات در ۲۴/۹ درصد نمونه‌ها بالاتر از حد مجاز برای این دو نگهدارنده در استاندارد ملی بود. در حالیکه در نمونه‌های دوغ، آب‌میوه، شیر UHT، رب‌گوجه‌فرنگی و سس کچاپ استفاده از بنزوات و سوربات غیر مجاز است. بنابراین نهادهای مرتبط با کنترل غذا باید برنامه‌های کنترلی را برای جلوگیری از استفاده بی‌رویه این دو نگهدارنده در بعضی از مواد غذایی مانند نوشابه‌ها و دوغ‌ها در نظر بگیرند. و با توجه به اینکه این نوشابه و دوغ از مواد غذایی پرمصرف در ایران می‌باشند بنابراین کنترل سوربات و بنزوات آن‌ها خیلی ضروری می‌باشد.

سپاسگزاری

این مقاله استخراج شده از پایان‌نامه دانشجویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز با عنوان "تعیین مقدار اسید بنزوئیک و سوربیک در برخی از مواد غذایی موجود در بازار تبریز" می‌باشد. بدین وسیله از معاونت پژوهشی مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه به خاطر حمایت‌های انجام شده تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع

- Akbari-adergani, B., Eskandari, S. & Bahremand, N. (2013). Determination of Sodium Benzoate and Potassium Sorbate in "Doogh" Samples in Post Market Surveillance in Iran 2012. *Journal of Chemical Health Risks*, 3(1), 65-71.
- Aydin, Y., Sait, E., Abdurrahman, S. & Hamamci, C. (2012). High-Performance Liquid Chromatography Analysis and Assessment of Benzoic Acid in Yogurt, Ayran, and Cheese in Turkey. *Food Analytical Methods*, 5, 591-595.
- Bahremand, N. & Eskandari, S. (2013). Determination of Potassium Sorbate and Sodium Benzoate in "Doogh" by HPLC and Comparison with Spectrophotometry. *International Journal of Bio-Inorganic Hybrid Nanomaterials*, 2, 429-435.
- Chen, Q. C. & Wang, J. (2001). Simultaneous determination of artificial sweeteners,

این ترکیب به عنوان نگهدارنده در محصول باشد. در مطالعه‌ای دیگر در ایران سریری و غفوری (۲۰۱۰) مقدار بنزوات را در نمونه‌های سس کچاپ اندازه گرفتند که مقدار بنزوات شناسایی شده برابر ۱۲۰ ppm بود؛ که بالاتر از مقدار بنزوات اندازه گیری شده در مطالعه حاضر است. در مطالعات دیگر در کشورهای مختلف می‌توان به مطالعه‌ی González و همکاران (۱۹۹۸) در اسپانیا اشاره کرد که مقدار بنزوات و سوربات را در نمونه‌های سس کچاپ اندازه گرفتند که مقدار آن‌ها به ترتیب برابر 280 ± 20 و 255 ± 20 میلی‌گرم بر کیلوگرم بودند. در مطالعه‌ی دیگر Dong و همکاران (۲۰۰۶) در چین مقدار بنزوات را در نمونه‌های سس کچاپ ۱۷۵/۹ و مقدار سوربات را ۳۰۷/۶ میلی‌گرم بر کیلوگرم اعلام کردند؛ که نتایج حاصل از این دو مطالعه خیلی بالاتر از مطالعه حاضر بود.

بنزوات و سوربات اندازه‌گیری شده در تمام نمونه‌های کیک پایین‌تر از حد مجاز بودند. ولی سطح بنزوات و سوربات شناسایی شده خارج از محدوده ادعا شده بر روی برچسب نمونه‌ها بودند. سوربات به آرد کیک سازی برای محافظت در مقابل باکتری‌ها و کپک و مخمرها اضافه می‌شود و همان گونه که در مورد نان‌های صنعتی توضیح دادیم احتمالاً بنزوات شناسایی شده به دلیل بنزوئیل پراکسیدی است که برای رنگبری در آرد استفاده شده و اسید بنزوئیک در آرد باقی مانده است. در مطالعه دیگر در ایران محبوسی‌فر و همکاران (۲۰۱۱) در شیراز مقدار سوربات را اندازه‌گیری کردند که نتایج نشان داد که مقدار سوربات از ۱۳۲/۲ تا ۱۲۶۰/۲ میلی‌گرم بر لیتر متغیر بود. نتایج حاصل از این مطالعه پایین‌تر از مطالعه حاضر می‌باشد. بنابراین کارخانه‌جات مواد غذایی باید دقیقاً مقدار سوربات استفاده‌شده در کیک‌ها را بر روی برچسب قید کنند و از عبارات نامفهوم بر روی برچسب مانند "سوربات پتاسیم $ADI=25 \text{ mg/kg}$ " یا "سوربات پتاسیم" خودداری کنند.

نتیجه‌گیری

به طور کلی مقدار سوربات و بنزوات در نوشابه‌ها، دوغ‌ها، نان‌های صنعتی و انواع کیک در حد بالایی قرار داشت و با توجه به اینکه این اقلام جزو پرمصرف‌ترین اقلام غذایی در ایران هستند بنابراین می‌توانند به عنوان

preservatives, caffeine, theobromine and theophylline in food and pharmaceutical preparations by ion chromatography. *Journal of Chromatography A*, 937, 57-64.

Costa, A. C., Da Silva P. L., Tavares, M. F. & Micke, G. A. (2008). Determination of sorbate and benzoate in beverage samples by capillary electrophoresis—Optimization of the method with inspection of ionic mobilities. *Journal of Chromatography A*, 1204, 123-127.

Demian, J. M. (1999). *Principles of food chemistry*. 2nd ed. Springer; 250-261.

Dong, C., Mei, Y. & Chen, L. (2006). Simultaneous determination of sorbic and benzoic acids in food dressing by headspace solid-phase microextraction and gas chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1117, 109-114.

Dong, C. & Wang, W. (2006). Headspace solid-phase microextraction applied to the simultaneous determination of sorbic and benzoic acids in beverages. *Analytical Chemical Acta*, 562, 23-29.

Esfandiari, Z., Badiy, M., Mahmoodian, P., Sarhang, R., Yazdani, E. & Mirlohi, M. (2013). Simultaneous Determination of Sodium Benzoate, Potassium Sorbate and Natamycin Content in Iranian Yoghurt Drink (Doogh) and the Associated Risk of Their Intake through Doogh Consumption. *Iranian Journal of Public Health*, 42, 915-920.

Ferreira, I. M., Mendes, E., Brito, P. & Ferreira, M. A. (2000). Simultaneous determination of benzoic and sorbic acids in quince jam by HPLC. *Food Research International*, 33, 113-117.

García, I., Ortiz, MC., Sarabia, L., Vilches, C. & Gredilla, E. (2003). Advances in methodology for the validation of methods according to the International Organization for Standardization: Application to the determination of benzoic and sorbic acids in soft drinks by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 992, 11-27.

Gonzalez, M., Gallego, M. & Valcarcel, M. (1998). Simultaneous gas chromatographic determination of food preservatives following solid-phase extraction. *Journal of Chromatography A*, 823, 321-329.

HE, F. Y., YU, H., YIN, T. T. & ZHU, Z. F. (2010). Rapid programmed temperature gas chromatography for simultaneous determination of six common preservatives in vinegar sample. *Journal of China Condiment*, 6, 21-28.

Jay, J. M., Loessner, M. J. & Golden, D. A. (2005). *Modern food microbiology*, 7th ed. Springer; 301-306.

Kakemoto, M. (1992). Simultaneous determination of sorbic acid, dehydroacetic acid and benzoic acid by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 594, 253-257.

Kamankesh, M., Mohammadi, A., Modarres Tehrani, Z., Ferdowsi, R. & Hosseini, H. (2013). Dispersive liquid-liquid microextraction followed by high-performance liquid chromatography for determination of benzoate and sorbate in yogurt drinks and method optimization by central composite design. *Talanta*, 109, 46-51.

Khosroukhavar, R., Sadeghzadeh, N., Amini, M., Ghazi Khansari, M., Haji, A., Ejtemaeimehr, S. (2010). Simultaneous determination of preservatives (sodium benzoate and potassium sorbate) in soft drinks and herbal extracts using high-performance liquid chromatography (HPLC). *Journal of Medicinal Plants*, 35, 80-87.

Kokya, T., Farhadi, K. & Kalhori, A. (2012). Optimized Dispersive Liquid-Liquid Microextraction and Determination of Sorbic Acid and Benzoic Acid in Beverage Samples by Gas Chromatography. *Food Analytical Methods*, 5, 351-358.

Kritsunankul, O. & Jakmune, J. (2011). Simultaneous determination of some food additives in soft drinks and other liquid foods by flow injection on-line dialysis coupled to high performance liquid chromatography. *Talanta*, 84, 1342-1349.

Ling, D. S., Xie, H. Y., He, Y. Z., Gan, W. E. & Gao, Y. (2010). Determination of preservatives by integrative coupling method of headspace liquid-phase microextraction and capillary zone electrophoresis. *Journal of Chromatography A*, 1217, 7807-7811.

Lino, C. M. & Pena, A. (2010). Occurrence of caffeine, saccharin, benzoic acid and sorbic acid in soft drinks and nectars in Portugal and subsequent exposure assessment. *Food Chemistry*, 121, 503-508.

Lozano, V. A., Camiña, J. M., Boeris, M. S. & Marchevsky, E. J. (2007). Simultaneous determination of sorbic and benzoic acids in commercial juices using the PLS-2 multivariate calibration method and validation by high performance liquid chromatography. *Talanta*, 73, 282-286.

Marjan, M., Zahra, S., Gholamreza, D. & Katayoun, J. (2011). A Comparison between UV Spectrophotometer and High-performance Liquid Chromatography Method for the Analysis of Sodium Benzoate and Potassium Sorbate in Food Products. *Food Analytical Methods*, 4, 150-154.

- Mohammad, G., Zinelabidine, B., Zahra, M., Laleh, K., Mohammad, E. Z. & Abedi, S. (2013). Validation Method and Determination of Potassium Sorbat in Dough with HPLC. *Journal Mazandaran University Medical Sciences*, 24, 37-44. [In Persian, English abstract]
- Morales, M., Morante, S., Escarpa, A., Gonzalez, M., Reviejo, A. & Pingarron, J. (2002). Design of a composite amperometric enzyme electrode for the control of the benzoic acid content in food. *Talanta*, 57, 1189-1198.
- Mota, F. J. M., Ferreira, I. L. V., Cunha, S. C., Beatriz, M. & Oliveira, P. P. (2003). Optimisation of extraction procedures for analysis of benzoic and sorbic acids in foodstuffs. *Food Chemistry*, 82, 469-473.
- Nour, V., Trandafir, I. & Ionica, M. (2009). simultaneous determination of sorbic and benzoic acids in tomato sauce and ketchup using high-performance liquid chromatography. *Food Science and Technology*, 10, 157-162.
- Ochiai, N., Sasamoto, K., Takino, M., Yamashita, S., Daishima, S., Heiden, A. C. & Hoffmann, A. (2002). Simultaneous determination of preservatives in beverages, vinegar, aqueous sauces, and quasi-drug drinks by stir-bar sorptive extraction (SBSE) and thermal desorption GC-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 373, 56-63.
- Organization, WHO. (2000). Benzoic acid and sodium benzoate: concise International chemical assessment document, 26. WHO: Geneva.
- Pan, Z., Wang, L., Mo, W., Wang, C., Hu, W. & Zhang, J. (2005). Determination of benzoic acid in soft drinks by gas chromatography with on-line pyrolytic methylation technique. *Analytical chemical acta*, 545, 218-223.
- Pylypiw, H. M. & Grether, M. T. (2000). Rapid high-performance liquid chromatography method for the analysis of sodium benzoate and potassium sorbate in foods. *Journal of Chromatography A*, 883, 299-304.
- Qi, P., Hong, H., Liang, X. & Liu, D. (2009). Assessment of benzoic acid levels in milk in China. *Food Control*, 20, 414-418.
- Saad, B., Bari, M. F., Saleh, M. I., Ahmad, K. & Talib, M. K. M. (2005). Simultaneous determination of preservatives (benzoic acid, sorbic acid, methylparaben and propylparaben) in foodstuffs using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 1073, 393-397.
- Sariri, R. & Ghafouri, H. (2010). High Performance Liquid Chromatography for Determination of sodium benzoate as a preservative in Food products. *Journal of Biological Sciences of Lahijan*, 4(4), 37-45.
- Sieber, R., Bütikofer, U. & Bosset, J. O. (1995). Benzoic acid as a natural compound in cultured dairy products and cheese. *International Dairy Journal*, 5, 227-246.
- Tang, Y. & Wu, M. (2005). A quick method for the simultaneous determination of ascorbic acid and sorbic acid in fruit juices by capillary zone electrophoresis. *Talanta*, 65, 794-798.
- Tang, Y. & Wu, M. (2007). The simultaneous separation and determination of five organic acids in food by capillary electrophoresis. *Food Chemistry*, 103, 243-248.
- Techakriengkrai, I. & Surakarnkul, R. (2007). Analysis of benzoic acid and sorbic acid in Thai rice wines and distillates by solid-phase sorbent extraction and high-performance liquid chromatography. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20, 220-225.
- Tfouni, S. A. V. & Toledo, M. C. F. (2002). Determination of benzoic and sorbic acids in Brazilian food. *Food Control*, 13, 117-123.
- Thomassin, M., Cavalli, E., Guillaume, Y. & Guinchard, C. (1997). Comparison of quantitative high performance thin layer chromatography and the high performance liquid chromatography of parabens. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis*, 15, 831-838.
- Ulca, P., Atamer, B., Keskin, M. & Senyuva, H. Z. (2013). Sorbate and benzoate in Turkish retail foodstuffs. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 6, 209-213.
- Vesal, H., Mortazavian, A., Mohammadi, A. & Esmaeili, S. (2013). Potassium sorbate and sodium benzoate levels in doogh samples consumed by the Tehran market measured using high performance liquid chromatography. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 8(2), 181-190.
- Wen, Y., Wang, Y. & Feng, Y. Q. (2007). A simple and rapid method for simultaneous determination of benzoic and sorbic acids in food using in-tube solid-phase microextraction coupled with high-performance liquid chromatography. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388, 1779-1787.
- Zamani, M. F., Esmaeili, A. F., Moradi-khatoonabadi, Z., Shaneshin, M., Torabi, P., Shams Ardekani, M. & Hajimahmoodi, M. (2014). Sodium benzoate and potassium sorbate preservatives in Iranian doogh. *Food Additives & Contaminants: Part B*, 7(2), 115-119