

## Quantitative Determination of Ethanol and Methanol in Non-alcoholic Fermented Beverages and Herbal Distillates: Analytical Toxicology Perspectives

Afroz Ahmadi<sup>1</sup>, Maryam Akhghari<sup>2</sup>, Saeed Gholamzadeh<sup>3</sup>, Mohammad Zarenezhad<sup>4\*</sup>

1. *MAc in Toxicology, Department of Toxicology & Pharmacology, Faculty of Pharmacy, Pharmaceutical Sciences Branch, Islamic Azad University (IAUPS), Tehran, Iran*
2. *Associate Professor, Legal Medicine Research Center, Legal Medicine Organization, Tehran, Iran*
3. *MD, Legal Medicine Research Center, Legal Medicine Organization, Tehran, Iran*
4. *MD, PhD in Research, Legal Medicine Organization, Tehran, Iran*

### Article Info

Received: 24 Nov 2016

Accepted: 21 Nov 2017

Published Online: 03 Dec 2017

DOI: 10.30699/epub.sjfm.23.3.225

Original Article



### Abstract

**Background:** Non-alcoholic fermented beverages and herbal distillates are among the popular beverages in Iran. Therefore their safety is of great issue. Many reports indicate that these beverages are contaminated with ethanol and methanol. There are always questions about alcoholic content of beverages from jurisdiction authorities. The aim of the present study was to analyze some brands of herbal distillates and non-alcoholic fermented beverages available in Iran market to determine ethanol and methanol concentrations.

**Materials and Methods:** A total of five brands of non-alcoholic beverages and five brands of herbal distillates were selected. Ten samples from each brand (totally 100 samples) were randomly bought from market. Ethanol and methanol concentrations were determined using headspace gas chromatography equipped with flame ionization detector. Acetonitrile was applied as internal standard. Data were analyzed by SPSS software.

**Findings:** Results of the present study showed that none of the herbal distillates or non-alcoholic beverages contained ethanol and methanol more than maximum allowable limits. However mean ethanol concentration (with ethanol content of 0.59% volume/volume=v/v) was significantly higher in ten samples of one brand of fermented non-alcoholic beverages in comparison to other brands ( $p<0.05$ ). Mean methanol level was detected in ten samples of one brand of herbal distillates significantly higher than other brands as much as 0.03% v/v ( $p<0.05$ ). Ethanol concentration in non-alcoholic beverages was in the range of 0-2.2% v/v. In herbal distillates, methanol and ethanol concentrations were in the ranges of 0-0.03% and 0-0.09% v/v respectively.

**Conclusion:** Ethanol and methanol concentrations were non-toxic in non-alcoholic fermented beverages and herbal distillates. Presence of ethanol and methanol in food stuff above accepted limit has life-threatening consequences so the quality control of herbal products and non-alcoholic beverages is needed for safety and it should be conducted periodically for public health guarantee.

**Keywords:** Herbal Distillates, Non-alcoholic Beverages, Ethanol, Methanol, Headspace Gas Chromatography, Analytical Toxicology

### Corresponding Information

Mohammad Zarenezhad, MD, PhD in Research, Legal Medicine Organization, Tehran, Iran. Email: zarenezhad@hotmail.com. Tel: 071-36324100

Copyright © 2017, Ir J Forensic Med. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.

### How to Cite This Article:

Ahmadi A, Akhghari M, Gholamzadeh S, Zarenezhad M. Quantitative Determination of Ethanol and Methanol in Non-alcoholic Fermented Beverages and Herbal Distillates: Analytical Toxicology Perspectives. Ir J Forensic Med. 2017; 23 (3):225-233

## بررسی کمی متانول و اتانول در نوشیدنی‌های تخمیری غیرالکلی و عرقیات گیاهی؛ جنبه‌های سم‌شناسی تجزیه‌ای

افروز احمدی<sup>۱</sup>، مریم اخگری<sup>۲</sup>، سعید غلامزاده<sup>۳</sup>، محمد زارع‌نژاد<sup>۴\*</sup>

۱. کارشناسی ارشد سم‌شناسی، گروه سم‌شناسی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد تهران، تهران، ایران
۲. دانشیار، مرکز تحقیقات سازمان پزشکی قانونی، بخش سم‌شناسی، سازمان پزشکی قانونی کشور، تهران، ایران
۳. پزشک قانونی، مرکز تحقیقات سازمان پزشکی قانونی، تهران، ایران
۴. پزشک قانونی، دکترای تخصصی پژوهش، مرکز تحقیقات سازمان پزشکی قانونی، تهران، ایران

چکیده	اطلاعات مقاله
<p><b>زمینه و هدف:</b> امروزه نوشیدنی‌های تخمیری غیرالکلی (ماء‌الشعیر) و عرقیات گیاهی به‌صورت گسترده در ایران استفاده می‌شود؛ بنابراین بی‌خطری آن‌ها از اهمیت خاصی برخوردار است. گزارش‌های متعددی مبنی بر وجود متانول و اتانول در نوشیدنی‌ها وجود دارد. در این زمینه و برای پاسخ‌دهی به پرسش‌های طرح‌شده از سوی مقامات قضایی مبنی بر تعیین کمی میزان الکل در این فرآورده‌ها، مطالعه حاضر طراحی شد. هدف از انجام مطالعه، تعیین غلظت متانول و اتانول در برندهای ماء‌الشعیر و عرقیات گیاهی موجود در بازار ایران است.</p> <p><b>روش بررسی:</b> پنج برند از انواع ماء‌الشعیر و پنج برند از عرقیات گیاهی انتخاب شدند. از هر برند ۱۰ نمونه (در مجموع ۱۰۰ نمونه) به‌صورت تصادفی خریداری شد. غلظت متانول و اتانول در تمامی نمونه‌ها به روش Headspace GC (کروماتوگرافی گازی مجهز به مجهز به Headspace) و با استفاده از شناساگر یونش شعله (Flame ionization detector) آنالیز شدند. استونیتریل به‌عنوان استاندارد داخلی استفاده شد. نتایج با نرم‌افزار SPSS تجزیه و تحلیل آماری شدند.</p> <p><b>یافته‌ها:</b> نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان داد غلظت متانول و اتانول در تمامی برندهای ماء‌الشعیر و عرقیات گیاهی، پایین‌تر از حد سمی بود. میانگین غلظت اتانول با میزان ۰/۵۹٪ حجمی / حجمی در ده نمونه از یک برند ماء‌الشعیر نسبت به دیگر برندها به‌صورت معنی‌داری بالاتر بود (<math>P &lt; 0/05</math>). در ده نمونه از یک برند عرقیات گیاهی، میانگین غلظت متانول با میزان ۰/۰۳٪ حجمی / حجمی به‌صورت معناداری بالاتر از دیگر برندها بود (<math>P &lt; 0/05</math>). غلظت اتانول در کلیه برندهای ماء‌الشعیر در محدوده ۰-۲/۲٪ حجمی / حجمی گزارش شد. در عرقیات گیاهی، غلظت متانول و اتانول به ترتیب در محدوده ۰-۰/۰۳٪ حجمی / حجمی و ۰-۰/۰۹٪ حجمی / حجمی به دست آمد.</p> <p><b>بحث و نتیجه‌گیری:</b> غلظت متانول و اتانول در برندهای ماء‌الشعیر و عرقیات گیاهی در مقادیر غیر سمی بود. با توجه به اینکه وجود الکل‌ها در مقادیر بیش‌ازحد مجاز در محصولات غذایی تهدیدکننده سلامت مصرف‌کنندگان است، کنترل کیفی دوره‌ای محصولات گیاهی و ماء‌الشعیرهای غیرالکلی، برای حفظ سلامتی جامعه لازم و ضروری است.</p> <p><b>کلیدواژه‌ها:</b> عرقیات گیاهی، نوشیدنی‌های غیرالکلی، متانول، اتانول، کروماتوگرافی گازی مجهز به Headspace، سم‌شناسی تجزیه‌ای</p>	<p>تاریخ وصول: ۹۵/۰۹/۰۴ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۸/۳۰ انتشار آنلاین: ۹۶/۰۹/۱۲</p> <p><b>نویسنده مسئول:</b> <b>دکتر محمد زارع‌نژاد</b> پزشک قانونی، دکترای تخصصی پژوهش، عضو پیوسته مرکز تحقیقات سازمان پزشکی قانونی، تهران، ایران</p> <p><b>تلفن:</b> ۰۷۱-۳۶۳۲۴۱۰۰</p> <p><b>پست الکترونیک:</b> zarenezhad@hotmail.com</p>

## مقدمه

از هر برند، ۱۰ نمونه و در مجموع ۱۰۰ نمونه جمع‌آوری شد. جمع‌آوری نمونه‌ها از ابتدای شهریورماه سال ۱۳۹۴ تا آبان‌ماه همان سال به طول انجامید. نمونه‌برداری به شکل تصادفی و از فروشگاه‌های توزیع مواد غذایی شهر شیراز صورت گرفت. به تاریخ تولید، انقضا و سری ساخت محصول توجه ویژه‌ای شد؛ زیرا برای صحت نتایج، رعایت شرایط یکسان در مورد نمونه‌ها لازم و ضروری است. هر برند با حرف خاص خود مشخص شد و نمونه‌های مربوط به هر برند از شماره ۱ تا ۱۰ شماره‌گذاری شدند.

## ب) مواد موردنیاز

اتانول، متانول و استونیتریل همگی با درجه خلوص بالا (Analytical grade) و کاغذ pH متر (pH indicator strips, non-) (Merck Chemical Co) از شرکت مرک (۱۴-۰=bleeding, pH) کشور آلمان تهیه شدند.

## ج) انجام آزمایش‌های سم‌شناسی تجزیه‌ای

## بررسی pH نمونه‌ها

pH همه نمونه‌های ماء‌الشعیر و عرقیات گیاهی به وسیله کاغذ pH متر مرک و مقیسه با مقیاس مندرج بر روی ظرف pH متر اندازه‌گیری شدند.

## تهیه محلول استاندارد و استاندارد داخلی

بهترین روش برای شناسایی کمی و هم‌زمان اتانول و متانول در نوشیدنی‌ها، روش کروماتوگرافی گازی مجهز به Headspace است (۴). روش شناسایی اتانول و متانول از قبل در آزمایشگاه معتبرسازی شده است.

یک میلی‌لیتر از اتانول، متانول و استونیتریل به صورت جداگانه به بالون ژوژه ۱۰۰ میلی‌لیتری منتقل شد و حجم کل نمونه با آب مقطر به ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. محلول حاصل، حاوی ۱٪ حجمی/حجمی از اتانول، متانول و یا استونیتریل بود. برای تهیه محلول استاندارد کاری، غلظت‌های مختلفی از مخلوط متانول ۱٪، اتانول ۱٪ و استونیتریل ۱٪ تهیه شد. برای محاسبه RRF (Relative Response Factor) غلظت‌های ۱:۱، ۱:۲، ۱:۵، ۱:۱۰، ۱:۲۰، ۱:۵۰ از اتانول: استونیتریل و متانول: استونیتریل ساخته شد و RRF طبق فرمول  $RRF = \frac{AUC(\text{اتانول})}{AUC(\text{استونیتریل})} / \frac{AUC(\text{اتانول})}{AUC(\text{استونیتریل})}$  محاسبه شد. منحنی حاصل تقسیم سطح زیر منحنی (Area Under the Curve = AUC) در مقابل غلظت رسم شد. مقدار RRF از شیب منحنی خط و طبق فرمول محاسبه شد.

RRF یا فاکتور ایجاد پاسخ نسبی به منظور اصلاح پاسخ دتکتور در دستگاه‌هایی که بر پایه کروماتوگرافی کار می‌کنند، به کار می‌رود. در صورت وجود خطا در تزریق و یا تهیه محلول‌های استاندارد کاری، استفاده از RRF موجب کاهش خطای آزمایش خواهد شد (۵، ۶). حداقل غلظت

تولید و مصرف عرقیات گیاهی و ماء‌الشعیر، به صورتی که در حال حاضر در کشور ایران وجود دارد، به ندرت در دیگر کشورها مشاهده می‌شود (۱). امروزه در کنار پیشرفت فناوری و صنعتی شدن جهان به همراه تنوع زیاد در تولید انواع کالاهای مصرفی و با کیفیت گوناگون، گرایش افراد به سوی مصرف نوشیدنی‌ها افزایش چشمگیری داشته است (۱). تولید نوشیدنی‌های الکلی تخمیری در بسیاری از کشورها مرسوم است. بسیاری از نوشیدنی‌ها در مقیاس خانگی و با مقادیر اندک تهیه می‌شوند (۲). آبجو و یا محصولات حاصل از تخمیر جو از گذشته‌های دور استفاده می‌شده‌اند. آبجو از تخمیر قند موجود در غلات به دست می‌آید. مهم‌ترین اجزاء برای تولید آبجو و یا ماء‌الشعیر، جوی کاملاً له‌شده و نوعی مخمر آبجو است. انواع آبجوی تولیدشده در سراسر دنیا حاوی ۴-۶٪ حجمی/حجمی از الکل اتیلیک هستند (۲). در ایران به دلیل وجود شرایط مذهبی، از آبجوهای با درجه الکلی صفر و یا همان ماء‌الشعیر استفاده می‌شود.

گیاهان دارویی (Medicinal plants) و عرقیات حاصل از آن‌ها (Herbal distillates) از دیرباز مورد توجه خاص بوده‌اند. این گیاهان و عرقیات امروزه به سبب اعتقاد بر بی‌ضرری این ترکیبات و ارزان بودن آن‌ها نسبت به داروهای موجود در فارماکوپه رسمی، به‌عنوان خط اول درمان در بسیاری از موارد استفاده می‌شوند. در ایران، به سبب شرایط اقلیمی‌اش، انواع گیاهان دارویی یافت می‌شود و تولید و عرضه انواع فرآورده‌ها و فرمولاسیون‌های دارویی از این گیاهان انجام می‌گیرد. مطالعات گذشته حاکی از آن است که نوشیدنی‌های غیرالکلی و عرقیات گیاهی به روش تخمیر و یا تقطیر تولید می‌شوند (۳).

با توجه به شرایط فرهنگی و مذهبی جامعه، همواره پرسش‌های متعددی مبنی بر محتوای الکل نوشیدنی‌های غیرالکلی تخمیری و عرقیات گیاهی مطرح است. پژوهش پیش رو برای پاسخ‌دهی به پرسش‌های قضات گرامی طراحی شد. هدف از انجام مطالعه حاضر بررسی کمی نمونه‌های ماء‌الشعیر و عرقیات گیاهی موجود در بازار ایران از ۵ برند مختلف از نظر وجود اتانول و متانول است.

## مواد و روش‌ها

## الف) جمع‌آوری نمونه‌ها

در یک مطالعه مقطعی تحلیلی و برای اندازه‌گیری میزان اتانول و متانول در برخی از انواع عرقیات گیاهی و برندهای مختلف ماء‌الشعیر موجود در بازار ایران، مطالعه حاضر، در آزمایشگاه سم‌شناسی پزشکی قانونی استان فارس اجرا شد. بدین منظور، ۵ برند مختلف ماء‌الشعیر (A, B, C, D, E) و ۵ برند مختلف عرقیات گیاهی (F, G, H, I, K) از نوع گلاب، عرق نعناع، خارشتر، عرق بیدمشک و عرق کاسنی تهیه شد.

میزان الکل موجود در نمونه‌های مختلف را می‌توان به صورت درصد حجمی الکل، یا با واحد ppm و mg/L بیان کرد که این واحدها در سرتاسر جهان استفاده می‌شوند. در مطالعه حاضر، میزان اتانول و متانول در نمونه‌های ماءالشعیر و عرقیات گیاهی به صورت درصد حجمی بیان شد.

### تحلیل آماری

تحلیل آماری یافته‌های این مطالعه با استفاده از نرم‌افزارهای SPSS نسخه ۲۲ انجام شد. با توجه به کمی بودن متغیرها (غلظت اتانول و متانول)، از تست Kolmogorov-Smirnov برای بررسی نرمال بودن توزیع داده‌ها استفاده شد. با توجه به نرمال بودن توزیع داده‌ها، تست One-way ANOVA برای بررسی معنی‌دار بودن تفاوت میانگین‌ها در چند گروه در مقیاس  $p < 0.05$  به کار رفت. آزمون Tukey post hoc test برای شناسایی گروهی که دارای تفاوت معنی‌دار با بقیه گروه‌ها است، به کار گرفته شد.

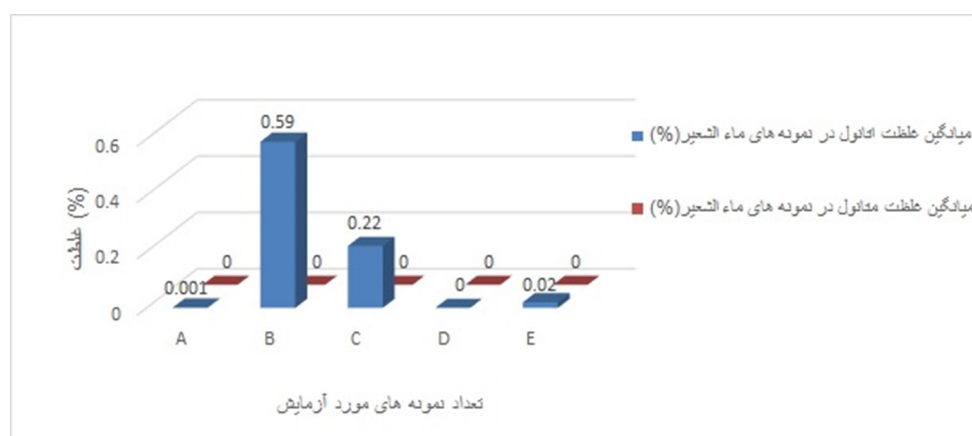
### یافته‌ها

در بررسی pH همه نمونه‌ها، متوسط pH نمونه‌های ماءالشعیر در محدوده ۴-۵ pH به دست آمد. متوسط pH نمونه‌های عرقیات معادل ۶-۷ pH محاسبه شد. در این مطالعه غلظت اتانول و متانول در پنج برند مختلف از ماءالشعیر و عرقیات گیاهی (از هر برند ۱۰ نمونه) به روش Headspace GC بررسی کمی شدند. نتایج نشان داد که از پنج برند ماءالشعیر تنها در یک برند (B) میانگین غلظت اتانول به شکل معنی‌داری از دیگر برندها بالاتر بود ( $p < 0.05$ ).

قابل‌شناسایی (Limit of Detection = LOD) برای اتانول و متانول ۰.۰۰۰۱٪ و حداقل غلظت قابل‌اندازه‌گیری (Limit of Quantitation = LOQ) برای اتانول و متانول ۰.۰۰۱٪ به دست آمد.

### مشخصات دستگاه Headspace GC و شرایط کروماتوگرافی

جداسازی اتانول و متانول توسط Headspace GC مدل Agilent (۶۸۹۰N, USA) مجهز به شناساگر یونش شعله (Flame Ionization Detector = FID) صورت گرفت. ستون استفاده‌شده، از نوع DB-ALC ۱ و به ابعاد  $320 \mu\text{m} \times 1/8 \mu\text{m} \times 30 \text{m}$  بود. نمونه‌برداری بدون دخالت اپراتور و به وسیله روش اتوماتیک Headspace انجام شد. ۳ میلی‌لیتر از نمونه‌های ماءالشعیر و عرقیات به صورت جداگانه در ویال ریخته شد و در ویال‌ها کاملاً محکم بسته شد. برای ایجاد تعادل در فضای بالای ویال و الکل موجود در فاز مایع، ویال‌ها به مدت ۱۵ دقیقه در دمای  $60^\circ\text{C}$  در فضای تعبیه‌شده قرار داده شدند. پس از ایجاد تعادل غلظتی اتانول، متانول و استونیتریل، بین فاز آبی و فضای بالای ویال طبق برنامه از پیش تنظیم‌شده  $1000 \mu\text{L}$  از نمونه توسط Injector در دمای  $150^\circ\text{C}$  تزریق شد. خط انتقال نمونه (Transfer line) معادل  $140^\circ\text{C}$  تنظیم شد. دمای  $35^\circ\text{C}$  oven و زمان نگهداری در این دما ۵ دقیقه انتخاب شد. از گاز نیتروژن با درجه خلوص ۹۹/۹۹٪، سرعت جریان  $4/9 \text{ mL/min}$  Flow rate و با فشار ۱۸/۵۵ PSI به عنوان گاز حامل استفاده شد. برای عملکرد شناساگر FID، هوای فشرده و گاز هیدروژن استفاده شد. گاز هیدروژن با سرعت جریان  $35 \text{ mL/min}$  توسط هیدروژن ژنراتور تولید شد. سرعت جریان هوای فشرده نیز  $250 \text{ mL/min}$  بود. دمای شناساگر بر روی  $300^\circ\text{C}$  تنظیم شد.



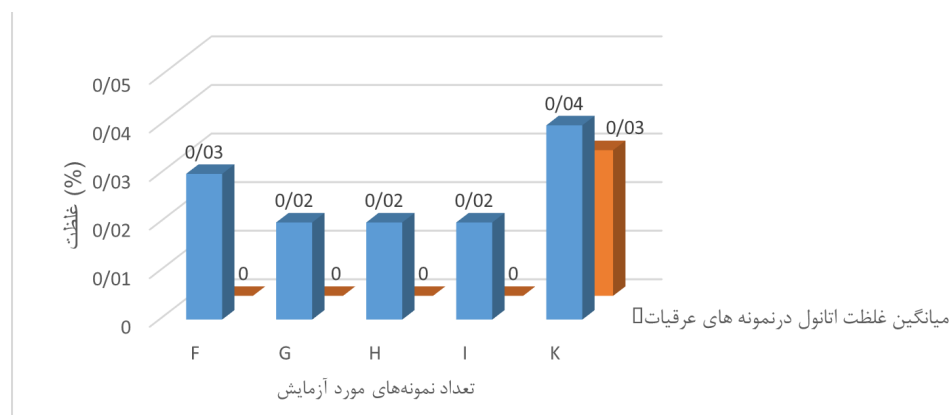
شکل ۱. میانگین غلظت اتانول و متانول در ۵ برند ماءالشعیر (از هر برند ۱۰ نمونه) آنالیز شده به روش Headspace Gas Chromatography

مقایسه‌ای از جدول، حاکی از آن است که میزان اتانول در برندهای مختلف ماء‌الشعیر با یکدیگر تفاوت معنی‌داری دارند ( $p=0/004$ )؛ اما میزان متانول در برندهای مختلف ماء‌الشعیر با یکدیگر تفاوت معنی‌داری ندارند ( $p=0/418$ ). میزان اتانول نیز در برندهای مختلف عرقیات با یکدیگر تفاوت معنی‌داری ندارند ( $p=0/217$ )، ولی میزان متانول در برندهای مختلف عرقیات با یکدیگر تفاوت معنی‌داری دارند ( $p=0/016$ ). شکل‌های ۱ و ۲ بیانگر میانگین غلظت اتانول و متانول در ۵ برند ماء‌الشعیر و ۵ برند عرقیات گیاهی است.

میانگین غلظت متانول در تمامی پنج برند ماء‌الشعیر صفر گزارش شد. در بررسی پنج برند عرقیات به روش ANOVA یک‌طرفه، میزان اتانول‌ها تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند ( $p<0/05$ ). میانگین غلظت متانول در ۱۰ نمونه عرقیات برند K معادل  $0/02 \pm 0/03$  حجمی/حجمی بود که دارای تفاوت معنی‌داری با دیگر برندهای عرقیات از نظر وجود متانول بود ( $p<0/05$ ). در یک نمونه از برند K، غلظت متانول ۰/۰۹٪ به دست آمد. جدول شماره ۱ یک نتیجه بررسی همه برندهای ماء‌الشعیر و عرقیات گیاهی را نشان می‌دهد. نتایج

جدول شماره ۱. آمار توصیفی میزان اتانول و متانول در نوشیدنی‌های بررسی‌شده (ماء‌الشعیر و عرقیات گیاهی) به تفکیک نوع نوشیدنی و برند، در ۱۰ نمونه از هر برند

نوشیدنی	برند	متغیر	کمترین غلظت (درصد)	بیشترین غلظت (درصد)	میانگین غلظت (درصد)	انحراف معیار (درصد)	RSD	واریانس (درصد)
ماء‌الشعیر	A	اتانول	۰/۰۰۰	۰/۱۳	۰/۰۱	۰/۰۴	۴	۰/۰۰
		متانول	۰/۰۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰	۰/۰۰
	B	اتانول	۰/۰۰۰	۲/۲۰	۰/۵۹	۰/۷۸	۱/۳۲	۰/۰۰
		متانول	۰/۰۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰	۰/۰۰
	C	اتانول	۰/۰۰۰	۰/۸۰	۰/۲۲	۰/۳۰	۱/۳۶	۰/۰۰
		متانول	۰/۰۰۰	۰/۰۱	۰/۰۰	۰/۰۰	۰	۰/۰۰
	D	اتانول	۰/۰۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰	۰/۰۰
		متانول	۰/۰۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰	۰/۰۰
	E	اتانول	۰/۰۰۰	۲/۲۰	۰/۰۲	۰/۰۷	۳/۵	۰/۰۰
		متانول	۰/۰۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰	۰/۰۰
F	اتانول	۰/۰۰۰	۰/۰۸	۰/۰۳	۰/۰۳	۱	۰/۰۰	
	متانول	۰/۰۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰	۰/۰۰	
G	اتانول	۰/۰۰۰	۰/۰۴	۰/۰۲	۰/۰۲	۱	۰/۰۰	
	متانول	۰/۰۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰	۰/۰۰	
عرقیات گیاهی	H	اتانول	۰/۰۰۰	۰/۰۹	۰/۰۲	۰/۰۲	۱	۰/۰۰
		متانول	۰/۰۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰/۰۰	۰	۰/۰۰
	I	اتانول	۰/۰۰۰	۰/۰۷	۰/۰۲	۰/۰۳	۱/۵	۰/۰۰
		متانول	۰/۰۰۰	۰/۰۳	۰/۰۰	۰/۰۰	۰	۰/۰۰
	K	اتانول	۰/۰۰۰	۰/۰۶	۰/۰۴	۰/۰۲	۰/۵	۰/۰۰
متانول	۰/۰۰۰	۰/۰۹	۰/۰۳	۰/۰۲	۰/۶۶	۰/۰۰		



شکل ۲. میانگین غلظت اتانول و متانول در ۵ برند عرقیات گیاهی (از هر برند ۱۰ نمونه) آنالیز شده به روش Headspace Gas Chromatography



## بحث

می‌کنند و در اختیار عموم قرار می‌دهند. روش‌های گوناگونی برای تولید ماء‌الشعیر غیرالکلی وجود دارد؛ معمول‌ترین روش تولید صنعتی ماء‌الشعیر، الکلی‌زدایی (Dealcoholization) محصول پس از مرحله تخمیر است. روش دیگر در کاهش میزان الکلی، استفاده از روش تخمیر محدودشده الکلی (Restricted Alcoholic Fermentation) است. در این روش از نوعی مخمر که میزان اندکی الکلی تولید می‌کند، استفاده می‌شود. گونه مخمر استفاده‌شده و قند (گلوکز، فروکتوز، مالتوز و سوکروز) موجود در محیط، در تعیین میزان الکلی تولیدشده تأثیرگذار است. از دیگر روش‌های حذف الکلی در فراورده‌های تخمیری می‌توان به استفاده از حرارت، دیالیز و یا اسمز معکوس اشاره کرد (۸). در پژوهشی، سویه‌های خاص از مخمر ساکارومایسس و قندهای گوناگون در تولید الکلی در ماء‌الشعیر بررسی شده است. نتایج حاصل از تحقیق نشان داد سویه *Saccharomyces Rouxii* بهترین نوع مخمر برای تولید ماء‌الشعیر غیرالکلی است. این سویه قادر به تخمیر مالتوز (مهم‌ترین قند موجود در جو) نیست و حداکثر میزان الکلی در محصول نهایی ۰/۲٪ حجمی/حجمی خواهد بود (۸).

عرقیات گیاهی (Herbal Distillates) یکی از مهم‌ترین فراورده‌های گیاهی مورد استفاده در کشور ایران به شمار می‌آیند. طبق تخمین سازمان بهداشت جهانی، ۸۰٪ بیماران در کشورهای درحال توسعه از فراورده‌های گیاهی به‌عنوان خط اول درمان استفاده می‌کنند (۷). مؤسسه ملی استاندارد ایران هرگونه عصاره حاصل از گیاه تازه و یا خشک را که حاوی مواد مؤثره و ترکیبات آروماتیک است، به‌عنوان عرقیات گیاهی تقسیم‌بندی می‌کند (۹). افزون بر مصارف دارویی، بسیاری از عرقیات گیاهی در صنایع غذایی نیز به کار می‌روند. در سال‌های اخیر، نتایج مطالعات متعددی بیانگر وجود متانول در عرقیات گیاهی بوده است. در طی مراحل تولید عرقیات گیاهی، متانول به‌عنوان یکی از مواد فرار در عرقیات تولید می‌شود (۷). در تولید عصاره‌های گیاهی و عرقیات سنتی نیز گاه متانول، اتانول و استون به‌عنوان حلال استخراج‌کننده مواد مؤثره گیاهی استفاده می‌شوند؛ بنابراین توجه به باقی‌مانده حلال‌هایی مانند متانول در محصول نهایی فراورده‌های گیاهی از اهمیت به‌سزایی برخوردار است (۱۰). از آنجایی که بسیاری از حلال‌های آلی سمی هستند، حداکثر میزان باقی‌مانده (Maximum Residue Limits) حلال‌ها در محصولات و عرقیات گیاهی در بسیاری از کشورها لحاظ می‌شود. در حال حاضر در بسیاری از کشورها، استاندارد مدونی برای مراحل تولید عرقیات گیاهی وجود ندارد. این در حالی است که در برخی از کشورهای آمریکایی و اروپایی همه مراحل کشت، برداشت محصول گیاهی، خشک‌کردن گیاه و حلال‌های مورد استفاده برای استخراج مواد مؤثره به شکل عرقیات گیاهی، دارای استاندارد مشخص هستند (۱۱).

حداکثر غلظت قابل تحمل (MTC)<sup>۱</sup> از متانول در یک نوشیدنی در کشورهای مختلف و نوع آشامیدنی (الکلی یا

وجود مواد فرار و الکلی‌ها در آشامیدنی‌های تخمیری و تقطیری که به‌عنوان نوشیدنی‌های الکلی و غیرالکلی و یا عرقیات گیاهی استفاده می‌شوند، همواره مورد توجه بوده است. در پرونده‌های ارجاعی از سوی مقامات قضایی، پرسش‌های گوناگونی مبنی بر میزان الکلی موجود در نوشیدنی‌ها مطرح است. نتایج حاصل از این تحقیق تا حدی پاسخگوی این پرسش‌ها است. طبق گزارش WHO در سال ۲۰۱۴م، آلودگی نوشیدنی‌های الکلی به متانول در کشورهای آفریقایی، آسیایی و جنوب آمریکا گزارش شده است (۵). وجود متانول در مشروبات الکلی دست‌ساز، تهدیدی بر سلامتی و حیات جوامع بشری به‌شمار می‌آید؛ برای نمونه در سال ۲۰۱۶م در کشور هندوستان ۲۷ نفر در اثر مسمومیت با متانول موجود در نوشیدنی‌های الکلی فوت کرده‌اند. سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۱۴م هشدارنامه‌ای مبنی بر طغیان (Outbreak) مسمومیت با متانول در کشورهای ترکیه، پاکستان، نروژ، اندونزی و هندوستان صادر کرده است. در این هشدارنامه تعداد موارد مسمومیت مرتبط با متانول موجود در مشروبات الکلی تخمیری بین ۸۰۰-۲۰ نفر گزارش شده است که حدود ۳۰٪ از این افراد در اثر شدت مسمومیت فوت کرده‌اند (۵).

وجود متانول در نوشیدنی‌های تخمیری به دلایل مختلف است؛ گاهی به علت افزودن عمدی متانول به نمونه، به‌عنوان جایگزینی ارزان برای اتانول است (۶). پکتین‌ها ساختمانی پلی‌ساکاریدی دارند و در دیواره سلولی میوه‌ها و سبزیجات یافت می‌شوند. در اثر عملکرد مخمرها، باکتری‌ها و قارچ‌ها بر روی میوه‌هایی با درصد پکتین بالا، متانول به میزان قابل‌توجهی تولید می‌شود. آنزیم‌های هیدرولاز موجود در برخی از مخمرها از خانواده ساکارومایسس پکتین را هیدرولیز کرده و محصول این هیدرولیز متانول می‌باشد (۲)؛ بنابراین آنزیم‌های تجزیه‌کننده پکتین (Pectolytic Enzymes) می‌توانند موجب تولید متانول در نوشیدنی‌های تخمیری شوند (۲). در طی مراحل تولید و نگهداری مواد اولیه گیاهی برای تولید عرقیات و ماء‌الشعیرهای میوه‌ای، فرآیند تخمیر سلولز موجود در ساقه و یا هسته گیاهان، همچنین فعالیت‌های آنزیم‌هایی مانند پکتین متیل استراز در ۵-۶ pH و اثر آن بر بافتهای گیاهی، به تولید متانول می‌انجامد (۷).

نوشیدنی‌های تخمیری حاصل از تخمیر قند موجود در جو و دیگر غلات، بر اساس محتوای الکلی، به چند دسته بخش می‌شوند. در نوع الکلی این نوشیدنی‌ها، محتوای الکلی بیش از ۱/۲٪ حجمی/حجمی است؛ درحالی‌که در انواع غیرالکلی، میزان الکلی اتیلیک از ۰/۵٪ حجمی/حجمی بالاتر نیست (۸). با توجه به شرایط مذهبی و اعتقادی، تولید و عرضه نوشیدنی‌های تخمیری غیرالکلی مانند ماء‌الشعیر، در بسیاری از کشورهای اسلامی جایگزین نوشابه‌های الکلی شده است (۸). در ایران تولید مشروبات الکلی به شکل کارخانه‌ای وجود ندارد و هیچ‌یک از مراحل تولید این فراورده‌ها تحت کنترل سیستم‌های نظارتی نیست. با توجه به شرایط مذهبی کشور، بسیاری از کارخانه‌ها اقدام به تولید ماء‌الشعیر غیرالکلی

1. Maximum Tolerable Concentration

در نوشیدنی‌های غیرالکلی (۵٪ حجمی/حجمی) پایین‌تر است. در این مطالعه، متوسط بیش‌ترین میزان اتانول، در یک برند ماء‌الشعیر و به میزان ۴۶۴۳ mg/L (۵۹٪ حجمی/حجمی) به دست آمد که تقریباً معادل میزان مجاز الکل اتیلیک در نوشیدنی‌های غیرالکلی در ایران (۵٪ حجمی/حجمی) است.

عوامل متعددی بر تولید متانول در نوشیدنی‌های تخمیری مؤثرند؛ مهم‌ترین این عوامل pH محیط، دما و آلودگی میکروبی و قارچی هستند (۱۷). پکتین موجود در میوه‌ها در ۵-۶ pH و تحت تأثیر آنزیم پکتین استراز، به متانول تبدیل می‌شود. از طرفی در مطالعات گذشته بر روی pH انواع نوشیدنی‌های گازدار، pH انواع نوشیدنی‌های غیرالکلی در محدوده ۳-۵ pH گزارش شده است (۱۸)؛ بنابراین در pH اسیدی احتمال تولید متانول از پکتین کاهش می‌یابد و یکی از دلایل وجود نداشتن متانول در نمونه‌های ماء‌الشعیر می‌تواند عدم وجود pH بهینه برای فعالیت آنزیم پکتین استراز باشد. از دیگر عوامل مؤثر بر عدم تولید متانول می‌توان به حرارت بالا اشاره کرد؛ یکی از دلایل عدم تولید متانول در نمونه‌های ماء‌الشعیر، استفاده از حرارت بالا در فرایند تولید ماء‌الشعیر است. نیز آلودگی قارچی در محیط تولید ماء‌الشعیر می‌تواند موجب شکست ساختمان پکتین و تولید متانول شود؛ بنابراین تولید ماء‌الشعیر در شرایط دور از میکروارگانیسم‌ها، عاری بودن محصول نهایی را از آلودگی به متانول تضمین می‌کند (۲).

### نتیجه‌گیری

نتایج حاصل از تحقیق حاضر بیانگر وجود اتانول و متانول در مقادیر مجاز در برخی از برندهای ماء‌الشعیر و عرقیات گیاهی در ایران است؛ بنابراین رعایت شرایط تولید، استریل کردن محصول نهایی و یا جوشاندن آن در دمای بالای ۸۰ درجه سلسیوس و بسته‌بندی و نگهداری مناسب نوشیدنی‌های غیرالکلی، از تولید اتانول و متانول در هنگام تولید و در مدت‌زمان نگهداری محصول جلوگیری می‌کند.

پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی، آنالیزهای سم‌شناسی بر روی عرقیات گیاهی فله موجود در عطاری‌ها انجام گیرد تا بتوان در خصوص اختلاف شرایط تولید عرقیات گیاهی در کارخانجات و تولید دستی و سنتی آن‌ها و تأثیر آن بر تولید اتانول و متانول در محصول نهایی اظهار نظر کرد.

### سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از پرسنل آزمایشگاه سم‌شناسی استان فارس خصوصاً آقای دکتر رضا خشنود به جهت همکاری در پیشبرد امور مربوط به مقاله قدردانی می‌کنند.

غیرالکلی) متفاوت است. نقش عواملی مانند سوء‌تغذیه، کمبود فولات و سطح سلامت فرد را در مواجهه با مقادیر اندک متانول و ایجاد مسمومیت نباید نادیده گرفت (۱۲). بر اساس پروتکل WHO، وجود متانول با غلظت ۶-۲۷ mg/L در آبجو و ۱۰-۲۲۰ mg/L در اسپریت (نوعی مشروب الکلی با محتوای بیش از ۴۰٪ حجمی/حجمی الکل اتیلیک) مجاز است. قوانین کشورهای اروپایی در خصوص میزان مجاز متانول در نوشیدنی‌ها متفاوت است؛ زیرا برخی از نوشیدنی‌ها الکلی و برخی غیرالکلی هستند و منبع گیاهی تولید آن‌ها متفاوت است. اتحادیه اروپا میزان مجاز متانول را در نوشیدنی‌ها ۱/۵-۲/۰٪ حجمی/حجمی اعلام می‌کند (۵).

در مطالعه Mousavi و همکاران در سال ۲۰۱۱ م بر روی عرقیات گیاهی در شهر مشهد، غلظت متانول در برخی از عرقیات گیاهی آزمایش شد و بیش‌ترین غلظت متانول در یکی از عرقیات گیاهی و به میزان متوسط ۱۲۰۸ mg/L (۱۶٪ حجمی/حجمی) گزارش شد (۱).

در مطالعه Shirani و همکاران نیز بر روی ۸۴ نمونه عرقیات گیاهی مختلف در ایران بررسی صورت گرفت. نتایج حاصل از تحقیق آن‌ها نشان داد غلظت متانول در نمونه‌ها بین ۲۷۷-۴۳ mg/L (۰/۰۳۶-۰/۰۰۶٪ حجمی/حجمی) است. در مطالعه آن‌ها ۵۵ نمونه حاوی متانول با مقادیر بالاتر از غلظت مجاز متانول در نمونه‌های خوراکی در ایران (۱۰۰ mg/L) معادل ۰/۰۱۳٪ حجمی/حجمی بودند (۱۳). این در حالی است که در بسیاری از منابع، از جمله دستورالعمل صادره از اتحادیه اروپا برای بررسی باقی‌مانده حلال‌ها در مواد غذایی، غلظت مجاز متانول در مواد غذایی ۳۰۰۰ ppm یا به عبارتی ۳۰۰۰ mg/L (معادل ۰/۳۸۹٪ حجمی/حجمی) ذکر شده است. همچنین پروتکل استرالیا در مورد مکمل‌های غذایی و قوانین کشور کانادا در مورد محصولات طبیعی ۳۰۰۰ mg/L را حد مجاز میزان متانول در مواد غذایی اعلام کرده‌اند (۱۴).

در مطالعه Delirrad و همکاران، پنج گونه عرقیات گیاهی از نظر وجود متانول ارزیابی شدند. نتایج حاصل از تحقیق آن‌ها نشان داد که کم‌ترین میزان متانول در گلاب و با غلظت حدود ۷۲ ppm (معادل ۰/۰۰۹٪ حجمی/حجمی) دیده شد. هم‌چنین عرق بیدمشک با میزان ۲۷۸ ppm (معادل ۰/۰۳۶٪ حجمی/حجمی) دارای بیش‌ترین غلظت متانول در میان عرقیات ارزیابی شده بود (۱۵). نتایج حاصل از تحقیق حاضر نشان‌دهنده وجود متانول تنها در یک برند گلاب و به میزان ۲۳۱ mg/L (معادل ۰/۰۰۳٪ حجمی/حجمی) بود که از غلظت مجاز (۰/۳۸۹٪ حجمی/حجمی) پایین‌تر است. در مطالعه Gazani و همکاران بر روی محتوای اتانول در عرقیات گیاهی نشان داده شد که بیش‌ترین میزان اتانول، در گلاب به میزان ۹۶ mg/L دیده شد (۱۶). در پژوهش پیش رو، متوسط میزان اتانول تنها در یک برند عرقیات گیاهی (گلاب) به میزان ۰/۰۴٪ حجمی/حجمی به دست آمد که از میزان مجاز اتانول

## References

1. Mousavi SR, Namaei-Ghassemi M, Layegh M, Afzal Aghae M, Vafae M, Zare Gh, et al. Determination of Methanol Concentrations in Traditional Herbal Waters of Different Brands in Iran. *Iran J Basic Med Sci.* 2011; 14(4): 361–8.
2. Ohimain EI. Methanol contamination in traditionally fermented alcoholic beverages: the microbial dimension. *Springer Plus.* 2016; 5(1): 1607. <https://doi.org/10.1186/s40064-016-3303-1>
3. Baschali A, Tsakalidou E, Kyriacou A, Karavasioglou N, Matalas AL. Traditional low-alcoholic and non-alcoholic fermented beverages consumed in European countries: a neglected food group. *Nutr Res Rev.* 2017;30(1):1-24. <https://doi.org/10.1017/S0954422416000202>
4. Kuffel N, Ruppel T. Gas Chromatography, APPLICATION NOTE. PerkinElmer, Inc. Shelton, CT. A Method for the Quantification of Ethanol Content in Consumable Fruit Juices by Headspace Injection. Available from: <http://w.perkinelmer.cl/assets/quantification-of-ethanol-content-in-consumable-fruit.pdf>.
5. World Health Organization, World Health Organization. Management of Substance Abuse Unit. Global status report on alcohol and health, 2014. World Health Organization; 2014.
6. Arslan MM, Zeren C, Aydin Z, Akcan R, Dokuyucu R, Ketten A, et al. Analysis of methanol and its derivatives in illegally produced alcoholic beverages. *J Forensic Leg Med.* 2015;33:56-60. <https://doi.org/10.1016/j.jflm.2015.04.005>
7. Ahmadabadi AN, Sedaghat M, Ranjbar A, Poorolajal J, Nasiripour H, Ahmadabadi MN. Quantitative analysis and health risk assessment of methanol in medicinal herbal drinks marketed in Hamadan, Iran. *J App Pharm Sci.* 2016; 6 (07): 049-052. <https://doi.org/10.7324/JAPS.2016.60707>
8. Hosseini E, Kadivar M, Shahedi M. Physico-chemical properties and storability of Non-alcoholic malt drinks prepared from oat and barley malts. *J Agr Sci Tech.* 2011; 14(1): 173-82.
9. Delfan B, Bahmani M, Rafieian-Kopaei M, Delfan M, Saki K. A review study on ethnobotanical study of medicinal plants used in relief of toothache in Lorestan Province, Iran. *Asian Pac J Trop Dis.* 2014; 4: 879-84. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60751-9](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60751-9)
10. Wang ML, Wang JT, Choong YM. A rapid and accurate method for determination of methanol in alcoholic beverage by direct injection capillary gas chromatography. *J Food Comp Anal.* 2004; 17(2): 187-96. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2003.08.006>
11. Folashade O, Omoregie H, Ochogu P. Standardization of herbal medicines-A review. *Int J Biodivers Conserv.* 2012; 4(3): 101-12.
12. Paine AJ, Dayan AD. Defining a tolerable concentration of methanol in alcoholic drinks. *Hum Exp toxicol.* 2001; 20(11): 563-8. <https://doi.org/10.1191/096032701718620864>
13. Shirani K, Hassani FV, Azar-Khiavi KR, Moghaddam ZS, Karimi G. Determination of methanol in Iranian herbal distillates. *J Complement Integr Med.* 2016; 13(2): 123-7. <https://doi.org/10.1515/jcim-2015-0041>
14. European Medicines Agency, ICH guideline Q3C (R6) on impurities: guideline for residual solvents. Committee for Human Medicinal Products. December 2016. Available from: [https://www.ich.org/fileadmin/Public\\_Web\\_Site/ICH\\_Products/Guidelines/Quality/Q3C/Q3C\\_R6\\_Step\\_4.pdf](https://www.ich.org/fileadmin/Public_Web_Site/ICH_Products/Guidelines/Quality/Q3C/Q3C_R6_Step_4.pdf).
15. Delirrad M, Ghasempour Z, Hassanzadazar H, Roshani Y, Mohammadi D, Forouzan S, et al. Determination of methanol content in herbal distillates produced in Urmia using spectrophotometry. *Iran J Toxicol.* 2012; 6(16): 594-9.
16. Gazani MN, Shariati S, Rafizadeh A, Safarzadeh Vishekaei MN. Study of Ethanol Presence in Some Ornamental and Aromatic Plants Using Gas Chromatography. *J Ornament Plants.* 2015; 5(4):249-53.
17. Distilled Alcoholic Beverages. Available from: <https://www.foodelphi.com/distilled-alcoholic-beverages-distilled-spirits>.
18. Godwill EA, Jane IC, Scholastica IU, Marcellus U, Eugene AL, Gloria OA. Determination of some soft drink constituents and contamination by some heavy metals in Nigeria. *Toxicol Rep.* 2015; 2: 384-90. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2015.01.014>