



Available online: <https://ijhe.tums.ac.ir>

مقاله پژوهشی

سنجش میزان اسید بنزوئیک، اسید سوربیک و اتانول به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و کروماتوگرافی گازی در محصولات کفیر صنعتی عرضه شده در بازار ایران

یگانه مظاهری^۱، فرنگیس مربوطیان^۲، سعید عاقبت بخیر^۳، علیرضا بختیاری^۴، بهروز تاجدار اورنج^۳، بهروز اکبری آدرگانی^{۵،*}

- ۱- گروه مهندسی بهداشت محیط، دانشکده بهداشت، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
- ۲- گروه سم شناسی و فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران، تهران، ایران
- ۳- مرکز تحقیقات علوم تغذیه و صنایع غذایی، پژوهشکده سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، کرمانشاه، ایران
- ۴- مرکز تحقیقات سلامت آب، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران
- ۵- مرکز ملی حلال جمهوری اسلامی ایران، سازمان غذا و دارو، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله:

زمینه و هدف: بنزوات و سوربات برای جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌ها و برای افزایش ماندگاری مواد غذایی در اکثر محصولات غذایی استفاده می‌شوند. با توجه به احتمال استفاده غیرمجاز از این دو نگهدارنده در کفیر، در این مطالعه غلظت سوربات و بنزوات در این محصول با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا اندازه‌گیری شد. همچنین با توجه اهمیت موضوع و مطابقت با ضوابط ملی از این جهت که محتوای اتانول محصول کفیر می‌تواند حداکثر ۰/۵ درصد باشد، میزان اتانول این محصول با استفاده از روش کروماتوگرافی گازی اندازه‌گیری شد.

تاریخ دریافت: ۱۴۰۳/۱۰/۱۲
تاریخ ویرایش: ۱۴۰۳/۱۲/۲۱
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۱۲/۲۶
تاریخ انتشار: ۱۴۰۴/۰۳/۰۷

روش بررسی: در این مطالعه توصیفی-مقطعی ۸۸ نمونه از دوغ‌های کفیر تولید شده به روش صنعتی از نام‌های تجاری مختلف، از مراکز عرضه مواد خوراکی و آشامیدنی از نقاط مختلف ایران به صورت تصادفی جمع‌آوری شده و تا انجام آزمون‌های موردنظر با استفاده از روش کروماتوگرافی در دمای ۴ °C به آزمایشگاه منتقل شد. تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها در نرم‌افزار SPSS با استفاده از آزمون آماری ANOVA یک‌طرفه جهت مقایسه میانگین داده‌ها صورت گرفت. در تمامی آزمون‌ها سطح معناداری ۰/۰۵ لحاظ گردید.

واژگان کلیدی: کفیر، اسید بنزوئیک، اسید سوربیک، اتانول

یافته‌ها: در هیچ‌یک از نمونه‌ها سوربات شناسایی نشد و بنزوات هم فقط در ۱۱ عدد از نمونه‌ها مشاهده شد و میانگین غلظت آن ۰/۶۷۶۳ mg/L بود. میانگین غلظت اتانول نیز ۰/۲۹۹۷ درصد به دست آمد و در ۱۰ عدد از نمونه‌ها الکل بیش از ۰/۵ درصد اندازه‌گیری شد که مغایر با ضوابط ملی است. **نتیجه‌گیری:** وجود مقدار ناچیز بنزوات در فراورده ممکن است به علت فعل و انفعالات باکتری‌های اسیدلاکتیک باشد. افزایش درصد الکل نیز می‌تواند به علت تحت کنترل نبودن کامل فرایند تخمیر حین تولید محصول باشد. پیشنهاد می‌گردد به‌منظور بهبود شاخص‌های تغذیه‌ای و در راستای صیانت از سلامتی مصرف‌کنندگان حد مجاز برای نگهدارنده‌ها در این محصول تعیین گردد.

پست الکترونیکی نویسنده مسئول:
b.akbari@fda.gov.ir

Please cite this article as: Mazaheri Y, Marboutian F, Aghebat-Bekheir S, Bakhtiari A, Tajdar-oranj B, Akbari-adergani B. Assessment of benzoic acid, sorbic acid and ethanol level by high performance liquid chromatography and gas chromatography in industrial kefir products offered in the Iranian retail market. *Iranian Journal of Health and Environment*. 2025;18(1):129-40.

مقدمه

شیر یک غذای کامل است که حاوی بسیاری از مواد مغذی مورد نیاز انسان و نوزادان از جمله کربوهیدرات، پروتئین، چربی، ویتامین‌ها و مواد معدنی است (۱، ۲). به همین دلیل احتمال آلودگی و فساد آن توسط میکروارگانیسم‌های مختلف بالا بوده و ماندگاری (Shelf life) کمی دارد. بنابراین لازم است با به کار بردن فرایندهایی، محصولاتی با فسادپذیری کمتر و در نتیجه ماندگاری بیشتر، از شیر تولید کرد. در حال حاضر بیشتر از فرایند تخمیر استفاده می‌شود و محصولاتی نظیر ماست و کفیر از شیر به دست می‌آید (۳). کفیر نوعی محصول لبنی تخمیر شده گازدار با طعم ترشی خاص و ویژگی‌های حسی شبیه به ماست است که با استفاده از دانه‌های کفیر یا آغازگرهای کشت (Starter Culture) خشک شده، تولید می‌شود (۴). این نوشیدنی از اقوامی که در کوه‌های قفقاز زندگی می‌کردند، منشأ گرفته و به دلیل افزایش طول عمر آن‌ها، مشهور شده است (۵). دانه‌های کفیر دارای رنگ سفید یا زرد بوده، قطر آن‌ها از ۱-۲ mm تا ۳-۲۰ mm متغیر و ساختار آن‌ها توده‌ای شکل (همانند یک گل کلم) به نظر می‌رسد (۶). این دانه‌ها شامل یک ترکیب همزیستی بیش از ۳۰ نوع مختلف از باکتری‌های اسیدلاکتیک (CFU/g) 10^{6-8} ، مخمرها (CFU/g) 10^{6-8} و باکتری‌های اسید استیک (CFU/g) 10^5 است که درون نوعی ماتریکس پلی ساکاریدی به نام کفیران قرار دارند (۷). دانه‌های کفیر علاوه بر کفیران، حاوی کربوهیدرات دیگری به نام گلوکوالاکتان، پروتئین کازئین و بسیاری مواد دیگر نیز هستند (۸). کفیر به عنوان یک عامل مهم جهت افزایش طول عمر مطرح است. مطالعات نشان داده است کفیر به دلیل خواص ضد سرطانی، ضد دیابتی، کاهش‌دهنده کلسترول، تقویت‌کننده سیستم ایمنی و همچنین دارا بودن مقادیر بالایی از ویتامین‌های گروه B، فولیک اسید، کلسیم و آمینواسیدهای ضروری، برای سلامت بدن و افزایش طول عمر مفید است (۹). از دیگر مزایای کفیر، می‌توان به وجود باکتری‌های پروبیوتیک در

آن اشاره کرد؛ این باکتری‌ها علاوه بر کمک به هضم راحت مواد غذایی در روده، می‌توانند از رشد میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا (پاتوژن) در روده جلوگیری کنند (۳). از آنجایی که تخمیر محصول تا رسیدن به دست مصرف‌کننده ادامه پیدا می‌کند، امکان تغییر در طعم و حتی فساد محصول وجود دارد؛ برای رفع این مشکل، یا باید کفیر را پس از تولید طی چند روز مصرف کرد و یا از نگهدارنده‌ها برای افزایش زمان ماندگاری محصول استفاده کرد (۱۰، ۱۱). استفاده از نمک‌های اسید بنزوئیک و سوربیک به عنوان نگهدارنده، به جهت فعالیت این نگهدارنده‌ها در pH اسیدی، در محصول کفیر تولیدشده در کارخانه رایج است. استاندارد کدکس حداکثر میزان مجاز استفاده از بنزوئیک اسید و سوربیک اسید را در شیرهای تخمیری (از جمله کفیر) را به ترتیب ۳۰۰ ppm و ۱۰۰۰ ppm اعلام کرده است (۱۲). در حالیکه سازمان استاندارد ایران، افزودن هر نوع نگهدارنده به این محصول ممنوع اعلام کرده است (۱۳). بر اساس قوانین JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives)، میزان مصرف افزودنی‌های غذایی که سلامتی انسان را تهدید نکند، تحت عنوان حد مجاز مصرف روزانه (Acceptable Daily Intake) تعریف می‌شود به عبارت دیگر حد مجاز مصرف روزانه، مقدار ماده افزودنی است که فرد می‌تواند روزانه مصرف کند، بدون اینکه به سلامتی فرد آسیبی وارد شود. این مقدار برای بنزوئیک اسید و نمک‌های آن ۵-۰ mg به ازای هر کیلوگرم وزن بدن و در مورد اسید سوربیک و نمک‌های آن ۲۵-۰ mg به ازای هر کیلوگرم وزن تعیین شده است (۱۴)؛ پس می‌توان گفت یک انسان ۷۰ kg روزانه می‌تواند حداکثر ۳۵۰ mg بنزوئیک اسید و ۱۷۵۰ mg اسید سوربیک یا نمک‌های آن‌ها را بدون ایجاد مشکل سلامتی دریافت کند.

بنـزوات گـرچه از سـوی FDA (Food and Drug Administration) به عنوان نگهدارنده امن در لیست

گازی (۳۰، ۳۱) و ... استفاده کرد. به علت دقیق تر بودن و سهولت روش کروماتوگرافی گازی، معمولاً از این روش برای اندازه گیری الکل اتانول در صنایع غذایی بیشتر استفاده می شود (۳۲). بررسی مطالعات و گزارش های موجود نشان می دهد که تاکنون هیچ مطالعه ای به منظور تعیین غلظت بنزوئیک اسید و سوربیک اسید در کفیر انجام نشده است؛ بنابراین غلظت این نگهدارنده ها در این فراورده تخمیری مهم به همراه اتانول اندازه گیری شد.

مواد و روش ها

اندازه گیری بنزوئیک اسید و سوربیک اسید

- مواد شیمیایی و استانداردها: هیدروکسید سدیم با خلوص ۹۸/۵ درصد از Acros بلژیک، هگزا سیانوفرات-پتاسیم با خلوص بیش از ۹۸ درصد از panreac اتحادیه اروپا، استات روی با خلوص بیش از ۹۸ درصد، بنزوات سدیم و سوربات پتاسیم از Dae Jung کره جنوبی و سایر مواد شیمیایی استفاده شده در انجام آزمایشات از شرکت Merck آلمان خریداری گردید.

محلول های استاندارد سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم با غلظت ۱۰۰ mg/L تهیه گردید؛ محلول های تهیه شده تا زمان استفاده، در دمای اتاق نگهداری شدند.

- دستگاه HPLC: از دستگاه HPLC مدل CECIL با ستون ۱۸ C، $5 \mu m \times 4/6 \text{ nm} \times 250 \text{ nm}$ ساخت انگلستان استفاده شد. جداسازی بنزوات و سوربات با بافر استات (pH=۳/۶) و استونیتریل با نسبت ۱:۱ به عنوان فاز متحرک، طول موج ۲۳۵ nm، سرعت جریان ۱/۲ mL/min، میزان حجم تزریق ۲۰ μL انجام شد.

- نمونه ها: ۸۸ نمونه (۴ نشان تجاری با سهم عمده مصرف و از هر کدام ۲۲ نمونه) کفیرهای تولید شده به روش صنعتی توسط کارخانه های معتبر، از فروشگاه های سطح عرضه توزیع نشان های تجاری مورد مطالعه و از نقاط مختلف کشور شامل تهران، اصفهان، البرز، شیراز، مشهد و خوزستان به طور

GRAS (Generally Recognized as Safe) قرار گرفته، اما در اثر مصرف این نگهدارنده عوارض زیان آوری مثل آسم، تشنج، مشکلات پوستی (کهیر و جوش) و اسیدوز متابولیک حتی در دوزهای پایین مشاهده شده است؛ اما سوربات به دلیل اینکه می تواند از همان طریق که اسیدهای چرب متابولیزه می شوند تجزیه شود، بنابراین همانند اسیدهای چرب در بدن به آب و دی اکسید کربن متابولیزه می شود، بنابراین اثرات سمی آن کمتر از بنزوات است، فقط در برخی موارد کمی عدم تحمل ویژه (Idiosyncratic Intolerance) در اثر مصرف سوربات در انسان مشاهده شده است (۱۵-۱۷). تاکنون روش های مختلفی برای اندازه گیری بنزوئیک اسید و سوربیک اسید در مواد غذایی گزارش شده است؛ از بین این روش ها می توان روش های اسپکتروفتومتری (۱۸، ۱۹)، کروماتوگرافی گازی (۲۰، ۲۱)، کروماتوگرافی مایع (۲۲-۲۴)، کروماتوگرافی یونی (۱۸، ۲۵، ۲۶) و غیره اشاره کرد. در بین این روش های آنالیز، کروماتوگرافی نتایج بهتری به ما می دهد، زیرا این دو نگهدارنده در اکثر مواد غذایی باهم اضافه می شوند؛ بنابراین روش های کروماتوگرافی توانایی شناسایی همزمان این دو نگهدارنده را با قدرت جداسازی بالا دارند. همچنین روش های کروماتوگرافی گازی به دلایل مراحل طولانی استخراج و آماده سازی و همچنین روش های مشتق سازی نسبت به روش های کروماتوگرافی مایع کارایی کمتری دارند. بنابراین روش های کروماتوگرافی مایع به دلیل مراحل آماده سازی کمتر و عدم نیاز به مشتق سازی به عنوان یک روش معتبر برای اندازه گیری سوربات و بنزوات شناخته می شوند (۲۳). الکل اتانول نیز در طی فرایند تخمیر توسط مخمر تولید می شود (۲۷)؛ اما مقدار آن باید زیر حد استاندارد باشد، بیشینه غلظت اتانول در فراورده های تخمیری شیر مطابق استاندارد ملی ایران ۰/۵ درصد است (۱۳). برای اندازه گیری اتانول در سیستم های غذایی می توان از روش های تقطیر (۲۸)، اسپکتروفتومتری (۲۹)، کروماتوگرافی

تصادفی در تابستان ۱۴۰۲ جمع‌آوری و در شرایط مناسب به آزمایشگاه منتقل شد؛ نمونه‌ها تا زمان آنالیز در دمای 4°C نگهداری شدند.

- فرایند استخراج سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم از کفیر: به‌منظور استخراج این دو نگهدارنده، ۲ mL نمونه کفیر و ۶ mL هیدروکسید سدیم ۰/۱ M به یک بالن ۵۰ mL منتقل و به‌خوبی هم زده شد تا استخراج بنزوات سدیم و سوربات پتاسیم به درون فاز آبی به‌خوبی انجام شود. سپس به این مخلوط ۱ mL اسید سولفوریک ۰/۵ M، ۱ mL استات روی و ۱ mL پتاسیم هگزاسیانوفرات اضافه شد. پس از همگن کردن و انجام سانتریفیوژ، فاز شفاف فوقانی را جدا کرده و از صافی با منافذ $0.2\ \mu\text{m}$ عبور داده و $20\ \mu\text{L}$ از محلول حاصل به دستگاه کروماتوگرافی تزریق شد (۳۳). در مرحله بعدی، پیک به‌دست آمده از دستگاه ثبت شده و همین مراحل برای تمامی ۸۸ نمونه تکرار گردید (شکل ۱).

- آنالیز نمونه‌ها: پیش از آزمون نمونه‌ها، منحنی‌های کالیبراسیون با استفاده از محلول‌های استاندارد با غلظت‌های ۵، ۱۰، ۲۰، ۵۰، $100\ \text{mg/L}$ از نگهدارنده‌ها مورد بررسی قرار گرفت. بررسی خطی بودن و رسم منحنی کالیبراسیون، با استفاده از استانداردهای کاری در نقاط مشخص در محدوده آزمایش بنزوات و سوربات سدیم $100\text{--}1\ \text{mg/L}$ با ضریب همبستگی بالاتر از ۰/۹۹۹۹ انجام شد. سپس غلظت نمونه‌ها با استفاده از هر معادله منحنی کالیبراسیون ثبت شده محاسبه گردید. مقادیر بازیابی آنالیت در مطالعه حاضر بیش از ۹۴ درصد بود. حد تشخیص (LOD) و حد اندازه‌گیری (LOQ) روش برای بنزوات به ترتیب $0.05\ \text{mg/L}$ و $0.15\ \text{mg/L}$ و برای سوربات $0.05\ \text{mg/L}$ و $0.16\ \text{mg/L}$ و برای اتانول $0.02\ \text{mg/L}$ و $0.61\ \text{mg/L}$ درصد محاسبه شد. درنهایت تجزیه و تحلیل آماری توسط نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ صورت گرفت. مقایسه میانگین داده‌ها با استفاده از آزمون آماری ANNOVA یک‌طرفه انجام گردید. در تمامی آزمون‌ها سطح معناداری ۰/۰۵ لحاظ گردید. با مقایسه سطح زیر پیک به‌دست‌آمده

از هر نمونه با منحنی کالیبراسیون رسم شده با استفاده از محلول‌های استاندارد؛ غلظت سوربات پتاسیم و بنزوات سدیم در هر نمونه تعیین شد.

اندازه‌گیری الکل (اتانول)

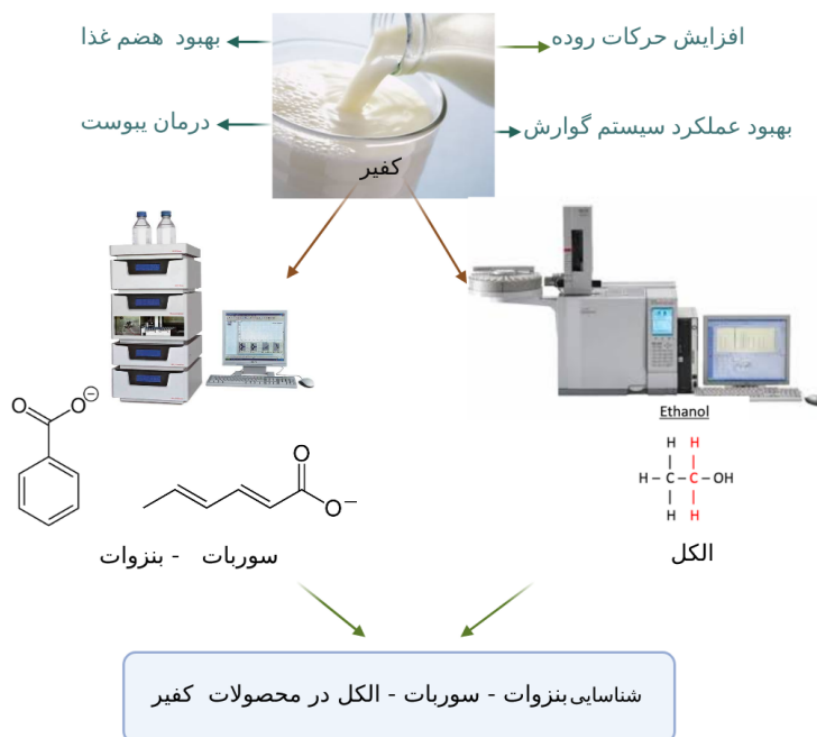
- مواد و روش‌ها: اتانول و استونیتریل با خلوص آزمایشگاهی از شرکت Merck آلمان خریداری شدند.

- دستگاه GC: دستگاه GC مدل ۳۸۰۰ cp (ساخت آمریکا) با شناساگر FID به کار گرفته شد. برای جداسازی و اندازه‌گیری اتانول، از ستون cp-wax 5 h با قطر $0.25\ \text{mm}$ ، طول ۳۰ m و گاز حامل نیتروژن استفاده گردید. دمای آنالیز نمونه 150°C ، مدت انجام آنالیز $3/123\ \text{min}$ و فشار $52\ \text{psi}$ بود.

- نمونه‌ها: ۸۸ نمونه (۴ نشان تجاری با سهم عمده مصرف و از هر کدام ۲۲ نمونه) از کفیرهای تولید شده به روش صنعتی توسط کارخانه‌های معتبر، به‌صورت تصادفی از نقاط مختلف کشور شامل تهران، اصفهان، البرز، شیراز، مشهد و خوزستان در تابستان ۱۴۰۲ جمع‌آوری و به آزمایشگاه منتقل شد؛ نمونه‌ها تا زمان آنالیز در دمای 4°C نگهداری شدند.

- فرایند استخراج الکل اتیلیک از کفیر: ابتدا ۴۰ mL از نمونه داخل لوله سانتریفیوژ ریخته شد و سپس با سرعت $3000\ \text{rpm}$ و به مدت ۵ min سانتریفیوژ گردید. سپس مقدار ۰/۵ mL از محلول رویی برداشته شده و پس از عبور از صافی با منافذ $0.22\ \mu\text{m}$ به میکروسل منتقل گردید. $20\ \mu\text{L}$ استونیتریل به محلول اضافه شده و به‌خوبی هم زده شد. در مرحله بعد، $1\ \mu\text{L}$ از محلول حاصل به دستگاه کروماتوگرافی گازی (GC) تزریق گردید (۳۴). سپس پیک به‌دست آمده از دستگاه ثبت شده و همین مراحل برای تمامی ۸۸ نمونه تکرار گردید (شکل ۱).

- آنالیز نمونه‌ها: با مقایسه سطح زیر پیک به‌دست آمده از هر نمونه با منحنی کالیبراسیون رسم شده با استفاده از محلول‌های استاندارد؛ غلظت اتانول در هر نمونه تعیین شد.



شکل ۱- فرایند شناسایی و اندازه‌گیری نگهدارنده‌ها و الکل در نمونه‌های کفیر صنعتی

یافته‌ها

و انحراف معیار محاسبه شده برای غلظت بنزوات، سوربات و درصد اتانول در نمونه‌های کفیر صنعتی در جدول ۱ ارائه شده است.

در مطالعه حاضر غلظت اسید بنزوئیک و اسید سوربیک با روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و غلظت الکل اتانول با روش کروماتوگرافی گازی اندازه‌گیری شد. مقادیر میانگین

جدول ۱- مقادیر بنزوات، سوربات و الکل در نمونه‌های کفیر

گونه مورد مطالعه	تعداد نمونه	کمینه	بیشینه	میانگین	انحراف معیار
بنزوات (mg/L)	۸۸	N.D.	۹/۰۱	۰/۶۷۶۳	۲/۰۰۴۱
سوربات (mg/L)	۸۸	N.D.	N.D.	N.D.	N.D.
اتانول (درصد)	۸۸	N.D.	۱/۰۳	۰/۲۹۹۷	۰/۲۵۲۲

N.D. = Not Detected

بحث

کفیر و دوغ نوشیدنی‌های تخمیر شده شیر با مزایای سلامتی بالقوه از جمله خواص ضد سرطانی به‌ویژه در سلول‌های روده بزرگ هستند (۳۵). تولید کفیر شامل روش‌های سنتی و صنعتی، با استفاده از دانه‌های کفیر یا آغازگر کشت تجاری است (۳۶). در مطالعه حاضر اسید سوربیک و مشتقات آن در هیچ‌یک از ۸۸ نمونه شناسایی نشد و بنزوات هم فقط در ۱۱ نمونه مشاهده شد. گرچه مطابق استاندارد کدکس افزودن حداکثر ۳۰۰ ppm بنزوات به کفیر مجاز است (۱۲)، ولی استاندارد ملی ایران افزودن بنزوئیک اسید و نمک‌های آن به هرگونه لبنیات تخمیری را غیرمجاز اعلام کرده است (۱۳). بیشترین غلظت یافت شده بنزوات، متعلق به نمونه شماره ۳۵ (۹/۰۱ ppm) بود. در سال ۲۰۱۶، Madani و همکاران میانگین غلظت بنزوات سدیم را در ۳۶ نمونه از دوغ‌های گرمادیده بدون گاز عرضه شده در سطح شهر اصفهان ۴۰۶/۴۰۶ ppm اندازه‌گیری کردند که از نتایج مطالعه حاضر بیشتر است (۳۷). در مطالعه سال ۲۰۱۳ Akbari و همکاران، میانگین غلظت سدیم بنزوات و پتاسیم سوربات در دوغ‌های عرضه شده در سطح تهران به ترتیب ۱۹۵/۹ ppm و ۳۲۸/۸ ppm گزارش شد که از یافته‌های مطالعه حاضر بسیار بیشتر است (۳۳).

در مطالعه سال ۲۰۱۷ Abbasvali و همکاران بر دوغ‌های صنعتی عرضه شده در شهر شیراز، میانگین غلظت بنزوات و سوربات به ترتیب ۳۱/۸۳ ppm و ۳۱/۸۳ ppm به دست آمد که بازهم از نتایج مطالعه حاضر بسیار بیشتر است (۳۸). در سال ۲۰۱۳ Vesal و همکاران بیشترین غلظت بنزوات و سوربات در نمونه‌های دوغ صنعتی شهر تهران را به ترتیب ۴۹/۳ ppm و ۲۶۷/۸ ppm گزارش کردند که از نتایج مطالعه حاضر بسیار بالاتر است (۳۹). Aydin Yildiz و همکاران در سال ۲۰۱۱، میانگین غلظت بنزوات در نمونه‌های دوغ ۵ شهر بزرگ ترکیه را ۶/۸۴۶ ppm گزارش کردند که از نتایج مطالعه حاضر بالاتر است (۴۰). در سال ۲۰۱۳ Esfandiari

و همکاران، مطالعه‌ای بر روی دوغ‌های سنتی تولید شده در شهر اصفهان انجام دادند و میانگین غلظت سدیم بنزوات در ۳ ماه مختلف سال را ۵/۵۸۳ ppm اندازه‌گیری کردند که از یافته‌های مطالعه حاضر بالاتر است (۴۱).

در مطالعه سال ۲۰۱۴ Zamani و همکاران، بنزوات سدیم در همه نمونه دوغ‌های صنعتی مورد بررسی سطح شهر تهران شناسایی شد، درحالی‌که سوربات پتاسیم در ۱۳ درصد نمونه‌ها یافت شد. این درحالی‌که است که در مطالعه حاضر بنزوات در ۱۲/۵ درصد نمونه‌ها شناسایی شد. میانگین غلظت بنزوات و سوربات در دوغ‌های صنعتی سطح شهر تهران را به ترتیب ۲۱/۳ و ۱۳/۳ ppm گزارش کردند که از نتایج مطالعه حاضر بالاتر است (۴۲). همچنین Amirpour و همکاران در سال ۲۰۱۵ مطالعه‌ای بر دوغ‌های صنعتی توزیع شده در سطح شهر ساری با استفاده از HPLC انجام دادند و میانگین غلظت بنزوات و سوربات را به ترتیب ۹۷/۵ ppm و ۹۸/۴ ppm گزارش کردند که از نتایج مطالعه حاضر بسیار بیشتر است (۴۳). رایج‌ترین روش آنالیز برای تعیین بنزوئیک اسید، اسید سوربیک یا بنزوات سدیم (۲۱۱E) و سوربات پتاسیم (۲۰۲E)، استفاده از HPLC فاز معکوس شناخته شده است (۴۲، ۱۵). HPLC با آشکارساز ماورای بنفش روشی قابل اعتماد برای تجزیه و تحلیل این مواد نگهدارنده در دوغ است که نتایج دقیق‌تری را در مقایسه با اسپکتروفتومتری، به‌ویژه در غلظت‌های پایین ارائه می‌دهد (۴۴).

Esfahani و همکاران در سال ۲۰۱۸، میانگین غلظت اتانول اندازه‌گیری شده در نمونه‌های کفیر و سرکه تولید شده توسط چند نمونه با نام تجاری مشهور توسط دستگاه GC را به ترتیب ۰/۰۵۲ درصد و ۰/۰۵۶ درصد گزارش کردند که از نتایج مطالعه حاضر کمتر است (۳۲). Jafari و همکاران در سال ۲۰۲۰ میانگین غلظت اتانول در ۵ نمونه با نام تجاری مختلف سرکه صنعتی را ۰/۱۰۵ درصد گزارش کردند که از یافته‌های مطالعه حاضر کمتر است (۴۵). محتوای الکل در کفیر بسته به شرایط تولید و نگهداری متفاوت است و مخمرها

مقدار اندک بنزوات سدیم در نمونه‌های دوغ کفیر آزمون شده در مطالعه حاضر می‌تواند به دلیل تشکیل طبیعی اسید بنزوئیک طی فرایند تخمیر شیر و انتقال آن به این فراورده باشد. در پژوهش‌های آتی می‌توان با در نظر گرفتن احتمال تشکیل طبیعی بنزوئیک و تعیین مقدار بنزوئیک اسید طبیعی در لبنیات حد مجاز برای این نگهدارنده تعریف کرد.

نتیجه‌گیری

افزودن بنزوات و سوربات به فراورده‌های تخمیری شیر، مطابق ضوابط استاندارد ملی ایران به شماره ۱۱۱۷۷ ممنوع است، گرچه از نظر کدکس وجود حداکثر ۳۰۰ ppm بنزوات و ۱۰۰۰ ppm سوربات در این فراورده‌ها مجاز است. سوربات در هیچ‌کدام از نمونه‌های مورد آزمایش دیده نشد و بنزوات هم فقط در ۱۱ نمونه مشاهده گردید (بیشترین: ۹/۰۱ ppm)؛ با توجه به اینکه بیشترین غلظت بنزوات شناسایی شده در این مطالعه بازهم از حد مجاز کدکس بسیار پایین‌تر است؛ این مقدار ناچیز ممکن است در اثر فعل‌وانفعالات باکتری‌های اسیدلاکتیک تولید شده باشد. میانگین غلظت اتانول نمونه‌ها در زیر حد مجاز استاندارد ملی ایران (۰/۵ درصد) بود، ولی ۱۰ عدد از نمونه‌ها از حد استاندارد انحراف داشتند (بیشترین درصد الکل شناسایی شده: ۱/۰۳ درصد) که از حد مجاز اعلام شده در استاندارد ملی ایران بیشتر است. این اتفاق ممکن است به دلیل عدم کنترل کامل و مناسب فرایند تخمیر محصول اتفاق افتاده باشد. نتایج نشان می‌دهد که روش آماده‌سازی و آنالیز نمونه‌ها توسط GC و HPLC یک روش مناسب، با دقت بالا و مؤثر به ترتیب برای تعیین نگهدارنده‌ها و الکل در دوغ کفیر است. لازم به ذکر است تعیین حد مجاز نگهدارنده‌ها در دوغ کفیر با هدف ارتقای سلامت جامعه بر اساس استانداردهای ملی پیشنهاد می‌گردد.

ملاحظات اخلاقی

نویسندگان کلیه نکات اخلاقی شامل عدم سرقت ادبی،

مسئول اصلی تولید الکل هستند. Setiawati و همکاران در سال ۲۰۲۱، میزان اتانول را زیر ۱/۸ درصد در کفیر گزارش کرده‌اند (۴۶). درحالی‌که که یک مطالعه در اندونزی نشان داد که ۱۰۰ درصد نمونه‌های کفیر حاوی الکل بالای ۰/۵ درصد هستند (۴۷). به‌طور کلی فرآیند تخمیر تحت تأثیر شرایط مختلفی از جمله pH، دما، غلظت قند و مقدار مخمرها قرار می‌گیرد (۴۸). به‌عبارت دیگر دما و مدت زمان نگهداری به‌طور قابل توجهی بر محتوای الکل تأثیر می‌گذارد، به‌طوری‌که ذخیره‌سازی در شرایط انجماد در دمای 10°C - به مدت ۷ روز منجر به پایین‌ترین سطح الکل ۰/۰۴ درصد می‌شود (۴۶) نتایج مطالعه دیگری در ترکیه نشان می‌دهد که در محصولات لبنی بنزوات سدیم در ۷۴ تا ۸۵ درصد نمونه‌ها وجود دارد، درحالی‌که سطح سوربات پتاسیم در پنیر در محدوده قانونی (۱۰۰۰ ppm) بوده است (۴۹). مصرف بی‌رویه مواد غذایی حاوی نگهدارنده‌های شیمیایی و مواجهه طولانی مدت با منابع حاوی بنزوات اثرات نامطلوب بر سلامتی دارد به‌عنوان مثال، وجود سدیم بنزوات در رژیم غذایی منجر به بیش فعالی در کودکان (۵۰) و برخی واکنش‌های آلرژیک مانند کهیر می‌گردد (۵۱). لذا کنترل مقدار آن در فراورده‌ها امری ضروری و اجتناب‌ناپذیر است.

رعایت ضوابط بهداشتی و شرایط خوب تولید در تجهیزات و تأسیسات واحدهای تولیدی محصولات لبنی طی مراحل تولید شیر می‌تواند منجر به کاهش احتمال آلودگی و افزایش ماندگاری فراورده‌های حاصل گردد. همچنین رعایت دقیق زنجیره سرما هنگام حمل و نقل، توزیع و نگهداری شیر به منظور کاهش آلودگی الزامی است (۵۱). حفظ و رعایت شرایط نگهداری بهینه برای دوغ کفیر ضرورت استفاده از نگهدارنده‌ها را از بین می‌برد؛ بنابراین افزایش آگاهی تولیدکنندگان، گامی مؤثر در کاهش استفاده از آن‌ها در فرایند تولید است. نگهداری محصول تحت شرایط مناسب و افزایش نظارت بر فرآیندهای تولید در داخل کارخانه‌ها نشان‌دهنده یک اقدام استراتژیک مهم برای کاهش استفاده از نگهدارنده است. به‌طور کلی وجود

دانشکده بهداشت و گروه سم‌شناسی و فارماکولوژی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تهران و مرکز تحقیقات سلامت آب سازمان غذا و دارو که نهایت همکاری را در انجام این مطالعه داشتند تشکر به عمل می‌آید.

انتشار دوگانه، تحریف داده‌ها و داده‌سازی را در این مقاله رعایت کرده‌اند.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از کلیه همکاران گروه بهداشت مواد غذایی

References

- Ghahremani MH, Ghazi Khansari M, Farsi Z, Yazdanfar N, Jahanbakhsh M, Sadighara P. Bisphenol A in dairy products, amount, potential risks, and the various analytical methods, a systematic review. *Food Chemistry: X*. 2024;101142.
- Ghanati K, Basaran B, Abedini A, Akbari Adergani B, Akbari N, Sadighara P. Zearalenone, an estrogenic component, in bovine milk, amount and detection method; A systematic review and meta-analysis. *Toxicology Reports*. 2024;13:101688.
- Triwibowo B, Wicaksono R, Antika Y, Ermi S, Jarmiati A, Setiadi AA, et al. The effect of kefir grain concentration and fermentation duration on characteristics of cow milk-based kefir. *IOP Conference Series: Journal of Physics*. 2020;1444(1):012001.
- Dertli E, Çon AH. Microbial diversity of traditional kefir grains and their role on kefir aroma. *LWT-Food Science and Technology*. 2017;85:151-57.
- Esener OBB, Balkan B, Armutak E, Uvez A, Yildiz G, Hafizoglu M, et al. Donkey milk kefir induces apoptosis and suppresses proliferation of Ehrlich ascites carcinoma by decreasing iNOS in mice. *Biotechnic & Histochemistry*. 2018;93(6):424-31.
- Kesencas H, Yerlikaya O, Ozer E. A functional milk beverage: Kefir. *Agro Food Industry Hi-Tech*. 2013;24(6):53-55.
- Fouladgar S, Shahraki AF, Ghalamkari G, Khani M, Ahmadi F, Erickson PS. Performance of Holstein calves fed whole milk with or without kefir. *Journal of Dairy Science*. 2016;99(10):8081-89.
- Harta O, Ionomopoulou M, Bekatorou A, Nigam P, Kontominas M, Koutinas A. Effect of various carbohydrate substrates on the production of kefir grains for use as a novel baking starter. *Food Chemistry*. 2004;88(2):237-42.
- Farag MA, Jomaa SA, Abd El Wahed A, R El Seedi H. The many faces of kefir fermented dairy products: Quality characteristics, flavour chemistry, nutritional value, health benefits, and safety. *Nutrients*. 2020;12(2):346.
- Irigoyen A, Arana I, Castiella M, Torre P, Ibanez F. Microbiological, physicochemical, and sensory characteristics of kefir during storage. *Food Chemistry*. 2005;90(4):613-20.
- Mohamadi S, Mofid V, Zeinali T, Rahmani A, Sadighara P, Peivasteh Roudsari L. Microbial and chemical characteristics of doogh (Iranian fermented milk drink). *International Journal of Food Science*.

- 2021;2021(1):3009795.
12. Alimentarius C. Standard for fermented milks. Codex Alimentarius Commission, 2022 CXS 243-2003.
13. Iran National Standards Organization. Fermented milks– Kefir drink –Specification and Test Methods. Tehran: INSO; 2022 [cited 2024 April 10]. Available from: <https://www.inso.gov.ir/portal/home>.
14. Pylypiw Jr HM, Grether MT. Rapid high-performance liquid chromatography method for the analysis of sodium benzoate and potassium sorbate in foods. *Journal of Chromatography A*. 2000;883(1-2):299-304.
15. Saad B, Bari MF, Saleh MI, Ahmad K, Talib MKM. Simultaneous determination of preservatives (benzoic acid, sorbic acid, methylparaben and propylparaben) in foodstuffs using high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2005;1073(1-2):393-97.
16. Hong H, Liang X, Liu D. Assessment of benzoic acid levels in milk in China. *Food Control*. 2009;20(4):414-18.
17. Mota FJ, Ferreira IM, Cunha SC, Beatriz M, Oliveira P. Optimisation of extraction procedures for analysis of benzoic and sorbic acids in foodstuffs. *Food Chemistry*. 2003;82(3):469-73.
18. Costa ACO, Da Silva Perfeito L, Tavares MF, Micke GA. Determination of sorbate and benzoate in beverage samples by capillary electrophoresis—Optimization of the method with inspection of ionic mobilities. *Journal of Chromatography A*. 2008;1204(1):123-27.
19. Lozano VA, Camiña JM, Boeris MS, Marchevsky EJ. 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*. 2007;73(2):282-86.
20. Kakemoto M. Simultaneous determination of sorbic acid, dehydroacetic acid and benzoic acid by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*. 1992;594(1-2):253-57.
21. Morales M, Morante S, Escarpa A, Gonzalez M, Reviejo A, Pingarron J. Design of a composite amperometric enzyme electrode for the control of the benzoic acid content in food. *Talanta*. 2002;57(6):1189-98.
22. Techakriengkrai I, Surakarnkul R. 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*. 2007;20(3-4):220-25.
23. Wen Y, Wang Y, Feng YQ. 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*. 2007;388:1779-87.
24. García I, Ortiz MC, Sarabia L, Vilches C, Gredilla E. 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*. 2003;992(1-2):11-27.
25. Chen QC, Wang J. Simultaneous

- determination of artificial sweeteners, preservatives, caffeine, theobromine and theophylline in food and pharmaceutical preparations by ion chromatography. *Journal of Chromatography A*. 2001;937(1-2):57-64.
26. Thomassin M, Cavalli E, Guillaume Y, Guinchard C. Comparison of quantitative high performance thin layer chromatography and the high performance liquid chromatography of parabens. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 1997;15(6):831-38.
 27. Barukcic I, Gracin L, Rezek Jambrak A, Bozanic R. Comparison of chemical, rheological and sensory properties of kefir produced by kefir grains and commercial kefir starter. *Dairying: A journal for the improvement of milk production and processing (Mljekarstvo: Casopis za unaprijedenje proizvodnje i prerade mlijeka)*. 2017;67(3):169-76.
 28. Iran National Standards Organization. Fruit juices – Specification and Test Methods. Tehran: INSO; 2024 [cited 2024 April 15]. Available from: <https://www.inso.gov.ir/portal/home>.
 29. Sriariyanun M, Mutrakulcharoen P, Tapaamorndech S, Cheenkachorn K, Rattanaporn K. A rapid spectrophotometric method for quantitative determination of ethanol in fermentation products. *Oriental Journal of Chemistry*. 2019;35(2).
 30. Wang ML, Choong YM, Su NW, Lee MS. A rapid method for determination of ethanol in alcoholic beverages using capillary gas chromatography. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2003;11(2):3.
 31. Wang ML, Wang JT, Choong YM. Simultaneous quantification of methanol and ethanol in alcoholic beverage using a rapid gas chromatographic method coupling with dual internal standards. *Food Chemistry*. 2004;86(4):609-15.
 32. Esfahani MN, Aarabi A. Investigating the content of alcohol in beverage products produced in Iran and imported similar samples. *Journal of Halal Search*. 2019;1(1):18-30 (in Persian).
 33. Akbari Adergani B, Eskandari S, Bahremand N. Determination of sodium benzoate and potassium sorbate in “doogh” samples in post market surveillance in Iran 2012. *Journal of Chemical Health Risks*. 2013;3(1):65-71.
 34. Brill SK, Wagner MS. Alcohol determination in beverages using polar capillary gas chromatography-mass spectroscopy and an acetonitrile internal standard. *Concordia College Journal of Analytical Chemistry*. 2012;3:6-12.
 35. Grishina A, Kulikova I, Alieva L, Dodson A, Rowland I, Jin J. Antigenotoxic effect of kefir and ayran supernatants on fecal water-induced DNA damage in human colon cells. *Nutrition and Cancer*. 2011;63(1):73-9.
 36. Kim DH, Jeong D, Song KY, Seo, KH. Comparison of traditional and backslipping methods for kefir fermentation based on physicochemical and microbiological characteristics. *LWT Food Science and Technology*. 2018;97:503-507.
 37. Madani RA, Esfandiar Z, Saraji M. Assessment of Sodium Benzoate Concentration in Doogh Distributed in Isfahan, Iran. *Journal of Health System Research*. 2016;12(1):58-63 (in Persian).
 38. Abbasvali M, Taleb Najafabadi H, Falah Mehrjerdi A. Analysis of chemical properties and determination of two preservatives in industrial Dough

- consumed in Shiraz. *Food Hygiene*. 2017;7(3 (27)):49-59.
39. Javanmardi F, Barati M, Nemati M, Aref HS. A Survey of benzoate and sorbate concentrations in different foods in the eastern Azerbaijan. *Food Technology and Nutrition*. 2017;14(4):37-52 (in Persian).
40. Yildiz A, Erdogan S, Saydut A, Hamamci C. High-performance liquid chromatography analysis and assessment of benzoic acid in yogurt, ayran, and cheese in Turkey. *Food Analytical Methods*. 2012;5:591-95.
41. Esfandiari Z, Badiey M, Mahmoodian P, Sarhangpour R, Yazdani E, Mirlohi M. 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*. 2013;42(8):915.
42. Zamani Mazdeh F, Esmacili Aftabdari F, Moradi Khatoonabadi Z, Shaneshin M, Torabi P, Shams Ardekani M, et al. Sodium benzoate and potassium sorbate preservatives in Iranian doogh. *Food Additives & Contaminants: Part B*. 2014;7(2):115-19.
43. Amirpour M, Arman A, Yolmeh A, Akbari Azam M, Moradi Khatoonabadi Z. Sodium benzoate and potassium sorbate preservatives in food stuffs in Iran. *Food Additives & Contaminants: Part B*. 2015;8(2):142-48.
44. Bahremand N, Eskandari S. Determination of potassium sorbate and sodium benzoate in "Doogh" by HPLC and comparison with spectrophotometry. *International Journal of Bio-Inorganic Hybrid Nanomaterials*. 2013;2(3):429-35.
45. Jafari M, Rezaei M. Measuring and comparing the ethanol level in traditional and industrial vinegars in Halal food industry. *Islam And Health Journal*. 2020;5(2):7-12.
46. Setiawati A, Sari I, Hasyati N, editors. Effect of temperature and time storage towards alcohol level in cow milk kefir. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*; 2021. IOP Publishing.
47. Muzaifa M, Abubakar Y, Nilda C, Sapitri M, editors. Alcohol content and chemical characteristics of fermented beverages in Aceh Province-Indonesia. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*; 2023. IOP Publishing.
48. Van Quyen N, Thao NQ, Anh NT, Dat NT. The influence of some factors on the production of alcohol whisky by *Saccharomyces cerevisiae* MS42 from barley malt. *Vietnam Journal of Biotechnology*. 2018;16(3):525-32.
49. Küçükçetin A, Şık B, Demir M. Determination of sodium benzoate, potassium sorbate, nitrate and nitrite in some commercial dairy products. *Gıda*. 2008;33(4):159-64.
50. McCann D, Barrett A, Cooper A, Crumpler D, Dalen L, Grimshaw K, et al. Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebo-controlled trial. *The Lancet*. 2007;370(9598):1560-67.
51. Farajvand N, Alimohammadi M. Prevalence of staphylococcus aureus in four famous brand of doogh produced in Iran. *Iranian Journal of Health and Environment*. 2014;7(1):85-94 (in Persian).



Available online: <https://ijhe.tums.ac.ir>

Original Article



Assessment of benzoic acid, sorbic acid and ethanol level by high performance liquid chromatography and gas chromatography in industrial kefir products offered in the Iranian retail market

Yeganeh Mazaheri¹, Farangis Marboutian², Saeed Aghebat-Bekheir², Alireza Bakhtiari¹, Behrouz Tajdar-oranj³, Behrouz Akbari-adergani^{4,5,*}

1- Department of Environmental Health Engineering, School of Public Health, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2- Department of Toxicology and Pharmacology, School of Pharmacy, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

3- Nutrition and Food Industry Research Center, Health Research Institute, Kermanshah University of Medical Sciences, Kermanshah, Iran

4- Water Safety Research Center, Food and Drug Administration, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran

5- Halal Research Center of IRI, Iran Food and Drug Administration, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran

ARTICLE INFORMATION:

Received: 01 January 2025

Revised: 11 March 2025

Accepted: 16 March 2025

Published: 28 May 2025

Keywords: Kefir, Benzoic acid, Sorbic acid, Ethanol

ABSTRACT

Background and Objective: Benzoate and sorbate are utilized to prevent the growth of microorganisms and to extend the shelf life of most food products. However, according to national hygienic regulations, the use of these two preservatives in kefir is not permitted. In this study, the concentration of these preservatives in kefir was determined using high-performance liquid chromatography. Additionally, due to the importance of this issue and compliance with national regulations—which specify a maximum ethanol limit of 0.5% in kefir—the ethanol content of this product was also determined using the gas chromatography method.

Materials and Methods: In this descriptive-cross-sectional study, 88 samples of industrially produced kefir from different brands were randomly collected from various regions of Iran and sent to the laboratory at 4 °C. Statistical analysis of the data was performed using SPSS software, and one-way ANOVA was applied to compare the mean values. In all tests, a significance level of 0.05 was considered.

Results: Sorbate was not detected in any of the samples, while benzoate was observed in only 11 samples, with an average concentration of 0.6763 mg/L. The average concentration of ethanol was 0.2997%, and in 10 samples, the ethanol content exceeded 0.5%, which is in violation of national regulations.

Conclusion: The presence of trace amounts of sorbate in the product may be attributed to the activity of lactic acid bacteria. The increase in alcohol percentage could also be due to insufficient control over the fermentation process during production. To improve nutritional quality and safeguard consumer health, it is recommended that limits be established for preservatives in this product.

***Corresponding Author:**
b.akbari@fda.gov.ir

Please cite this article as: Mazaheri Y, Marboutian F, Aghebat-Bekheir S, Bakhtiari A, Tajdar-oranj B, Akbari-adergani B. Assessment of benzoic acid, sorbic acid and ethanol level by high performance liquid chromatography and gas chromatography in industrial kefir products offered in the Iranian retail market. *Iranian Journal of Health and Environment*. 2025;18(1):129-40.

