

اصالت سنجی آب لیمو به وسیله تعیین اسیدهای آلی اصلی با روش آنزیمی

مریم جلیلی^۱، زهرا علائی روزبهانی^{۱*}، بتول حسینخانی^۲

۱- پژوهشکده غذایی و کشاورزی، پژوهشگاه استاندارد، کرج، ایران

۲- شرکت نوژان پیشرو، تهران، ایران

* صندوق پستی: ۱۴۳۹۸۱۷۴۳۵، تهران یا کرج، ایران
sh.arab@modares.ac.ir

دریافت: ۱۴۰۴/۰۲/۰۷

پذیرش: ۱۴۰۴/۰۹/۱۲

چکیده

آب میوه‌ها از جمله آب لیمو، معمولاً به‌طور گسترده در معرض تقلبات قرار می‌گیرند و شناسایی روش‌هایی برای تشخیص تقلبات در آنها، یکی از دغدغه‌های اصلی سازمان‌های قانونگذار می‌باشد. در این پژوهش مقدار سیتریک، ایزوسیتریک اسید و نسبت آنها، به‌عنوان شاخص شناسایی تقلب در آب لیموی ایرانی بررسی شد. برای این کار، ۳۰ نمونه، از دو نوع لیموی تازه لایم ایرانی و مکزیکی از بازار تهیه و به روش آبگیری از آنها، آب لیموی طبیعی تهیه و مقدار سیتریک و ایزو سیتریک اسید در آنها به روش آنزیمی NADPH اسپکتروسکوپی اندازه‌گیری شد. برای تعیین وضعیت آب لیموی توزیع شده در کشور، تعداد ۵۰ نمونه آب لیموی تجاری از بازار مصرف تهیه و مقدار این دو اسید در آنها اندازه‌گیری شد. حد تشخیص و حد تعیین مقدار برای سیتریک اسید به ترتیب ۰/۰۹۸ و ۰/۲۹۸ و برای ایزو سیتریک اسید به ترتیب ۰/۱ و ۰/۳۵ میلی‌گرم در لیتر به دست آمد. میزان بازیافت این دو اسید با استفاده از روش آنزیمی از ۹۶ تا ۹۹ درصد برای سیتریک و از ۹۷ تا ۹۹ درصد برای دی ایزو سیتریک اسید متغیر بود. صحت روش با استفاده از محلول‌های مرجع معتبر تأیید و همه نتایج به دست آمده دارای مقادیر z-score قابل قبول بودند. دقت روش از نظر انحراف استاندارد نسبی زیر ۴/۸ درصد بود. مقدار سیتریک اسید و ایزو سیتریک اسید در نمونه‌های طبیعی لایم ایرانی و مکزیکی به ترتیب از $47/8 \pm 5/40$ تا $56/5 \pm 4/48$ گرم در لیتر و از

کپی، بازنشر و بازآفرینی کنید و یا آن را ویرایش و بازسازی نمایید، به شرط آنکه نام نویسنده را ذکر کرده و از آن برای مقاصد غیرتجاری استفاده کنید.

۰/۲۲۱±۰/۰۶۱ تا ۰/۲۶۶±۰/۰۶۳ گرم در لیتر متغیر بوده و بین دو واریته تفاوت معنی دار وجود نداشت ($P>0/05$). حدود ۴۴/۴ درصد از نمونه‌های آب لیموی بازار مصرف با استاندارد مطابقت نداشته و تقلبی بودند. این پژوهش همچنین نشان داد که روش آنزیمی مورد استفاده برای اندازه‌گیری سیتریک و ایزو سیتریک اسید از دقت، صحت و قابلیت تفکیک‌پذیری بسیار خوبی برخوردار بوده و نسبت به روش کروماتوگرافی در مدت زمان کوتاه‌تر و با هزینه کمتر قابل انجام است.

کلید واژگان: آب لیموترش، سیتریک اسید، دی‌ایزوسیتریک اسید، تقلب

۱-مقدمه

ایمنی مواد غذایی برای محافظت از سلامت مصرف کنندگان و کمک به تضمین امنیت غذایی از اهمیت بالایی برخوردار است. تقلب در مواد غذایی یکی از عوامل مهمی است که امنیت غذا را به مخاطره می‌اندازد. انواع تقلبات در مواد غذایی بیشتر با اهداف اقتصادی انجام می‌شوند و قدمت آن به دوران تجاری‌سازی مواد غذایی برمی‌گردد. قوانین روم باستان حاوی احکامی علیه آلودگی و تقلب تجاری در مواد غذایی بوده است [۱].

طبق تعریف تقلب در مواد غذایی یک اصطلاح کلی بوده و عبارت است از جایگزینی عمدی، اضافه کردن، دستکاری یا ارائه‌ی نادرست مواد غذایی، مواد تشکیل دهنده غذا یا بسته‌بندی مواد غذایی و یا ارائه‌ی اظهارات نادرست یا گمراه کننده در مورد یک محصول، که با هدف کسب منفعت اقتصادی بیان می‌شود [۲]. بنابراین، اطمینان از ایمن بودن، اصیل بودن و کیفیت خوب غذا هم در داخل و هم برای تجارت بین‌المللی حیاتی است [۳].

تقلب در مواد غذایی ۱۰ تا ۱۵ میلیارد دلار در سال برای صنعت غذای جهانی هزینه دارد. اگرچه برخی برآوردها به طور قابل توجهی بالاتر هستند. به‌عنوان مثال، برآورد سازمان جهانی گمرک در سال ۲۰۰۴ از میزان خسارت ناشی از تقلبات مواد غذایی، ۵۰ میلیارد دلار بوده است [۴]. بنابراین، این موضوع سبب شده که تعیین اصالت

مواد غذایی به یکی از دغدغه‌های اصلی سازمان‌های قانونگذار و دولت‌ها در جوامع مختلف تبدیل شده و هر ساله روش‌های آزمایشگاهی متعددی برای تعیین اصالت مواد غذایی شناسایی شوند.

اصالت‌سنجی مواد غذایی از جمله عسل، روغن‌های خوراکی و فراورده‌های مرکبات، به‌عنوان یکی از چالش‌های مهم در کنترل کیفیت و ایمنی غذایی، همواره مورد توجه پژوهشگران و سازمان‌های نظارتی در سطح جهان قرار داشته است. اصالت‌سنجی عسل با استفاده از طیف‌سنجی رامان همراه با تحلیل چندمتغیره برای تعیین منشأ گیاهی عسل [۵] و بهره‌گیری از حسگرهای الکتروشیمیایی اصلاح‌شده با نانوذرات اکسید مس برای شناسایی ترکیبات فنولی نظیر اسید کافئیک [۶]، از نمونه‌های گزارشات معتبر و کارآمد است. همچنین، رویکردهای میکروشیمیایی تحلیل‌های شیمیایی نوین توانسته‌اند در شناسایی ناخالصی‌ها و بررسی نسبت ترکیبات اسیدی در عسل نقش مهمی ایفا کنند [۷]. برای روغن‌ها، تکنیک‌هایی نظیر کروماتوگرافی، طیف‌سنجی جرمی و روش‌های ایزوتوپی به‌طور گسترده به‌عنوان استانداردهای بین‌المللی برای شناسایی ناخالصی‌ها و ترکیبات تقلبی به‌کار می‌روند. در حوزه مرکبات نیز، اندازه‌گیری نسبت ترکیباتی همچون اسید سیتریک و ایزو سیتریک با روش‌های مرجع، یکی از ابزارهای کلیدی در تشخیص تقلبات و تعیین اصالت آب

میوه و آب لیمو به شمار می‌آید.

آب لیموترش با توجه به میزان ویتامین ث و دارا بودن مواد فعال زیستی موثر بر سلامت انسان، مصرف آن به عنوان یک افزودنی غذایی در سطح جهانی رو به افزایش است [۸]. گیاه لیموترش متعلق به جنس سیتروس است. لیمو مکزیکی و لیمو ایرانی دو گونه‌ی اصلی لیموترش کشت شده در کشور است که در تولید صنعتی عصاره لیموترش استفاده می‌شود. تولید کنندگان اصلی لیمو و لیموترش در جهان عبارت است از هند (۱۴،۴ درصد)، مکزیک (۱۱،۶ درصد)، چین (۱۱،۵ درصد)، آرژانتین (۹،۱ درصد)، برزیل (۶،۸ درصد)، ترکیه (۵،۲ درصد)، اسپانیا (۵،۰ درصد)، ایالات متحده آمریکا (۳،۷ درصد)، آفریقای جنوبی (۲،۲ درصد) و ایران (۱/۲ درصد) می‌باشند [۹]. آب، قندها، اسیدهای آلی، فلاونوئیدها، اسیدهای آمینه، ویتامین‌ها، مواد معدنی و ترکیبات فنلی اجزای اصلی میوه لیمو هستند [۱۰]. متاسفانه از سال‌ها قبل، آب لیمو در معرض انواع مختلفی از تقلب قرار گرفته است [۱۱ و ۱۲]. عوامل مختلفی از جمله سودجویی تولید کنندگان، قیمت بالای آب لیموترش طبیعی، چالش‌ها در برداشت، تقاضای رو به رشد مصرف کنندگان و فقدان روش دقیق برای تعیین اصالت آب لیمو، این صنعت را در برابر تقلبات مختلف بسیار آسیب‌پذیر کرده است [۱۳]. از سویی شناسایی و پیشگیری از تقلب در فراورده‌های گیاهی موضوع بسیار پیچیده‌ای است، زیرا عوامل مختلفی از جمله تنوع در ارقام مختلف، مرحله‌ی بلوغ، شرایط محیطی در طول رشد، شرایط نگهداری و روش‌های فرایند پس از برداشت می‌توانند به‌طور قابل توجهی بر اجزای گیاه تأثیر بگذارند [۱۴-۱۶]. به‌طور کلی، در حال حاضر می‌توان روش‌های تشخیص تقلبات و اصالت‌سنجی را به دو دسته کلی هدفمند و غیرهدفمند طبقه‌بندی کرد. بیشترین روش‌های معمول آنالیز استفاده شده، روش‌های آنالیز

هدفمند می‌باشند که تمرکز آن شناسایی و اندازه‌گیری یک ترکیب خاص و یا گروهی از ترکیبات (آمینو اسیدها، اسیدهای آلی، قندها و...) است که این ترکیبات می‌توانند نشان‌دهنده تقلب باشد و یا به‌عنوان یک بیومارکر نشان دهنده محصول خالص و معتبر باشد [۱۴، ۱۷ و ۱۸].

اسید ایزوسیتریک، فراورده چرخه اسیدهای تریکربوکسیلیک، یکی از اسیدهای اصلی در مرکبات است و در غلظت‌های کمتر در میوه‌های مختلف یافت می‌شود. محتوای ایزو سیتریک اسید یکی از نشانگرهایی است که برای تشخیص اصالت و کیفیت محصولات میوه از جمله آب میوه‌ها استفاده می‌شود. میزان ایزو سیتریک اسید می‌تواند برای تخمین محتوای میوه در فراورده تولید شده، استفاده شود [۱۵].

اسیدسیتریک^۱ یک اسید تریکربوکسیلیک ضعیف است که به‌طور طبیعی در مرکبات متمرکز شده است. اسیدسیتریک اغلب به‌عنوان افزودنی غذایی برای ایجاد اسیدیته و طعم ترش به غذاها و نوشیدنی‌ها استفاده می‌شود. در میان میوه‌ها، اسیدسیتریک بیشتر در لیمو و لیموترش موجود است که ۸ درصد وزن میوه خشک را تشکیل می‌دهد [۲۰ و ۱۹]. با توجه به اینکه یکی از مارکرهای اصلی آب لیموترش مقدار دی‌ایزوسیتریک، سیتریک‌اسید و نسبت این دو اسید می‌باشد، بنابراین تعیین مقدار این پارامترها می‌تواند به عنوان یک روش هدفمند، تقلباتی از قبیل محتوای آب میوه به‌کار رفته (درصد میوه به‌کار رفته در تولید این آب میوه)، آب افزوده و اسید افزوده در این آب میوه را که از مهمترین تقلبات برای این آب میوه می‌باشد، به خوبی نشان دهد. روش‌های متعددی برای اندازه‌گیری سیتریک و ایزوسیتریک در آب لیمو وجود دارد که از آن جمله می‌توان به روش الکتروفورز موئینه^۲ [۲۱ و ۲۲]، مقایسه روش‌های آنزیمی، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، الکتروفورز موئینه [۲۳]، روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا- فاز

^۱ Capillary electrophoresis

^۲ 2-hydroxy-1,2,3-propanetricarboxylic acid

معکوس^۱ [۲۴]، کروماتوگرافی گازی^۲ [۲۵] و طیف‌بینی رزونانس مغناطیسی هسته (NMR) اشاره کرد. اگرچه محتوای اسید ایزوسیتریک در آب میوه‌ها را می‌توان با استفاده از روش‌های مختلف تعیین کرد، استانداردهای اتحادیه اروپا و کدکس تنها روش‌های آنزیمی را برای تعیین محتوای اسید ایزوسیتریک در آب میوه توصیه می‌کنند [۲۶ و ۲۷].

به دلیل محدودیت‌های دسترسی، روش آنزیمی اندازه‌گیری اسید آلی دی ایزوسیتریک تاکنون در کشور مورد استفاده قرار نگرفته است. بنابراین، هدف این مطالعه، اعتبارسنجی روش آنزیمی برای اندازه‌گیری دی ایزوسیتریک و سیتریک اسید است. یکی دیگر از اهداف پروژه، بررسی تقلب در آب لیموترش‌های تولید شده در کشور از طریق اندازه‌گیری میزان اسید سیتریک و دیایزوسیتریک به روش آنزیمی می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

در این مطالعه، محلول بافر ۷/۶ (محلول ۱)، نیکوتین آمید آدنین دی نوکلئید فسفات (محلول ۲)، سوسپانسیون ایزوسیترات دهیدروژناز (محلول ۳)، محلول دیایزوسیتریک (محلول ۴) که از شرکت ایرانی نوراژن خریداری شد. همچنین، محلول بافر ۷/۵ (محلول ۵)، ال-مالات دهیدروژناز (محلول ۶)، دیلاکتات دهیدروژناز (محلول ۷)، سوسپانسیون سیترات لیز لیفیللاز (محلول ۸) و استاندارد سیتریک اسید (محلول ۹) نیز از شرکت مگازیم خریداری شد. سایر مواد شامل پلیوینیل پلپیرولیدان، هیدروکسید سدیم با درجه خلوص آزمایشگاهی، اسید کلریدریک با خلوص ۳۷ درصد از شرکت مرک و کاغذ صافی (واتمن شماره ۱) از شرکت واتمن خریداری شدند.

۱-۲ نمونه‌ها

تعداد ۵۴ نمونه آب لیموی تجاری از بازار مصرف در کشور خریداری شد. با توجه به اینکه در کشور فقط لیموی ترش واریته‌های مکزیکی و ایرانی برای آبیگری و تهیه آب لیمو مورد استفاده قرار می‌گیرند، تعداد ۱۰ نمونه لیموترش (شامل ۵ نمونه آب لیموترش لایم واریته مکزیکی و ۵ نمونه آب لیموترش لایم واریته ایرانی) تهیه و بر اساس روش‌های معمول آبیگری در صنعت، آبیگری شدند و به این ترتیب آب لیموی تازه تهیه شد. تمامی نمونه‌ها به لوله فالکن منتقل شده و در دمای منفی ۱۸ درجه سانتی‌گراد تا زمان انجام آزمون نگهداری شدند. سپس، مقدار سیتریک اسید، ایزوسیتریک و نسبت آنها در نمونه‌ها اندازه‌گیری شد. هر آزمون ۳ بار تکرار شد.

۲-۲ اندازه‌گیری دی ایزوسیتریک اسید کل (آزاد و باند شده)

مقدار ۵۰ میلی‌لیتر نمونه آب میوه صاف شده به ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری منتقل و pH آن با کمک محلول سود ۱ مولار تا ۱۱ تنظیم شد. سپس، مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر محلول ۳۰ درصد پراکسید هیدروژن اضافه شد و محلول به مدت ۲۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفت. پس از آن، محلول خنک شده و با اسید کلریدریک ۱ مولار تا pH برابر ۷/۶ تنظیم و نمونه با آب مقطر به حجم رسانده شد. سپس، به آن ۰/۵ گرم پلی‌وینیل پلی‌پیرولیدان اضافه شد و پس از ۵ دقیقه همزدن شدید با کاغذ صافی واتمن شماره ۱ صاف شد. از این نمونه به مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر برای انجام آزمون به سل منتقل شد. سپس، ۲ میلی‌لیتر آب مقطر، به مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر محلول بافر شماره ۱ و مقدار ۰/۱ میلی‌لیتر محلول ۲ اضافه شد و محتوای سل به مدت ۳ دقیقه هم زده شد. سپس، جذب این محلول در طول موج ۳۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (A1). پس از آن، مقدار ۰/۰۲ میلی‌لیتر از محلول ایزوسیترات دهیدروژناز به سل اضافه شد و پس از ۳ دقیقه همزدن، مجدداً جذب نمونه‌ها

²Gas Chromatography

¹ Reverse Phase-HPLC

محاسبه شد. در این رابطه ضریب خاموشی NADPH در ۳۴۰ نانومتر برابر $1 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \times \text{mol}^{-1} \times \text{L}$ است.

$$C = \frac{V \times MV}{\varepsilon \times d \times v} \times \Delta A_{\text{citricacid}} \left[\frac{g}{L} \right]$$

V= حجم نهایی نمونه (میلی لیتر)

MV= وزن ملکولی دی ایزوسیتریک اسید (گرم بر مول)

ضریب خاموشی NADPH (در ۳۴۰ نانومتر) = ε

D= مسیر نور برحسب سانتی متر

V= حجم نمونه برحسب میلی لیتر

۲-۴ اعتباردهی روش آزمون

برای اعتباردهی روش آزمون، مواردی شامل اندازه‌گیری میزان بازیافت، خطی بودن، تجدید پذیری، تکرار پذیری روش، حد تشخیص^۱ (LOD) و حد کمی^۲ (LOQ) برای اندازه‌گیری دی ایزوسیتریک و ایزوسیتریک اسید به روش آنزیمی تعیین شد [۲۵].

۲-۴-۱ اندازه‌گیری بازیافت

برای اندازه‌گیری مقدار بازیافت سیتریک‌اسید و ایزو سیتریک اسید، مقدار مناسب سیتریک‌اسید و ایزو سیتریک اسید به ۱۰۰ میلی لیتر از هر یک از نمونه‌ها (به صورت جداگانه)، اضافه شد و سپس مقدار هریک از دو اسید بر اساس روش توضیح داده شده اندازه‌گیری و درصد بازیافت بر اساس فرمول زیر محاسبه شد. اندازه‌گیری بازیافت در سه سطح غلظت مختلف، به ترتیب مقادیر ۱۰، ۲۰، ۳۰ گرم بر لیتر اسید سیتریک و مقادیر ۰/۱، ۰/۱۵ و ۰/۲ گرم بر لیتر برای دی ایزوسیتریک اسید انجام و هر آزمون ۳ بار تکرار شد.

$$R(\%) = \frac{A_{(a+s)} - A_a}{A_s} \times 100$$

A (a+s): مقدار غلظت گزارش شده در نمونه همراه

استاندارد

As: مقدار استاندارد اضافه شده

Aa: مقدار غلظت اندازه‌گیری شده در نمونه به تنهایی

اندازه‌گیری شد (A2). همزمان با نمونه، محلول شاهد نیز تهیه و جذب آن اندازه‌گیری شد. مقدار اختلاف جذب برای هر دو نمونه شاهد و نمونه اصلی به دست آمد (A2-A1). سپس، ΔAD -Isocitric از تفاضل اختلاف جذب های نمونه شاهد و نمونه اصلی به دست آمد. مقدار دی ایزو سیتریک در نمونه از فرمول زیر محاسبه شد. در این رابطه ضریب خاموشی NADPH در ۳۴۰ نانومتر برابر $1 \times 10^4 \text{ cm}^{-1} \times \text{mol}^{-1}$ است.

$$C = \frac{V \times MV}{\varepsilon \times d \times v} \times \Delta A_{D - \text{Isocitricacid}} \left[\frac{g}{L} \right]$$

V= حجم‌های نمونه (میلی لیتر)

MV= وزن مولکولی دی ایزوسیتریک اسید (گرم بر مول)

ضریب خاموشی NADPH (در ۳۴۰ نانومتر) = ε

D= (سانتی متر) مسیر نور

V= (میلی لیتر) حجم نمونه

۲-۳ اندازه‌گیری سیتریک‌اسید

ابتدا نمونه‌های آب لیموترش به نسبت ۱ به ۲۰۰ رقیق شدند. سپس، ۱/۸ میلی لیتر آب مقطر و ۰/۲ میلی لیتر نمونه رقیق شده به سل دستگاه اسپکتروفتومتر منتقل شد و به آن ۰/۱ میلی لیتر محلول بافر شماره ۵ و مقدار ۰/۱ میلی لیتر محلول ۶ و ۰/۰۲ میلی لیتر از سوسپانسیون شماره ۷ اضافه و محتوای سل به مدت ۴ دقیقه هم زده شد. جذب این محلول با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ۳۴۰ نانومتر اندازه‌گیری شد (A1). پس از آن، مقدار 0/02 میلی لیتر از محلول ۸ (ایزوسیترات دهیدروژناز) به سل اضافه شد و پس از ۳ دقیقه همزدن، مجدداً جذب نمونه‌ها اندازه‌گیری شد (A2). همزمان با نمونه، محلول شاهد نیز تهیه و جذب آن اندازه‌گیری شد. در محلول شاهد، به جای نمونه، آب اضافه شد. مقدار اختلاف جذب برای شاهد و نمونه اصلی محاسبه شد (A2-A1) و سپس سیتریک‌اسید از تفاضل اختلاف جذب نمونه شاهد و نمونه اصلی به دست آمد. مقدار اسیدسیتریک در نمونه از فرمول زیر

² Limit of Quantitation

¹ Limit of Detection

۲-۴-۲ تعیین خطی بودن

برای تعیین محدوده کاری کیت مورد استفاده در روش آنزیمی اندازه‌گیری سیتریک اسید، مقدار ۰/۲ میلی‌لیتر استاندارد اسیدسیتریک به‌عنوان نمونه استفاده شد. محدوده‌ی غلظت از ۰/۰۰۵ تا ۰/۵ گرم در لیتر اسید سیتریک در نظر گرفته شد که معادل ۱-۱۰۰ میکروگرم اسید سیتریک در هر کووت است. برای تعیین محدوده‌ی کاری دی ایزوسیتریک نیز ۰/۱ میلی‌لیتر از استاندارد دی ایزو سیتریک اسید در محدوده‌ی غلظت ۰/۰۱-۰/۰۸ گرم در لیتر، که معادل ۱ تا ۸۰ میکروگرم دی ایزوسیتریک اسید در هر کووت است، استفاده شد.

۲-۴-۳ بایاس (گرایش)

یکی از پارامترها برای بررسی صحت روش، اندازه‌گیری بایاس است که با مقایسه میانگین نتایج (x) به دست آمده با کیت اسیدسیتریک یا دی ایزوسیتریک با مقدار مرجع مناسب (ref (ref x) به دست آمد. در این مطالعه، بایاس نسبی بر حسب درصد محاسبه می‌شود:

$$b(\%) = \frac{x - x_{ref}}{x_{ref}} \times 100$$

ماده مرجع برای اسید سیتریک محلول استاندارد ۰/۲ گرم در لیتر و برای دی ایزوسیتریک محلول استاندارد ۰/۳ گرم در لیتر می‌باشد. که برای هر اسید این آزمون ۱۰ بار تکرار شد.

۲-۴-۴ تکرارپذیری و تجدیدپذیری روش

برای بررسی تکرارپذیری روش، دو نمونه لیموترش ایرانی و مکزیکی با مقدار مشخصی از ایزو سیتریک اسید و دی ایزو سیتریک اسید به‌طور جداگانه غنی‌شده و در طول یک روز، ۶ بار مورد آزمون قرار گرفت. برای تعیین تجدیدپذیری روش، ۱۰ نمونه آب لیمو با مقدار مشخص از هر یک از دو اسید غنی شده و توسط آزمون‌گرهای مختلف، اندازه‌گیری شد.

۲-۴-۵ حد تشخیص (LOD) و حد کمی (LOQ)

حد محاسبه شده تشخیص (LOD) و حد محاسبه شده کمی (LOQ) بر اساس آنالیز نمونه‌هایی است که مطابق با روش ارائه شده در این مطالعه انجام شده است. LOD کمترین غلظت آنالیت است که با روش قابل تشخیص است. LOD به صورت $3 \times s^0$ محاسبه می‌شود که در آن s^0 انحراف معیار جذب A1 است. LOQ پایین‌ترین سطحی است که در آن عملکرد کیت به‌طور قابل قبولی قابل تکرار است. LOQ به صورت $kQ \times s^0$ محاسبه می‌شود که در آن s^0 همان انحراف معیار جذب A1 است [۲۹ و ۲۷].

۲-۵ بررسی آماری

آمار توصیفی (میانگین، انحراف استاندارد، دامنه) و تحلیل واریانس یک طرفه (ANOVA) با استفاده از نرم‌افزار Minitab (Version 18, State College, PA., USA) انجام شد. سطح احتمال ۰/۰۵ برای تعیین اختلاف معنی‌دار بین نمونه‌های آب لیموی طبیعی (لیمو ایرانی و مکزیکی) و نمونه‌های تجاری تهیه شده از بازار مصرف در نظر گرفته شد.

۳-نتایج و بحث

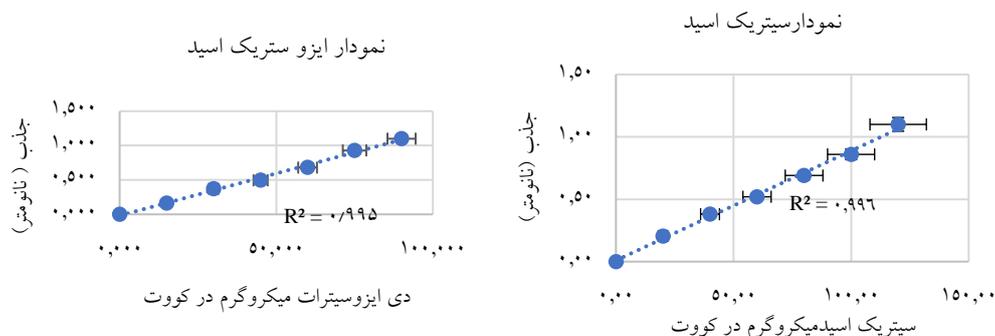
نتایج مربوط به محدوده‌ی خطی برای هر دو سیتریک‌اسید و دی ایزوسیتریک به‌عنوان یک فاکتور مهم در ارزیابی کارایی روش آنزیمی تعیین شد (شکل ۱). نتایج خطی بودن روش آنزیمی اندازه‌گیری دی ایزوسیتریک (در محدوده ۰ تا ۱۰۰ میکروگرم در کووت) و سیتریک اسید (محدوده بین ۰ تا ۹ میکروگرم در کووت) نشان داد مقدار R^2 برای هر دو اسید ($R^2 > 0.995$) است که نمونه‌ها به اندازه کافی خطی هستند. غنیم^۱ و همکاران (۲۰۱۹) گزارش کردند که مقادیر ضریب همبستگی بزرگتر از ۰,۹۹۵ نشان می‌دهد که روش به اندازه کافی خطی است [۲۸]. نتایج

^۱Ghuniem

برای سیتریک اسید و ۹۷ تا ۹۹ درصد برای دی ایزو سیتریک اسید به‌دست آمد (جدول ۱).

میزان بازیافت در اندازه‌گیری سیتریک و دی ایزو سیتریک اسید رضایت‌بخش بود و در محدوده‌ی ۹۶ تا ۹۹ درصد

شکل ۱ میزان جذب A2 برای محدوده غلظت‌های تهیه شده برای سیتریک‌اسید و دی ایزوسیتریک اسید



جدول ۱ پارامترهای ارزیابی روش اسپکتروسکوپی برای سنجش سیتریک اسید و ایزوسیتریک اسید

ایزوسیتریک اسید	سیتریک اسید	فاکتور اعتبارسنجی روش
۰/۱	۰/۰۹۸	حد تشخیص (گرم در لیتر)
۰/۳۵	۰/۲۹۸	حد کمی (گرم در لیتر)
-۳/۵	-۱/۵	اختلاف نسبی (درصد)
۰/۲۹۹	۰/۱۹۷	میانگین انحراف معیار (گرم در لیتر)
۰/۰۰۷	۰/۰۰۹	انحراف معیار
۲/۵	۴/۷	تکرارپذیری (درصد)

تجدیدپذیری و تکرارپذیری که بر اساس میزان انحراف استاندارد نسبی (RSD) بیان می‌شود، در جداول ۱ و ۲ نشان داده شده است. میزان درصد تجدیدپذیری (RSDr) برای اندازه‌گیری سیتریک و دی ایزوسیتریک به ترتیب ۷/۴ و به‌دست آمد (جدول ۱). تکرارپذیری (RSDr) برای سیتریک‌اسید و دی ایزو سیتریک اسید ۸/۲ و ۷/۲ به ترتیب برای نمونه‌های آب لیموترش طبیعی مکزیک و ایرانی و برای ایزوسیتریک اسید در آب لیموترش مکزیک و ایرانی به ترتیب ۸/۴ و ۱/۳ به‌دست آمد (جدول ۲). حد تشخیص سیتریک‌اسید با حداکثر حجم ۷/۱ میلی‌لیتر، ۰۹۸/۰ میلی‌گرم در لیتر و حد تشخیص (LOD) دی

میزان میانگین و درصد میزان بازیافت هر دو اسید در جدول ۱ نشان داده شده است. بیاتی و همکاران میزان بازیافت این انحراف استاندارد نسبی^۱ (RSD) دو ترکیب را با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)^۲، بالاتر از ۷۲ درصد [۱۱] گزارش کردند که از مقدار به‌دست آمده در پژوهش حاضر کمتر بود.

مقدار بایاس روش آنزیمی اندازه‌گیری ایزو سیتریک‌اسید و دی ایزو سیتریک اسید با استفاده از محلول‌های استاندارد تعیین شد. همه‌ی نتایج اندازه‌گیری‌شده در محدوده رضایت‌بخش بودند و امتیاز z قابل قبول ($z \geq 2$) ($score \leq -2$) داشتند (جدول ۱). نتایج مربوط به

² High Performance Liquid Chromatography

¹ Relative Standard Deviation

ایزوسیتریک است با حداکثر حجم نمونه ۲ میلی لیتر نمونه مقدار ۱/۰ میلی گرم در لیتر به دست آمد. حد کمی (LOQ) برای سیتریک اسید و ایزو سیتریک اسید به ترتیب ۲۹۸/۰ و ۳۵/۰ میلی گرم در لیتر به دست آمد.

جدول ۲ تکرارپذیری میزان سیتریک اسید و ایزوسیتریک اسید اندازه گیری شده در آب لیمو مکزیکی و ایرانی

عنوان	نمونه	تعداد	میانگین (گرم در لیتر)	انحراف معیار*	تکرار پذیری
سیتریک اسید	آب لیمو مکزیکی	6	58/61	1/67	2/8
	آب لیمو ایرانی	6	54/9	1/49	2/7
بررسی ایزوسیتریک اسید	آب لیمو مکزیکی	6	0/182	0/008	4/8
	آب لیمو ایرانی	6	۰/۳۰۹	0/009	۳/۰۱

*انحراف معیار برای اسید سیتریک بر اساس میزان ضریب رقت (۲۰۰) به کار رفته، گزارش شده است.

بررسی منابع نشان می دهد که اکثر روش های اندازه گیری مربوط به اسیدهای آلی مثل اسید سیتریک، اسید مالیک و تارتاریک اسید است. به عنوان مثال، نتایج ارزیابی کارایی روش کروماتوگرافی مایع برای اندازه گیری اسیدهای آلی سیتریک و مالیک اسید در آب میوه ها در سال ۲۰۱۲ نشان داد که در روش کروماتوگرافی مایع، حد تشخیص (LOD) ۰/۰۳ و ۳/۳۱ میلی گرم و حد کمی (LOQ) بین ۰/۱ و ۱۱/۰۳ میلی گرم در لیتر بوده و مقدار باز یافت بین ۸۲ در صد و ۱۱۰ در صد گزارش شده است [۲۹]. در مطالعه دیگری در سال ۲۰۱۳ روش کروماتوگرافی مایع فاز معکوس با کارایی فوق بالا (RP-UHPLC1) برای اندازه گیری اسیدهای آلی سیتریک و مالیک اسید به کار گرفته شد. پژوهشگران حد تشخیص ۱ میلی گرم در لیتر را گزارش کردند [۲۷]. گزارش ها در مورد اندازه گیری دی ایزو سیتریک اسید محدود است. در سال ۲۰۰۰ محققان با روش الکتروفورز موئینه میزان حد تشخیص را برای دی ایزوسیتریک اسید حدود ۰/۰۰۵ گرم در لیتر و ۰/۰۰۲ گرم در لیتر برای سیترات گزارش کردند [۲۵]. بیاتی و همکاران میزان بازیافت سیتریک و دی ایزوسیتریک اسید را با استفاده از دستگاه HPLC، بالاتر از ۷۲ درصد گزارش کردند. آنها میزان LOD و LOQ را به ترتیب برای سیتریک اسید ۱۲/۵ و ۴۰ میلی گرم در لیتر و برای ایزو سیتریک

اسید ۰/۱۷ و ۰/۵ میلی گرم در لیتر گزارش کردند [۱۱]. نتایج نشان می دهد این در مقایسه با اکثر روش های دیگر دارای میزان LOD و LOQ پایین تری می باشد. از طرفی اندازه گیری دی ایزوسیتریک اسید و سیتریک اسید به روش آنزیمی نسبت به روش کروماتوگرافی در مدت زمان کوتاهتر و با هزینه کمتر به راحتی امکان پذیر است. همچنین، نتایج معتبر سازی و صحت گذاری روش نیز نشان داد روش آنزیمی از دقت، صحت و قابلیت تفکیک پذیری بسیار خوبی برخوردار است. بر اساس استانداردهای اتحادیه اروپا، اندازه گیری میزان سیتریک اسید به دو روش آنزیمی و روش کروماتوگرافی مایع امکان پذیر است. اما برای دی ایزوسیتریک اسید تنها روش استاندارد بین المللی موجود روش آنزیمی است. در روش کروماتوگرافی، چالش اصلی در جدا سازی این اسید آلی از اسید مالیک است و از آنجایی که، جداسازی این دو اسید با روش کروماتوگرافی مایع به راحتی امکان پذیر نیست و نیاز به صرف هزینه و زمان زیادی دارد، بنابراین روش آنزیمی مطلوب تر است. مطابق آنچه در جدول ۳ مشاهده می شود، مقدار سیتریک اسید از $47/8 \pm 5/40$ در نمونه های آب لیموی ایرانی طبیعی تا $56/5 \pm 4/48$ در نمونه های آب لیموی مکزیکی طبیعی متغیر بوده و مقدار ایزو سیتریک اسید نیز از $0/221 \pm 0/061$ تا $0/266 \pm 0/063$ به ترتیب در

۲۱۷±۱۵ متغیر بود، که با حد تعیین شده در استاندارد انجمن آب میوه اروپا (حداکثر ۳۰۰) مطابقت دارد.

آب لیموی طبیعی ایرانی و مکزیکی متغیر بود. نسبت بین سیتریک‌اسید به ایزو سیتریک‌اسید نیز از ۲۱۰±۱۳ تا

جدول ۳ مقایسه محتوای اسیدسیتریک و ایزوسیتریک اسید در آب لیمو طبیعی مکزیکی و آب لیمو طبیعی ایرانی

عنوان	نمونه	تعداد	sd ± میانگین	مینیم	ماکسیم	p-value	دستورالعمل‌ها AIJN
سیتریک اسید	آب لیمو مکزیکی	15	56/5 ± 4/48	41/2	67/5	p>0s05	40-75
	آب لیمو ایرانی	15	47/8 ± 5/40	39/4	65/3		
بررسی ایزوسیتریک اسید	آب لیمو مکزیکی	15	0/266 ± 0/063	0/19	0/39	p>0s05	0/18 -0/6
	آب لیمو ایرانی	15	0/221 ± 0/063	0/21	0/31		
بررسی ایزوسیتریک اسید	آب لیمو مکزیکی	15	217 ± 15	148	372	p>0s05	حداکثر تا 300
	آب لیمو ایرانی	15	210 ± 13	156	۳۹۴		

نتایج بررسی دو نوع آب لیموی طبیعی ایرانی و مکزیکی نشان داد که مقدار سیتریک‌اسید، ایزو سیتریک‌اسید و نسبت آنها در هر دو وارته مورد بررسی با استاندارد بین المللی^۱ AIJN1 مطابقت دارد و از سوی دیگر اختلاف معنی‌داری بین این دو ویژگی در بین دو وارته مورد بررسی مشاهده نشد ($p>0/05$). بنابراین، اندازه‌گیری اسید سیتریک و ایزو سیتریک و محاسبه نسبت آنها در نمونه های آب لیموی ایرانی می‌تواند به‌عنوان شاخص بررسی تقلب در آب لیمو نظر گرفته شود. در تایید این موضوع، انجمن آب میوه اروپا برخی از شاخص‌ها مانند اسید سیتریک، اسید دی ایزو سیتریک، بیکس، چگالی نسبی، خاکستر، فلاونوئیدها (هسپریدین و اریوسیتترین)، گلوکز و فروکتوز را برای تشخیص تقلب در آب لیمو اندازه‌گیری کرد [۳۰-۳۱]. گرچه برخی پژوهشگران به‌دنبال تشخیص ترکیب خاص یا نسبت بین ترکیبات دیگر به‌عنوان شاخصی برای کشف تقلب در این فراورده بوده و گزارش کردند که شاخص‌های تعیین شده توسط انجمن آب میوه اروپا به تنهایی برای تعیین تقلب کافی نیستند. لورته و همکاران (۲۰۱۴) گزارش کردند که این شاخص‌ها برای

تشخیص تقلب در آب لیموی اسپانیایی مناسب نیستند، زیرا برخی از پارامترها (علیرغم وجود تقلب) از محدوده تعیین شده توسط انجمن آب میوه اروپا فراتر نمی‌روند. با این حال، آنها تأیید کردند که برخی از پارامترهای اندازه‌گیری شده، مانند اسید دی ایزو سیتریک، اسید سیتریک و غلظت یون پتاسیم می‌توانند بین آب لیموهای طبیعی و انواع بازسازی شده آب لیموترش تمایز قائل شوند [۲۹]. بیاتی و همکاران برای ایجاد روشی برای شناسایی تقلب در آب لیمو، کاتیون‌های مختلف، شامل Ca^{+2} ، Na^{+} ، K^{+} ، NH_4^{+} ، Li^{+} ، Mg^{+2} و آنیون‌های مختلف شامل، Cl^{-} ، NO_2^{-} ، F^{-} ، SO_3^{-2} ، PO_4^{-3} ، NO_3^{-} و Br^{-} و همچنین نسبت سیتریک به ایزو سیتریک را در نمونه‌های آب میوه طبیعی و آب میوه صنعتی اندازه‌گیری کردند. نتایج آنها نشان داد اختلاف معنی‌داری میان کاتیون‌های لیتیوم، سدیم و پتاسیم و یون کلرید، در بین نمونه‌های قلبی و نمونه‌های طبیعی مشاهده می‌شود. نسبت سیتریک‌اسید به ایزو سیتریک نیز در نمونه‌های طبیعی $۲۸۰±۸۶$ بود، در حالی که این نسبت در محصولات تجاری $۱۴۹±۵۰۳$ به‌دست آمد. این پژوهشگران گزارش کردند ۱۰۰ درصد نمونه‌های قلبی

^۱ European Fruit Juice Association

که حاوی ۳۰ درصد محتوی میوه آب لیمو بودند با این روش شناسایی شدند [۱۱].

جدول ۴ مقایسه محتوای اسیدسیتریک و ایزوسیتریک اسید در انواع مختلف آب لیموهای ایران

کد نمونه	تعداد	سیتریک اسید (گرم در لیتر)		ایزو سیتریک اسید (گرم در لیتر)	
		محدوده	±sd میانگین	محدوده	±sd میانگین
۱	5	۵۲-۶۰	۰,۶۶±۰,۵۶ ^a	۰,۴-۰,۴۵	۰,۰۱±۰,۰۴ ^a
۲	5	۵۲-۵۹	۰,۷۱±۰,۵۲ ^a	۰,۱۶-۰,۰۴	۰,۲۸±۰,۱۷ ^b
۳	5	۶۳-۵۳	۰,۱۳±۰,۵۸,۶۷ ^a	۰,۰۸-۰,۲۲	۰,۰۷±۰,۱۶ ^c
۴	4	۶۴-۴۵	۰,۵۴±۰,۰۹ ^a	۰,۰۴-۰,۲۴	۰,۱۲±۰,۱۰ ^c
۵	4	۴۵-۷۲	۰,۱۸±۰,۵۶ ^a	۰,۱۱-۰,۲۶	۰,۰۸±۰,۱۷ ^c
۶	4	۵۴-۶۹	۰,۵۹±۰,۰۸,۶۶ ^a	۰,۱۸-۰,۲۷	۰,۲۲±۰,۰۵ ^c
۷	5	۴۲-۴۹,۵	۰,۳۵±۰,۴۷,۸ ^a	۰,۱-۰,۲۴	۰,۱±۰,۱۷ ^c
۸	5	۴۸-۵۵	۰,۴۹±۰,۱۲,۷ ^a	۰,۲۸-۰,۳۵	۰,۲۹±۰,۰۲ ^b
۹	5	۶۱-۵۱	۰,۵۱±۰,۰۵,۵ ^a	۰,۲۱ ND-	۰,۱۳±۰,۰۹ ^c
۱۰	3	۴۸-۵۶	۰,۵۲±۰,۰۰ ^a	۰,۱۳-۰,۲۱	۰,۱۷±۰,۰۴ ^c
۱۱	3	۴۵-۶۸	۰,۵۳±۰,۱۲,۵۰ ^a	۰,۰۵۴-۰,۰۳	۰,۱۴±۰,۰۱ ^c
۱۲	3	۵۲-۷۰	۰,۶۳±۰,۱۹,۸۷ ^a	۰,۰۵۶-۰,۳۷	۰,۱۶±۰,۰۱ ^c
۱۳	3	۳۸-۷۲	۰,۵۶±۰,۱۷,۱۶ ^a	۰,۰۲۱-۰,۲۸	۰,۱۰±۰,۰۱ ^c

سیتریک اسید و ایزو سیتریک اسید معنی دار بود ($p < 0/05$).

در پژوهشی مشابه که توسط شجاعی و همکاران در ایران انجام شد، مقدار اسیدهای آلی سیتریک، ایزو سیتریک و مالیک، با استفاده از دستگاه LC-MS/MS^۱ اندازه‌گیری شدند و نسبت سیتریک به ایزو سیتریک به‌عنوان شاخص تقلب در آب لیمو بررسی شد. نتایج نشان داد اسیدهای آلی اصلی در نمونه‌های آب لیموترش طبیعی ایرانی (تهیه شده از لیموی تازه)، اسید سیتریک، اسید ایزو سیتریک و اسید مالیک بودند که مقادیر آنها به ترتیب از ۴۸/۳۰ تا ۶۶/۵۴ گرم در لیتر، ۰/۲۴ تا ۰/۶۱ گرم در لیتر و ۱/۷۳ تا ۱۰/۵۰ گرم در لیتر متغیر بود. این محققین همچنین گزارش کردند که از بین ۳۰ نمونه آب لیموی صنعتی و ۲۰ نمونه غیر صنعتی جمع‌آوری شده از بازار، ۵۳ درصد نمونه‌های

در بررسی حاضر، همچنین مقدار سیتریک اسید، ایزو سیتریک و نسبت این دو در ۵۴ نمونه جمع‌آوری شده از بازار آزمون شد که نتایج آن در جدول ۴ نشان داده شده است. از بین ۵۴ نمونه تهیه شده از بازار م صرف (از ۱۳ برند مختلف)، تعداد ۲۴ نمونه (۴۴/۴ درصد) با این استاندارد مطابقت نداشتند که نشان‌دهنده تقلب در آنها بود. مقدار سیتریک اسید در آنها از بین ۴۲ تا ۶۳ گرم در لیتر، مقدار ایزو سیتریک اسید از غیرقابل تشخیص تا ۰/۴۵ گرم بر لیتر و نسبت سیتریک به ایزو سیتریک اسید نیز از ۱۲۶ تا ۷۵۰ گرم در لیتر متغیر بود. مقدار ایزو سیتریک اسید در بین برندهای مختلف اختلاف معنی‌داری نشان داد ($p < 0/05$).

نتایج همچنین نشان داد اختلاف بین نمونه‌های تهیه شده از بازار مصرف و نمونه‌های طبیعی تهیه‌شده در مقدار

^۱ Liquid Chromatography-Tandem Mass Spectrometry

تقلب در آب لیمو می‌باشد و بالا بودن این نسبت می‌تواند به‌عنوان شاخص نشان‌دهنده افزودن اسیدسیتریک در برخی آب میوه‌ها مثل آب لیموترش استفاده شود. این پژوهش همچنین نشان داد که روش آنزیمی به‌کار رفته برای اندازه‌گیری این دو اسید، نسبت به روش کروماتوگرافی در مدت زمان کوتاه‌تر و با هزینه کمتر به راحتی امکان‌پذیر بوده و روش آنزیمی از دقت، صحت و قابلیت تفکیک‌پذیری بسیار خوبی برخوردار است و همچنین نتایج به‌دست آمده از کیت داخلی تولید شده توسط شرکت نورائون پیشرو از نظر صحت و دقت کاملاً مشابه کیت مرجع مگازیم بود. نتایج ارزیابی نمونه‌های تهیه شده از بازار مصرف نشان داد، بر اساس این روش، حدود ۴/۴ درصد از نمونه‌های تهیه شده از بازار مصرف آب لیموی تقلبی می‌باشند.

۵-منابع

- [1] Armstrong, D. J. (2009). Food chemistry and US food regulations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 57(18), 8180-8186.
- [2] Spink, J., & Moyer, D. C. (2011). Defining the public health threat of food fraud. *Journal of Food Science*. 76(9), R157-R163.
- [3] Roozbahani, Z. A., Labbafi, M., Aghakhani, A., Izadi, S., & Ghasemi, J. (2024). Identification of the authenticity and geographical origin of Iranian lime juice by targeted method and machine learning. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 18 (1), 40-55.
- [4] Sun, D. W. (Ed.). (2008). *Modern techniques for food authentication*. Academic Press.
- [5] Huzortey, A. A., Arefi, A., Anderson, B., Khadem, H., Sackey, S. S., Mahmoodi-Khaledi, E., & Tavassoli, S. H. (2022). 532-nm laser-excited Raman spectroscopic evaluation of Iranian honey. *Food Analytical Methods*, 15 (3), 772-782.
- [6] Ebrahimi, N., Rafiee-Pour, H. A., & Mahmoodi-Khaledi, E. (2024). Ferulic acid detection in honey using carbon paste electrode

صنعتی و ۶۰ درصد نمونه‌های غیرصنعتی بر اساس نسبت اسید سیتریک به اسید سیتریک (بیش از ۳۰۰) تقلبی تشخیص داده شدند [۲۷].

بر اساس پژوهش حاضر، حدود ۴/۴ در صد نمونه‌های موجود در بازار بر اساس مقدار سیتریک اسید و ایزو سیتریک اسید و همچنین نسبت این دو اسید تقلبی بودند. میزان تقلب در نمونه‌های بازار در این پژوهش از آنچه توسط علایی به دست آمد، کمتر بود. وی در سال ۱۳۹۶، اصالت نمونه‌های آب لیموی موجود در بازار را با نمونه‌های طبیعی و بر اساس استاندارد اتحادیه اروپا مورد بررسی قرار داده و میزان سدیم، پتاسیم، منیزیم، کلسیم، فسفر کل، فرمالین و قندهای گلوکز، فروکتوز و ساکاروز را در آنها اندازه‌گیری کرد. این محقق گزارش کرد ۹۰ درصد نمونه‌های موجود در بازار مصرف با این استاندارد مطابقت نداشتند. شیخ‌الدین و همکاران (۲۰۱۹) نیز ۶۵ نمونه آب لیمو (شامل ۴۲ نمونه آب لیموی بسته‌بندی شده و ۲۳ نمونه آب لیموترش تازه) از تبریز خریداری کردند و مقدار کل ترکیبات فنلی و ترکیبات اریوسیتترین^۱، نارینجین^۲ و هسپریدین^۳ را برای بررسی تقلب احتمالی بررسی کردند. نتایج نشان داد بر اساس ترکیبات فنلی، در مجموع ۹ نمونه (۱۳/۸ درصد) با قوانین مؤسسه استاندارد ایران مطابقت نداشتند. در حالی که، بر اساس میانگین فلاونوئیدهای اریوسیتترین، نارینجین و هسپریدین، ۳۳ نمونه (۵۰/۷۸ درصد) با قوانین مؤسسه استاندارد ایران مطابقت نداشتند. آنها همچنین گزارش کردند در مطالعه حاضر، دلیل استاندارد نبودن اکثر نمونه‌های آب لیمو وجود فلاونوئیدهای نارینجین بود [۳۴-۳۳].

۴-نتیجه‌گیری

نتایج این بررسی نشان داد که اندازه‌گیری نسبت سیتریک اسید به ایزو سیتریک اسید شاخص مناسبی برای تعیین

^۱Hesperidin

^۱ Eriocitrin

^۲ Naringenin

- Advances in Food Authenticity Testing* (pp. 625-665). Woodhead Publishing.
- [16] Yu, C., Wang, Y., Cao, H., Zhao, Y., Li, Z., Wang, H., ... & Tang, Q. (2020). Simultaneous determination of 13 organic acids in liquid culture media of edible fungi using high-performance liquid chromatography. *BioMed Research International*. 2020(1), 2817979.
- [17] Callao, M. P., & Ruisánchez, I. (2018). An overview of multivariate qualitative methods for food fraud detection. *Food Control*. 86, 283-293.
- [18] McGrath, T. F., Haughey, S. A., Patterson, J., Fahl-Hassek, C., Donarski, J., Alewijn, M., ... & Elliott, C. T. (2018). What are the scientific challenges in moving from targeted to non-targeted methods for food fraud testing and how can they be addressed?—Spectroscopy case study. *Trends in Food Science & Technology*. 76, 38-55.
- [19] Kang, D. E., Sur, R. L., Haleblan, G. E., Fitzsimons, N. J., Borawski, K. M., & Preminger, G. M. (2007). Long-term lemonade based dietary manipulation in patients with hypocitraturic nephrolithiasis. *The Journal of Urology*, 177(4), 1358-1362.
- [20] Penniston, K. L., Steele, T. H., & Nakada, S. Y. (2007). Lemonade therapy increases urinary citrate and urine volumes in patients with recurrent calcium oxalate stone formation. *Urology*. 70(5), 856-860.
- [21] Ježek, J., & Suhaj, M. (2001). Application of capillary isotachopheresis for fruit juice authentication. *Journal of Chromatography A*. 916 (1-2), 185-189.
- [22] Saavedra, L., Garcia, A., & Barbas, C. (2000). Development and validation of a capillary electrophoresis method for direct measurement of isocitric, citric, tartaric and malic acids as adulteration markers in orange juice. *Journal of Chromatography A*. 881 (1-2), 395-401.
- [23] Kvasnička, F., Voldřich, M., Pyš, P., & Vinš, I. (2002). Determination of isocitric acid in citrus juice—a comparison of HPLC, enzyme set and capillary isotachopheresis methods. *Journal of Food Composition and Analysis*. 15 (6), 685-691.
- [24] AliAbadi, M. H. S., Karami-Osboo, R., Kobarfard, F., Jahani, R., Nabi, M., modified by C-C3N4/Li2CoMn3O8 nanocomposite. *Microchemical Journal*, 203, 110925.
- [7] Khoveis, Z. N., Mahmoodi-Khaledi, E., Rafiee-Pour, H. A., & Farhadpour, M. (2024). Novel electrochemical sensor based on NiZnFe2O4/CPE for measurement of p-coumaric acid in honey. *Arabian Journal of Chemistry*, 17(2), 105472.
- [8] Jahani, R., van Ruth, S., Yazdanpanah, H., Faizi, M., AliAbadi, M. H. S., Mahboubi, A., & Kobarfard, F. (2022). Isotopic signatures and patterns of volatile compounds for discrimination of genuine lemon, genuine lime and adulterated lime juices. *Food Control*. 136, 108837.
- [9] Peterson, J. J., Beecher, G. R., Bhagwat, S. A., Dwyer, J. T., Gebhardt, S. E., Haytowitz, D. B., & Holden, J. M. (2006). Flavanones in grapefruit, lemons, and limes: A compilation and review of the data from the analytical literature. *Journal of Food Composition and Analysis*. 19, S74-S80.
- [10] Jamil, N. E. L. O. F. E. R., Jabeen, R., Khan, M. U. Z. A. F. F. A. R., Riaz, M. U. S. A. R. A. T., Naeem, T. A. Y. Y. I. B. A., Khan, A. Q. S. A., ... & Fahmid, S. H. A. G. U. F. T. A. (2015). Quantitative assessment of juice content, citric acid and sugar content in oranges, sweet lime, lemon and grapes available in fresh fruit market of Quetta city. *International Journal of Basic & Applied Sciences*. 15(1), 21-24.
- [11] Bayati, A., Hassanzadazar, H., Nazari, F., & Hosseini, M. J. (2020). Identification parameters for comparison of naturally and commercially lime juice. 12(1):110-119.
- [12] Shafiee, S., & Minaei, S. (2018). Combined data mining/NIR spectroscopy for purity assessment of lime juice. *Infrared Physics & Technology*. 91, 193-199.
- [13] Everstine, K., Spink, J., & Kennedy, S. (2013). Economically motivated adulteration (EMA) of food: common characteristics of EMA incidents. *Journal of Food Protection*, 76 (4), 723-735.
- [14] Dasenaki, M. E., & Thomaidis, N. S. (2019). Quality and authenticity control of fruit juices—a review. *Molecules*, 24(6), 1014.
- [15] Rinke, P. (2016). Tradition meets high tech for authenticity testing of fruit juices. In

- simultaneous determination of main organic acids in fruits and juices. *Food Chemistry*. 135 (1), 150-154.
- [30] Cunha-Santos, E. C. E., Viganó, J., Neves, D. A., Martínez, J., & Godoy, H. T. (2019). Vitamin C in camu-camu [*Myrciaria dubia* (HBK) McVaugh]: evaluation of extraction and analytical methods. *Food Research International*. 115, 160-166.
- [31] AIJN (European Fruit Juice Association). (2005). AIJN code of practice for evaluation of fruit and vegetable juices.
- [32] Lorente, J., Vegara, S., Martí, N., Ibarz, A., Coll, L., Hernández, J., ... & Saura, D. (2014). Chemical guide parameters for Spanish lemon (*Citrus limon* (L.) Burm.) juices. *Food Chemistry*. 162, 186-191.
- [33] Alaei Roozbahani, Z. (2019). Evaluation of chemical parameters for authenticity of commercial lime juice. *Iranian Food Science and Technology Research Journal*, 15 (4), 497-506
- [34] Sofian, I., & Sarab, I. (2020). Determination of adulteration of lime juices in Tabriz based on measurement of phenolic compounds by spectrometry and chromatography. *Journal of Health*. 11 (4), 459-467.
- Yazdanpanah, H., ... & Faizi, M. (2022). Detection of lime juice adulteration by simultaneous determination of main organic acids using liquid chromatography-tandem mass spectrometry. *Journal of Food Composition and Analysis*, 105, 104223.
- [25] Jham, G. N., Fernandes, S. A., Garcia, C. F., & Silva, A. A. D. (2002). Comparison of GC and HPLC for the quantification of organic acids in coffee. *Phytochemical Analysis*. 13 (2), 99-104.
- [26] Alimentarius, C. (2005). Codex general standard for fruit juices and nectars. *Codex Stan*, 247-2005.
- [27] European Standards. Fruit and vegetable juices - Enzymatic determination of D-isocitric acid content by the NADPH spectrometric method. *DIN EN 1139*. 1994.
- [28] Ghuniem, M. M., Souaya, E. R., Khorshed, M. A., & Souaya, E. R. (2019). Optimization and validation of an analytical method for the determination of some trace and toxic elements in canned fruit juices using quadrupole inductively coupled plasma mass spectrometer. *Journal of AOAC International*. 102(1), 262-270.
- [29] Scherer, R., Rybka, A. C. P., Ballus, C. A., Meinhart, A. D., Teixeira Filho, J., & Godoy, H. T. (2012). Validation of a HPLC method for

پیوست الف

جدول نمادها و اختصارات

نمادها و اختصارات	توصیف
NADP ⁺	بتا - نیکوتین آمید - آدنین - دی نوکلئوتید
NADPH	بتا - نیکوتین آمید - آدنین - دی نوکلئوتید، به شکل احیا شده
CL	سیترات لیاز (EC ^a 4/1/3/6)
MDH	مالات دهیدروژناز (EC 1/1/1/37)
LDH	لاکتات دهیدروژناز (EC 1/1/1/27)
ICDH	ایزوسیترات دهیدروژناز
IU	یک واحد بین‌المللی از فعالیت کاتالیزوری آنزیمی که ۱ میکرو مولار از سوبسترا را در هر دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد تحت شرایطی تبدیل می‌کند.
C	غلظت ماده
P	غلظت جرمی
aEnzyme commission	

Authenticity assessment of lemon juice by determination of major organic enzymatic method acids using

Maryam Jalili¹, Zahra Alaei Roozbahani^{1*}, Batoul Hosseinkhani²

1. Food and Agriculture Research Institute, Standard Research Institute, Karaj, Iran

2. Nojan Pishro Company, Tehran, Iran

Receipt: 2025/04/27

Accepted: 2025/12/03

Abstract

Fruit juices were already under intensive analytical authenticity control for decades. Adulteration is relatively easy to perform because of the chemical composition and the wide natural variation seen in juice. Addition of water and/or sugar, acidification, cheaper fruit, colorants, flavor, and vitamins are typically frauds that are performed with criminal intent and sometimes with high level sophistication to make the adulterated products as difficult as possible to detect. In this sense, effective, reliable and rapid food authentication methods represent a valuable and irreplaceable tool for the authorities to set up control systems to ensure juice quality and safety and to promote mitigation of fraud. D-Isocitric acid and citric acid are two organic acid found in most fruit juices. They are an important marker in multicomponent procedures for the evaluation of authenticity and quality of fruit products; high citric/isocitric acid ratios can be used as an indicator of citric acid addition in some juices especially in lime juice. The measurement of D-Isocitric acid by HPLC method is very difficult and time consuming in addition in this time, enzymatic method is one of the main international standard method for this component. One of the main aim in this research set up enzymatic method for measurement of these organic acids as one of the most commonly used analytical techniques (enzymatic method) and it represents a very attractive choice because this method is simple, rapid and cost effective.

Keywords: lime juice, citric acid, D-Isocitric acid, adulteration