

## کروماتوگرافی مایع با کار آئی بالا برای ردیابی سدیم بنزوات به عنوان نگهدارنده در مواد غذایی بسته بندی

ریحانه سریری\*<sup>۱</sup>، حسین غفوری<sup>۲</sup>

\*<sup>۱</sup> و <sup>۲</sup> - دانشگاه گیلان، دانشکده علوم، گروه بیولوژی، رشت، ایران، صندوق پستی: ۱۴۸۴

sariri@guilan.ac.ir

### چکیده

در این تحقیق یک روش سریع، تکرار پذیر و قابل اعتماد برای اندازه گیری سدیم بنزوات (یکی از مهم ترین نگهدارنده های مواد غذایی) در آب میوه ها، نوشابه ها، لبنیات، انواع سس ها و برخی دیگر مواد غذایی بسته بندی طراحی و به کار گرفته شده است. کروماتوگرافی مایع با کار آئی بالا (HPLC) مجهز به ردیاب ماورای بنفش (UV) برای اندازه گیری کیفی و کمی این افزودنی غذایی طراحی شد نمونه های غذایی مورد بررسی با استفاده از بافر فاز متحرک کروماتوگرافی به نسبت ۱۰:۱۰ رقیق شدند. نمونه های غلیظ تر و یا جامد نیز در مخلوط کننده با همان بافر رقیق شدند و سپس همه نمونه ها قبل از آنالیز توسط (HPLC) صاف شدند تا ذرات ریز جامد جدا شوند. برای ردیابی و تعیین مقدار سدیم بنزوات در نمونه ها از ستون فاز معکوس (C<sub>18</sub>) استفاده شده و ردیاب (UV) در طول موج ۲۲۵ مورد استفاده قرار گرفت. با به کار گرفتن سدیم بنزوات مرکب به عنوان استاندارد خارجی، مقدار این افزودنی در نمونه ها به صورت در صد وزنی محاسبه گردید.

**کلمات کلیدی:** مواد غذایی بسته بندی، سدیم بنزوات، نگهدارنده های غذایی، آنالیز با HPLC و افزودنی ها.

## مقدمه

برای جلوگیری از فساد مواد غذایی بسته‌بندی مانند آب میوه‌ها، نوشابه‌ها، سس‌های غلیظ، پنیر و غیره، اغلب اوقات، برخی نگهدارنده‌های شیمیایی مانند سدیم بنزوات و یا پتاسیم کلراید به آن‌ها اضافه می‌شوند. اضافه کردن این نوع افزودنی‌ها از رشد قارچ و فساد زودرس مواد غذایی جلوگیری کرده و آن‌ها را در شرایط تازه و مناسب نگه می‌دارند.

در هر صورت، بر اساس قوانین بین‌المللی غذا و دارو (Food and Drug Association, FDA)، افزودنی‌های غذایی فقط در صورتی که به عنوان سالم و بی‌ضرر بوده (generally recognized as safe, GRAS) و روی برچسب ماده غذایی این مطلب ذکر شده باشد، مجاز هستند. به عنوان مثال، سدیم بنزوات تا غلظت ۰/۱٪ ولی پتاسیم سوربات تا حدود ۰/۲-۰/۱٪ مجاز هستند (۱). اهمیت افزودنی‌های مواد غذایی و اثر آن‌ها روی سلامت مصرف‌کننده همیشه مورد توجه دانشمندان بوده است. در برخی موارد گزارش‌هایی در مورد حساسیت به این نوع مواد افزودنی گزارش شده‌اند (۲). سدیم بنزوات یکی از رایج‌ترین نگهدارنده‌های مواد غذایی است که با داشتن خاصیت ضد میکروبی به بسیاری از مواد غذایی بسته‌بندی شده مایع و جامد اضافه می‌شود. این ماده هم‌چنین در برخی فرآورده‌های دارویی و آرایشی نیز به عنوان نگهدارنده به کار برده می‌شود. این نمک سدیم بنزوئیک اسید می‌تواند به خوبی در شرایط اسیدی عمل نموده و از رشد قارچ، کپک و باکتری جلوگیری نماید. این ماده به فرآورده‌های نوشیدنی مانند آب میوه، نوشابه و آب معدنی اضافه می‌شود تا آن‌ها را در شرایط تازه و سالم نگهداری نماید (۳، ۴، ۵ و ۶). با توجه به خاصیت ضد

قارچی و ضد باکتریایی سدیم بنزوات، افزایش آن به لبنیات در بسیاری از کشورها در حد مجاز توصیه شده است (۷). در بررسی‌های انجام شده روی برخی مواد نگهدارنده اثرات مختلف روی میکروارگانیسم‌ها گزارش شده‌اند. به عنوان مثال سدیم بنزوات به عنوان ماده آنتی‌باکتریال معرفی شده است (۸). در مقابل، از پتاسیم سوربات فعالیت ضد قارچی و کندکنندگی رشد انواع کپک مشاهده و گزارش شده است (۹). استرهای پاراهیدروکسی بنزوئیک اسید نیز دارای فعالیت ضد قارچ‌اند. بررسی‌های تحقیقاتی نشان داده‌اند که قدرت ضد قارچی این استرها به طول زنجیر آلکیل آن‌ها بستگی دارد به طوری که استرهای با زنجیر بلند آلکیلی به دلیل ناپایداری بیشتر دارای خواص ضعیف‌تری از استرهای کوچک‌تر هستند. از طرف دیگر، باید در نظر داشت که سدیم بنزوات در دوزهای بالا می‌تواند سرطان‌زا باشد و چنانچه بیش از حد مجاز استفاده شود می‌تواند اثرات مضر برای سلامتی داشته باشد (۱۰). در یک مطالعه تحقیقاتی، دوزهای مختلف سدیم بنزوات به جیره غذایی موش‌های آزمایشگاهی به مدت ۱۰ روز اضافه شد. نتایج نشان دادند که در موش‌های نر، وزن نسبی کبد و کلیه‌ها، سطح سرمی آلومین، پروتئین توتال و گاما‌گلوبولین ترانس‌پیتیداز به شدت افزایش یافته و بروز سیتوپلاسم شیشه‌ای و بزرگ شدن هپاتوسیت نیز مشاهده شدند (۱۱). از طرفی، استفاده خوراکی سدیم بنزوات و سوربیک اسید در موش‌های آزمایشگاهی نشان دادند که اثرات مخرب سدیم بنزوات بیشتر از سوربیک اسید، به خصوص در عمل رشد، طول زندگی و احتمال مواجه شدن با مشکلات استرسی بوده است.

هاری (۱۳) برای بررسی برخی افزودنی‌ها در مواد غذایی استفاده نموده است.

### روش های تجربی

#### جمع آوری نمونه ها

مواد غذایی و نوشیدنی‌های آماده و بسته‌بندی شده از سوپرمارکت‌های موجود در شهر رشت خریداری شدند. هر نمونه با استفاده از بافر فاز ثابت به صورت محلول ۱۰٪ تهیه شدند.

#### معرف های شیمیائی

سدیم بنزوات، آمونیم استات، استونتریل با گرید HPLC و استیک اسید گلاسیال از شرکت شیمیائی مرک خریداری شدند. آب مقطر با گرید HPLC نیز از شرکت آریا ارتو در رشت خریداری گردید.

#### فیلترها

فیلترهای نایلون  $47 \text{ mm} \times 0.45 \text{ }\mu\text{m}$  برای فاز متحرک و نایلون آکروویسک  $25 \text{ mm} \times 0.45 \text{ }\mu\text{m}$  برای نمونه‌ها از شرکت آریا ارتو رشت خریداری شدند.

#### فاز متحرک

۰/۳ گرم آمونیم استات در حدود ۹۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر با HPLC grade در بالون یک لیتری حل شده و با افزایش ۰/۵ میلی لیتر استیک اسید گلاسیال که (pH) محلول روی ۴/۴ تنظیم گردید و حجم با آب مقطر به یک لیتر رسید. محلول بافر سپس با استفاده از صافی نایلونی صاف شد و در مرحله بعدی ۹۰۰ میلی‌لیتر آن با ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر HPLC grade مخلوط شد. مخلوط حاصل بعد از خارج شدن

استفاده از HPLC برای اندازه‌گیری مواد نگهدارنده در نمونه‌های تجاری، به خصوص در محصولات غذایی، روشی سریع و قابل اعتماد است که می‌تواند خطرات ممکن را به خوبی نشان دهد. با ایجاد تغییرات مختلف در روش، از آن برای اندازه‌گیری نگهدارنده‌های متفاوت در لبنیات (۱۲)، آب میوه‌های طبیعی، نوشابه‌ها، مارگارین، ماست، پنیر و ژله‌ها، زیتون، سس‌ها و میوه‌های مختلف (۱۳ و ۱۴) استفاده شده است. روش‌های دیگر کروماتوگرافی، از قبیل لایه نازک (TLC) برای اندازه‌گیری سدیم بنزوات در آب میوه‌ها (۱۵)، کروماتوگرافی فاز جامد (۱۶) و الکتروفورز لوله موئین برای تعیین سدیم آزید به شکل مشتق ۳ و ۵ دی نیترو بنزوئیل در نوشابه‌ها (۱۷) مورد استفاده قرار گرفته‌اند. این روش‌ها، مشکلاتی از قبیل طولانی بودن مرحله پاک‌سازی و هم‌چنین استفاده از تتراهیدروفوران در فاز متحرک داشته‌اند که استفاده از آن‌ها را محدود کرده است. تتراهیدروفوران حلالی است که روی لوله‌های پلاستیک مورد استفاده در عمل صاف کردن اثر گذاشته و هم چنین ضایعات آن سمی و دفع آن‌ها مشکل است.

سرعت زیاد تولید مواد غذایی آماده، لزوم و اهمیت افزودن مواد نگهدارنده را بهتر نشان می‌دهد. بنابراین، یک روش سریع، قابل اعتماد و تکرارپذیر برای اندازه‌گیری و ردیابی این گونه افزودنی‌ها در مواد غذایی آماده بسیار ضروری است. در این تحقیق، یک روش سریع، ساده و تکرارپذیر برای اندازه‌گیری سدیم بنزوات در مواد غذایی آماده طراحی و مورد استفاده قرار گرفته است. این روش، نوعی ساده شده از کروماتوگرافی مایع با کارآئی بالا (HPLC) است که

میلی لیتر فاز متحرک برای ۲ دقیقه در مخلوط کن قرار گرفتند و بعد از صاف کردن مایع زیر صافی به نسبت ۱ به ۱۰ با بافر فاز متحرک رقیق گردید. همه نمونه‌های رقیق شده با استفاده از صافی نایلونی  $25 \mu\text{m} \times 0.45$  mm nylon Acrodisk صاف شدند. از نمونه‌های مایع حدود ۵-۸ میلی لیتر و از نمونه‌های جامد و غلیظ حدود ۱ میلی لیتر بعد از عمل صاف کردن باقی ماندند که برای آنالیز توسط HPLC کافی بودند.

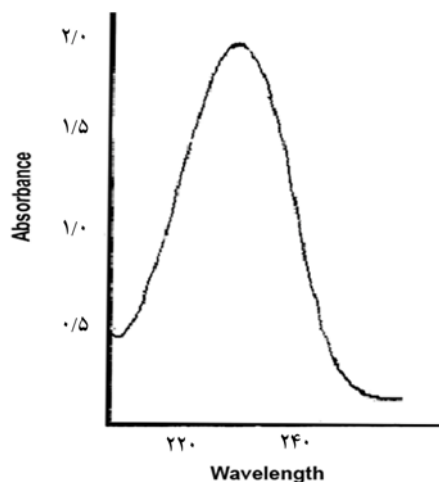
### کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا High Performance Liquid Chromatography, HPLC

دستگاه HPLC مورد استفاده ساخت شرکت Waters™ بوده است. این دستگاه مجهز به لامپ دوتائی ۱۵۲۵، طول موج جذبی ۱۴۸۷، نمونه‌گیر اتوماتیک AS-400 ردیاب فتودیود L-3000 و ایستگاه دیتا Breeze 3.2 بود. عملکرد دستگاه HPLC از طریق ایزوکراتیک با حجم تزریقی ۱۰ میکرولیتر و دمای ستون  $20^\circ\text{C}$  تنظیم گردید. ستون کروماتوگرافی از نوع Supelcosil LC-18,  $25\text{cm} \times 4.6\text{mm}$ ,  $5\mu\text{m}$ , Waters™ ساخت کشور آمریکا (USA) بود. هر نمونه در زمان حدود ۱۲ دقیقه جمع‌آوری گردیده و با ردیاب ماورای بنفش در طول موج ۲۲۵ nm بررسی شد. مقدار بهینه سرعت جریان  $0.8$  میلی لیتر بر ثانیه بود. غلظت سدیم بنزوات در نمونه با استفاده از روش استاندارد خارجی محاسبه شد. این روش تا محدوده غلظتی  $2/5$  تا  $100$  میلی گرم بر لیتر خطی بوده و حد ردیابی برای استاندارد سدیم بنزوات ۱ میلی گرم بر لیتر، برای نگهدارنده در نمونه مایع ۱۰ میلی گرم بر لیتر و بالاخره، برای نگهدارنده در نمونه جامد ۵۰ میلی گرم بر لیتر تعیین شد.

گازها به عنوان فاز متحرک HPLC مورد استفاده قرار گرفت. این بافر هم چنین برای استخراج سدیم بنزوات از مواد جامد و رقیق نمودن نمونه‌های مایع به کار گرفته شد.

### محلول های استاندارد

محلول استوک استاندارد با حل کردن ۵۰ گرم سدیم بنزوات در آب HPLC grade و به حجم رساندن محلول در بالون ژوزه ۱۰۰ میلی لیتری تهیه گردید. برای رسم نمودار کالیبراسیون، محلول‌های استاندارد از طریق رقیق کردن نمونه استوک توسط بافر فاز متحرک با غلظت‌های  $2/5$ ، ۵، ۱۰ و  $20\%$  تهیه شدند. طیف UV محلول سدیم بنزوات 125 ppm تهیه گردید (شکل ۱) و با استفاده از این طیف طول موج ماکزیمم در ۲۲۵ نانومتر تعیین گردید.



شکل ۱: طیف ماورای بنفش محلول سدیم بنزوات 125 ppm

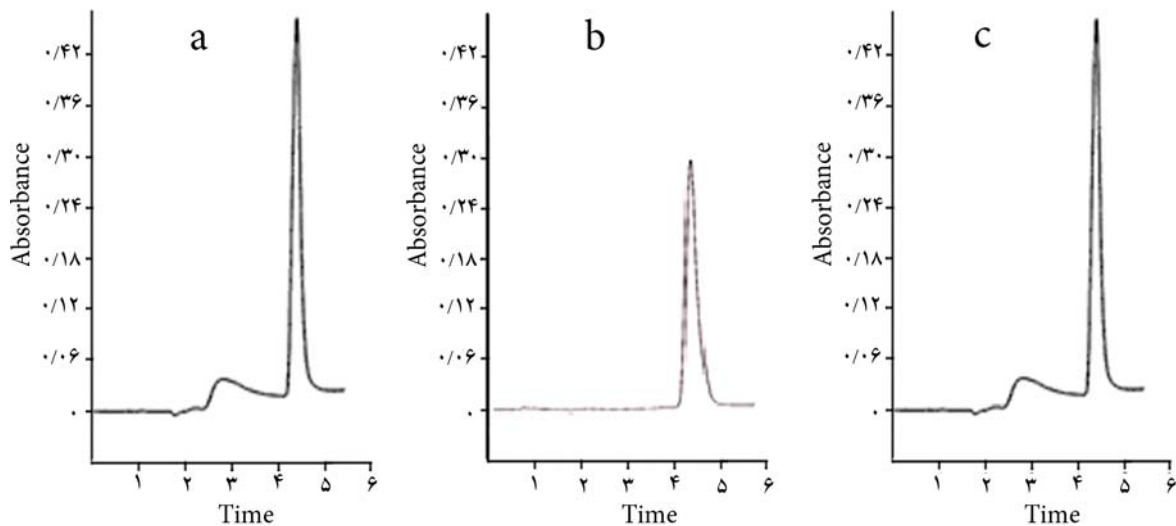
### آماده سازی نمونه‌ها

نمونه‌های مایع از طریق رقیق کردن، ۱ میلی لیتر از هر نمونه با ۱۰ میلی لیتر فاز متحرک تهیه شدند. در مورد نمونه‌های جامد، ۱۰ گرم از هر یک در ۵۰

## نتایج

شرایط بهینه جداسازی و ردیابی سدیم بنزوات با تنظیم غلظت آمونیم استات و pH فاز متحرک فراهم شد. غلظت آمونیم استات و pH بهینه سیستم به ترتیب ۰/۳۰ گرم بر لیتر و ۴/۵ تعیین شدند. سرعت جریان بهینه ۰/۸ میلی لیتر در دقیقه بود که منجر به حداقل پهن شدگی نوار و زمان منطقی برای شستشو (reasonable elution time) گردید. جدول ۱ نتایج غلظت سدیم

بنزوات در نمونه‌های مختلف را نشان می‌دهد. کروماتوگرام‌های به دست آمده برای سدیم بنزوات و نمونه‌های نوشابه و آب میوه در شکل ۲ نشان داده شده‌اند. به طوری که در این شکل مشخص است، برای استاندارد و نمونه‌های مورد مطالعه کروماتوگرام شفاف و بدون وجود مزاحمت است که نشان‌دهنده عدم وجود ناخالصی و استاندارد بودن شرایط کار بوده است.



شکل ۲: کروماتوگرام (HPLC) برای: (a) یک نمونه نوشابه دارای سدیم بنزوات، (b) نمونه استاندارد سدیم بنزوات ۱۲۵ ppm و (c) یک نمونه آب میوه دارای سدیم بنزوات

بیمارستان‌ها با هماهنگی مسئول‌های مربوط تهیه شدند و بنابراین بر چسب محصول اصلی مشاهده نشد. جدول ۱ نتایج مربوط به حضور و مقدار کمی سدیم بنزوات در برخی منتخب این نمونه‌ها را نشان می‌دهد. ستون سمت چپ جدول مقادیر مجاز سدیم بنزوات را در نمونه‌های غذایی مشابه نشان می‌دهد که توسط کمیته بین المللی غذا و دارو تعیین و توصیه شده‌اند.

بیشترین حساسیت برای سدیم بنزوات در طول موج ماگزیمم ( $\lambda_{max}$ ) خود مشاهده گردید. طیف ماورای بنفش این نگهدارنده که در شکل ۱ آورده شده است، نشان می‌دهد مقدار  $\lambda_{max}$  برای محلول استاندارد سدیم بنزوات در حدود ۲۳۰ نانومتر می‌باشد. نمونه‌هایی نیز از رستوران‌های شهری و بیرون شهری، برخی مکان‌هایی که غذای عمومی تهیه می‌کنند مانند آشپزخانه‌ها، سلف سرویس دانشگاه‌ها و برخی

جدول ۱: غلظت سدیم بنزوات در نمونه‌های مختلف مواد غذایی بسته‌بندی

نمونه غذایی	شکل ظاهری	تعداد تست	سدیم بنزوات (ppm)	نوشته روی برچسب	حداکثر مقدار مجاز سدیم بنزوات (ppm)
نوشابه	مایع	۱۴	۳۸۲	بدون نگهدارنده	۵۰۰
آب میوه مخلوط	مایع	۶	۷۶	بدون نگهدارنده	۱۰۰۰
آب پرتقال	مایع	۴	۱۰۸	بدون نگهدارنده	۱۰۰۰
آب سیب	مایع	۹	۱۰۲	بدون نگهدارنده	۱۰۰۰
سس مایونز	نیمه جامد	۹	۱۲۶	بدون نگهدارنده	۵۰۰
کچاپ	نیمه جامد	۹	۱۲۰	بدون نگهدارنده	۵۰۰
کره	جامد	۲	۴۳	بدون نگهدارنده	۵۰۰

برای بررسی بهتر صحت نتایج، نمونه‌های کنترلی (spike samples) نیز به این صورت تهیه شدند که مقدار مشخص سدیم بنزوات به آن‌ها اضافه شده و مقدار ردیابی شده آن محاسبه شد تا تطابق مقدار افزوده شده و بررسی شده را مشخص کند. جهت تهیه این کنترل‌ها،

مقدار ۰/۱٪ (۱۰۰۰ ppm) و ۰/۰۵٪ (۵۰۰ ppm) سدیم بنزوات به نمونه‌ها اضافه شده و مشاهده شد که مقادیر بازیابی شده در محدوده ۹۷-۸۹٪ بودند (جدول ۲) که این نتایج تأیید کننده صحت روش ردیابی است.

جدول ۲: نتایج مربوط به مقدار در صد بازیابی با استفاده از نمونه‌های کنترل

محصول غذایی	مقدار موجود قبل از افزودن کنترل (ppm)	مقدار افزوده شده (ppm)	مقدار موجود بعد از افزودن کنترل (ppm)	مقدار بازیابی (%)
نوشابه	۳۸۲	۳۰	۴۰۵	۹۶
آب میوه مخلوط	۷۶	۵	۸۰	۹۷
آب پرتقال	۱۰۸	۱۰	۱۱۵	۹۵
آب سیب	۱۰۲	۱۰	۱۱۰	۹۶
سس مایونز	۱۲۶	۱۰	۱۳۱	۸۹
کچاپ	۱۲۰	۱۰	۱۳۱	۹۷
کره	۴۳	۵	۴۷	۹۸

با استفاده از یک بررسی کتابخانه‌ای، مقادیر سدیم بنزوات در نمونه‌های مختلف که توسط روشی

مشابه در این تحقیق و یا روش‌های دیگر مقایسه شدند. اطلاعات به دست آمده در جدول ۳ خلاصه شده‌اند.

جدول ۳: مقادیر سدیم بنزوات در نمونه‌های مختلف غذایی با روش‌های متفاوت

نمونه غذایی	سدیم بنزوات (ppm) تحقیق حاضر به روش (HPLC)	سدیم بنزوات (ppm) گزارش شده در منبع ۷ توسط HPLC	سدیم بنزوات (ppm) گزارش شده در منبع ۱۳ توسط Capillary electrophoresis
نوشابه	۳۸۲	۱۰۲	۲۲۵
آب میوه	۷۶	۹۸	۱۸۹
آب پرتقال	۱۰۸	۹۸	۱۹۰
آب سیب	۱۰۲	۹۴	-
سس مایونز	۱۲۶	۱۲	-
کچاپ	۱۲۰	۴۰	-
کره	۴۳	۵۲	-

### بحث

لازم به تأکید است که از میان ۷۰ نمونه مواد غذایی تهیه شده از سوپر مارکت‌های سطح شهر حدود ۵۰٪ نمونه‌های مایع شامل آب میوه‌ها، نوشابه‌ها، دوغ، شیر ساده و طعم‌دار و غیره بودند. نمونه‌های نیمه جامد شامل سس‌های مختلف، رب گوجه‌فرنگی، انار و آلوجه و هم چنین مرباهای مخلوط بودند و بالاخره، نمونه‌های جامد انواع کره، میوه‌های کمپوت شده و بستنی بودند. ستون سمت چپ جدول ۱ مقادیر مجاز سدیم بنزوات را در نمونه‌های غذایی مشابه نشان می‌دهد که توسط کمیته بین‌المللی غذا و دارو تعیین و توصیه شده‌اند. با توجه به مقادیر اندازه‌گیری شده در نمونه‌های تحقیق حاضر، و مقایسه آن‌ها با اندازه‌های مجاز، مشخص می‌شود که سدیم بنزوات در اغلب آن‌ها کمتر از میزان مجاز بوده است. ولی نکته قابل توجه این که روی بر چسب همه نمونه‌های مورد بررسی در این تحقیق اغلب عبارت "عاری از مهار کننده" وجود داشت در حالی که مقادیر یافت شده در

برخی موارد بیشتر از مقدار مجاز بین‌المللی هستند. برخی از نمونه‌ها نیز از محصول کلی برداشته شدند به این معنی که بسته‌بندی به صورت بزرگ و فله‌ای بود و برای تحقیق مقدار در حدود نیم کیلو خریداری شدند و بنابراین بر چسب محصول اصلی مشاهده نشد، مانند رب انار و رب آلوجه و برخی پنیرها و کره‌های محلی که از نمونه فله‌ای تهیه گردیدند. در میان محصولات اندکی که وجود نگهدارنده غذایی را روی بر چسب ذکر کرده بودند، هیچکدام نوع و مقدار آن را نوشته بودند.

با توجه به جدول ۳، مشاهده می‌شود که روش اندازه‌گیری دخالت مستقیم روی مقدار به دست آمده ندارند و بیشتر مربوط به کشور و کارخانه سازنده محصول است. در تحقیق حاضر، مقدار سدیم بنزوات در اغلب نمونه‌های مورد بررسی با ادعای روی بر چسب مغایرت داشتند و تنها در حدود ۵٪ از محصولات بسته‌بندی و آماده مصرف موجود در بازار دارای برچسب دقیق و گویا و یا نزدیک به مقدار واقعی نگهدارنده موجود در محصول بودند!

### سپاسگزاری

این تحقیق از محل جایزه تحقیقاتی انجمن سلطنتی شیمی انگلستان انجام شده است که به این وسیله مراتب قدردانی و تشکر را داریم.

### منابع

1. U. S. Government Printing Office, Code of Federal Regulations Title 21, Washington, DC, Revised 1 April, 1999. Section: 1841733.
2. Brause, A.R., 1993. Food allergies related to the presence of preservative. Association of Food & Drug Office Journal, 57, 4, 6-9.
3. Archer, A.W., 1980. HPLC determination of preservatives in orange juice. Analyst 105, 407-411.
4. Fernando, J. M. Mota; Ferreira, I.M.P.L.V.O.; Cunha, S.C.; Beatriz M. and Oliveira, P.P.; 2003. Optimisation of extraction procedures for analysis of benzoic and sorbic acids in foodstuffs. Food Chemistry, 82(3), 469-473.
5. Gagliardi, L.; De Orsi, D.; Manna, L. and Tonelli, D., 1997. Determination of food preservatives in canned whole fruits. Journal of Liquid Chromatography & Related Technologies, 20, 1797-1799.
6. Burini, G. and Damiani, P., 1991. Determination of sorbic acid in margarine and butter by high-performance liquid chromatography with fluorescence detection. 543, 69-73.
7. Aurelio López-Malo A.; Barreto-Valdivieso J.; Palou, E. and Martín, F.S., 2007. Aspergillus flavus growth response to cinnamon extract and sodium benzoate mixtures. Food Control. 18(11), 1358-1362.
8. Hwang, C.A. and Larry Beuchat, R., 1995. Efficacy of a lactic acid/sodium benzoate wash solution in reducing bacterial contamination of raw chicken. International Journal of Food Microbiology. 27 (1), 91-98.

بر اساس روشی که در این تحقیق طراحی شده بود و نتایج حاصل از کروماتوگرافی مایع با کارآئی بالا، می‌توان نتیجه‌گیری نمود که این نوع کروماتوگرافی دستگاهی می‌تواند با طراحی صحیح و مناسب روشی سریع، دقیق و ساده در دسترس قرار دهد. این روش را می‌توان، علاوه بر سدیم بنزوات، برای بررسی و ردیابی بسیاری از افزودنی‌های غذایی در نمونه‌های مختلف موجود در بازار استفاده نمود. باید توجه داشت که در مورد برخی نمونه‌های غذایی مانند مربای تمشک و یا میوه‌هایی از این قبیل، که خودشان نگهدارنده‌های طبیعی شبیه به سدیم بنزوات دارند، جواب‌ها زیاد قابل اعتماد نخواهند بود. از طرفی، با توجه به وجود برخی آنتی اکسیدانت‌ها و نگهدارنده‌های طبیعی موجود در میوه‌ها و سبزی‌ها، برای بسیاری از محصولات بسته‌بندی شده آن‌ها نیاز به افزودن نگهدارنده‌های شیمیائی نیست. این موضوع بسیار قابل توجه و مهم می‌باشد و لازم است که دانشمندان این رشته توجه مسئولان صنایع غذایی را به این نکته جلب نمایند. اهمیت این موضوع زمانی بیشتر مورد توجه قرار می‌گیرد که اثرات منفی مواد افزودنی سنتزی از قبیل سرطان‌زایی و تغییر در متابولیسم نیز در نظر گرفته شوند. اخیراً ثابت شده است که سدیم بنزوات اثر بازدارندگی روی آزاد شدن لپتین (۱۸)، و در نتیجه چاقی به خصوص در کودکان دارد (۱۹). رفتار غیر عادی و فعالیت‌های بیش از حد همراه بواکنش‌های غیر طبیعی اجتماعی در کودکان سنین ۳ ساله و دبستانی نیز ممکن است به دلیل استفاده بیش از حد تنقلات غنی از نگهدارنده‌ها باشد (۲۰).



9. Kim, J.H.; Campbell, B.C.; Mahoney N.; Chan, K.L.; Molyneux R.J. and Balajee, A., 2010. Augmenting the activity of antifungal agents against aspergilli using structural analogues of benzoic acid as chemosensitizing agents. *Fungal Biology*, Corrected proof, In press.
10. Jones, J.M., 1992. The effect of sodium benzoate on general health. *Food Safety*, Eagan Press, St. Paul, MN, pp 407-412.
11. Fujitani, T., 1993. Increased serum cholesterol and phospholipid levels due to ingestion of sodium benzoate. *Toxicology Letters*, 69(2), 171-179.
12. Kucukcetin, A.; Silk, B. and Demir, M., 2008. Determination of sodium benzoate, potassium sorbate, nitrate and nitrite in some commercial dairy products. *GIDA* 33(4): 159-164.
13. Harry, M.; Pylypiw Jr.; Maureen, T. and Grether, T., 2000. Rapid high-performance liquid chromatography method for analysis of sodium benzoate and potassium sorbate in foods. *Journal of Chromatography A*. 883, 299-304.
14. Tfouni, S.A.V. and Toledo, M.C.F. 2002. Determination of benzoic and sorbic acid in Brazilian food. *Food Control* 13(2), 117-123.
15. Mandrou, B. and Bressolle, F., 1980. Thin layer chromatography reflectometric determination of benzoic and sorbic acids in fruit beverages. *Journal of Association Office of Analytical Chemistry*, 63, 675-678.
16. Mandrou, B.; Nollet, V.; Gastaldi, E.; and Fabre, E., 1998. Solid-phase extraction as a clean-up procedure for the liquid chromatographic determination of benzoic acid and sorbic acid in fruit-derived products. *Journal of Liquid Chromatography and Related Technologies*, 21, 829-842.
17. Ohashi, M.; Kitada, Y. and Imai, S., 2004. Capillary electrophoresis of drink samples containing sodium azide. *Journal of Chromatography A*, 1045(1-2), 247-251.
18. Giuseppe, R.De.; Bamonti, F.; Novembrino, F.; Liso, De.; Sommaruga, D. and Vigna, L., 2010. Overweight and obesity in an Italian Scholar age children. *Clinical Nutrition Supplements* 5(S1), 5-14.
19. Ciardi, C.; Jenny, M.; Tschoner, A.; Ueberall, F.; Patsch, J.; Pedrini, M.; Ebenbicher, C. and Fuchs, D., 2010. Food additives sodium sulfite, sodium benzoate and curcumin inhibit leptin release in murine adipocytes in vitro. *Clinical Nutrition Supplements* 5(S1), 5-14.
20. McCann, D.; Barrett, A.; Cooper, A.; Crumpler Dalen, L.; Grimshaw, K.; Kitchin, E.; Lok, K.; Porteous, L. and Prince, E., 2007. Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomized double-blinded, placebo-controlled trial. *The Lancet*, 1-8.