

اصالت سنجی آب لیموهای مصرفی استان گلستان با استفاده از کروماتوگرافی مایع جفت شده با آشکارساز جرمی

مهدی مهام^{۱*}، روح اله کرمی اسبو^۲، محمد حسین شجاعی علی آبادی^۳

۱- استادیار گروه شیمی، واحد علی آباد کنول، دانشگاه آزاد اسلامی، علی آباد کنول، ایران

۲- استادیار مؤسسه تحقیقات گیاه پزشکی کل کشور، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، تهران، ایران

۳- مدیر عامل آزمایشگاه علوم حیاتی فاروق، تهران، ایران

(تاریخ دریافت: ۹۷/۰۴/۰۳ تاریخ پذیرش: ۹۷/۱۱/۰۹)

چکیده

آب لیموهای صنعتی ممکن است دارای افزودنی های غیر مجاز بوده که منجر به بیماری های مختلفی در افراد جامعه شوند. در نتیجه، استفاده از روش های کارا و مؤثر جهت شناسایی آب لیموهای تقلبی بسیار حائز اهمیت است. در تحقیق حاضر برای اولین بار در کشور، تشخیص تقلب در آب لیموهای صنعتی در استان گلستان از طریق آنالیز اسیدهای آلی شامل اسید سیتریک، اسید ایزوسیتریک، اسید مالیک و همچنین تعیین نسبت بین اسید سیتریک و اسید ایزوسیتریک با استفاده از کروماتوگرافی مایع جفت شده با آشکارساز جرمی ارائه شده است. صحت روش ارائه شده، از طریق آنالیز نمونه های آب لیموی طبیعی تأیید شد. حد تشخیص و حد اندازه گیری کمی برای اسید سیتریک، اسید ایزوسیتریک و اسید مالیک به ترتیب ۲ و ۵، ۰/۰۲ و ۰/۰۵، ۰/۲ و ۰/۵ میلی گرم بر لیتر به دست آمد. نمونه های آب لیموی صنعتی از برندهای تجاری پرمصرف موجود در سطح عرضه انتخاب شدند و شناسایی نمونه های تقلبی از طریق مقایسه مقادیر اسیدهای آلی با مقادیر مجاز تعیین شده توسط استاندارد اروپا، انجام شد. نتایج به دست آمده نشان داد که روش پیشنهادی بسیار مؤثر و حساس در تشخیص نمونه های تقلبی آب لیمو صنعتی می باشد.

کلید واژگان: آب لیمو، اسیدهای آلی، کروماتوگرافی مایع جفت شده با آشکارساز جرمی

* مسئول مکاتبات: mehdimaham@gmail.com

۱- مقدمه

لیموترش که به اختصار لیمو نامیده می‌شود، از خانواده مرکبات بوده و مصارف فراوانی مخصوصاً در آشپزی پیدا نموده است. دلیل عمده پرورش لیموها، استفاده از طعم ترش آنها به واسطه وجود مقدار زیادی اسید سیتریک می‌باشد. بهترین مناطق برای رشد درختچه‌های لیموترش، مناطق گرمسیری با آب و هوای مدیترانه‌ای است. مرغوب‌ترین لیموترش‌ها در ایران، در شهرهای گرمسیری جنوب و استان فارس کشت می‌شوند. در ایران در سال ۱۳۹۵، از حدود ۲/۸۷ میلیون هکتار سطح باغ‌های کشور (اعم از غیربارور و بارور)، حدود ۸۳۱ هزار هکتار معادل ۲۹٪ به میوه‌های نیمه‌گرمسیری اختصاص داشته که از این مقدار ۸۲/۳۶٪ آن مربوط به سطح بارور و ۱۷/۶۴٪ مربوط به سطح غیربارور بوده است. لیموترش ۴/۳٪ از کل سطح باغ‌های میوه‌های نیمه‌گرمسیری (اعم از غیربارور و بارور) را به خود اختصاص داده است. همچنین، از ۸ میلیون تن میوه‌های نیمه‌گرمسیری تولید شده در سال ۱۳۹۵، میزان تولید لیموترش معادل ۷/۹٪ از کل میزان تولید میوه‌های نیمه‌گرمسیری بوده است [۱]. بزرگ‌ترین تولیدکننده لیموترش در جهان، کشور هند با سهم حدود ۱۶٪ از کل لیموی ترش تولیدی جهان می‌باشد. پس از کشور هند به ترتیب کشورهای مکزیک، آرژانتین، برزیل و اسپانیا با تولید حدود ۱۴/۵، ۱۰، ۸ و ۷٪ لیموی ترش تولیدی جهان قرار دارند [۲]. آب لیموی یکی از پرمصرف‌ترین محصولات گیاهی و مکمل‌های غذایی در ایران می‌باشد. آب لیموی طبیعی در درمان زخم معده، اختلالات تنفسی، اختلالات ادراری، یبوست و سرماخوردگی تأثیر داشته و دارای خواص ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدان می‌باشد که منجر به افزایش قدرت سیستم ایمنی بدن می‌شود [۳ و ۴]. موضوع تقلب در آب لیمو تاریخی و پرسابقه است. شناسایی و کشف تقلب از دو نظر بهداشتی و اقتصادی اهمیت خاصی دارد؛ زیرا مواد اضافه شده می‌توانند برای سلامتی مضر و خطرناک باشند. همچنین، هزینه‌ای که صرف خرید پرداخت

می‌شود، بیش از ارزش ماده خریداری شده است و سایر تولیدکنندگان از دور رقابت خارج شده و سیستم اقتصادی یک کشور دچار اضمحلال می‌گردد. در دوران قدیم، به دلیل کوچک بودن محیط‌های زندگی و تأثیر بیداری وجدان عمومی و اخلاق، تقلب عمدتاً در زمینه‌هایی صورت می‌گرفت که تأثیر مستقیم بر زندگی و بهداشت مردم نمی‌گذاشت. با بزرگ شدن مراکز تولید و فروش و گسترش شهرنشینی، انواع تقلب در محصولات غذایی نیز گسترش یافت. متأسفانه امروزه بسیاری از آب لیموهای صنعتی به دلیل وجود افزودنی‌های شیمیایی و سنتزی نه تنها خواص غذایی و درمانی ندارند بلکه منجر به بیماری مختلفی از جمله انواع سرطان‌ها، بیماری‌های گوارشی، کلیوی، کبدی و تخریب مینای دندان می‌شوند. در نتیجه، استفاده از روش‌های معتبر به منظور تشخیص تقلبات آب لیمو در برندهای تجاری امری ضروری و حیاتی است [۵ و ۶].

اسیدهای آلی از جمله ترکیبات اصلی موجود در مرکبات و سبزی‌ها می‌باشند. ماهیت و غلظت اسیدهای آلی موجود در مرکبات به دلیل تأثیر زیادشان بر روی خواص ارگانولپتیک و پایداری آبمیوه‌ها بسیار حائز اهمیت است. این ترکیبات به طور گسترده‌ای به عنوان افزایش‌دهنده‌های غذایی در تولید نوشیدنی‌ها، آبمیوه‌ها و نوشیدنی‌های گیاهی استفاده شده‌اند [۷]. اسیدهای آلی، در مقایسه با سایر ترکیبات موجود در میوه، حساسیت کمتری به تغییر در طی فرایندهای ذخیره‌سازی و پردازش دارند. در نتیجه، به عنوان یک شاخص مفید برای اعتبار محصولات میوه در نظر گرفته می‌شوند [۸]. اندازه‌گیری دقیق اسیدهای آلی و نسبت آنها برای تعیین درصد عصاره و ارزیابی کیفی محصولات مرکبات بسیار مفید می‌باشد؛ زیرا هر میوه یک الگوی منحصر به فرد برای اسیدهای آلی موجود دارد [۹]. اندازه‌گیری کمی اسید مالیک، اسید سیتریک، اسید ایزوسیتریک و مشخص نمودن نسبت اسیدسیتریک به اسید ایزوسیتریک در نمونه‌های آب لیمو به عنوان یک معیار مهم و کاربردی در تشخیص تقلب در آب لیموی صنعتی در نظر گرفته می‌شود. بر

شده است. طیف‌سنجی جرمی باعث آنالیز همزمان آنایت های مختلف با حساسیت و گزینش پذیری زیاد می‌شود [۲۳ و ۲۴]. امروزه استفاده از فراورده‌های سنتزی به جای فراورده‌های طبیعی در نمونه‌های آب لیمو بسیار شایع شده است. روش‌های مختلفی جهت بررسی تقلبات در نمونه‌های آب لیمو مورد استفاده قرار گرفته‌اند. به عنوان مثال، در روش پلاریمتری چرخش نوری مالیک اسید و در روش اسپکتروفتومتری میزان اسیدهای آمینه و ترکیبات پلی فنلی کل جهت بررسی کیفیت نمونه‌های آب لیمو، اندازه‌گیری می‌شوند [۲۵]؛ اما روش‌های فوق زمان‌بر بوده و به راحتی با افزودن نمک‌های سدیم و پتاسیم و همچنین با ایجاد فرمولاسیون‌های مختلف می‌توان این روش‌های سنجش را فریب داد. علاوه بر این، استفاده از این روش‌ها باعث می‌شود که افراد سودجو با افزایش تعداد ترکیبات مضر برای ایجاد فرمولاسیون‌های مناسب، سلامت مصرف‌کننده را به خطر بیندازند. همچنین، آنالیزهایی که در استاندارد ویژگی‌های لیموترش وجود دارند مانند آزمون‌های اندیس فرمالین، ماده خشک، بریکس، انیدرید سولفور، اسیدیته و pH مستلزم انجام روش‌های آماری دقیق جهت کشف تقلبات در نمونه‌های آب لیمو می‌باشند [۲۶]. در نتیجه به‌کارگیری روشی دقیق و سریع جهت بررسی کیفیت نمونه های آب لیمو الزامی است. هدف از تحقیق حاضر، ارائه یک روش پیشرفته برای بررسی تقلبات آب لیموی صنعتی در استان گلستان از طریق آنالیز کروماتوگرافی مایع جفت شده با آشکارساز جرمی می‌باشد. ۳۲ نمونه صنعتی از ۸ برند تجاری پرمصرف موجود در سطح عرضه و ۵ نمونه طبیعی انتخاب و اندازه‌گیری کمی اسیدهای آلی شامل اسید سیتریک، اسید ایزوسیتریک و اسید مالیک در نمونه‌ها انجام شد. تقلب و ناخالصی در نمونه‌های آب لیموی صنعتی از طریق مقایسه مقادیر اسیدهای فوق و نسبت اسید سیتریک به اسید ایزوسیتریک با مقادیر مجاز تعیین‌شده توسط استاندارد اروپا، مشخص شد.

طبق استاندارد اروپا، مقادیر مجاز اسید سیتریک، اسید ایزوسیتریک، اسید مالیک و نسبت مجاز اسید سیتریک به اسید ایزوسیتریک در نمونه‌های آب لیمو باید به ترتیب ۴۰-۷۵، ۰/۶۰۰-۰/۱۸۰، ۱/۵-۵/۰ گرم بر لیتر و ≤ 300 باشد [۱۰]. اندازه‌گیری اسیدهای آلی در ماتریس‌های مختلف مانند آب، گیاهان، آبمیوه‌ها، خاک، عسل و نمونه ادرار گزارش شده است [۱۱-۱۳]. روش‌های آنزیمی [۱۴]، کروماتوگرافی [۱۵ و ۱۶] و الکتروفورز موئینه [۱۷] به‌طورگسترده‌ای برای آنالیز اسیدهای آلی استفاده شده‌اند. آنالیزهای آنزیمی با توجه به نیاز به کیت‌های مخصوص برای هر اسید و مصرف مقادیر زیاد معرف‌های شیمیایی آلی، زمان‌بر بوده و از لحاظ اقتصادی مقرون‌به‌صرفه نمی‌باشند. روش‌های سنتی کروماتوگرافی بدون مشتق‌سازی، نیازمند تکنیک‌های خالص‌سازی برای حذف تداخل ماتریس (به‌عنوان مثال قندها و ترکیبات فنولی) می‌باشند. اکثر روش‌های توسعه یافته برای آنالیز اسیدهای آلی با استفاده از کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) و آشکارسازهای ضریب شکست [۱۸]، طیف‌نورسنجی ماوراء بنفش-مرئی [۱۹]، هدایت سنجی [۲۰] و الکتروشیمیایی [۲۱] گزارش شده‌اند. جداسازی و اندازه‌گیری کمی اسیدهای آلی با کروماتوگرافی مایع جفت شده با آشکارسازهای مرسوم بسیار دشوار است و منجر به محدوده دینامیکی خطی باریک (یک مرتبه بزرگی) و حد تشخیص بزرگ می‌شود؛ زیرا ساختار اسیدهای آلی تفاوت محسوسی با هم ندارند و انواع اسیدهای آلی دارای خصوصیات طیفی مشابه می‌باشند. همچنین، مقادیر pKa اکثر اسیدهای آلی نسبتاً مشابه بوده و در نتیجه به کارگیری تغییرات pH را برای جداسازی کروماتوگرافی اسیدهای آلی با محدودیت مواجه می‌سازد [۲۲]. ترکیب طیف سنجی جرمی با یک تکنیک جداسازی از قبیل کروماتوگرافی گازی، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و الکتروفورز موئینه به طور گسترده‌ای برای آنالیز متابولیت های آب‌دوست استفاده

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد و معرف‌های شیمیایی

اسیدهای آلی شامل اسید سیتریک، اسید ایزوسیتریک و اسید مالیک از شرکت سیگا-آلد ریچ خریداری شدند. متانول (درجه HPLC) از شرکت مرک تهیه شد. یک محلول استوک از اسیدهای آلی در آب دیونیزه شامل اسید سیتریک، اسید مالیک و اسید ایزوسیتریک به ترتیب با غلظت‌های ۱۰۰، ۱۰ و ۱ میلی گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. منحنی کالیبراسیون مربوط به هر اسید آلی از طریق رقیق‌سازی محلول استوک به وسیله آب دیونیزه به دست آمد.

۲-۲- نمونه‌گیری

برای تهیه نمونه‌های آب لیموی طبیعی، لیموترش‌های سنگی^۱ و شیرازی^۲ تهیه شده از میوه‌فروشی‌ها در استان گلستان، پس از شست شو توسط چاقو دو تکه شدند و سپس به وسیله دستگاه آبمیوه‌گیری دستی، آب لیموی طبیعی تهیه شده صاف شد. همچنین، ۳۲ نمونه صنعتی از ۸ برند تجاری پرمصرف موجود در سطح عرضه از سوپر مارکت‌های موجود در استان گلستان انتخاب شدند و نمونه‌های هر برند با هم مخلوط و یک نمونه آزمایشی تهیه شد.

۲-۳- آماده‌سازی نمونه تجزیه‌ای

پنجاه میکرولیتر از نمونه آب لیمو با ۱۴۵۰ میکرولیتر آب مخلوط گردید و پس از صاف شدن با پالایه ۰/۴۵ میکرون برای تزریق وارد دستگاه تزریق خودکار شد.

۲-۴- دستگاهوری

اندازه‌گیری کمی اسیدهای آلی با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا مدل HPLC (Waters Alliance) متصل شده به یک دستگاه MS/MS (Waters Micromas ZQ) مجهز به

یک منبع یونیزاسیون الکترو اسپری در مد منفی انجام شد. جداسازی کروماتوگرافی با استفاده از ستون Gl sciences C18 (طول ۲۵ سانتیمتر و قطر ذرات ۴/۶ میکرومتر) در دمای ستون ۴۰°C انجام شد. فاز متحرک در مد شویس شیبی با محلول آب + اسید فرمیک ۰/۱٪ و سرعت ۰/۳ میلی‌لیتر بر دقیقه شروع و پس از گذشت شش دقیقه به ترکیب ۱۰۰٪ محلول متانول + اسید فرمیک ۰/۱٪ رسید. حجم تزریق ۳۰ میکرولیتر بود. دو ترنزیشن پایش چندگانه واکنش^۳ در مد منفی برای اندازه‌گیری‌های کمی و کیفی اسیدهای آلی استفاده شد (جدول ۱). سایر پارامترهای عملکردی شامل ولتاژ موئینه^۴، ۳kV، دمای منبع و تخریب^۵: ۱۲۰ و ۱۵۰°C، سرعت جریان های گاز تخریب و مخروطی^۶: ۳۵۰ و ۵۰ لیتر بر ساعت بود.

۳- نتایج و بحث

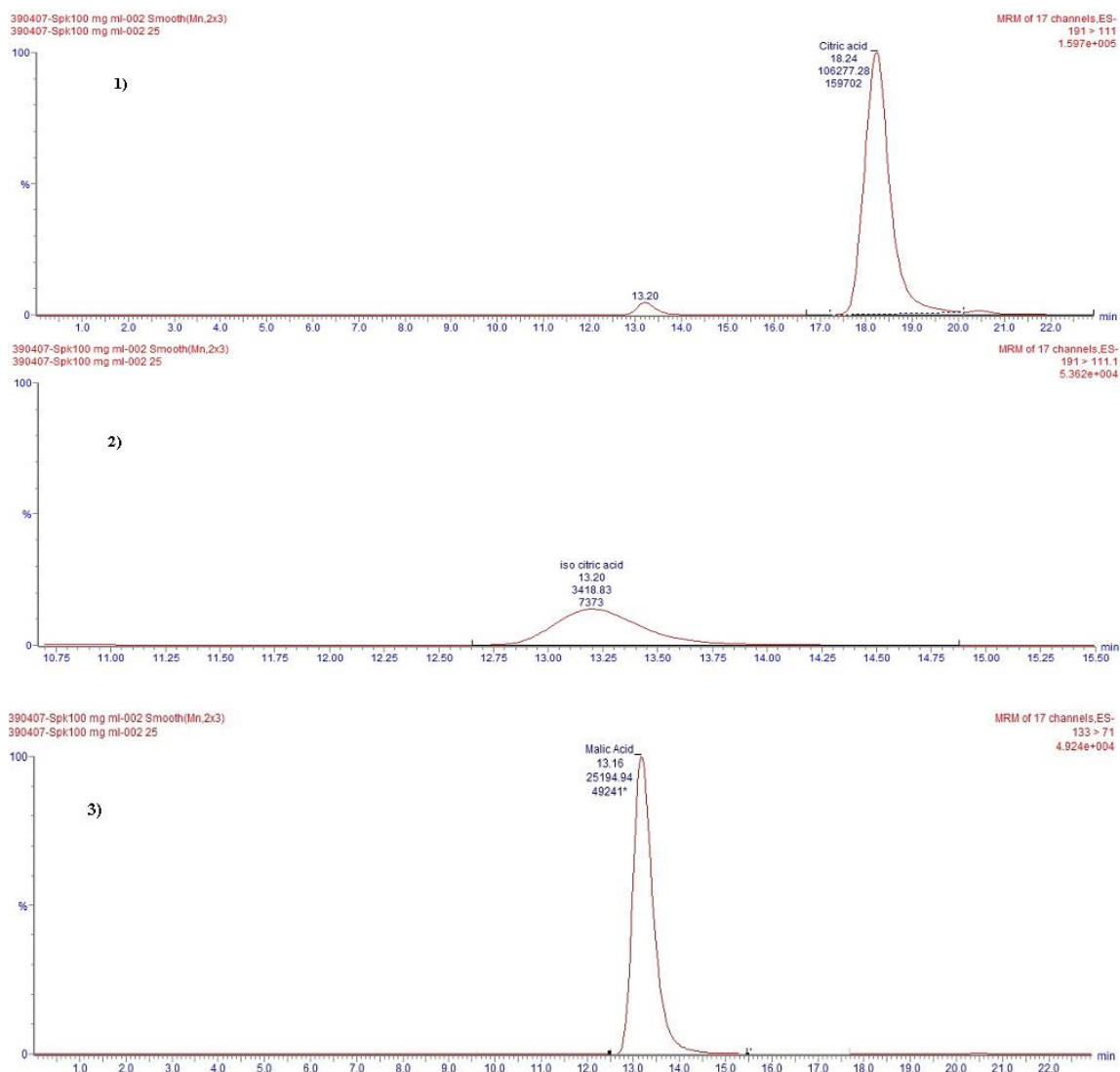
در تحقیق حاضر، یک روش مؤثر جهت اصالت سنجی نمونه های آب لیمو از طریق جداسازی اسیدهای آلی شامل اسید سیتریک، اسید مالیک و اسید ایزوسیتریک با استفاده از ستون و فاز متحرک و روش تفکیک جرمی معرفی شده انجام شد (شکل ۱). استفاده از دو ترنزیشن MRM برای هر اسید آلی منجر به تأیید دقیق آنالیت های مورد نظر شد. با توجه به تشابه جرمی اسید سیتریک و اسید ایزوسیتریک جداسازی آنها حائز اهمیت بود؛ زیرا تعیین مقدار اسید ایزوسیتریک نقش کلیدی در اصالت سنجی نمونه‌های آب لیمو دارد. قیمت بالای اسید ایزوسیتریک مانع جدی برای افزودن این ترکیب در نمونه‌های آب لیموی تقلبی موجود در بازار است؛ اما تمایز اسید مالیک از اسید ایزوسیتریک و سیتریک، به دلیل داشتن جرم‌های مختلف، به راحتی انجام شد.

3. Multiple Reaction Monitoring (MRM)
4. Capillary voltage
5. Source and desolvation
6. Flow rates desolvation and cone gas

1. Lemon
2. Lime

Table 1 Multiple Reaction Monitoring (MRM) transitions used for organic acids

Organic Acids	Parent (m/z)	Daughter (m/z)	Cone (V)	Collision (V)
Malic Acid	133	71	20	20
Malic Acid	133	115	20	20
Citric Acid	191	87	20	40
Citric Acid	191	111	20	20
IsoCitric Acid	191	111	20	20
IsoCitric Acid	191	173	20	30

**Fig 1** Multiple reaction monitoring (MRM) chromatograms in 100, 1 and 10 g/L standard solutions for citric, isocitric and malic acids, respectively. (1: citric acid; 2: isocitric acid; 3: malic acid)

مصرف و فروش لیموترش مختص کشور ما و چند کشور آسیایی بوده و منابع تولید محصول مرجع وجود ندارد، بنابراین تنها راه اثبات صحت روش دستگامی استفاده از لیموترش

منحنی‌های کالیبراسیون برای اسید سیتریک، اسید ایزوسیتریک و اسید مالیک به ترتیب در محدوده ۵-۱۰۰، ۰/۵-۱۰/۰۵ و ۱۰ گرم بر لیتر ($R^2 > 0/99$) خطی بود. از آنجائیکه این نوع

نوع لیموترش‌های تولیدی در کشور در ماه‌های مختلف برداشت و فروش جمع‌آوری شوند. همچنین، محاسبات حد تشخیص و حد اندازه‌گیری کمی کارایی روش ارائه شده را برای آنالیز مقادیر بسیار جزئی از اسیدهای آلی در نمونه‌های آب لیمو اثبات نمود.

به منظور بررسی کیفیت آب لیموهای صنعتی در استان گلستان، ۳۲ نمونه صنعتی از ۸ برند تجاری پرمصرف موجود در سطح عرضه انتخاب شدند. مقادیر اسیدهای آلی شامل اسید سیتریک، اسید ایزوسیتریک، اسید مالیک و نسبت بین اسید سیتریک به اسید ایزوسیتریک در نمونه‌ها تعیین و با مقادیر مجاز مقایسه شدند (جدول ۳).

در تمامی برندهای تجاری، مقدار اسید سیتریک در محدوده استاندارد بود؛ اما مقدار اسید ایزوسیتریک و در نتیجه نسبت مابین اسید سیتریک و اسید ایزوسیتریک به جز در برندهای ردیف ۶ و ۸ (جدول ۳) در محدوده مجاز قرار نداشت. در این دو برند تجاری، مقدار اسید مالیک خارج از مقدار مجاز تعیین شده بود که با توجه به نتایج به دست آمده از آنالیز نمونه‌های لیمو سنگی طبیعی می‌توان نتیجه‌گیری نمود که ممکن است عرضه‌کنندگان این برندهای تجاری از نمونه‌های لیمو سنگی برای تهیه آب لیموهای صنعتی استفاده نموده‌اند. همچنین در یک برند تجاری (ردیف ۴ جدول ۳)، مقدار اسید مالیک در محدوده مجاز قرار داشت، اما مقدار اسید ایزوسیتریک که نقش اصلی در تعیین کیفیت آب لیموی صنعتی دارد از مقدار استاندارد تعیین شده بیشتر بود، شاید یکی از مهم‌ترین دلایل این اتفاق استفاده از کنسانتره آب لیمو و رقیق نمودن آن با آب لیموهای تقلبی باشد که در این حالت میزان اسید ایزوسیتریک از مقدار مجاز تعیین شده بیشتر می‌شود.

بر اساس نتایج به دست آمده، اکثر نمونه‌های آب لیموی صنعتی دارای اسیدهای آلی خارج از محدوده مجاز تعیین شده در استاندارد اروپا بودند که نشان‌دهنده اصیل نبودن محصول عرضه شده می‌باشد.

طبیعی می‌باشد. صحت روش با بررسی نتایج آب لیمو طبیعی به عنوان محصول مرجع بررسی شد. حد تشخیص و اندازه‌گیری کمی به ترتیب از طریق اندازه‌گیری غلظت اسیدهای آلی در نسبت سیگنال به نویز ۳ به ۱ و ۱۰ به ۱ تعیین شد. بر این اساس، حد تشخیص و اندازه‌گیری کمی برای اسیدسیتریک، اسید ایزوسیتریک و اسید مالیک به ترتیب ۲ و ۵، ۰/۰۲ و ۰/۰۵، ۰/۲ و ۰/۵ میلی‌گرم بر لیتر به دست آمد.

ابتدا آنالیز آب لیموهای طبیعی از طریق اندازه‌گیری اسیدهای آلی شامل اسید سیتریک، اسید ایزوسیتریک، اسید مالیک و تعیین نسبت بین اسید سیتریک به اسید ایزوسیتریک انجام شد. همان‌طور که در جدول ۲ نشان داده شد، ۲ نمونه لیمو شیرازی و ۳ نمونه لیمو سنگی در این مرحله آنالیز شدند. بررسی اثر ماتریس آب لیموی طبیعی بر روی نتایج نشان داد که مقادیر اسید سیتریک، اسید ایزوسیتریک، اسید مالیک و همچنین نسبت بین اسید سیتریک و اسید ایزوسیتریک در نمونه‌های لیمو شیرازی کاملاً منطبق با استاندارد اروپا می‌باشند. ولی در مورد اسید مالیک در لیمو سنگی حد تعیین شده در استاندارد اروپا نیاز به بررسی بیشتر و تحقیق در انواع لیموترش‌های سنگی کشت شده در کشور دارد. در سه نمونه لیمو سنگی مختلف جمع‌آوری شده در سطح شهر، هیچ‌یک از نمونه‌ها دارای اسید مالیک در محدوده مجاز تعیین شده نبودند. تحقیقات نشان می‌دهد شرایط نگهداری و ذخیره‌سازی میوه‌ها می‌تواند محتوای اسید آلی آنها را تغییر دهد. روت و همکاران در یک بررسی ۳ تا ۶ ماهه در سبب مشخص نمودند که غلظت اسید مالیک پس از شش ماه کمتر از زمان برداشت آن بود [۲۷].

نتایج تحقیق حاضر و همچنین مطالعات سایر محققان نشان می‌دهد که حد مجاز اسید مالیک در لیموترش‌های سنگی در عرضه فروش در داخل کشور بسیار متفاوت‌تر از این محدوده در لیموترش‌های اروپا می‌باشد؛ بنابراین برای بومی‌سازی میزان حد مجاز اسید مالیک در لیموترش‌های سنگی، لازم است این

Table 2 Analysis of natural lime and lemon juice samples

Sample	Organic acids	Results	allowed limit	Conformity
Lime (1)	Citric Acid	48.2 (g/L)	40-75 (g/L)	Yes
	IsoCitric Acid	0.44 (g/L)	0.180-0.600 (g/L)	Yes
	Citric Acid/IsoCitric Acid ratio	109.5	≤ 300	Yes
	Malic Acid	3.3 (g/L)	1.5-5.0 (g/L)	Yes
Lime (2)	Citric Acid	44.2 (g/L)	40-75 (g/L)	Yes
	IsoCitric Acid	0.42 (g/L)	0.180-0.600 (g/L)	Yes
	Citric Acid/IsoCitric Acid ratio	105.2	≤ 300	Yes
	Malic Acid	2.6 (g/L)	1.5-5.0 (g/L)	Yes
Lemon (1)	Citric Acid	40.2 (g/L)	40-75 (g/L)	Yes
	IsoCitric Acid	0.375 (g/L)	0.180-0.600 (g/L)	Yes
	Citric Acid/IsoCitric Acid ratio	107.2	≤ 300	Yes
	Malic Acid	< 0.6 (g/L)	1.5-5.0 (g/L)	No
Lemon (2)	Citric Acid	52.91 (g/L)	40-75 (g/L)	Yes
	IsoCitric Acid	0.48 (g/L)	0.180-0.600 (g/L)	Yes
	Citric Acid/IsoCitric Acid ratio	110.2	≤ 300	Yes
	Malic Acid	1.1 (g/L)	1.5-5.0 (g/L)	No
Lemon (3)	Citric Acid	56.5 (g/L)	40-75 (g/L)	Yes
	IsoCitric Acid	0.55 (g/L)	0.180-0.600 (g/L)	Yes
	Citric Acid/IsoCitric Acid ratio	102.7	≤ 300	Yes
	Malic Acid	< 0.6 (g/L)	1.5-5.0 (g/L)	No

Table 3 Analysis of industrial lemon juice samples

Sample	Organic acids	Results	allowed limit	Conformity
(1)	Citric Acid	54.1 (g/L)	40-75 (g/L)	Yes
	IsoCitric Acid	< 0.03 (g/L)	0.180-0.600 (g/L)	No
	Citric Acid/IsoCitric Acid ratio	> 1800	≤ 300	No
	Malic Acid	< 0.6 (g/L)	1.5-5.0 (g/L)	No
(2)	Citric Acid	44.1 (g/L)	40-75 (g/L)	Yes
	IsoCitric Acid	0.13 (g/L)	0.180-0.600 (g/L)	No
	Citric Acid/IsoCitric Acid ratio	339.2	≤ 300	No
	Malic Acid	< 0.67 (g/L)	1.5-5.0 (g/L)	No
(3)	Citric Acid	40.0 (g/L)	40-75 (g/L)	Yes
	IsoCitric Acid	0.09 (g/L)	0.180-0.600 (g/L)	No
	Citric Acid/IsoCitric Acid ratio	444.4	≤ 300	No
	Malic Acid	< 0.6 (g/L)	1.5-5.0 (g/L)	No
(4)	Citric Acid	43.5 (g/L)	40-75 (g/L)	Yes
	IsoCitric Acid	0.67 (g/L)	0.180-0.600 (g/L)	No
	Citric Acid/IsoCitric Acid ratio	65.0	≤ 300	Yes
	Malic Acid	1.3 (g/L)	1.5-5.0 (g/L)	Yes
(5)	Citric Acid	45.2 (g/L)	40-75 (g/L)	Yes
	IsoCitric Acid	0.11 (g/L)	0.180-0.600 (g/L)	No
	Citric Acid/IsoCitric Acid ratio	411.0	≤ 300	No
	Malic Acid	< 0.6 (g/L)	1.5-5.0 (g/L)	No
(6)	Citric Acid	66.7 (g/L)	40-75 (g/L)	Yes
	IsoCitric Acid	0.385 (g/L)	0.180-0.600 (g/L)	Yes
	Citric Acid/IsoCitric Acid ratio	173.2	≤ 300	Yes
	Malic Acid	1.23 (g/L)	1.5-5.0 (g/L)	No
(7)	Citric Acid	62.8 (g/L)	40-75 (g/L)	Yes
	IsoCitric Acid	0.158 (g/L)	0.180-0.600 (g/L)	No
	Citric Acid/IsoCitric Acid ratio	397.5	≤ 300	No
	Malic Acid	0.386 (g/L)	1.5-5.0 (g/L)	No
(8)	Citric Acid	51.7 (g/L)	40-75 (g/L)	Yes
	IsoCitric Acid	0.545 (g/L)	0.180-0.600 (g/L)	Yes
	Citric Acid/IsoCitric Acid ratio	94.9 (g/L)	≤ 300	Yes
	Malic Acid	1.318 (g/L)	1.5-5.0 (g/L)	No

۴- نتیجه گیری

پایه و برهان لازم جهت کشف تقلب، شناسایی اجزای آب لیمو در حالت اصیل طبیعی و بدون تقلب و سپس مقایسه آب لیموی مشکوک با مشخصات نمونه طبیعی است. مواد موجود در این محصول محدوده وسیعی از ترکیبات شیمیایی را در برمیگیرد که در این تحقیق الگوی اسیدهای آلی آن مبنای مناسبی جهت کشف تقلب بوده است. آب لیمو به عنوان یکی از پر مصرفترین مکملهای غذایی در درمان بسیاری از بیماریها نقش مؤثری دارد. هرچند استفاده از آب لیموهای تقلبی نه تنها در بهبود بیماری نقش ندارند بلکه بر روی سلامت افراد جامعه اثرات بسیار سویی میگذارند؛ بنابراین، استفاده از روشهای کارا و مؤثر به منظور بررسی میزان تقلب در نمونههای آب لیمو در حفظ و ارتقای سلامت جامعه بسیار حیاتی و الزامی است. در تحقیق ارائه شده برای اولین بار در کشور، کیفیت آب لیموهای صنعتی در استان گلستان از طریق اندازه گیری کمی اسیدهای آلی شامل اسید سیتریک، اسید ایزوسیتریک، اسید مالیک و همچنین نسبت بین اسید سیتریک به اسید ایزوسیتریک با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع جفت شده با آشکارساز جرمی بررسی شد. به منظور گزارش میزان ناخالصی در نمونههای صنعتی، مقادیر به دست آمده برای اسیدهای آلی مورد مطالعه، با استاندارد اروپا تطبیق داده شد. براساس نتایج حاصل شده، اصالت اکثر آب لیموهای صنعتی عرضه شده در بازار مورد تردید است که با توجه به مضرات ناشی از مصرف آب لیموی تقلبی بر روی سلامت افراد جامعه و اهمیت موضوع، انتظار می رود بررسی بیشتری بر روی محصولات عرضه شده در بازار توسط نهادهای نظارتی مرتبط انجام پذیرد.

۵- تشکر و قدردانی

این مقاله مستخرج از طرح پژوهشی مورد حمایت دانشگاه آزاد اسلامی واحد علی آباد کتول می باشد.

۶- منابع

- Agricultural Statistics, Horticultural Products, 3, 1-231.
- [2] Food And Agricultural Organization of the United Nations: Economic And Social Department: The Statistical Division.
- [3] Saeidi, I., Hadjmohammadi, M.R., Peyrovi, M., Iranshahi, M., Barfi, B., Babaei, A.B., Dust, A.M. (2011). 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*, 56(2), 419-422.
- [4] Vekiari, S.A., Protopapadakis, E.E., Papadopoulou, P., Papanicolaou, D., Panou, C., Vamvakias, M. (2002). Composition and seasonal variation of the essential oil from leaves and peel of a cretan lemon variety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50(1), 147-153.
- [5] Vekiari, S.A., Protopapadakis, E.E., Papadopoulou, P., Papanicolaou, D., Panou, C., Vamvakias, M. (2002). Composition and seasonal variation of the essential oil from leaves and peel of a cretan lemon variety. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 147-153.
- [6] Moshonas, M.G., Shaw, P.E. (1972). Analysis of flavor constituents from lemon and lime essence. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 20, 1029-1030.
- [7] Scherer, R., Rybka, A.C.P., Ballus, C.A., Meinhart, A.D., Filho, J.T., Godoy, H.T. (2012). Validation of a HPLC method for simultaneous determination of main organic acids in fruits and juices. *Food Chemistry*, 135(1), 150-154.
- [8] Camara, M.M., Diez, C., Torija, M.E., Cano, M.P. (1994). HPLC determination of organic acids in pineapple juices and nectars. *European Food Research and Technology*, 198(1), 52-56.
- [9] Uckoo, R.M., Jayaprakasha, G.K., Nelson, S.D., Patil, B.S. (2011). Rapid simultaneous determination of amines and organic acids in citrus using high-performance liquid chromatography. *Talanta*, 83(3), 948-954.
- [10] Anonymous. (2016). AIJN - European Fruit Juice Association. Reference Guideline for Lime Juice. 1-4.
- [11] Bylund, D., Norstrom, S.H., Essen, S.A., Lundstrom, U.S. (2007). Analysis of low molecular mass organic acids in natural waters by ion exclusion chromatography

- [1] Ahmadi, K., Gholizadeh, H., Ebadzadeh, H.R., Hatami, F., Hosseinpour R., Ebadshah, H., Rezaei M.M., Fazli Estabragh M. (1396).

- in common bean as related to mobilization of aluminum- and iron-bound phosphates. *Environmental and Experimental Botany*, 48(1), 1–9.
- [21] Kotani, A., Miyaguchi, Y., Tomita, E., Takamura, K. (2004). Determination of organic acids by high-performance chromatography with electrochemical detection during brewing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52(6), 1440–1444.
- [22] Aktas, A.H., Şen, S., Yilmazer, M., Cubuk, E. (2005). Determination of carboxylic acids in apple juice by RP HPLC. *Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering*, 24(1), 1–6.
- [23] Yoshida, H., Mizukoshi, T., Hirayama, K., Miyano, H. (2007). Comprehensive analytical method for the determination of hydrophilic metabolites by high-performance liquid chromatography and mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55(3), 551–560.
- [24] Yoshida, H., Yamazaki, J., Ozawa, S., Mizukoshi, T., Miyano, H. (2009). Advantage of LC-MS Metabolomics Methodology Targeting Hydrophilic Compounds in the Studies of Fermented Food Samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57(4), 1119–1126.
- [25] Taghizadeh, M., Asemi, Z., Shakeri, H., Gholsorkhi, F., Takhtfiroozeh, S.M. (2014). The Sensitivity and specificity of spectrophotometer and polarimeter methods in the detection of fraud of produced lemon juice in Iran. *Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services*. 36(5), 16–21.
- [26] Pirsá, S., Alizadeh, M., Faraji, N., Garage, S. (2018). Determination of industrial lemon juice adulteration in organic lemon juice by statistical analysis and physicochemical characteristic. *Food Science and Technology*, 14(73), 255–263.
- [27] Róth, E., Berna, A., Beullens, K., Yarramraju, S., Lammertyna, J., Schenk, A., Nicolaï, B. (2007). Postharvest quality of integrated and organically produced apple fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 45(1), 11–19.
- tandem mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1176(1–2), 89–93.
- [12] Suarez-Luque, S., Mato, I., Huidobro, J.F., Simal-Lozano, J., Sancho, M.T. (2002). Rapid determination of minority organic acids in honey by high-performance liquid chromatography. *Journal of Chromatography A*, 955(2), 207–214.
- [13] Wang, P., Zhou, R. (2006). Determination of organic acids exuded from plant roots by high performance liquid chromatography. *Chinese Journal of Chromatography*, 24(3), 239–242.
- [14] Bogdanov, S., Charrière, J.D., Imdorf, A., Kilchenmann, V., Fluri, P. (2002). Determination of residues in honey after treatments with formic and oxalic acid under field conditions. *Apidologie*, 33(4), 399–409.
- [15] Murtaza, M.A., Rehman, S.U., Anjum, F.M., Huma, N., Tarar, O.M., Mueen-Ud-Din, G. (2012). Organic acid contents of buffalo milk cheddar cheese as influenced by accelerated ripening and sodium salt. *Journal of Food Biochemistry*, 36(1), 99–106.
- [16] Suzzi, G., Sacchetti, G., Patrignani, F., Corsetti, A., Tofalo, R., Schirone M., Fasoli, G., Gardini, F., Perpetuini, G., Lanciotti, R. (2014). Influence of pig rennet on fatty acid composition, volatile molecule profile, texture and sensory properties of Pecorino di Farindola cheese. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(11), 2252–2263.
- [17] Laube, H., Boden, J., Schneider, R. (2017). Capillary electrophoresis method for the analysis of organic acids and amino acids in the presence of strongly alternating concentrations of aqueous lactic acid. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 40(7), 981–988.
- [18] Mato, I., Suarez-Luque, S., Huidobro, J.F. (2005). A review of the analytical methods to determine organic acids in grape juices and wines. *Food Research International*, 38(10), 1175–1188.
- [19] Mimmo, T., Ghizzi, M., Marzadori, C., Gessa, C.E. (2008). Organic acid extraction from rhizosphere soil: effect of field-moist, dried and frozen samples. *Plant and Soil*, 312(1–2), 175–184.
- [20] Shen, H., Yan, X., Zhao, M., Zheng, S., Wang, X. (2002). Exudation of organic acids

Authentication of consumed lemon juice in Golestan province using liquid chromatography-mass spectrometry

Maham, M.^{1*}, Karami-Osboo, R.², Shojaee AliAbadi, M. H.³

1. Assistant Professor, Department of Chemistry, Aliabad Katoul Branch, Islamic Azad University, Aliabad Katoul, Iran

2. Assistant Professor of Iranian Research Institute of Plant Protection, Tehran, Iran

3. Farough Life Sciences Research Laboratory, Tehran, Iran

(Received: 2018/06/24 Accepted: 2019/01/29)

Industrial lemon juice may contain unauthorized additives that can lead to various diseases in society. As a result, it is highly important to use effective methods to identify the fake lemon juice. In this study, for the first time in our country, detection of cheating in industrial lemon juice in Golestan province is presented by analyzing organic acids, including citric acid, isocytic acid, malic acid, and also determining the ratio between citric acid and isocytic acid using liquid chromatography-mass spectrometry. The accuracy of the proposed method was confirmed by analyzing natural lemon juice samples. The limits of detection and quantification were 2 and 5, 0.02 and 0.05, 0.2 and 0.5 mg L⁻¹ for citric acid, isocytic acid, and malic acid, respectively. Industrial lemon juice samples were selected from commercially available brands, and fake samples were detected by comparison of the amounts of organic acids with the authorized values set by the European Standard. The results showed that the proposed method is very effective and sensitive in detecting cheating samples of industrial lemon juice.

Key words: Lemon juice, Organic acids, Liquid chromatography-mass spectrometry

* Corresponding Author E-Mail Address: mehdimaham@gmail.com