

ORIGINAL ARTICLE

Validation Method and Determination of Potassium Sorbat in Dough with HPLC

Mohammad Gholipour,
Zinelabidine Babai,
Zahra Mohammadi,
Laleh Karimzadeh,
Mohammad Hossein Esfahani zadeh,
Saber Abedi

Food Quality Control Lab, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received Jaunary 21, 2013 ; Accepted November 3, 2013)

Abstract

Background and purpose: According to the confirmed dangerous side effects of chemical preservatives such potassium sorbate in public health and food safety, accurate monitoring of the presence of preservatives in food is necessary. Since, according to Iran national standard, using potassium sorbate in dough as preservative is prohibited, so, this study aimed to investigate the presence of potassium sorbate in dough and validation method of potassium sorbate detection.

Material and methods: In this study, 100 dough samples were collected from Mazandaran province factories. The samples were analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC), UV detectors. Validation was performed according to USP and ICH guidelines.

Results: The correlation coefficient of curve equation was 99.9%. The linearity rang was from 19 to 100 µg/ml and the limit of detection LOD and limit of quantification (LOQ) were 6.37 and 19.11 µg/ml, respectively. The accuracy of repeatability and intermediate precision of the range were acceptable. Potassium sorbate was detected in 32% samples. Content of Potassium sorbate in 22% of samples was greater than 100 mg/kg and in 10% of samples were lower than 100 mg/kg.

Conclusion: With regard to the presence of potassium sorbate in dough samples despite of Iran national standard ban on the use of it in dough, continues monitoring of several preservatives such as potassium sorbate seems to be necessary.

Keywords: Validation, Potassium sorbate, dough, determination

J Mazand Univ Med Sci 2014; 24(109): 37-44 (Persian).

استاندارد سازی و تعیین هیزان سوربات پتاسیم در دوغ به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

محمد قلی پور

زین العابدین بابایی

زهرهای محمدی

لاله کریم زاده

محمد حسین اصفهانی زاده

صابر عابدی

چکیده

سابقه و هدف: با توجه عوارض تأیید شده نگهدارنده‌های شیمیایی از جمله سوربات‌ها در سلامت عمومی و ایمنی غذایی، دقیق و نظارت بر کاربرد نگهدارنده‌ها در مواد غذایی کاملاً ضروری می‌باشد. افروزنده سوربات پتاسیم در دوغ بر اساس استاندارد ملی ایران منمنع است. هدف این پژوهش معتبرسازی روش اندازه‌گیری سوربات پتاسیم در دوغ و هم‌چنین بررسی وجود آن در دوغ تولیدی استان مازندران می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه ۱۰۰ نمونه دوغ‌های تولیدی در کارخانه‌های استان مازندران جمع‌آوری شدند. آزمون به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) و با دتکتور UV انجام شد. معتبرسازی روش آزمون بر اساس راهنمای ICH و USP انجام گردید.

یافته‌ها: ضریب همبستگی معادله منحنی کالیبراسیون برابر با ۹۹/۹ درصد به دست آمد. دامنه خطی بودن از ۱۹ تا ۱۰۰ میکروگرم در میلی‌لیتر بود و حد تشخیص (LOD) و حد تعیین مقدار (LOQ) به ترتیب ۶/۳۷ و ۱۹/۱۱ محاسبه شد. دقیق روش از نظر تکراری‌بودی و دقیق میانی در محدوده قابل پذیرش قرار داشت.

استنتاج: نتایج نشان می‌دهد که در ۳۲ درصد نمونه‌ها سوربات پتاسیم وجود داشت. ۲۲ درصد نمونه‌ها دارای سوربات پتاسیم بالاتر از ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم و ۱۰ درصد از نمونه‌ها حاوی سوربات پتاسیم کمتر از ۱۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم بودند. با توجه به وجود سوربات پتاسیم در دوغ که مغایر با استاندارد ملی ایران می‌باشد، نظارت مناسب بر مصرف نگهدارنده‌های مختلف از جمله سوربات پتاسیم در دوغ تولیدی مازندران و ایران ضروری به نظر می‌رسد.

واژه‌های کلیدی: استانداردسازی، سوربات پتاسیم، دوغ، اندازه‌گیری

مقدمه

طبق آخرین آمارهای ارائه شده، میزان تولید سالانه دوغ در ایران ۱۲۰۰۰ تن می‌باشد^(۱،۲). این محصول به دو صورت گازدار و بدون گاز تولید می‌شود^(۳). از آنجایی که در ایران دوغ بدون گاز بیشتر مصرف

دوغ، نوشیدنی لبنی است که از ترکیب ماست، آب، اسانس‌های گیاهی و نمک به دست می‌آید. امروزه، تولید دوغ در ایران، به عنوان یک نوشیدنی مغذی و مقوی در مقایسه با انواع نوشیدنی‌های دیگر، قابل توجه می‌باشد.

E-mail: Gholipour49@gmail.com

مؤلف مسئول: محمد قلی پور - بابل: جاده شهید صالحی، مرزبال، کوچه شهید عباس زاده، پلاک ۶۲۲
آزمایشگاه کنترل کیفی مواد غذایی- آرامیدنی- آرایشی و بهداشتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران
تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۱/۲ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۲/۴/۲۴ تاریخ تصویب: ۱۳۹۲/۸/۱۲

اهمیت کاربرد افروندنی‌ها در مواد غذایی موضوع مهمی در کشورهاست. به همین دلیل قوانینی در کشورهای مختلف برای کنترل کاربرد افروندنی‌های خوراکی وضع شده است که این قوانین باعث محدودیت در کاربرد آن‌ها و افزایش ایمنی غذایی می‌شود^(۹). افزودن سوربات پتاسیم در دوغ بر اساس استاندارد ملی ایران من نوع و نیز برخلاف فرمولاسیون‌های اعلام شده در پروانه ساخت می‌باشد^(۳). با توجه به مطالعات مختلف انجام شده و تأیید و اثبات عوارض خطرناک کاربرد نگهدارنده‌های شیمیایی از جمله سوربات‌ها در سلامت عمومی و ایمنی غذایی، دقت و نظارت بر کاربرد نگهدارنده‌ها در مواد غذایی کاملاً ضروری می‌باشد.

طبق بررسی‌های انجام شده، تولید کنندگان به منظور خوش طعم تر شدن دوغ، انسان‌های مختلف از جمله انسان‌نوع به آن اضافه می‌کنند که باعث می‌شود در روش اندازه‌گیری میزان سوربات پتاسیم در دوغ با اسپکتروفتومتری ماوراء بنفسن، جذب انسان‌نوع با سوربات پتاسیم تداخل یابد. به همین خاطر این پژوهش با هدف بررسی وجود سوربات پتاسیم در دوغ تولیدی استان مازندران در سال ۱۳۹۱ انجام گردید که با معتبرسازی روش اندازه‌گیری آن به روش HPLC به عنوان روش جایگزین مناسب اسپکتروفتومتری ماوراء بنفسن در دوغ می‌باشد.

مواد و روش‌ها

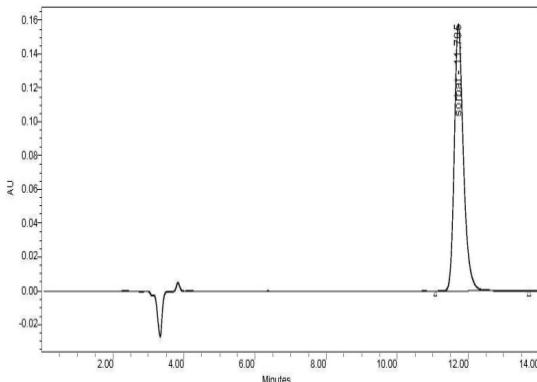
مواد و تجهیزات مورد نیاز

سوربات پتاسیم، متانول، استونتریل با درجه خلوص HPLC از شرکت Merck (Germany) خریداری شد. آب مقطر دیونیزه مصرفی در آزمایش (با هدایت الکتریکی کمتر از ۰/۰۵ میکروزیمنس) توسط دستگاه Millipore direct Q (France) تهیه شد. بافر استات از حل کردن ۰/۷۷۱ گرم استات آمونیوم در یک لیتر آب مقطر دیونیزه و تنظیم pH در ۴/۶ تهیه گردید.

می‌شود، بیش از ۹۰ درصد دوغ تولیدی کشور از نوع بدون گاز است^(۱).

عملده‌ترین عوامل فساد دوغ کپک‌ها و مخمرها هستند. می‌توان گفت که مخمرها بهتر می‌توانند در دوغ رشد کرده، در آن گاز تولید کنند و طعم آن را تغییر دهند. به هر حال، مخمرها تأثیر نامطلوبی بر مصرف کننده نمی‌گذارند. اما رشد کپک‌ها در دوغ باعث تغییر طعم و رنگ دوغ می‌شود^(۴). گاهی اوقات تولید کنندگان دوغ برای اجتناب از رشد این میکرووارگانیسم‌ها، از نگهدارنده‌هایی مانند سوربات پتاسیم استفاده می‌کنند. نتایج یک بررسی بر روی ۴۳ نمونه دوغ و ۶ نمونه ماست در استان خراسان رضوی نشان می‌دهد که ۲۸ نمونه (۵۷/۱۵ درصد) حاوی سوربات پتاسیم و ۲۱ نمونه (۴۳/۸۴ درصد) فاقد سوربات پتاسیم بودند^(۵). اثر ممانعت کنندگی سوربات ممکن است منجر به مرگ سلول، کاهش رشد میکرووارگانیسم و جلوگیری از تشکیل اسپور شود. اکثر مخمرها با غلظت ۰/۰۱ تا ۰/۲ درصد سوربات مهار می‌شوند. سوربات بر روی همه مراحل رشد کپک‌ها شامل تولید اسپور و تشکیل ریسه‌ها اثر می‌گذارد. در نتیجه سنتز سموم قارچی با جلوگیری از رشد کپک کنترل می‌گردد.

پایداری سوربات به نوع ماده غذایی (pH)، ترکیبات (اسیدهای آلی، افروندنی‌های دیگر)، فعالیت آبی، تعداد میکروب‌ها، عوامل نگهدارنده، رطوبت آن، دمای نگهداری و نحوه بسته‌بندی بستگی دارد. میزان سوربات در خلال نگهداری به دلیل رشد میکروبی، اکسیداسیون یا واکنش با اجزا مواد غذایی کاهش می‌یابد^(۶). سوربات در بدن از طریق بتا اکسیداسیون (همانند سایر اسیدهای چرب) باعث ایجاد CO₂ و آب می‌گردد. مقدار قابل قبول دریافت روزانه آن (ADI) را ۲۵ میلی‌گرم به ازاء هر کیلوگرم وزن بدن اعلام کرده اند^(۷). استفاده طولانی از سوربات پتاسیم به واکنش‌های حساسیتی، تهوع، اسهال و از دست رفتن مواد مغذی در غذا منجر می‌شود^(۸).



نمودار شماره ۱: کروماتوگرام HPLC مربوط به استاندارد سوربات پتاسیم ($10 \mu\text{g}/\text{ml}$ و تزریق $20 \mu\text{l}$)

درنتیجه حجم نمونه‌ای معادل $100 \mu\text{l}$ برای سطح اطمینان 95% درصد و میزان اشتباه مورد قبول در برآورد نسبت جامعه آماری (d) معادل $10 \mu\text{l}$ درصد در نظر گرفته شد (۵). تعداد $100 \mu\text{l}$ نمونه دوغ تولید شده از سطح کارخانجات سطح استان مازندران با تاریخ تولیدهای مختلف، به صورت تصادفی و از ابتدای فصل تابستان 1389 تا ابتدای تابستان سال 1391 جمع آوری گردید تا از نظر سوربات پتاسیم مورد بررسی قرار گیرد. البته سعی گردید تا تعداد نمونه یک کارخانه با حجم تولید آن واحد تناسب داشته باشد. از هر کارخانه تعداد $3 \sim 6$ نمونه بر اساس حجم نمونه در دسترس به صورت تصادفی از کلیه 22 کارخانه فعال تولید کننده دوغ مازندران جمع آوری شد. این واحدهای تولیدی در شهرهای سوادکوه، محمودآباد، آمل، بابل، تنکابن، بهشهر، قائم شهر، شیرکامه نور و ساری قرار داشتند. نمونه‌هایی انتخاب شدند که حداقل 48 ساعت از تولید آنها گذشته باشد. پس از تهیه به آزمایشگاه انتقال داده شده و تا زمان انجام آزمون در یخچال نگهداری گردیدند.

آماده سازی نمونه ها

مقدار 25 ml لیتر از نمونه‌های دوغ به بالن ژوژه 100 ml لیتری منتقل شدند و به آنها 35 ml لیتر متانول اضافه گشت و پنج دقیقه شدیداً مخلوط گردیدند و سپس با آب دیونیزه به حجم رسانده شدند. مخلوط

برای تنظیم pH از محلول اسید استیک و آمونیاک استفاده شد.

تمامی آزمون‌ها با دستگاه HPLC مدل Breeze از کمپانی (USA) Waters مجهز به Waters 1525 Binary Detector، Waters 2487 Dual λ Absorbance Detector، Autosampler 717 plus، ستون ODS2 و نرمافزار V.3.2 Breeze انجام گردیدند. فاز متخرک (۳۵ درصد متانول و ۶۵ درصد محلول بافر استات) با سرعت جریان $1/2 \text{ ml}/\text{litr}$ در دقیقه از ستون عبور داده و میزان جذب استانداردها و نمونه‌های تهیه شده، در طول موج 235 nm اندازه گیری گردید.

تهیه استانداردها

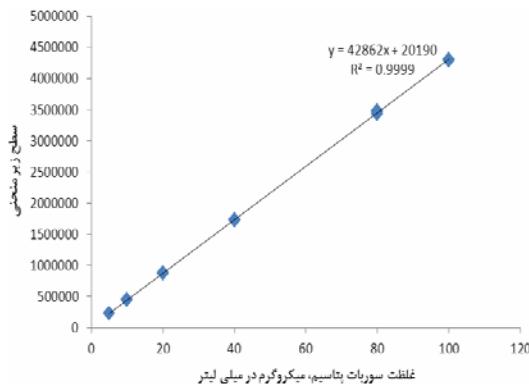
محلول استاندارد مادر با غلظت $1000 \mu\text{g}/\text{ml}$ از انحلال سوربات پتاسیم با آب مقطر دیونیزه تهیه شد. برای انجام آزمون از نمونه دوغ فاقد سوربات پتاسیم به عنوان نمونه شاهد در کلیه مراحل آزمون استفاده گردید. به این منظور محلول‌های استاندارد سوربات پتاسیم ضمن در نظر گرفتن دامنه خطی منحنی استاندارد، با غلظت‌های $5, 10, 20, 40$ و $80 \mu\text{g}/\text{ml}$ با افزودن حجم‌های محاسبه شده از محلول استاندارد مادر به نمونه دوغ شاهد تهیه شدند و آماده‌سازی نمونه روی آن انجام گرفت (۱۰). نمودار شماره ۱ کروماتوگرام حاصل از تزریق $20 \mu\text{l}$ از استاندارد $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ به وسیله دستگاه HPLC، در طول موج 235 nm را نشان می‌دهد.

معتبرسازی روش اندازه گیری سوربات پتاسیم به روش HPLC
معتبرسازی روش آزمون بر اساس راهنمای ICH

و (۱۱) USP Q2R1 انجام گردید.

نمونه برداری

با توجه به مطالعه‌ای که به همین منظور در خراسان انجام شد، $57/15$ درصد از نمونه‌های دوغ حاوی سوربات پتاسیم بودند ($p=0.5715$).



نمودار شماره ۲: منحنی کالیبراسیون سوربات پتاسیم در ۶ غلظت: ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر

جدول شماره ۳: مقادیر محاسبه شده LOD و LOQ

نتیجه	پارامتر
۱۰/۶۵	LOD بر اساس SD_{xy}
۲/۰۸	LOD بر اساس SD_a
۶/۳۷	میانگین
۱۹/۱۱	LOQ مقدار

دامنه خطی بودن Range

از آنجا که کمترین مقدار قابل تعیین مقدار ۱۹ ppm می باشد، بنابراین دامنه خطی بودن به غلظت ۱۹ تا ۱۰۰ ppm محدود می گردد.

صحت روش

جهت اثبات صحت آزمون از غنی سازی نمونه شاهد و اندازه گیری در صد بازیافت استفاده شد. نتایج بدست آمده از آزمون های انجام شده در ۳ غلظت و هر کدام با ۳ بار تکرار در جدول شماره ۳ و نمودار شماره ۳ آمده است.

دقت آزمون

به منظور اثبات دقت آزمون، برای محاسبه تکرار پذیری نمونه های غنی سازی شده در ۳ غلظت هر کدام ۳ بار تزریق شدند. با محاسبه میانگین، انحراف از استاندارد و انحراف معیار نسبی از استاندارد و مقایسه با جدول شماره ۴ دقت آزمون مورد تأیید قرار گرفت.

به دست آمده توسط کاغذ صافی صاف شد. محلول صاف شده از میکروفیلتر سر سرنگی (۰/۴۵ میکرون) عبور داده شد و در نهایت ۲۰ میکرولیتر به دستگاه تزریق گردید.

یافته ها

اعتبار دهی اندازه گیری سوربات پتاسیم به روش HPLC آزمون مناسب بودن سیستم

آزمون مناسب بودن سیستم به منظور اطمینان از کارآیی سیستم در کیفیت رضایت بخش آنالیتیک انجام می گیرد. تعداد بشقابک های فرضی (N)، ظرفیت (k)، ضریب تقارن (A_s) و فاکتور دنبالگی (T) بر اساس راهنمای USP روی پیک آنالیت انجام گرفت (جدول شماره ۱).

جدول شماره ۱: نتایج آزمون مناسب بودن سیستم روی پیک مربوط به غلظت ۵ $\mu\text{g}/\text{ml}$

پارامتر	نتیجه پیک سوربات پتاسیم	مقدار توصیه شده
-	۱/۱۷۰۵	زمان بازداری (دقیقه)
$0,95 < X < 1,5$	۱/۲۸۸۶	ضریب تقارن (A_s)
< 2	۱/۲۸۸۶	فاکتور دنبالگی (T)
$> 2...$	۱۰۶۴۹/۸	تعداد بشقابک های فرضی (N)

خطی بودن روش آزمون:
خطی بودن با آنالیز رگرسیون خطی ارزیابی شد. نمونه های غنی سازی شده در ۶ سطح غلظت ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۰۰ میکرو گرم در میلی لیتر به همراه نمونه شاهد تحت شرایط یکسان هر کدام ۳ بار تزریق گردیدند. منحنی کالیبراسیون با معادله خط $y = 42862x + 20190$ و ضریب همبستگی $R^2 = 0.999$ به دست آمد (نمودار شماره ۲).

حد تشخیص LOD و حد تعیین مقدار LOQ از میانگین انحراف استاندارد خط رگرسیون (SD_{xy}) و انحراف استاندارد خط رگرسیون (SD_a) معادله خط $y = bx + a$ محاسبه شد (جدول شماره ۲).

جدول شماره ۵: توزیع فراوانی نسبی و مطلق سطح سوربات پتاسیم
دوغ تولیدی کارخانجات لبند استان مازندران

تعداد نمونه ها	فراوانی درصد	میزان سوربات پتاسیم (میلی گرم بر کیلو گرم)
.	۶۸	۶۸
۰ - ۱۰۰	۱۰	۱۰
>۱۰۰	۲۲	۲۲

نتایج آزمون نمونه ها نشان می دهد که ۳۲ درصد نمونه ها دارای سوربات پتاسیم بودند. در ۲۲ درصد نمونه ها میزان سوربات پتاسیم بالاتر از ۱۰۰ میلی گرم بر کیلو گرم و در ۱۰ درصد از نمونه ها در حدود ۱۰۰ تا صفر میلی گرم بر کیلو گرم به دست آمد. ۶۸ درصد از نمونه ها فاقد سوربات پتاسیم بودند. در جدول شماره ۶ میانگین مربوط به نمونه های یک کارخانه تولیدی آورده شده است. نتایج نشان می دهد که میانگین سوربات پتاسیم در کل نمونه ها ۶۴/۱۲ میلی گرم در کیلو گرم بوده است. بالاترین میزان سوربات پتاسیم مربوط به کارخانه شماره ۱۳ با دامنه صفر تا ۳۱۲/۵۳±۲۲۵/۸۳

میلی گرم در کیلو گرم بوده است.

جدول شماره ۶: میانگین و انحراف معیار میزان سوربات پتاسیم در دوغ های تولیدی کارخانجات استان مازندران از تابستان سال ۱۳۸۹ تا آخر بهار سال ۱۳۹۱

میانگین	شماره محصول	میانگین	شماره محصول
۱۷/۸۷±۳۰/۹۵	۱۲	.	۱
۳۱۲/۵۳±۲۲۵/۸۳	۱۳	.	۲
.	۱۴	.	۳
.	۱۵	۱۵۶/۳۸±۲۹۸/۷۹	۴
۸۷/۹۳±۱۱۱/۶۹	۱۶	.	۵
.	۱۷	.	۶
.	۱۸	۶۶/۱۳±۱۱/۱۶	۷
۸۵/۱۸±۱۳۲/۷۴	۱۹	۲۳۹/۹۳±۲۳۳/۵۰	۸
۷۷/۲۴±۱۴۰/۳۴	۲۰	۸۲/۶۳±۱۳۸/۳۹	۹
۱۰۲/۶۳±۱۰۲/۶۳	۲۱	.	۱۰
.	۲۲	۹۴/۹۸±۸۵/۳۳	۱۱

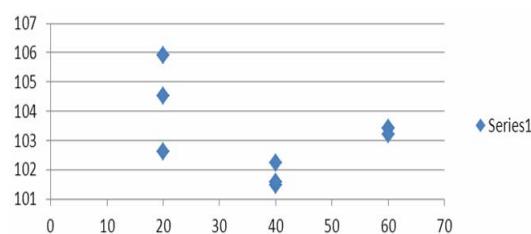
بحث

مشخص شده که اگر دوغ در دمای یخچال (۵ درجه سانتی گراد) نگهداری شود، تا پایان هفته پنج نگهداری، هیچ تغییر قبل توجهی در طعم و بوی دوغ

جدول شماره ۳: نتایج صحبت آزمون در غلظت های ۱۰، ۲۰ و ۳۰

(n=3) µg/ml

غلظت	سطح زیر منحنی	غلظت بازیافت شده	درصد بازیافت شده
۱۰	۹۷۹۷۴۷	۲۰/۵۲	۲۰
۱۰	۹۱۶۰۸۵	۲۰/۹۰	۲۰
۱۰	۹۲۷۹۸۳	۲۱/۱۸	۲۰
۱۰	۱۱۷۷۳۱۷	۴۰/۹۰	۴۰
۱۰	۱۷۵۹۸۴۶	۴۰/۰۹	۴۰
۱۰	۱۷۶۱۴۵۳	۴۰/۶۲	۴۰
۱۰	۲۶۸۰۰۴۷	۶۲/۰۶	۶۰
۱۰	۲۶۷۹۳۲۸	۶۲/۰۴	۶۰
۱۰	۲۶۷۴۵۰۰	۶۱/۹۳	۶۰



نمودار شماره ۳: درصد بازیافت در سه سطح ۲۰، ۴۰ و ۶۰ µg/ml (n=3)

جدول شماره ۴: نتایج تکرارپذیری، و دقت میانی در غلظت های ۲۰، ۴۰ و ۶۰ µg/ml (n=3)

RSD% Horwitz	RSD%	SD	Mean	غلظت
۶/۸۶	۳/۳۱	۲۸۷۹۹	۸۶۹۰۲۷	۲۰ تکرارپذیری
۶/۱۵	۰/۴۱	۲۷۴۳	۱۷۶۴۸۰۵	۴۰
۵/۷۹	۰/۱۱	۳۰۱۷	۲۶۷۷۹۵۸	۶۰
۶/۸۳	۳/۳۱	۲۸۷۹۹	۸۶۹۰۲۷	۲۰ دقت میانی
۶/۱۵	۲/۰۳	۳۶۵۶۷	۱۷۹۹۲۸۷	۴۰
۵/۷۹	۱/۸۷	۵۱۲۰۸	۲۷۳۴۴۲۰	۶۰

هم چنین برای محاسبه دقت میانی، نمونه های غنی سازی شده در ۳ غلظت در ۳ روز کاری تزریق شدند. با محاسبه میانگین، انحراف از استاندارد، و انحراف معیار نسبی از استاندارد و مقایسه با جدول شماره ۴ دقت آزمون مورد تأیید قرار گرفت.

اندازه گیری سوربات پتاسیم در دوغ با توجه به تعهد برای حفظ حقوق تولید کنندگان، یک کد برای نمونه های دوغ تولیدی در یک کارخانه در نظر گرفته شد. یافته های مربوط به توزیع فراوانی مطلق و فراوانی نسبی سطح سوربات پتاسیم دوغ در جدول شماره ۵ نشان داده شده است.

نمونه‌ها) دارای سوربات پتاسیم بوده‌اند. به‌طوریکه میزان سوربات پتاسیم در ۱۰ درصد از نمونه‌ها کم‌تر از ۱۰۰ ppm و در بقیه نمونه‌های دارای سوربات پتاسیم، بالاتر و یا مساوی ۱۰۰ ppm بود. در حالی که بالاترین میانگین سوربات پتاسیم محاسبه شده ۳۱۲/۵ ppm بود. در سایر نمونه‌ها این ماده شناسائی نگردید. نتایج مطالعه‌ای که در چین برای اعتباردهی و اندازه‌گیری هم‌زمان چند نگهدارنده از جمله سوربات پتاسیم در مواد غذائی مختلف از جمله ماست انجام شد، نشان داد که LOD برای سوربات پتاسیم ۰/۲ ppm و ضریب خطی ۰/۹۹۶۹ در دامنه ۰/۰-۲ ppm بوده است. میانگین سوربات اندازه‌گیری شده برای ماست ۱۵۷/۷ ppm بود(۱۲). در بررسی که در ترکیه بر روی ۴۵ نمونه ماست انجام شد، ۳ نمونه دارای سوربات پتاسیم معادل ۵۷۷/۹-۲۸/۹ ppm بودند(۱۳). در مطالعه دیگری که به همین منظور در ترکیه انجام شد، میزان سوربات پتاسیم در ۱۱ درصد نمونه‌ها (۴ نمونه) از کل نمونه‌های ماست کش دار در محدوده ۴/۴ ppm-۳۲۱/۹-۶۱۲/۹ بود(۱۴). نتایج پژوهشی که در خراسان رضوی بر روی ۴۹ نمونه دوغ آن استان انجام شد، نشان داد که ۵۷/۱۵ درصد از نمونه‌ها (۲۸ نمونه) دارای سوربات پتاسیم بودند(۱۵). نتایج پژوهش‌های ذکر شده بالاتر از نتایج پژوهش حاضر بود. در بررسی دیگری که در استان آذربایجان غربی بر روی نمونه‌های دوغ انجام شد نشان داد که ۲۸/۱۴ درصد از نمونه‌ها آلوود به سوربات پتاسیم بودند(۱۵).

از نکات قابل توجه در این پژوهش آن است که نتایج بدست آمده در نمونه‌های آزمون شده، انحراف معیار زیادی را نشان می‌دهد که علت آن، کاربرد متناسب و غیر مستمر سوربات پتاسیم می‌باشد. به‌طوری که در برخی از نمونه‌ها از این نگهدارنده استفاده نشده بود. استفاده از سوربات پتاسیم در درجه اول به محدودیت‌های قانونی و اعمال قانون و در درجه دوم به زمان تولید دوغ بستگی دارد. به این معنی که افزودن سوربات پتاسیم به دوغ برخلاف استاندارد ملی

نگهداری شده مشاهده نمی‌شود. در حالی که اگر دوغ در دمای محیط (۲۰ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شود، با گذشت زمان دچار تغییر می‌شود. به خصوص در هفته‌های چهارم و پنجم طعم آن نسبت به روزهای اول ترش تر می‌شود ولی اگر دمای محیط بسیار بالا (۳۳ درجه سانتی‌گراد) باشد، تغییرات طعم و بو از هفته دوم آغاز می‌شود.

با افزایش دما و گذشت زمان، رشد و نمو مخمرها افزایش می‌یابد. این امر دقیقاً با مشخصات فیزیولوژیکی مخمرها مطابقت دارد. زیرا دمای مناسب برای رشد اکثر مخمرها در محدوده ۲۵ تا ۳۰ درجه سانتی‌گراد و حداقل ۴۷ تا ۴۵ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. رشد اکثر مخمرها در اثر واکنش اسیدی (در pH نزدیک ۴ تا ۴/۵) تقویت می‌شود(۴). بنابراین می‌توان گفت دوغ، محیط مناسبی جهت رشد و فعالیت مخمرهاست و احتمالاً مؤثرترین روش طبیعی کنترل فعالیت آن‌ها، نگه داری در شرایط سردخانه و دماهای تقلیل یافته است.

از نظر آلودگی با کپک، اگرچه شروع رشد کپک‌ها در مقایسه با باکتری‌ها یا مخمرها آهسته‌تر است و در صورتی که شرایط برای تمام این میکرووارگانیسم‌ها مساعد باشد، معمولاً کپک‌ها قادر به رقابت با مخمرها و باکتری‌ها نیستند، اما اگر رشد کپک‌ها آغاز شود ممکن است سایر مراحل رشد با سرعت زیادی انجام گیرد(۴). به منظور جلوگیری از رشد این نوع میکرووارگانیسم‌ها برخی از تولیدکنندگان برخلاف مقررات استاندارد ملی، اقدام به افروختن نگهدارنده‌های نظیر سوربات پتاسیم می‌کنند. اندازه‌گیری سوربات پتاسیم اضافه شده به دوغ، با روش اسپکتروفوتومتری ماوراء بنفش نیز انجام می‌شود، اما به علت مشکل تداخل طیف جذبی در ناحیه ماوراء بنفش با سوربات پتاسیم، در این پژوهش روش اندازه‌گیری آن به روش HPLC معتبرسازی شد. به‌طوری که در روش HPLC اثر عامل مخدوش کننده تداخل طیف، حذف می‌شود.

این بررسی نشان داد که ۳۲ نمونه (۳۲ درصد از کل

تولیدات کارخانه‌ها از نظر وجود سوربات پتابسیم و سایر نگهدارنده‌ها به عنوان گامی مؤثر در جهت کاهش مصرف نگهدارنده‌ها ضروری به نظر می‌رسد. با توجه به نتایج بدست آمده مطابق با معیارهای استانداردسازی روش انجام آزمون، اندازه‌گیری سوربات پتابسیم در دوغ با روش کروماتوگرافی با کارایی بالا می‌تواند روش مطمئن و مناسبی باشد به‌طوری که اندازه‌گیری سوربات پتابسیم نشان داد ۳۲ درصد از نمونه‌ها دارای این ماده بوده‌اند.

ایران است^(۳) که عامل بازدارنده مصرف سوربات پتابسیم می‌باشد. از طرفی عاملی که تولید کننده را ترغیب می‌کند تا از این نگهدارنده استفاده کند، شرایط آب و هوایی در ایران که مناسب رشد کپک می‌باشد و تأثیر بازدارنده‌گی سوربات پتابسیم بر رشد کپک و محمره‌ها می‌باشد.

با توجه به این که شرایط مناسب انبارداری دوغ تولیدی نیاز به مصرف نگهدارنده‌ها را از بین می‌برد، از این‌رو افزایش آگاهی تولید کننده‌ها و افزایش کنترل

References

- Mirchooli Borazgh A, Sedaghat N. Effect of packaging and temperature on the shelf-life of free gas Doogh. Journal of Food Science and Technology 2011; 2(3): 1-8 (Persian).
- Foroughinaia S, Abbasi S, Hamidi Esfahani Z. Effect of Individual and Combined Addition of Salep, Tragacantin and Guar Gums on the Stabilisation of Iranian Doogh. iranian Journal of Nutrition Science and Food Technology 2007; 2(2): 15-25 (Persian).
- Institute of standards and Industrial Research of Iran. Dough-Specifications and test method. NO.2453. 2th ed. Tehran: ISIRI; 2008.
- Mortazavi A, Kasshani Nejad M, Ziaolagh H. Food microbiology (W.C. Frazier), 1 rd ed. Mashhad: Ferdowsi University Press; 2002. p. 209-297.
- Yazdanian G, Bakherad Z, Rashidi M, Khezri M. Determination of potassium sorbate as a preservative and its effect on control of mold growth in dairy. (online). 2006. Available from: <http://www.mums.ac.ir/shares/drug/bahmanzadehn1/poster%20sorbat.ppt>. Accessed Januray 14, 2013.
- Campos CA, Alzamora SM, Gerschenson LN. Inhibitory action of potassium sorbate degradation products against *Staphylococcus aureus* growth in laboratory media. Int J Food Microbiol 2000; 54(1-2): 117-122.
- Committee on food chemicals codex Food and Nutrition Board. Food chemicals codex (FCC). Fifth ed. Washington DC: The National Academic Press; 2004. p. 327.
- Godbole M. Potassium Sorbate Dangers and Side Effects. (online). Available from: <http://www.buzzle.com/articles/are-there-potassium-sorbate-dangers-and-side-effects.html> Accessed January 14, 2013.
- Tfouni SAV, Toledo MCF. Determination of benzoic and sorbic acids in Brazilian food. Food Control 2002; 13(2): 117-123.
- ICH Expert Working Group. Validation of Analytical Procedures: Text and Methodology Q2 (R1), International Conference on Harmonisation of Technical Requirements for Registration of Pharmaceuticals for Human Use, Geneva, 2005.
- General Chapter 621. Chromatography-System Suitability, in: The United States Pharmacopeia, 30th Ed, The United States Pharmacopeia Convention, Rockville, 2006, p. 254.
- Wang L, Zhang X, Wang Y, Wang W. Simultaneous determination of preservatives

- in soft drinks, yogurts and sauces by a novel solid-phase extraction element and thermal desorption-gas chromatography. *Anal Chim Acta* 2006; 577(1): 62-67.
13. Kucukcetn A, Sk B, Ccek A, Certel M. Determination of sodium benzoate and potassium sorbate in yoghurt and white pickled cheese by HPLC. *Milchwissenschaft* 2004; 59(7/8): 420-422.
14. Küçükçetin A, Bülent S, Muammer D. Determination of sodium benzoate, potassium sorbate, nitrate and nitrite in some commercial dairy products. *GIDA* 2008; 33(4): 159-164.
15. Forozan S, Rahimrad A, Seidkhoe R. Dough contamination in West Azerbaijan province to supply the preservative potassium sorbate. The Twentieth Congress of Food Science Industry. University of sharif. Teheran, 1390.