

Determination of Adulteration of Lime Juices in Tabriz Based on Measurement of Phenolic Compounds by Spectrometry and Chromatography

Sheykh-aldini M¹, Salman nasab Z¹, Afshar Mogaddam M.R², Atazadeh R³, Khandaghi J*⁴

1. M.Sc Graduates of Food Science and Technology, Sarab Branch, Islamic Azad University, Sarab, Iran

2. Assistant Professor of Food and Drug Safety Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

3. Assistant Professor of Department of Food Science and Technology, Sofian Branch, Islamic Azad University, Sofian, Iran

4. Assistant Professor of Department of Food Science and Technology, Sarab Branch, Islamic Azad University, Sarab, Iran

* *Corresponding author.* Tel: +989144054509, Fax: +984143225135, E-mail: khandaghi@iausa.ac.ir

Received: Jun 28, 2018

Accepted: Sep 14, 2019

ABSTRACT

Background & objectives: Citrus lemon and lime juice, which contain high levels of vitamin C and natural antioxidant in the form of polyphenols, have a special place in the food basket of Iranian households. Flavonoids are among the polyphenolic compounds and Eriocitrin, Naringin and Hesperidin are among the most important flavonoids. Investigating the amount and type of polyphenols and flavonoids in this food is one of the tools to discover the authenticity of this juice.

Methods: In this research, 65 samples of lime juice (42 samples of packed lime juice and 23 samples of bulk lime juice) were purchased from Tabriz and total amount of phenolic compounds were determined using spectrophotometry. Also, the quantities of Eriocitrin, Naringin and Hesperidin were analyzed using liquid chromatography method in order to investigate possible counterfeiting.

Results: The average amount of total polyphenolic compounds of packed and bulk juices were 275 and 303 mg/l, respectively and totally, 9 samples (13.8%) did not conform to the Institute of Standards of Iran rules and were considered as not consumable. Regarding flavonoids, the results showed that the average amount of Eriocitrin, Naringin and Hesperidin were 17.32, 28.31 and 80.44, respectively. Accordingly, 33 samples (50.78%) were not consistent with the Institute of Standards of Iran rules. In the present study, the reason for the non-standardization of most lemon juice samples (78.8%) was presence of the Naringin flavonoids.

Conclusion: In determining flavonoid compounds in comparison with the method of measuring total phenolic compounds, 24 more samples of lime juice (36% of samples) were found not to be standard, so due to the increasing adulteration that occurs in the various food industries, it is imperative that food health monitoring institutions use new and effective methods for food authentication to ensure community health.

Keywords: Lime Juice; Tabriz; Polyphenol; Flavonoid; Spectrometry; Liquid Chromatography

Conflict of interest: None declared.

تشخیص تقلبات آلبیموهای مصرفی در شهر تبریز بر اساس اندازه گیری ترکیبات فنلی به دو روش اسپکترومتری و کروماتوگرافی

مهری شیخ‌الدینی^۱، زهرا سلمان‌نسب^۱، محمدرضا افشار مقدم^۲، رامین عطازاده^۳، جلیل خندقی^{۴*}

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، واحد سراب، دانشگاه آزاد اسلامی، سراب، ایران

۲. استادیار مرکز ایمنی غذا و دارو، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۳. استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد صوفیان، دانشگاه آزاد اسلامی، صوفیان، ایران

۴. استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، واحد سراب، دانشگاه آزاد اسلامی، سراب، ایران

* نویسنده مسئول. تلفن: ۰۹۱۴۴۰۵۴۵۰۹ فکس: ۰۴۱۴۳۲۵۱۳۵ ایمیل: khandaghi@iausa.ac.ir

چکیده

زمینه و هدف: لیموترش و آلبیمو که حاوی مقادیر بالایی از ویتامین C و ترکیبات آنتی‌اکسیدان طبیعی به شکل پلی‌فنل‌ها هستند، جایگاه ویژه‌ای در سبد غذایی خانوارهای ایرانی دارند. فلاونوئیدها جزو ترکیبات پلی‌فنلی بوده و اریوسیتترین، نارنجین و هسپریدین از مهم‌ترین فلاونوئیدها هستند.

روش کار: بررسی مقدار و نوع پلی‌فنل‌ها و فلاونوئیدها در این ماده غذایی یکی از ابزارهای پی‌بردن به اصالت آلبیموی طبیعی می‌باشند. در این تحقیق تعداد ۶۵ نمونه آلبیمو (۴۲ نمونه آلبیموی بسته‌بندی شده و ۲۳ نمونه آلبیموی فله‌ای) از شهر تبریز خریداری و ترکیبات فنلی تام به روش اسپکترومتری و مقادیر سه ترکیب فلاونوئیدی اریوسیتترین، نارنجین و هسپریدین در آن با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع، به‌منظور بررسی تقلبات احتمالی اندازه‌گیری شد.

یافته‌ها: میانگین مقدار تام ترکیبات پلی‌فنلی آلبیموهای بسته‌بندی‌شده و فله‌ای به ترتیب ۲۷۵ و ۳۰۳ میلی‌گرم در لیتر بدست آمد و در مجموع ۹ نمونه (۱۳/۸٪) با استاندارد ملی ایران مطابقت نداشته و غیرقابل مصرف تشخیص داده شد. در بررسی فلاونوئیدها نتایج نشان داد که میانگین مقادیر اریوسیتترین، هسپریدین و نارنجین به ترتیب ۱۷/۳۲، ۲۸/۳۱ و ۸۰/۴۳ بود و بر این اساس تعداد ۳۳ نمونه (۵۰/۷۸٪) از آلبیموها با استاندارد ملی ایران منطبق نبود. در مطالعه حاضر دلیل غیراستاندارد بودن بیشتر نمونه‌های آلبیمو (۷۸/۸٪)، دارا بودن ترکیب فلاونوئیدی نارنجین بوده است.

نتیجه‌گیری: در روش اندازه‌گیری ترکیبات فلاونوئیدی، ۲۴ نمونه آلبیموی بیشتر (۳۶٪ از نمونه‌ها) نسبت به روش اندازه‌گیری فنل تام، غیراستاندارد تشخیص داده شد و این موضوع نشان می‌دهد باتوجه به تقلب روزافزونی که در صنایع مختلف غذایی صورت می‌گیرد، لازم است نهادهای ناظر بر کیفیت بهداشتی مواد غذایی، از روش‌های جدید و کارآمد برای کشف تقلبات مواد غذایی و تامین سلامت جامعه استفاده نمایند.

واژه‌های کلیدی: آلبیمو، تبریز، پلی‌فنل، فلاونوئید، اسپکترومتری، کروماتوگرافی مایع

دریافت: ۹۷/۴/۷ پذیرش: ۹۸/۶/۲۳

مقدمه

موطن اصلی مرکبات آسیای جنوب شرقی است که در دامنه‌های هیمالیا، چین، مالایا، هند و ژاپن می‌باشد. ناحیه دیگری که به عنوان موطن ثانویه مرکبات

می‌شناسند کرانه‌های جنوبی دریای خزر می‌باشد که انواع مرکبات در این ناحیه مشاهده می‌شود (۱). مرکبات دارای املاح مختلف و سرشار از ویتامین‌های A، B و C هستند که جنبه دارویی و غذایی دارد. در

بین این ویتامین‌ها، ویتامین C در بین مرکبات بیشتر بوده و عمدتاً مصرف مرکبات به حضور ویتامین C مربوط می‌باشد (۲). اما خواص و فواید مرکبات تنها به داشتن ویتامین C محدود نمی‌شود و مرکبات سرشار از آنتی اکسیدان‌ها، پتاسیم، بتاکاروتن و فیبرهای محلول هستند که برای حفظ سلامت بدن بسیار مفید است (۳). در بین مرکبات، لیموترش جایگاه ویژه‌ای در سبد غذایی خانوار دارد و حاوی مقادیر بالایی از ترکیبات آنتی اکسیدان طبیعی به شکل پلی فنل‌ها است. لیموترش در حالت کلی به دو دسته لایم^۱ و لمون^۲ طبقه‌بندی می‌شود و عمدتاً میوه‌ای که برای تهیه آبلیمو استفاده می‌شود از طبقه لایم می‌باشد (۴). فلاونوئیدها جزو ترکیبات پلی فنلی هستند که از حلقه‌های بنزنی تشکیل شده‌اند. سه ترکیب اریوسیتترین، نارنجین و هسپریدین مهم‌ترین فلاونوئیدها هستند (۵-۷).

همراه با پیشرفت علم شیمی تقلبات جدی و وسیع نیز در مواد غذایی بوجود آمد. آبلیمو جزو مواردی است که از زمان‌های قدیم در آن تقلب صورت می‌گرفته است که از جمله آنها می‌توان به مخلوط کردن مقداری کاه زبر با آب نیمه گرم و استفاده از عصاره آن در تولید آبلیمو، اضافه کردن اسیدسیتریک یا جوهر لیمو به آبلیموی رقیق شده با آب، اضافه کردن اسیدهای معدنی و غیره اشاره کرد (۸،۹). در حال حاضر انجام تقلبات در آبلیمو پیشرفته‌تر شده است که از جمله می‌توان به اضافه کردن سیترات سدیم، اسیدسیتریک، گلیسیرین و اسانس‌های متعدد اشاره کرد. حتی در بعضی از مواقع تقلبات در آبلیمو تا حدی پیش رفته است که به جای فرآورده طبیعی از فرآورده‌های کاملاً سنتزی استفاده می‌شود (۱۰،۱۱). یکی از پارامترهایی که در آبلیموهای تقلبی تغییر می‌یابد پلی فنل‌های آن است که اخیراً مقدار تام پلی فنل‌ها نیز به روش‌های گوناگون مانند استفاده از

مواد سنتزی جبران می‌شود. بنابراین به نظر می‌رسد آنالیزهایی مانند آزمون‌های بریکس، اسیدیته، اندیس فرمالین، انیدرید سولفورو، ماده خشک، اسیدیته و مقدار تام ترکیبات فنلی که در حال حاضر در استاندارد ویژگی‌های لیموترش و روش آزمون آبلیموها وجود دارد (۱۲)، جوابگوی کشف این تقلبات پیشرفته نمی‌باشد و باید اقدام اساسی برای رفع این معضل اساسی در آبلیمو که بعنوان یک چاشنی اصلی و یکی از منابع اصلی تامین کننده ویتامین C مردم است، انجام شود.

تاکنون از روش‌های مختلفی در اندازه‌گیری ترکیبات فلاونوئیدی در نمونه‌ها و محصولات غذایی مختلف استفاده شده است (۱۶-۱۳). در این بین استفاده از روش‌های کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) یکی از تکنیک‌های جداسازی کارآمد در این زمینه می‌باشد چرا که به دلیل داشتن قدرت جداسازی بالا، تداخل ترکیبات مشابه در آن به حداقل می‌رسد و از طرفی امکان کوپلاژ آن با دتکتورهای مانند MS دستیابی به حدود تشخیص بسیار پایین‌تری را نیز امکان‌پذیر می‌کند.

هدف از انجام این کار پژوهشی تعیین مقادیر ترکیبات فنلی تام و مقادیر سه ترکیب فلاونوئیدی عمده لیموترش یعنی اریوسیتترین، نارنجین و هسپریدین در آبلیموهای مصرفی در شهر تبریز به منظور بررسی تقلبات احتمالی آن بود. برای این منظور ترکیبات فنلی تام به روش اسپکترومتری و ترکیبات فلاونوئیدی با استفاده از روش کروماتوگرافی مایع اندازه‌گیری شدند.

روش کار

در این تحقیق ۴۲ نمونه آبلیمو بسته‌بندی شده و ۲۳ نمونه آبلیموی فله‌ای (بدون برچسب و نام کارخانه سازنده) در پاییز سال ۱۳۹۶ از سوپرمارکت‌های سطح شهر تبریز به طور تصادفی انتخاب و خریداری شده و پس از انتقال به آزمایشگاه شیمی تجزیه در

¹ Lime

² Citrus lemon

دانشکده شیمی دانشگاه تبریز آزمایش‌های زیر روی آنها انجام گرفت.

اندازه‌گیری ترکیبات فنلی تام

پس از مخلوط نمودن کامل نمونه‌ها ۵۰ سی‌سی از هریک در داخل فالکن تیوب انتقال داده شده و ۱۰ دقیقه در داخل سانتیفریوژ (Hettich 320R, Germany) با دور ۵۰۰۰ قرار گرفت تا صاف شود. سپس ۱۰ سی‌سی از نمونه صاف شده داخل فالکن تیوب ۵۰ سی‌سی دیگری ریخته و ۱۰ سی‌سی اتانول ۹۶٪ روی آن اضافه شده و ۵ دقیقه ورتکس شد تا مخلوط گردد. اندازه‌گیری ترکیبات فنل تام به روش ذکر شده در استاندارد ملی ایران به شماره ۱۱۷ (تجدید نظر پنجم) با اعمال تغییرات کوچکی در آن انجام گرفت بطوریکه ۵۰۰ میکرولیتر از محلول آبلیموی رقیق شده با اتانول را داخل فالکن تیوب ۱۵ سی‌سی منتقل و روی آن ۳/۷۵ میلی‌لیتر محلول فولین سیکالتیو (۱ به ۱۰ رقیق شده) اضافه شده و کاملاً مخلوط شد. پس از ۵ دقیقه روی آن ۳/۷۵ میلی‌لیتر کربنات سدیم ۶٪ اضافه و ۶۰ دقیقه در تاریکی و در دمای آزمایشگاه قرار داده شد تا محلول آبی تیره تشکیل گردد. جذب این محلول در محدوده نورمرئی با طول موج ۷۸۰ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (Cecil-aquarius, England) قرائت و پس از رسم منحنی کالیبراسیون (با استفاده از محلول‌های استاندارد حاوی اسیدگالیک با غلظت‌های ۲۵-۵۰-۱۰۰-۲۰۰-۳۰۰-۵۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، غلظت

ترکیبات پلی‌فنلی بر اساس میزان جذب خوانده‌شده از اسپکتروفتومتر محاسبه شد.

به‌منظور اعتبارسنجی روش بکاررفته برای آنالیز ترکیبات فنلی تام در این تحقیق، تکرارپذیری و راندمان استخراج بررسی و محاسبه شد (۱۷).

اندازه‌گیری فلاونوئیدها

ابتدا نمونه‌های آبلیمو مخلوط و ۵۰ سی‌سی از هریک در داخل فالکن تیوب انتقال داده شده و ۱۰ دقیقه در داخل سانتیفریوژ با دور ۵۰۰۰ قرار گرفت تا صاف شود. به‌منظور استخراج ترکیبات فلاونوئیدی نارینجین، اریوسیتین و هسپریدین از آبلیمو از روش استخراج مایع-مایع استفاده شد (۱۸) بطوریکه ۲۰ میلی‌لیتر نمونه آبلیمو به داخل یک لوله آزمایش منتقل و ۰/۵ گرم سدیم کلرید به آن اضافه‌شد و مخلوط حاصل به‌شدت به‌هم زده شد تا نمک کاملاً در داخل فاز آبی حل‌شود. سپس ۴ میلی‌لیتر از حلال استونیتریل روی مخلوط حاصل اضافه شده و به مدت ۱۰ دقیقه ورتکس شد. پس از سانتیفریوژ کردن محلول حاصله، فاز رویی که شامل آنالیت‌های استخراج شده در داخل استونیتریل است به یک لوله دیگر منتقل شد. به‌منظور آنالیز مواد استخراج شده استونیتریل تحت گاز نیتروژن تبخیر شده و باقی‌مانده ترکیبات در داخل ۰/۵ میلی‌لیتر فاز متحرک حل گردید و به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (Agilent 1200, USA) تزریق شد (۱۹). شرایط بپینه HPLC برای آنالیز فلاونوئیدهای مورد مطالعه در جدول ۱ ذکر شده است.

جدول ۱. شرایط بپینه HPLC-UV به منظور آنالیز فلاونوئیدها

نوع ستون	Zorbax SB-Aq طول: ۱۵۰ میلی‌متر، قطر: ۴/۶ میلی‌متر و اندازه ذرات: ۵ میکرومتر
فاز متحرک	استونیتریل: متانول: استیک‌اسید، آب (۱۲:۵:۳:۸۰) با میزان جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه
تزریق کننده	با دمای ۴۰ درجه سلسیوس و لوپ: ۱۰ میکرولیتر
طول موج	۲۸۰ نانومتر

به‌منظور اعتبارسنجی روش آنالیز ترکیبات فلاونوئیدی، پارامترهای حدتشخیص (LOD)،

حداندازه‌گیری (LOQ)، تکرارپذیری و راندمان استخراج، بررسی و محاسبه شدند (۱۷).

به منظور مطالعه اثرات ماتریکس نمونه در میزان استخراج آنالیت‌ها نیز از روش افزایش استاندارد بهره گرفته شد. برای این منظور نمونه آبلیمو و آب دیونیزه با غلظت‌های ۱۰۰، ۳۰۰ و ۷۵۰ میکروگرم بر لیتر نسبت به هریک از آنالیت‌ها به صورت جداگانه افزوده شده و روش پیشنهادی بر روی آنها اجرا و مساحت زیر پیک برای آنالیت‌ها در نمونه آب لیمو نسبت به آب دیونیزه محاسبه گردید.

یافته ها

نتایج اندازه گیری ترکیبات فنلی تام

میانگین مقدار تام ترکیبات پلی فنلی و انحراف استاندارد نمونه‌های آبلیموی بسته‌بندی شده و فله‌ای به ترتیب 275 ± 86 و 303 ± 65 میلی گرم در لیتر بدست آمد که تفاوت معنی داری با هم نداشت. از ۶۵ نمونه مورد آزمایش، ۸ نمونه آبلیموی بسته‌بندی شده (۱۹٪) و

تنها یک نمونه آبلیموی فله‌ای (۳/۴٪) و در مجموع ۱۳/۸ درصد از نمونه‌های آبلیمو، بدلیل داشتن مقادیر کمتر از ۲۵۰ میلی گرم در لیتر از مقدار تام ترکیبات پلی فنلی با استاندارد ملی ایران به شماره ۱۱۷ مطابقت نداشته و غیرقابل مصرف تشخیص داده شد. به منظور بررسی تکرارپذیری روش مورد استفاده، روش پیشنهادی بر روی نمونه آبلیمو در چهار سطح غلظتی شامل: ۳۰، ۱۵۰، ۲۵۰ و ۴۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به ازای ۶ تکرار برای هر غلظت صورت گرفت که نتایج به صورت انحراف استاندارد نسبی (RSD%) در جدول ۲ نشان داده شده است. لازم به ذکر است کلیه آزمایشات بر روی آبلیموهایی انجام گرفت که ترکیبات فنلی آن اندازه گیری شده بود و مقادیر غلظتی در نمونه بلانک از مقادیر اسپایک شده کم شد.

جدول ۲. تکرارپذیری و راندمان استخراج در اندازه گیری ترکیبات فنلی تام آبلیمو

سطح غلظتی (میکروگرم بر میلی لیتر)	تکرارپذیری	راندمان استخراج
۳۰	۱/۴	۹۳/۴
۱۵۰	۱/۸	۸۹
۲۵۰	۰/۹	۹۱/۵
۴۵۰	۱/۳	۸۷/۹

نتایج اندازه گیری ترکیبات فلاونوئیدی

میانگین مقادیر غلظتی فلاونوئیدهای مورد مطالعه در آبلیمو و انحراف استاندارد آنها در جدول ۳ آورده شده است. مقایسه نتایج نشان می‌دهد که تعداد ۳۳ نمونه (۵۰/۷۸٪) از آبلیموها (شامل ۲۲ نمونه آبلیموی بسته‌بندی شده و ۱۱ نمونه آبلیموی فله‌ای) با استاندارد ملی ایران (۱۱) مطابق نمی‌باشد. بر اساس استاندارد ملی ایران وجود نارنجین و مقادیر غلظتی کمتر از ۱۵ و ۸ میکروگرم بر میلی لیتر از به ترتیب اریوسیتترین و هسپیردین نشان از تقلبی بودن آبلیموها دارد. طبق یافته‌ها تعداد ۱۶ نمونه از ۲۲ نمونه آبلیموی بسته‌بندی شده مردود (۷۲/۷٪) و تعداد ۱۰ نمونه از ۱۱ نمونه آبلیموی فله‌ای مردود

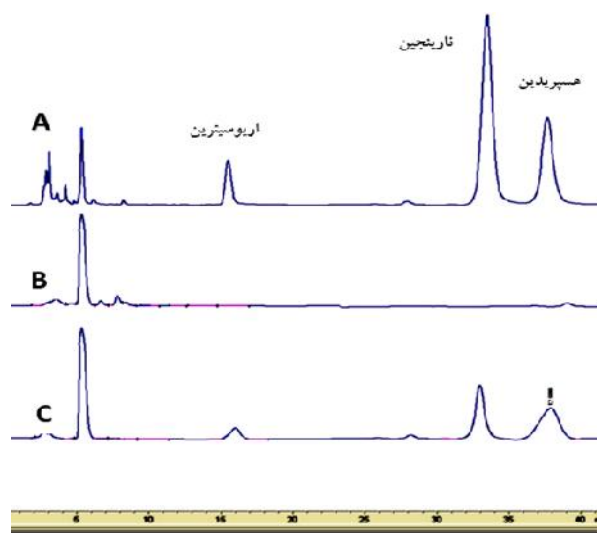
(۹۰/۹٪)، بدلیل دارا بودن نارنجین، تقلبی و غیرقابل مصرف تشخیص داده شد. کروماتوگرام مربوط به یک نمونه آبلیموی اسپایک شده با فلاونوئیدهای مورد مطالعه به غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر در نمودار ۱ آورده شده است. نتایج مشخصات تجزیه‌ای روش پیشنهادی در استخراج و اندازه گیری فلاونوئیدهای اریوسیتترین، نارنجین و هسپیردین از نمونه‌های آبلیمو در جدول ۴ گزارش شده است.

به منظور مطالعه کارایی روش پیشنهادی بر روی نمونه‌های آبلیمو و بررسی اثرات ماتریکس نمونه در میزان استخراج آنالیت‌ها، از روش افزایش استاندارد بهره گرفته شد. نتایج به دست آمده به صورت مقادیر

راندمان و انحراف استاندارد آن‌ها در جدول ۵ آورده شده است. این نتایج نشان می‌دهد که ماتریکس نمونه‌ها در کارایی روش پیشنهادی موثر نیست.

جدول ۳. میانگین مقادیر فلاونوئیدها (میکروگرم در میلی‌لیتر) در آبلیمو

نمونه	اریوسیتترین	نارنجین	هسپیریدین
آبلیمو	$17/32 \pm 9/27$	$28/31 \pm 12/85$	$80/43 \pm 31/03$



نمودار ۱. کروماتوگرام (PLC-UV : A) یک نمونه آبلیموی اسپایک‌شده با ۱۰۰ میکروگرم بر لیتر از اریوسیتترین، نارنجین و هسپیریدین، (B) نمونه شاهد، (C) نمونه آبلیموی حقیقی دارای نارنجین و هسپیریدین

جدول ۴. ارقام شایستگی روش پیشنهادی در استخراج ترکیبات فلاونوئیدی از نمونه‌های آبلیمو

آنالیت	معادله کالیبراسیون	محدوده خطی (ppm)	حد تشخیص (ppm)	حد کمی (ppm)	ضریب رگرسیون	انحراف استاندارد نسبی (%)	راندمان استخراج (%)
اریوسیتترین	$Y = 57/50.8 X + 15/3$	۰/۲-۲۵	۰/۰۵	۰/۲	۰/۹۹۹۷	۱/۴	۸۸/۵
نارنجین	$Y = 67/50.8 X - 69$	۰/۱۴-۱۰۰	۰/۱۴	۰/۵	۰/۹۹۷۶	۱/۱	۹۱/۲
هسپیریدین	$Y = 63/0.5 X - 73/9$	۰/۳-۱۵۰	۰/۰۸	۰/۳	۰/۹۹۹۶	۱/۸	۹۲/۶

جدول ۵. مطالعه اثر ماتریکس آبلیمو در کارایی استخراج فلاونوئیدها از آبلیمو

فلاونوئید	غلظت افزوده شده (ppm)	غلظت استخراج شده (ppm)	راندمان استخراج (%)
اریوسیتترین		$89 \pm 1/2$	۸۹
هسپیریدین	۱۰۰	$91 \pm 1/4$	۹۱
نارنجین		$84 \pm 0/7$	۸۴
اریوسیتترین		$283 \pm 1/3$	۹۴/۳
هسپیریدین	۳۰۰	$291 \pm 2/2$	۹۷
نارنجین		$288 \pm 1/5$	۹۶
اریوسیتترین		$741 \pm 1/2$	۹۸
هسپیریدین	۷۵۰	$751 \pm 1/6$	۱۰۱
نارنجین		$753 \pm 1/2$	۹۹

نتیجه‌گیری و بحث

در این کار پژوهشی از یک روش سریع و آسان به‌منظور استخراج و پیش‌تغلیظ فلاونوئیدهای اریوسیتترین، هسپریدین و نارینجین از نمونه‌های آبلیمو و آنالیز آنها با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا استفاده شد. نتایج به‌دست آمده نشان داد که این روش از حدتشخیص پایین، تکرارپذیری خوب، محدوده خطی وسیع و راندمان استخراج بالایی برخوردار است.

میانگین مقدار اریوسیتترین در انواع لیموترش‌های ایران در مطالعه‌ای ۲۴/۳ میکروگرم در میلی‌لیتر بدست آمده است (۲۰) که نزدیک به مقادیر حاصل از تحقیق حاضر یعنی ۱۷/۳۲ میکروگرم در میلی‌لیتر است. مقادیر بدست آمده برای هسپریدین در این مطالعه (۸۰/۴۳ میکروگرم در میلی‌لیتر) تفاوت قابل‌توجهی با مطالعات مشابه انجام گرفته بر روی این ترکیب فلاونوئیدی در کشورمان (با میانگین ۱۶/۰۳ میکروگرم در میلی‌لیتر) و نیز مقدار هسپریدین در انواع گونه‌های لیموترش در کشور مالزی (که از صفر تا ۱۶/۶۷ میکروگرم در میلی‌لیتر متغیر بوده است) نشان داد (۲۲-۲۰)؛ گرچه طبق استاندارد ملی ایران مقدار کمینه هسپریدین در آبلیمو ۸۰ میکروگرم در میلی‌لیتر اشاره شده است (۱۲).

همچنین نتایج نشان داد که نمونه‌های بسته‌بندی‌شده که محصول کارخانه‌های مختلف و دارای برچسب استاندارد و نیز تاییدیه وزارت بهداشت بود و انتظار می‌رفت که تقلب کمتری در آن صورت گرفته‌باشد (با ۵۲/۳۸٪ نمونه غیر قابل قبول)، بیشتر از نمونه‌های فله‌ای بدون نام و نشان و نظارت سازمان‌های نظارتی مانند موسسه استاندارد و اداره نظارت بر مواد غذایی و آشامیدنی وزارت بهداشت (با ۴۷/۸۳٪ نمونه غیر قابل قبول) مردود و تقلبی بودند. در مطالعه حاضر دلیل غیراستاندارد بودن بیشتر نمونه‌های

آبلیموی مردود (۷۸/۸٪) دارا بودن ترکیب فلاونوئیدی نارینجین بود.

در روش اندازه‌گیری ترکیبات فلاونوئیدی، ۲۴ نمونه آبلیموی بیشتر (۴۰٪ از نمونه‌ها) نسبت به روش اندازه‌گیری فنل‌تام، غیراستاندارد تشخیص داده شد و این موضوع نشان می‌دهد که تولیدکنندگان آبلیمو با روش‌هایی پیشرفته مانند افزودن ترکیبات حاوی پلی‌فنل‌ها که بعنوان مثال به وفور در پوست و دانه‌های مرکبات یافت می‌شود (۲۳، ۲۴)، سعی در بالابردن مقدار ترکیبات پلی‌فنلی تام در آبلیمو دارند تا در بررسی میزان فنل تام با متدهایی مانند اسپکتروسکوپی، آبلیمو طبیعی و سالم و بدون تقلب به‌نظر برسد. وجود مقادیر بالای فلاونوئید نارینجین در نمونه‌ها نیز می‌تواند از منشأ پوست مرکباتی مانند پرتقال و گریپ‌فروت باشد (۲۳، ۲۴). بنابراین و با توجه به تقلبات روزافزونی که به‌دلیل سودجویی بیشتر در صنایع مختلف غذایی صورت می‌گیرد، لازم است نهادهای ناظر بر کیفیت بهداشتی مواد غذایی، از روش‌های جدید، کارآمد و دقیق مانند روش کروماتوگرافی ارائه‌شده در این مطالعه و یا تکنیک‌های دیگر آنالیز ترکیبات فلاونوئیدی مانند کروماتوگرافی مایع با دتکتورهای یونیزاسیون الکترواسپری (LC/ESI) و یا دتکتور مَس اسپکترومتری (LC/MS) و همچنین آزمون‌هایی مانند تعیین مقدار بتاکاروتن، برای کشف تقلبات این چاشنی مهم غذایی و تامین سلامت جامعه استفاده نمایند.

تعارض منافع

نویسندگان هیچگونه تعارض منافع ندارند.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از آقای علی‌اکبر علیزاده که در انجام مراحل آزمایشگاهی و فنی این تحقیق همکاری نمودند تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

- 1- Moufida S, Marzouk B. Biochemical characterization of sweet orange, lemon, bergamot and bitter orange. *Phytochemistry*. 2003; 62(8): 1283-9.
- 2- Steven N. Vitamin C. Contents of Citrus Fruit and Their Products: A Review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 1980; 28(1): 8-18.
- 3- Jesudoss VA, Jayaraman S, Madhavan J, Namasivayam S. d-limonene attenuates blood pressure and improves the lipid and antioxidant status in high fat diet. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 2010; 2(11): 752-8.
- 4- Crozier A, Clifford MN, Ashihara H. Plant secondary metabolites: occurrence, structure and role in the human Diet. 1st ed. Tokyo: Blackwell, 2006: 320-86.
- 5- Pietta PG. Flavonoids as antioxidants. *Journal of Natural Products*. 2000; 63: 1035-42.
- 6- Garg A, Garg S, Zaneveld L, Singla A. Chemistry and pharmacology of the citrus bioflavonoid hesperidin. *Phytotherapy Research*. 2001; 15: 655-69.
- 7- Gattuso G, Barreca D, Gargiulli C, Leuzzi U, Caristi C. Flavonoid composition of citrus juices. *Molecules*. 2007; 12: 1641-73.
- 8- Singh SV, Jain RK, Gupta A, Dhatt AS. Debittering of Citrus juices – A review. *Journal of Food Science and Technology*. 2003; 40: 247–53.
- 9- Robards K, Antolovich M. Methods for assesing the authencity of lemon juice. *Analyst*. 1995; 120: 1-28.
- 10- Nogata Y, Ohta H, Yoza KI, Berhow M, Hasegawa S. High-performance liquid chromatographic determination of naturally-occurring flavonoids in Citrus with a photodiodearray detector. *Journal of Chromatography A*. 1994; 667: 59–66.
- 11-Taghizadeh M, Asemi Z, Shakeri H, Gholsorkhi F, Takhtfiroozeh SM. The Sensitivity and Specifity of Spectrophotometer and Polarimeter Methodes in the Detection of Fraud of Produced Lemon Juice in Iran. *Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services*. 2014 Dec; 36(5): 16-21. [In Persian]
- 12- Institute of Standards and Industrial Research of Iran. Lime juice – Specifications and Test methods. 5st revision, 2013; ISIRI No. 117. [In Persian]
- 13-Baranowska I, Bajkacz S. A new UHPLC-MS/MS method for the determination of flavonoids in supplements and DPPH-UHPLC-UV method for the evaluation of the radical scavenging activity of flavonoids. *Food Chemistry*. 2018; 256: 333-341.
- 14-Shena J, Li P, Hea C, Liua H, Liua Y. Simultaneous determination of 15 flavonoids from different parts of *Scutellaria baicalensis* and its chemometrics analysis. *Chinese Herbal Medicines*. 2019; 11: 20–27.
- 15-Yang X, Yan L, Liu T, Zhang Q, Zhao Y, Yu M, Yu Z. Simultaneous determination of bioactive flavonoids of *Hoveniae Semen* in rat plasma by LC-MS/MS: Application to a comparative pharmacokinetic study. *Journal of Chromatography B*. 2019; 1104: 73-80.
- 16- Lu XF, Zhou Y, Ren YP, Zhang J. Improved sample treatment for the determination of flavonoids and polyphenols in sweet potato leaves by ultra performance convergence chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2019; 169: 245-253.
- 17- Marinova D, Ribarova F, Atanassova M. Total phenolic and total Flavenoids in Bulgarian fruits and vegetables. *Journal of Chemical Technology and Metallurgy*. 2005; 40(3): 255-60.
- 18- Cristin ICS, João LMS, José LFCL, Elias AGZ. Liquid–liquid extraction in flow analysis: A critical review. *Analytica Chimica Acta*. 2009; 652: 54–65.
- 19- Gorinstein S, Huang D, Leontowicz H, Leontowicz M, Yamamoto K, Soliva-Fortuny K, et al. Determination of Naringin and Hesperidin in Citrus fruit by High performance liquid chromatography. *Acta Chromatographica*. 2006; (17): 108-24.
- 20- Saeidi I, Hadjmohammadi MR, Peyrovi M, Iranshahi M ,Barfi B, Beig Babaei A, et al. HPLC determination of hesperidin, diosmin and eriocitrin in Iranian lime juice using polyamide as an adsorbent for solid phase extraction. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2011; 56: 419–22.

- 21- Hajimahmoodi M, Moghaddam G, Mousavi SM, Sadeghi N, Oveisi MR, Jannat B. Total Antioxidant Activity and Hesperidin, Diosmin, Eriocitrin and Quercetin, Contents of Various Lemon Juices. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*. 2014; 13(6): 951-6.
- 22- Mohammed Fadlinizal AG, Nagendra PK, Weng KK, Ismail A. Flavonoid, hesperidine, total phenolic contents and antioxidant activities from Citrus species. *African Journal of Biotechnology*. 2010; 9(3): 326-30.
- 23- Russo M, Bonaccorsi I, Inferrera V, Dugo P, Mondello L. Underestimated sources of flavonoids, limonoids and dietary fiber: Availability in orange's by-products. *Journal of functional foods*. 2015; 12: 150–7.
- 24- Russo M, Bonaccorsi I, Torre G, Sarò M, Dugo P, Mondello L. Underestimated sources of flavonoids, limonoids and dietary fibre: Availability in lemon's by-products. *Journal of functional foods*. 2014; 9: 18–26.