

اندازه‌گیری کمی رنگ‌های مصنوعی مجاز خوراکی در مواد غذایی: افزایش سلامت و ایمنی غذا

کامبیز حسن‌زاده^۱، اعظم کرانی^{۲*}

۱- دکتری تخصصی، دانشیار فارماکولوژی، مرکز تحقیقات علوم سلولی و مولکولی، پژوهشکده توسعه سلامت، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران

۲- دکتری تخصصی شیمی تجزیه، آزمایشگاه کنترل غذا و دارو، معاونت غذا و دارو، دانشگاه علوم پزشکی کردستان، سنندج، ایران

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

چکیده

رنگ‌ها از جمله افزودنی‌های غذایی هستند که به طور مستقیم بر سلامت و ایمنی غذا تاثیر گذار می‌باشند. با توجه به افزایش روز افزون استفاده از رنگ‌های مصنوعی در صنایع غذایی، از طرفی زیانبار بودن مصرف بیش از حد این ترکیبات، به منظور افزایش سلامت و ایمنی غذایی در سطح جامعه، در این تحقیق سعی شده است که با استفاده از ساده‌ترین تجهیزات آزمایشگاهی، روشی معتبر جهت اندازه‌گیری کمی رنگ‌های مصنوعی در مواد غذایی ارائه شود. نمونه فرآورده یخی به علت بافت ساده‌ای که دارد، به عنوان نمونه حقیقی انتخاب شد. در این مطالعه سعی شد که کلیه رنگ‌های مصنوعی مجاز برای استفاده در مواد غذایی شامل رنگ‌های زرد، رنگ‌های قرمز، رنگ‌های آبی و مخلوط کلیه این رنگ‌ها به طور همزمان و به صورت قرمز - زرد، قرمز - آبی و آبی - زرد، طی یک تزریق در نمونه فرآورده یخی شناسایی و به صورت کمی اندازه‌گیری شود. کلیه پارامترهای اعتباربخشی روش معرفی شده، برای هر یک از رنگ‌ها محاسبه و با استانداردهای بین‌المللی مربوطه مورد مقایسه قرار گرفت. نتایج حاصل از پارامترهای اعتباربخشی، دارای تطابق بسیار خوبی با مقادیر استاندارد بین‌المللی هستند که تایید کننده قابلیت روش به عنوان یک روش معتبر آزمایشگاهی نه تنها برای تشخیص کیفی بلکه اندازه‌گیری کمی رنگ‌های مصنوعی مجاز در مواد غذایی است.

کلید واژگان: ایمنی و سلامت غذایی، اندازه‌گیری کمی، رنگ‌های مصنوعی مجاز خوراکی، فرآورده‌های یخی

*مسئول مکاتبات: azam.korani@gmail.com

۱- مقدمه

از نظر عامه رنگ و طعم غذا از ابزارهای تعیین کیفیت و مرغوبیت فرآورده غذایی می‌باشد، به لحاظ علمی نیز در بسیاری از موارد تغییرات این دو عامل می‌تواند بر خواص غذایی و درمانی فرآورده تاثیرگذار باشد. رنگ‌ها ترکیباتی هستند که در صنایع غذایی با هدف خوش‌منظرسازی فرآورده‌های تولیدی، زمینه لازم را برای عرضه رقابتی فرآورده‌های خوراکی در بازار فراهم می‌کنند [۱]. بنابراین رنگ‌ها را می‌توان به عنوان دسته مهمی از ترکیبات افزودنی به مواد غذایی معرفی کرد. به طور کلی این ترکیبات (رنگ‌ها) با توجه به منبع تهیه به دو دسته طبیعی و مصنوعی تقسیم می‌شوند. رنگ‌های مصنوعی مشابه طبیعی نداشته و در حقیقت ترکیباتی هستند که با استفاده از روش‌های شیمیایی سنتز می‌شوند و دارای دامنه کاربرد نامحدود بوده و در صنایع رنگرزی، داروسازی، میکروپشناسی، صنایع غذایی و... کاربرد دارند. عدم پایداری و حساسیت بالای رنگ‌های طبیعی به نور، دما، pH و... باعث ایجاد تغییرات فراوانی در این دسته از رنگ‌ها ضمن تهیه و نگهداری مواد غذایی می‌شود، بنابراین رنگ‌های مصنوعی در صنایع غذایی مورد توجه بیشتری قرار گرفته‌اند [۲]. این در حالی است که اثرات زیان‌آور این ترکیبات برای سلامتی انسان توسط محققان اثبات شده است [۳]. بسیاری از رنگ‌های مصنوعی به‌ویژه آنهایی که در ساختار خود دارای گروه‌های عاملی آزو^۱ و حلقه‌های آروماتیک^۲ هستند در صورت مصرف مداوم و یا جذب از طریق پوست می‌توانند منجر به آسیب‌دیدگی‌های کروموزومی [۴]، ایجاد حساسیت [۵]، آسم [۶]، تومورهای تیروئیدی [۷]، بیماری‌های تنفسی [۸] و در بسیاری از موارد سرطان [۹] شوند. تحقیقات انجام شده نشان داده است که مصرف روزانه مواد غذایی محتوی افزودنی‌های خوراکی از جمله رنگ‌های مصنوعی باعث پنج نمره کاهش ضریب هوشی کودکان شده است [۸]. بنابراین جهت اطمینان از سلامت مواد غذایی، بررسی نوع رنگ مورد استفاده در مواد غذایی و اندازه‌گیری مقدار کمی رنگ سنتزی اضافه شده از اهمیت فراوانی برخوردار است.

ضمن تحقیقات انجام شده بر شیرینی‌های خشک مناطق جنوب شهر تهران مشخص شده است که ۵۰/۳ درصد از کل نمونه‌ها، حاوی رنگ مصنوعی مجاز خوراکی و ۲۲ درصد از کل نمونه‌ها حاوی رنگ مصنوعی غیرمجاز خوراکی بودند [۹]. این نتایج با استفاده از تکنیک کروماتوگرافی لایه نازک^۳ و استخراج رنگ اضافه شده با استفاده از پشم طبیعی حاصل شده‌اند. همین‌طور تحقیقات انجام شده بر فرآورده‌های قنادی شهر قم (با استفاده از همین تکنیک‌ها) بیانگر آلوده بودن ۲۶/۷ درصد از این نمونه‌ها به رنگ سنتزی غیر مجاز خوراکی و ۲۱/۳ درصد رنگ سنتزی مجاز خوراکی می‌باشد [۱۰]. طی تحقیقات انجام شده دیگری بر آب آلبالو و آب‌زرشک عرضه شده در سطح شهر تهران مشخص شده است که بیش از ۸۹ درصد از نمونه‌ها حاوی رنگ مصنوعی بوده که از این تعداد ۱۸/۵ درصد محتوای رنگ مصنوعی غیرمجاز خوراکی بوده‌اند [۱۱]. در این کار تحقیقاتی نیز رنگ‌های افزوده شده با استفاده از پشم طبیعی استخراج و با تکنیک کروماتوگرافی لایه نازک تشخیص داده شده‌اند. متأسفانه با استفاده از این تکنیک‌ها امکان استخراج کامل رنگ‌های اضافه شده و اندازه‌گیری کمی آنها وجود ندارد.

در مراجع علمی، روش‌های تجزیه‌ای متفاوتی از جمله روش‌های الکتروشیمیایی^۴، الکتروفورز^۵، اسپکتروفتومتری^۶، لومینسانس شیمیایی^۷ و روش‌های کروماتوگرافی به منظور اندازه‌گیری‌های کمی و کیفی رنگ‌های سنتزی مورد استفاده قرار گرفته‌اند [۱۲-۱۶]. در سال ۲۰۰۸ Lin و Li [۱۲] از الکتروکروماتوگرافی اصلاح شده با کلسیم مونتموریلونیت^۸ برای اندازه‌گیری رنگ سودان I^۹ استفاده کردند. اسپکترومتری فاز جامد^{۱۰} تکنیک دیگری است که برای تشخیص و اندازه‌گیری رنگ‌های تارترازین^{۱۱}، پانسیوآر^{۱۲} و سانست‌یلو^{۱۳} در مواد غذایی مورد استفاده قرار گرفت [۱۳]. تکنیک کاپیلاری الکتروفورز هم به

3. Thin layer chromatography (TLC)

4. Electrochemical methods

5. Electrophoresis

6. Spectrophotometer

7. Chemical luminescence

8. Montmorillonite calcium

9. Sudan dye I

10. Solid phase spectrophotometry

11. Tartrazine

12. ponceau R

13. Sunset yellow

1. Azo functional group

2. Aromatic rings

این‌دیگوکارمین^۹ به عنوان رنگ‌های مصنوعی مجاز آبی و سانست-یلو و کینولاین‌یلو^{۱۰} به عنوان رنگ‌های مصنوعی مجاز زرد معرفی شده‌اند. با توجه به مجاز بودن استفاده از تعدادی از رنگ‌های مصنوعی در بسیاری از مواد غذایی، مصرف روزانه این فرآورده‌های غذایی توسط طیف وسیعی از افراد جامعه در محدوده‌های سنی متفاوت و مضرات فراوان این دسته از افزودنی-ها در صورت استفاده بیش از حد، علاوه‌بر تشخیص نوع ماده رنگی اضافه شده، کنترل مقدار آن نیز ضرورت دارد.

از آنجایی‌که روشی جامع و استاندارد به منظور اندازه‌گیری کمی رنگ‌های مصنوعی مجاز افزوده شده به مواد غذایی در کشور معرفی نشده است و همین‌طور ضرورت کنترل نوع و مقدار این ترکیبات در مواد غذایی توسط سازمان‌های مربوطه، در این پژوهش، سعی بر این است که با استفاده از ساده‌ترین امکانات و تجهیزات آزمایشگاهی، روشی معتبر جهت جداسازی، شناسایی و اندازه‌گیری کمی کلیه رنگ‌های مصنوعی مجاز خوراکی، ضمن یک تریق ارائه و در اختیار آزمایشگاه‌های مربوطه قرار داده شود. در روش ارائه شده، تکنیک کروماتوگرافی مایعی کوپل شده با آشکارساز UV استفاده شده است که از جمله تکنیک‌های کروماتوگرافی است که به‌طور معمول و به سادگی در بسیاری از آزمایشگاه‌های کنترل مواد غذایی، مورد استفاده قرار می‌گیرد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- ترکیبات و تجهیزات

کلیه نمونه‌های فرآورده یخی مورد نیاز از سوپرمارکت‌های سطح شهر سنجیدگی تهیه شد. استاندارد کلیه رنگ‌های مجاز خوراکی شامل کارمیزین، پانسیوآر، آلوراد، برلیانت‌بلو، ایندیگوکارمین، سانست‌یلو و کینولاین‌یلو با درجه تجزیه‌ای^{۱۱} از کمپانی^{۱۲} سیگما، حلال‌های متانول و استونیتریل با درجه کروماتوگرافی مایعی، پودر سدیم استات، اسید استیک و آمونیاک از کمپانی مرک^{۱۳} و

دلیل داشتن ویژگی‌هایی مانند جداسازی مناسب، زمان آنالیز کوتاه و مقدار بسیار کم نمونه مورد نیاز برای تشخیص و اندازه‌گیری رنگ‌ها در مواد غذایی استفاده شده است [۱۴]. حساسیت بالای تکنیک کروماتوگرافی مایعی با کارایی بالا کوپل شده با آشکارساز لومینسانس^۱ باعث شده است که در بسیاری از کارهای تحقیقاتی از این تکنیک برای اندازه‌گیری کمی و کیفی رنگ‌های قرمز در مواد غذایی استفاده شود [۱۵].

در بین تکنیک‌های مورد استفاده، کروماتوگرافی-مایعی کوپل شده با آشکارساز اسپکترومتری جرمی^۲، آشکارساز UV و آشکارساز آرایه دیودی^۳ از جمله مهمترین تکنیک‌های مورد استفاده برای جداسازی و تعیین مقدار رنگ‌های مصنوعی مورد استفاده در مواد غذایی هستند [۱۷-۱۹]. از بین این تکنیک‌ها، تکنیک کروماتوگرافی-مایعی کوپل شده با آشکارساز UV و آشکارساز آرایه دیودی، تجهیزات ساده‌تری داشته و اکثر آزمایشگاه‌های کنترل مواد غذایی سطح کشور مجهز به این دستگاه‌ها می‌باشند. اما با توجه به بافت پیچیده مواد غذایی یکی از مهمترین مراحل اندازه‌گیری‌های کیفی و کمی رنگ‌ها در مواد غذایی، آماده‌سازی نمونه و به عبارتی بهتر استخراج رنگ‌های اضافه شده به ماده غذایی می‌باشد. استفاده از اختلاف حلالیت رنگ‌های سنتزی در حلال‌های با pH های متفاوت و جذب و واجذب^۴ رنگ‌ها توسط فاز جامد (استخراج با فاز جامد) یکی از روش‌های مرسوم برای استخراج رنگ‌های مورد استفاده در مواد غذایی است. مسلماً انتخاب فاز جامد در میزان استخراج انتخابی گونه‌های مورد نظر اهمیت فراوانی دارد [۲۰].

در کشورهای مختلف نوع و مقدار رنگ مصرفی با توجه به ملاحظات فرهنگی و بهداشتی فرق دارد. در بسیاری از کشورها مقررات محدودکننده‌ای برای مصرف رنگ در غذاها وضع شده است. در کشور ما ترکیبات کارمیزین^۱، پانسیوآر و آلوراد^۲ به عنوان رنگ‌های مصنوعی مجاز قرمز، برلیانت‌بلو^۳ و

1. HPLC – Luminescence detector
2. LC-Mass
3. Diode array detector
4. Adsorption and desorption
5. Solid phase extraction
6. Carmoisine
7. Allura red
8. Brilliant blue

9. Indigo carmine
10. Quinoline yellow
11. Analytical grad
12. Sigma Company
13. Merck Company

Table 3 variation program of the UV detector wavelength in the presence of the red and yellow colors in sample

	Time (min)	Wavelength (nm)
1	0	435
2	9	435
3	9.2	490
4	9.55	490
5	9.65	435
6	11.6	435
7	11.9	490
8	24	490

شرایط بهینه برای ترکیب درصد فاز متحرک ضمن اندازه‌گیری در جدول ۴ نشان داده شده است. فاز متحرک A شامل بافر^۴ ۰/۰۵ M استات با pH=۷، فاز متحرک B حلال متانول و فاز متحرک C حلال استونیتریل است.

Table 4 program of the mobile phase variation with time in a run

Time (min)	A	B	C
0	97	1	2
1	97	1	2
22	40	30	30
23	90	10	0
24	90	10	0

۳-۲- تهیه محلول‌های استاندارد

محلول اولیه هرکدام از استانداردها با غلظت ۱۰۰۰ ppm با استفاده از آب دیونیزه^۵ به عنوان حلال تهیه شد. به منظور در نظر گرفتن اثر بافت نمونه محلول‌های استاندارد مورد نیاز با استفاده از تکنیک یکسان‌سازی بافت^۶ تهیه شدند، به این صورت که محلول رقیق شده نمونه، به عنوان حلال برای تهیه استانداردهای مورد نیاز با غلظت‌های ۲۰۰، ۱۵۰، ۱۰۰، ۶۰، ۳۰، ۱۰ مورد استفاده قرار گرفت. به منظور صرفه‌جویی در زمان، محلول محتوی مخلوط هر دسته از رنگ‌های سنتزی (زرد، قرمز و آبی) با غلظت‌های متفاوت تهیه شد. سپس ۶۰ میکرولیتر از محلول‌های تهیه شده فوق پس از عبور از فیلتر سرسرنگی به دستگاه تزریق شد. لازم به ذکر است که در اینجا همان محلول رقیق شده نمونه که به عنوان حلال در تهیه محلول‌های استاندارد

فیلتر سرسرنگی^۱ ۰/۲۵ μm از کمپانی میلی‌پور^۲ خریداری و مورد استفاده قرار گرفت.

جداسازی و اندازه‌گیری با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مجهز به آشکارساز UV با قابلیت اندازه‌گیری در طول‌موج‌های مختلف محدود به ۲۹۰ تا ۸۰۰ نانومتر و ستون کروماتوگرافی فاز معکوس^۳ با مشخصات C₁₈ (۲۵۰ × ۴/۶ mm) انجام شد.

۲-۲- شرایط دستگاهی

پس از بهینه نمودن شرایط، کلیه اندازه‌گیری‌ها در دمای ثابت ۲۲ درجه سانتی‌گراد و شدت جریان ثابت (۱/۲ ml/min) انجام شد. طول موج داده شده به دستگاه با توجه به نوع ترکیبات رنگی مورد اندازه‌گیری تغییر کرد. به این صورت که اندازه‌گیری رنگ‌های زرد توسط آشکارساز UV در طول موج ۴۳۵ نانومتر، رنگ‌های قرمز طول موج ۴۹۰ نانومتر و رنگ‌های آبی طول موج ۷۱۱ نانومتر انجام شد. اندازه‌گیری مخلوط این ترکیبات رنگی مطابق جدول‌های ۱، ۲ و ۳ که تغییرات طول موج دستگاه را با توجه به زمان‌های بازداری نشان می‌دهد، انجام شد.

Table 1 variation program of the UV detector wavelength in the presence of the red and blue colors in sample

	Time (min)	Wavelength (nm)
1	0	490
2	9.8	490
3	9.9	611
4	10.6	611
5	10.8	490
6	19	490
7	19.2	611
8	24	611

Table 2 variation program of the UV detector wavelength in the presence of the yellow and blue colors in sample

	Time (min)	Wavelength (nm)
1	0	611
2	10.5	611
3	10.7	435
4	18.3	435
5	18.5	611
6	24	611

4. Mobile phase
5. Buffer
6. Deionized water
7. Matrix match technique

1. Syringe Filter
2. Millipore Company
3. Reverse Phase Column Chromatography

مورد استفاده قرار گرفت پس از عبور از فیلتر سرسرنگی به عنوان محلول شاهد به دستگاه تزریق شد.

۲-۴- آماده‌سازی نمونه

نمونه‌های مورد اندازه‌گیری به مدت نیم‌ساعت قبل از اندازه‌گیری در دمای محیط نگهداری شدند تا اینکه به طور کامل ذوب شده و از حالت انجماد خارج شدند. سپس نمونه مورد نظر به نسبت ۵ برابر با آب مقطر رقیق شد. با توجه به اینکه در این کار نمونه‌های فرآورده‌یخی به عنوان نمونه حقیقی انتخاب شده و این نمونه دارای یافت بسیار ساده‌ای بوده، انجام مراحل استخراج به منظور جداسازی ترکیبات رنگی از بافت نمونه ضرورتی نداشته و تنها انجام رقیق‌سازی به نسبت ۵ کافی بود. پس از فیلتر کردن محلول رقیق‌شده نهایی با استفاده از فیلتر سرسرنگی $0.25 \mu\text{m}$ ، ۶۰ میکرولیتر از نمونه به دستگاه تزریق شد.

۳- بحث و نتایج

۳-۱- بهینه‌سازی شرایط جداسازی رنگ‌های

مصنوعی مجاز خوراکی

با توجه به ویژگی‌های ساختاری رنگ‌های مجاز خوراکی استفاده از تکنیک کروماتوگرافی مایعی - فاز معکوس^۱ به منظور جداسازی این ترکیبات می‌تواند موثر باشد. مهمترین ویژگی که در اینجا بایستی در نظر گرفته شود، میزان آبگریزی این ترکیبات و حضور گروه‌های اسیدی یا قلیایی در ساختار آنها است. به این ساختارها در شکل ۱ توجه کنید. ترکیبات رنگی دارای گروه آزو در ساختار خود آبگریزتر از رنگ‌هایی هستند که فاقد گروه آزو هستند. از طرفی ترکیبات دارای گروه نفتالن در ساختار خود آبگریزتر از ترکیبات دارای حلقه بنزن هستند [۲۱]. ضمن استفاده از تکنیک کروماتوگرافی مایعی فاز معکوس رنگ‌های خوراکی قطبی‌تر زودتر از رنگ‌های خوراکی غیرقطبی از ستون خارج خواهند شد. نکته دیگری که بایستی در نظر گرفته شود وجود گروه‌های اسیدی و قلیایی در ساختار این ترکیبات است که می‌تواند منجر به جابه‌جایی در ترتیب خروج این ترکیبات از ستون کروماتوگرافی شود [۲۱]. انتظار می‌رود که این ترکیبات با استفاده

از مخلوط حلال‌های آلی استونیتریل و متانول به عنوان فاز متحرک در طول ستون حرکت کنند. در منابع علمی گزارش شده است که استفاده از استونیتریل در فاز متحرک حتی در حضور متانول باعث غیرمقارن شدن پیک‌های مشاهده شده خواهد شد [۲۲]. در این شرایط استفاده از یک الکترولیت معدنی به عنوان اصلاح‌کننده در فاز متحرک به منظور افزایش قدرت تفکیک^۲ و جداسازی بهتر، همین‌طور کاهش زمان اندازه‌گیری به میزان منطقی و معقول ضروری است. با بررسی منابع علمی مشاهده می‌شود که استفاده از بافر استات در ترکیب فاز متحرک، نقش موثری در جداسازی ترکیبات رنگی دارای گروه آزو با استفاده از تکنیک کروماتوگرافی مایعی فاز معکوس دارد [۲۳]. در کار دیگری مشاهده شده است که با استفاده از یک برنامه شویش گردانی با استفاده از مخلوط بافر سدیم استات (0.1 M و 0.1 M) و pH و استونیتریل به عنوان فاز متحرک، جداسازی ۱۴ رنگ سنتزی خوراکی به خوبی انجام شده است [۱۹].

Chen و همکارانش، غلظت بهینه بافر استات بر اساس تعداد بشقاب‌های تئوری^۳ و تقارن پیک، حدود 0.1 M اعلام کردند [۲۴]. در غلظت‌های بالاتر از این مقدار، زمان‌بازداری^۴ پیک‌ها افزایش پیدا می‌کند که می‌تواند ناشی از فرایند استخراج نمکی^۵ در نتیجه برهم‌کنش قوی‌تر آنالیت با فاز ساکن باشد. پایداری بافر استات، عدم برهم‌کنش استات با فاز ساکن و مناسب بودن این نمک برای اندازه‌گیری‌های جذب UV از جمله مزایای استفاده از این بافر در ترکیب فاز متحرک می‌باشد. ترکیبات رنگی مورد بررسی در $\text{pH} = 7$ به صورت خنثی و بدون بار بوده و به خوبی با استفاده از تکنیک کروماتوگرافی مایعی فاز معکوس قابل اندازه‌گیری می‌باشند. کاهش pH جز آبی فاز متحرک باعث تفکیک و جداسازی ضعیف رنگ‌های دارای گروه آزو و از بین رفتن امکان تعیین مقدار این ترکیبات می‌شود. بنابراین $\text{pH} = 7$ به عنوان حالت بهینه انتخاب شده و بررسی بیشتر تغییرات pH لازم نیست.

2. Resolution
3. Theoretical plates
4. Retention time
5. Salting-out

1. Reverse phase chromatography (RP-HPLC)

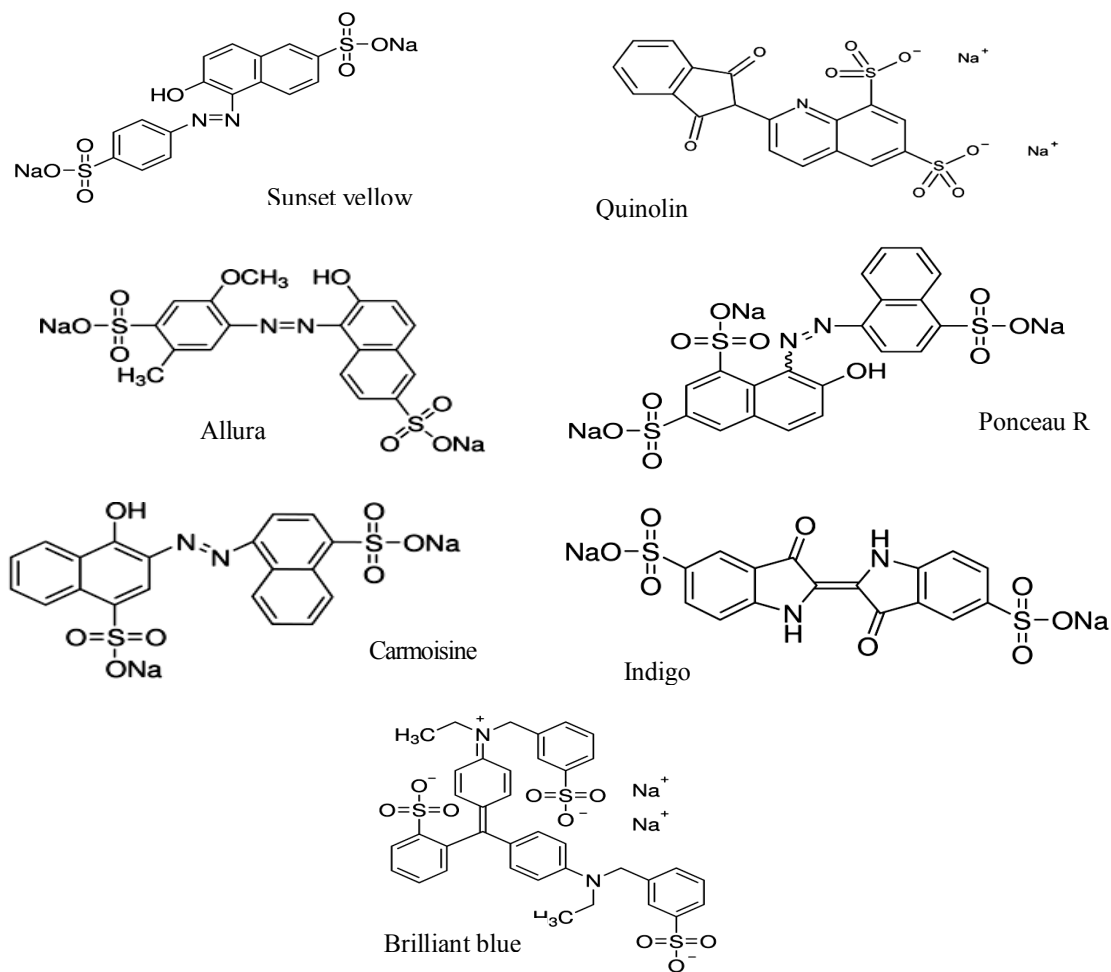


Fig 1 structure of the allowed food colors

متحرک A و B طوری تغییر می‌کند که در زمان ۲۵ دقیقه فاز متحرک ترکیبی از آن دو با درصدهای ۴۰ و ۶۰ درصد برسد و در پایان مجدداً به همان ترکیب درصد اولیه رسیده و به منظور برقراری تعادل مجدد ستون به مدت ۵ دقیقه در این ترکیب درصد ثابت می‌ماند. اما جداسازی و تفکیک مناسبی برای پیک‌ها در این شرایط مشاهده نشد. در برنامه شویشی دیگری علاوه بر استونیتریل و بافر استات از متانول هم در ترکیب درصد فاز متحرک استفاده شد، به این صورت که تا دقیقه ۱۰ آنالیز تنها از مخلوط متانول و بافر استات و از دقیقه ۱۰ تا دقیقه ۱۴ ترکیب درصد فاز متحرک طوری تغییر می‌کند که درصد فاز متحرک A (بافر استات) به صفر رسیده و از دقیقه ۱۴ تا دقیقه ۲۴ زمان آنالیز

طول موج انتخابی آشکارساز UV جهت اندازه‌گیری‌ها با توجه به طیف‌های اسپکتروسکوپی هریک از رنگ‌ها و در طول موج‌هایی که بیشترین جذب مشاهده می‌شود انجام شده است، در این شرایط بیشترین حساسیت برای اندازه‌گیری این ترکیبات حاصل خواهد شد. به منظور پیدا کردن برنامه شویشی بهینه، با استفاده از اطلاعات فوق و تحقیقات مشابه انجام شده [۱۷-۱۹] برنامه‌های شویشی مختلفی به صورت گرادینانی^۱ و ایزوکراتیک^۲ مورد بررسی قرار گرفتند. در ابتدا از استونیتریل و بافر استات با pH ۷ به مدت ۲ دقیقه به صورت ایزوکراتیک استفاده شد و سپس به مدت ۲۳ دقیقه تا رسیدن به زمان آنالیز ۲۵ دقیقه ترکیب درصد فازهای

1 Gradient program
2 Isocratic program

بودن^{۱۰} منحنی کالیبراسیون است بایستی بزرگتر از ۰/۹۹ باشد. در مورد تکرارپذیری و تجدیدپذیری، مقادیر^{۱۱} RSD حاصل به ترتیب بایستی کمتر از ۶ و ۱۱ درصد باشند. در مورد پارامتر درصد بازیافت^{۱۲}، میزان درصد بازیافت حاصل بایستی بین ۸۰ تا ۱۱۵ درصد باشد. به‌طور کلی قرار گرفتن نتایج اعتباربخشی یک آزمون آزمایشگاهی در محدوده‌های فوق تاییدکننده قابلیت روش جهت انجام اندازه‌گیری مورد نظر است. در غیر این صورت یعنی انحراف نتایج از گستره‌های فوق، روش طراحی شده نیازمند بازبینی و انجام اصلاحات می‌باشد.

Table 5 accepted range of the validation parameters in international standards (AOAC)

Validation parameters	Accepted Rang
R ²	0.99 ≤
Repeatability	6%
Reproducibility	11%
Recovery percent	80-115 %

۳-۲-۱- بررسی پارامتر ویژه بودن روش

برای این منظور، ابتدا محلول استاندارد هریک از رنگ‌ها به تنهایی تهیه و به دستگاه تزریق شد. در مرحله بعد، محلول آماده شده نمونه و سپس مخلوط رنگ‌های استاندارد اضافه شده به نمونه به دستگاه تزریق گردید. در شکل ۲ کروماتوگرام‌های مربوط به مخلوط استانداردهای اضافه شده به نمونه نشان داده شده است. نتایج مربوط به زمان بازداری هریک از رنگ‌ها در شرایط مختلف فوق در جدول ۶ ارائه شده است. نتایج گزارش شده میانگین زمان بازداری پیک‌های حاصل پس از ۳ بار اندازه‌گیری متوالی می‌باشد. مشاهده می‌شود که زمان‌بازداری استاندارد هریک از رنگ‌ها در بافت فرآورده یخی تفاوت‌های بسیار جزئی با زمان بازداری پیک‌های مربوط به استاندارد هر رنگ به‌تنهایی دارد که این تایید کننده ویژه بودن روش است. این ویژگی (ویژه‌بودن) تایید می‌کند که روش طراحی شده قابلیت بسیار خوبی برای تشخیص ترکیبات رنگی مورد استفاده در موادغذایی در حضور سایر ترکیبات موجود در بافت غذایی، داراست.

از مخلوط متانول و استونیتریل استفاده شد. سپس از دقیقه ۲۴ تا ۲۵ اندازه‌گیری، مجدداً ترکیب درصد فاز متحرک به حالت اولیه رسیده و به منظور برقراری حالت تعادل در ستون به مدت ۵ دقیقه در این شرایط نگهداری شد. اما متأسفانه باز هم جداسازی خوبی حاصل نشد. با تغییر ترکیب درصد فاز متحرک به صورت-های مختلف و استفاده از درصد‌های مختلف متانول، استونیتریل و بافر استات در زمان‌های مختلف اندازه‌گیری، برنامه شویشی ارائه شده در جدول ۴ حاصل شد. با استفاده از این برنامه شویشی کلیه رنگ‌ها با قدرت تفکیک مناسب جداسازی شده و علاوه بر شناسایی کیفی هریک از آنها امکان تعیین مقدار و اندازه‌گیری کمی آنها نیز فراهم شد.

۳-۲-۲- نتایج اعتباربخشی اندازه‌گیری رنگ‌های

مجاز خوراکی در فرآورده‌های یخی

در این مرحله به منظور بررسی بیشتر و تایید این روش برای اندازه‌گیری کیفی و کمی رنگ‌های مجاز خوراکی در موادغذایی پارامترهای اعتباربخشی^۱ مختلف شامل ویژه بودن^۲ روش، رسم منحنی کالیبراسیون^۳ و بررسی پارامتر همبستگی منحنی^۴ حاصل، پارامترهای حدتشخیص^۵ و کمترین مقدار قابل اندازه‌گیری^۶، تکرارپذیری^۷، صحت^۸ نتایج و بررسی اثر مزاحمت^۹ هریک از رنگ‌ها روی اندازه‌گیری سایر رنگ‌های این خانواده از افزودنی-های غذایی، مورد بررسی قرار گرفت. این پارامترها با توجه به استانداردهای بین‌المللی انتخاب و مورد بررسی قرار گرفته‌اند [۲۵] و [۲۶]. گستره مجاز هریک از پارامترها با استفاده از استانداردهای بین‌المللی AOAC [۲۷] در جدول ۵ ارائه شده است. با توجه به این جدول مشاهده می‌شود که پارامتر R² که بیان‌کننده خطی

1. Validation parameters
2. Specificity
3. Calibration curve
4. Correlation parameter
5. Detection limit (LOD)
6. Limit of quantitation (LOQ)
7. Repeatability
8. Accuracy
9. Interference

10. Linearity
11. Relative standard deviation
12. Recovery percent

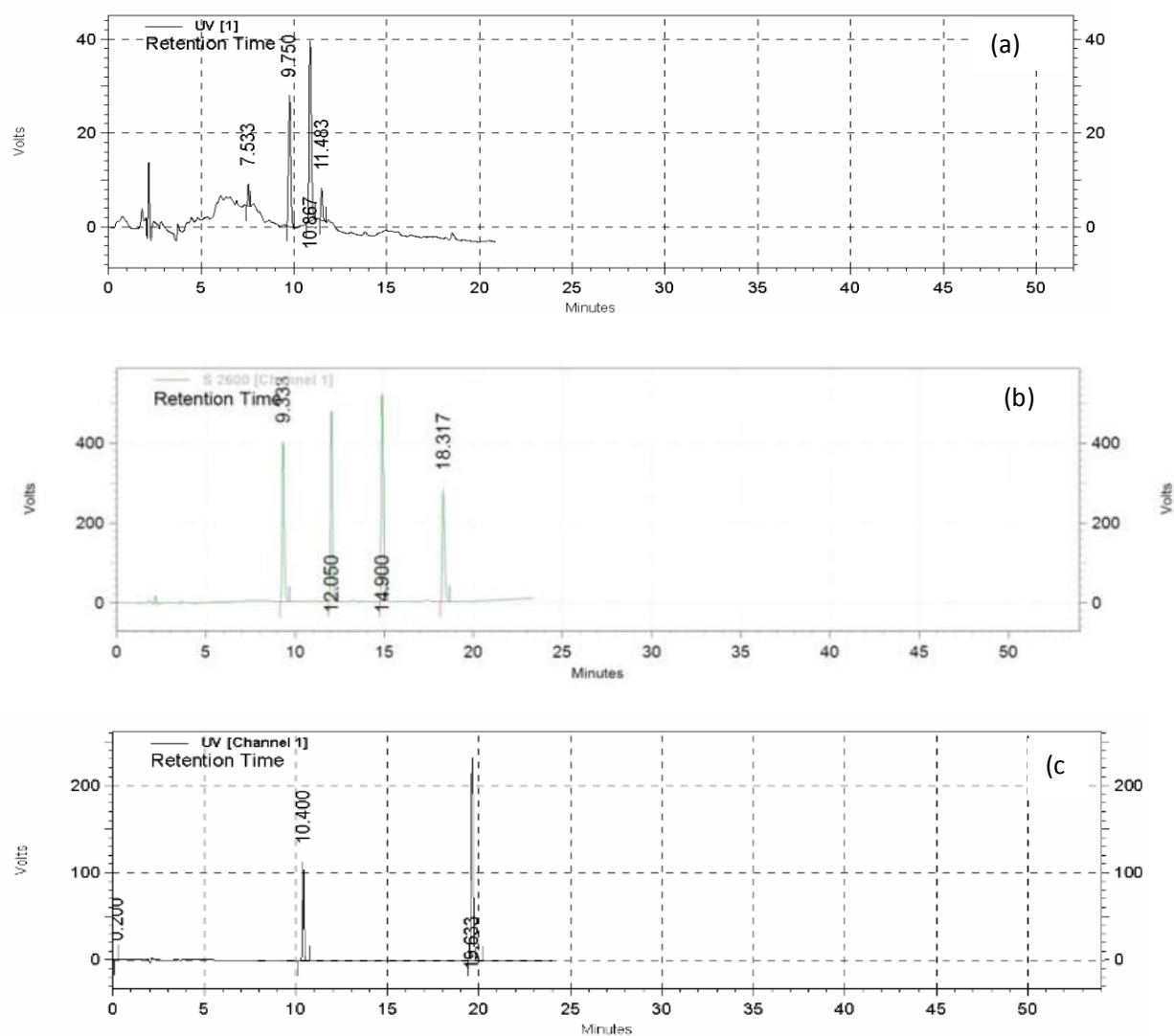


Fig 2 Chromatograms of the yellow standard colors (a) red standard colors (b) and blue standard colors(c)

Table 6 Retention times of the allowed food colors in standard solutions, in sample matrix and added to sample

Allowed food colors	R _f Standards (min)	R _f Color of sample matrix (min)	R _f Standards add to ice products (min)
Quinoline yellow (I)	7.4(±0.05)	7.48(±0.05)	7.53(±0.05)
Quinoline yellow (II)	9.68(±0.1)	9.65(±0.1)	9.75(±0.1)
Quinoline yellow (III)	11.53(±0.2)	11.78(±0.2)	11.48(±0.2)
Sunset yellow	10.66(±0.2)	-	10.86(±0.2)
Ponceau R	11.95(±0.1)	-	12.05(±0.1)
Allura red	14.75(±0.2)	-	14.9(±0.2)
Carmoisine	18.23(±0.1)	18.20(±0.1)	18.32(±0.1)
Indigo carmine	10.38(±0.005)	-	10.4(±0.005)
Brilliant blue	19.66(±0.005)	19.71(±0.005)	19.63(±0.005)

۳-۲-۲- رسم منحنی کالیبراسیون، تعیین محدوده خطی،

محاسبه LOD و LOQ

همان‌طور که در قسمت‌های قبلی هم اشاره شد، به منظور در نظر گرفتن اثر ماتریس نمونه، محلول‌های استاندارد با استفاده از محلول نمونه رقیق شده به عنوان حلال تهیه شدند، در مورد هر سری از این ترکیبات رنگی، ابتدا نمونه رقیق شده به عنوان شاهد به دستگاه تزریق شد و سپس مساحت پیک مربوط به شاهد از مساحت پیک استاندارد مربوطه کم شد و در پایان منحنی کالیبراسیون رسم شد. نتایج مورد استفاده برای رسم منحنی

کالیبراسیون، میانگین مساحت پیک‌های حاصل پس از ۳ بار اندازه‌گیری متوالی می‌باشد. نتایج حاصل از منحنی‌های کالیبراسیون رسم شده شامل ضریب همبستگی، محدود خطی، LOD و LOQ در جدول ۷ ارائه شده است. مشاهده می‌شود که در مورد کلیه رنگ‌های مجاز خوراکی کمترین غلظت قابل تشخیص ppm ۱ و کمترین غلظت قابل اندازه‌گیری معادل ppm ۱۰ است. یعنی با استفاده از این روش غلظت‌های بالای ppm ۱۰ با دقت بسیار بالایی قابل اندازه‌گیری هستند.

Table 7 correlation coefficient, linear range, LOD and LOQ obtained from calibration curves

	Calibration curve equation	R ²	Linear Range (ppm)	LOD (ppm)	LOQ (ppm)
Quinoline yellow (II)	y= 101624x -3090.5	0.999	10 - 300	1(±0.03)	10(±0.3)
Sunset yellow	y= 24859x +47100	0.997	10 - 300	1(±0.02)	10(±0.3)
Ponceau R	y=37366 x +27819	0.999	10 - 200	1(±0.01)	10(±0.1)
Allura red	y=45184 x +22136	0.999	10 - 150	1(±0.03)	10(±0.3)
Carmoisine	y= 23922 x -24022	0.998	10 - 200	1(±0.03)	10(±0.2)
Indigo carmine	y= 44737 x -58459	0.997	10 - 150	1(±0.02)	10(±0.4)
Brilliant blue	y= 127711x -165112	0.998	10 - 150	1(±0.02)	10(±0.3)

محدوده خطی منحنی کالیبراسیون رسم شده برای کینولاین‌یلو (II) و سانست‌یلو ppm ۳۰۰-۱۰ با ضریب همبستگی به ترتیب ۰/۹۹۹ و ۰/۹۹۷ است. در واقع در این محدوده غلظتی (ppm ۳۰۰-۱۰) مساحت پیک مشاهده شده برای هر یک از رنگ‌ها به طور خطی متناسب با غلظت هر رنگ در بافت نمونه غذایی تغییر می‌کند. در مورد رنگ‌های پانسیوآر و کارمیوزین این محدوده ppm ۲۰۰-۱۰ و در مورد رنگ‌های آلورارد، ایندیگوکارمین و برلیانت‌بلو این محدوده ppm ۱۵۰-۱۰ است. قابل یادآوریست که در ستون دوم این جدول معادله ریاضی تغییرات مساحت پیک‌های مشاهده شده در کروماتوگرام حاصل با غلظت هر رنگ نشان داده شده است.

هریک از ترکیبات رنگی با غلظت‌های مختلف در ماتریس نمونه فرآورده یخی بررسی شد و نتایج در جدول ۸ ارائه شده است. نتایج گزارش شده میانگین نتایج حاصل پس از ۳ بار اندازه‌گیری متوالی می‌باشد. با مقایسه نتایج درصدبازیافت حاصل برای هر یک از این رنگ‌ها با محدوده مجاز گزارش شده برای درصد بازیافت در جدول ۵ مشاهده می‌شود که درصد بازیافت محاسبه شده برای هر رنگ در بافت نمونه فرآورده یخی در گستره مجاز اعلام شده قرار دارد که این نتیجه نشان‌دهنده صحت قابل قبول نتایج اندازه‌گیری است. به عبارتی بهتر این نتیجه بیان می‌کند که مقدار کمی محاسبه شده برای هر رنگ، تطابق بسیار خوبی با مقدار واقعی هر رنگ در بافت نمونه دارد.

۳-۲-۳- صحت و درصدبازیافت

به منظور بررسی صحت نتایج اندازه‌گیری‌ها، درصد بازیافت

Table 8 accuracy results of measurement the allowed food colors in ice products

		Peak Area	Optained Concentration	Recovery Percent
Quinoline yellow (II)	sample	-	-	-
	sample +20 ppm	2208386(±1510)	21.76136051(±1)	104.870257(±1.5)
	sample + 42.85 ppm	4671850(±41504)	46.00232721(±1.4)	105.6425657(±3)
Sunset yellow	sample	-	22.00764311(±0.8)	-
	sample +20 ppm	1128204(±1740)	43.48944044(±1.6)	107.4089867(±2)
	sample + 42.85 ppm	1805432(±12468)	70.73220966(±2)	113.8424452(±5)
Ponceau R	sample	-	-	-
	sample +25 ppm	967184(±8653)	25.13956538(±2.1)	100.5582615(±3)
	sample +50 ppm	1953667(±2345)	51.54011668(±1.1)	103.0802334(±2.5)
	sample + 75 ppm	2825399(±19835)	74.86966761(±2.35)	99.82622348(±2.75)
Allura red	sample	-	-	-
	sample +25 ppm	1179685(±23690)	25.61855967(±1)	102.4742387(±4)
	sample +50 ppm	2203065(±19267)	48.26772751(±2.5)	96.53545503(±2.9)
	sample + 75 ppm	3458855(±24897)	76.06053028(±2.2)	101.4140404(±3.5)
Carmoisine	sample	135885(±1520)	6.684516345(±0.5)	-
	sample +25 ppm	722291(±1730)	31.19776775(±1.5)	98.0530056(±2)
	sample +50 ppm	1362403(±45960)	57.95606555(±1)	102.5430984(±5)
	sample + 75 ppm	1844946(±23968)	78.12758131(±2.2)	95.25741995(±2.8)
Indigo carmine	sample	-	-	-
	sample +25 ppm	1076516(±35809)	25.8399981(±0.9)	100.8799924(±4.3)
	sample +60 ppm	2526343(±49140)	60.24(±1.05)	100.4(±3.5)
	sample + 15 ppm	690108(±1458)	16.6697202(±1.9)	111.131468(±7)
Brilliant blue	sample	200517(±1769)	1.843236572(±0.1)	-
	sample +25 ppm	2898402(±27685)	24.96552079(±1.4)	92.50208315(±6)
	sample +60 ppm	6930994(±38976)	59.52(±1.4)	96.12793905(±2)
	sample + 15 ppm	1813354(±10670)	15.66609244(±1.76)	104.4406163(±2)

کند که اثرات خطای تصادفی ناشی از منابع مختلف (تغییر شرایط محیطی، تغییر شرایط دستگاهی و) در کوتاه مدت بر نتایج اندازه‌گیری‌های انجام شده توسط روش معرفی شده ناچیز و قابل صرف نظر است. به منظور بررسی اثرات خطای تصادفی ناشی از منابع مختلف (تغییر شرایط محیطی، تغییر شرایط دستگاهی و) در طولانی مدت، تکرارپذیری اندازه‌گیری‌ها در شش روز متوالی (تجدیدپذیری) با انتخاب یک رنگ از هر گروه رنگ‌های مجاز خوراکی مورد بررسی و نتایج حاصل به صورت RSD_R در جدول ۱۰ ارائه شده است. این نتایج باز هم حاکی از تجدیدپذیری مناسب اندازه‌گیری‌ها می‌باشد. به عبارتی بهتر، اثرات خطاهای تصادفی ناشی از منابع مختلف بر نتایج حاصل در طولانی مدت هم ناچیز و قابل صرف نظر است.

۳-۲-۴ تکرارپذیری (دقت) و تجدیدپذیری

به منظور بررسی تکرارپذیری اندازه‌گیری هریک از رنگ‌های مجاز خوراکی، نمونه محتوی هریک از این ترکیبات، شش بار آماده‌سازی و به دستگاه HPLC تزریق شد. میزان دقت یا تکرارپذیری اندازه‌گیری‌ها با محاسبه RSD_r برای تغییرات مساحت پیک مشاهده شده، غلظت به دست آمده و زمان بازداری پیک مشاهده شده، مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این محاسبات در جدول ۹ نشان داده شده است. مطابقت این نتایج با محدوده مجاز گزارش شده برای تکرارپذیری در جدول ۵، حاکی از دقت بالای اندازه‌گیری‌های کیفی (با توجه به مقدار RSD_r محاسبه شده برای زمان بازداری پیک‌ها) و کمی (با توجه به مقدار RSD_r محاسبه شده برای مساحت پیک‌ها و غلظت‌های حاصل) در مورد انواع رنگ‌های مجاز خوراکی است. در واقع این نتایج تایید می

Table 9 Precision results of measurement the allowed food colors in ice products

		1	2	3	4	5	6	Average	sd	RSD
Quinoline yellow (II)	Peak area	1572649	1543738	1550353	1547006	1526281	1579515	1553257	19653.7	1.26
	Concen (ppm)	15.5	15.22	15.28	15.25	15.05	15.57	15.31	0.19	1.26
	R _t (min)	9.75	9.7	9.8	9.65	9.87	9.68	9.74	0.08	0.84
Sunset yellow	Peak area	300077	313859	314084	315248	315816	315579	312443.8	6110.5	1.95
	Concen (ppm)	10.17	10.73	10.74	10.78	10.8	10.8	10.67	0.24	2.3
	R _t (min)	13.9	13.8	13.7	13.63	13.66	13.51	13.7	0.13	0.97
Ponceau R	Peak area	1525623	1580899	1485884	1533109	1574571	1583916	1547334	39131.9	2.52
	Concen (ppm)	40.08	41.56	39.02	40.28	41.39	41.64	40.66	1.04	2.57
	R _t (min)	12.033	11.983	12.08	12.017	11.98	11.98	12.012	0.0399	0.33
Allura red	Peak area	1887061	1879218	1849981	1845427	1867786	1885823	1869216	18067.5	0.96
	Concen (ppm)	41.27	41.1	40.45	40.35	40.84	41.24	40.87	0.39	0.97
	R _t (min)	14.85	14.85	14.8	14.73	14.81	14.73	14.79	0.05	0.36
Carmoisine	Peak area	103492	1104264	1058900	1064509	1072792	1038294	1062281	25349.3	2.38
	Concen (ppm)	39.76	42.66	40.76	41.00	41.34	39.90	40.91	1.059	2.59
	R _t (min)	18.32	18.23	18.35	18.22	18.25	18.3	18.27	0.053	0.29
Indigo carmine	Peak area	867310	879346	863400	862394	895622	843178	868541.6	17658.6	2.03
	Concen (ppm)	20.87	21.16	20.78	20.75	21.54	20.3	20.9	0.42	2.00
	R _t (min)	10.23	10.3	10.15	10.26	10.21	10.17	10.22	0.0568	0.55
Brilliant blue	Peak area	1818670	1788680	1805630	177580	1852710	1856740	1816371	3311.68	1.82
	Concen (ppm)	10.68	10.65	10.67	10.64	10.71	10.71	10.68	0.028	1.68
	R _t (min)	19.55	19.61	19.51	19.45	19.56		19.53	0.061	0.32

Table 10 reproducibility results of measurement the allowed food colors in ice products

	Sunset Yellow		Carmoisine		Brilliant Blue	
	Concen (ppm)	R _t (min)	Concen (ppm)	R _t (min)	Concen (ppm)	R _t (min)
1	22.007	13.85	6.68	18.32	2.59	19.35
2	21.62	13.8	6.71	18.25	2.86	19.8
3	22.41	13.75	6.63	18.41	2.61	19.6
4	21.79	13.68	6.11	18.35	2.96	19.5
5	21.89	13.76	7.14	18.2	2.74	19.56
6	22.13	13.41	6.68	18.31	2.74	19.39
Average	21.97	13.7	6.66	18.3	2.75	19.53
Sd	0.27	0.15	0.32	0.076	0.14	0.16
RSD _R	1.25	1.14	4.91	0.41	5.23	0.83

شده است.

نتایج گزارش شده میانگین ۳ اندازه‌گیری متوالی است. مطابقت نتایج حاصل با محدوده مجاز گزارش شده برای درصد بازیافت در جدول ۵ حاکی از جداسازی مناسب رنگ‌های مجاز خوراکی و عدم مزاحمت هریک از این ترکیبات بر اندازه‌گیری می‌باشد.

۳-۲-۵- اندازه‌گیری همزمان رنگ‌های مجاز خوراکی

آخرین پارامتر مورد بررسی، اثر مزاحمت رنگ‌های مختلف در حضور یکدیگر بر چگونگی جداسازی و نتایج اندازه‌گیری کمی می‌باشد. برای بررسی این موضوع درصد بازیافت هریک از رنگ‌ها با غلظت‌های مختلف در حضور سایر رنگ‌های قرمز، زرد و آبی محاسبه شده و نتایج در جدول‌های ۱۱، ۱۲ و ۱۳ نشان داده

Table 11 accuracy results of measurement the red and blue allowed food colors in yellow ice products

Added colors	Added colors to yellow sample	Peak area	Obtained concentration (ppm)	Recovery percent
Ponceau R	yellow sample +25(ppm)	970993(±1320)	25.24(±1.2)	100.96(±1.5)
	yellow sample + 50 (ppm)	1681472(±15687)	44.25(±2.1)	98.33(±2.5)
	yellow sample + 75 (ppm)	2531523(±15520)	67(±3.1)	89.33(±3.5)
Allura red	yellow sample +25(ppm)	1134368(±12348)	24.61(±1.3)	98.44(±2)
	yellow sample + 50 (ppm)	2169033(±14567)	47.51(±1.8)	105.5(±2.2)
	yellow sample + 75 (ppm)	3371621(±18790)	74.13(±2.1)	98.84(±2.5)
Carmoisine	yellow sample +25(ppm)	549778(±5645)	23.98(±1.5)	92.95(±2)
	yellow sample + 50 (ppm)	1157369(±12126)	49.38(±1.8)	109.7(±2.1)
	yellow sample + 75 (ppm)	1769134(±23467)	74.95(±2.25)	99.93(±2.5)
Indigo carmine	yellow sample + 30 (ppm)	1262479(±16579)	30.25(±1.5)	100.84(±1.8)
Brilliant blue	yellow sample + 30 (ppm)	3167796(±22348)	27.27(±1.2)	90.91(±1.9)

به عبارتی بهتر با توجه به این نتیجه می‌توان گفت روش ارائه شده قابلیت مناسبی برای جداسازی و تشخیص و اندازه‌گیری رنگ‌های مجاز خوراکی در نمونه‌های محتوی مخلوطی از این رنگ‌ها داراست.

Table 12 accuracy results of measurement the yellow and blue allowed food colors in red ice products

Added colors	Added colors to red sample	Peak area	Obtained concentration (ppm)	Recovery percent
Sunset yellow	red sample + 30 (ppm)	818215(±1320)	31.019(±2.1)	103.39(±2.5)
	red sample +60 (ppm)	1495418(±15467)	58.26(±1)	97.10(±1.5)
Indigo carmine	red sample + 30 (ppm)	1271354(±12167)	30.46(±1.5)	101.5(±1.9)
Brilliant blue	red sample + 30 (ppm)	3268994(±13457)	28.14(±2.3)	93.8(±2.8)

Table 13 accuracy results of measurement the red and yellow allowed food colors in blue ice products

Added colors	Added colors to blue sample	Peak area	Obtained concentration (ppm)	Recovery percent
Sunset yellow	blue sample + 30 (ppm)	804744(±1546)	30.48(±1.5)	101.6(±2)
Ponceau R	blue sample + 25 (ppm)	871496(±1170)	22.57(±1)	90.3(±1.3)
Allura red	blue sample + 25 (ppm)	1103915.5(±12379)	23.94(±2.1)	95.76(±3)
Carmoisine	blue sample + 25 (ppm)	519370(±1697)	23.035(±2)	92.14(±2.4)

شده می‌باشند. یکی از نمونه‌های مورد بررسی محتوی رنگ سبز بود که نتیجه بررسی کیفی و کمی این نمونه نشان داد که از مخلوطی از رنگ‌های زرد و آبی در تهیه این فرآورده یخی استفاده شده است. نتیجه اندازه‌گیری هریک از این نمونه‌ها که میانگین ۳ اندازه‌گیری متوالی است، در جدول ۱۴ ارائه شده است. در این جدول محصولات شرکت‌های مختلف با حروف الفبایی A تا E مشخص شده‌اند.

۳-۳- اندازه‌گیری رنگ‌های مجاز خوراکی در فرآورده‌های یخی تولید شده از شرکت‌های مختلف

تعدادی نمونه فرآورده یخی تولید شده توسط شرکت‌های مختلف از نظر نوع و مقدار رنگ به‌کار رفته، بررسی و مورد اندازه‌گیری قرار گرفتند. مشاهده شد که در کلیه موارد رنگ‌های مورد استفاده مجاز خوراکی و از نظر مقدار در حد استاندارد اعلام

Table 14 results of measurement the type and amount used colors in ice products produced by different companies

Sample	Observed colors concentration (ppm)						
	Quinoline yellow	Sunset yellow	Carmoisine	Allura red	Ponceau R	Indigo carmine	Brilliant blue
A	45.6(±1.4)	-	-	-	-	-	-
B	-	48.5(±1.6)	-	-	-	-	-
C	-	-	40.91(±1)	-	-	-	-
D	-	-	-	-	-	-	10.67(±0.7)
E	10.25(±0.7)	-	-	-	-	-	6.75(±0.5)

۴- نتیجه‌گیری

اندازه‌گیری رنگ‌های مجاز خوراکی توسط آزمایشگاه‌های سازمان غذا و دارو را داراست.

با توجه به عدم وجود روش استاندارد و معتبر آزمایشگاهی برای اندازه‌گیری کمی رنگ‌های مجاز خوراکی در مواد غذایی و ضرورت بررسی مقدار این افزودنی‌ها، توسط سازمان غذا و دارو، در این مطالعه سعی شده است با استفاده از حداقل تجهیزات که در هر آزمایشگاهی وجود دارد، روشی معتبر برای اندازه‌گیری رنگ‌های مجاز خوراکی در مواد غذایی ارائه شود. پس از بهینه‌سازی پارامترهای موثر بر روش آزمون، پارامترهای اعتباربخشی روش مورد استفاده برای هریک از رنگ‌های مجاز خوراکی مورد بررسی قرار گرفت که نتایج حاصل مطابقت بسیار خوبی با استانداردهای بین‌المللی اعتباربخشی دارند. درصد بازیافت هریک از رنگ‌های مجاز خوراکی در حضور سایر رنگ‌های این خانواده و به صورت مخلوط‌هایی از رنگ‌های قرمز - آبی، قرمز - زرد و آبی - زرد مورد بررسی قرار گرفته که باز هم نتایج حاصل حاکی از قابلیت قابل توجه این روش برای اندازه‌گیری رنگ‌های مجاز خوراکی در مواد غذایی است. همین‌طور با توجه به عدم استفاده از روش و تجهیزات پیچیده و نتایج حاصل از بررسی پارامترهای اعتباربخشی، مشاهده می‌شود، این روش قابلیت‌های لازم برای

۵- تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله بدین وسیله، مراتب تشکر و قدردانی خود را از معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی کردستان به خاطر حمایت‌های مالی لازم جهت انجام این پژوهش، اعلام می‌دارند.

۶- منابع

- [1] Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives., (2006) Evaluation of Certain Food Additives and Contaminants. 67, 1-107.
- [2] Minioty, K., Sakellariou, Ch., Thomaidis, N., (2000). Electrophoretic methods in the analysis of beverages. J Chromatography A., 880, 243-279.
- [3] Lin, C. S., Shoaf, S. E., Griffiths, J. C., (1992) Pharmacokinetic data in the evaluation of the safety of food and color additives. Regul Toxicol Pharmacol., 15, 62-72.

- colorants tartrazine, ponceau 4R and sunset yellow FCF in foodstuffs by solid phase spectrophotometry using partial least squares multivariate calibration. *Talanta*, 47, 861-868.
- [14] Liu, F. J., Liu, Ch. T., Li, W., Tang, A. N., (2015). Dispersive solid-phase microextraction and capillary electrophoresis separation of food colorants in beverages using diamino moiety functionalized silica nanoparticles as both extractant and pseudostationary phase. *Talanta*, 132, 366-372.
- [15] Zhang, Z., Zhang, Y., (2006). Development and optimization of an analytical method for the determination of Sudan dyes in hot chilli pepper by high-performance liquid chromatography with on-line electrogenerated BrO⁻-luminol chemiluminescence detection. *J Chromatography A*, 1129, 34-40.
- [16] Genaro, M.C., Giaconnonin, E., (1997). Identification and determination of red dyes in confectionery by ion-interaction high-performance liquid chromatography. *J Chromatography*, 767, 87-92.
- [17] Luo, X., Chen, B., (2006). Simultaneous determination of water-soluble and fat-soluble synthetic colorants in foodstuff by high-performance liquid chromatography–diode array detection–electrospray mass spectrometry. *J Chromatography A*, 1103, 170-176.
- [18] Katerina, S., Minioti, C.F., Sakellariou, N., Thomaidis, S., (2007). Determination of 13 synthetic food colorants in water-soluble foods by reversed-phase high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector. *Analytica Chimica Acta*, 583, 103–110.
- [19] Zamani, F., Rajabi, A., Moradi, Zh., Esmaili, F., Shams, M. R., Moghaddam, Gh., Hajimahmoodi, M., (2016) Determination of 8 Synthetic Food Dyes by Solid Phase Extraction and Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 15, 173-181.
- [20] Arthur, C., Killiam, L., Buchholz, K., (1992). Automation and optimization of solid-phase microextraction. *Analytical Chemistry*, 64, 1960-1966.
- [21] Vidotti, E.C., Costa, W.F., Oliveira, C.C., (2006). Development of a green chromatographic method for determination of
- [4] Combes, R.D., Haveland, S. R., (1998). A review of the genotoxicity of food, drug and cosmetic colours and other azo, triphenylmethane and xanthene dyes., *Mutation Research*. 98., 101-248.
- [5] Nevado, J.J.B., Cabanilas, C. G., Contito, A. M., (1995). Simultaneous spectrophotometric determination of three food dyes by using the first derivative of ratio spectra. *Talanta*, 42, 2043-2051.
- [6] Jennings, A. S., Schwartz, S. L., Balter, N. J., (1990). Effects of oral erythrosine (2',4',5',7'-tetraiodofluorescein) on the pituitary-thyroid axis in rats. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 103, 549-556.
- [7] European Food Safety Authority., (2005). Opinion of the scientific panel on food additives, flavourings, processing aids and materials in contact with food on a request from the commission to review the toxicology of a number of dyes illegally present in food in the EU., 263, 1-71.
- [8] Silbergeld, E. K., Anderson, S. M., (1982) Artificial food colors and childhood behavior disorders. *Bull NY Acad. Med.*, 58, 275-295.
- [9] Soltan Dallal, M. M., Mohammadi, H. R., Dastbaz, A., Vahedi, S., Salsali, M., Arasteh, M., Kafashi, T., Norooz Babaie, H., Namadi, K., (2007) The analysis of status of added colors to dried sweets in South of Tehran using thin layer chromatography, *journal of gorgan university of medical science*, 9, 73-78.
- [10] Arast, Y., Mohamadian, M., Noruzi, M., Ramuz, Z., (2013). Surveillance on Artificial Colors in Different Confectionary Products by Chromatography in Qom. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 15, 62-64.
- [11] Soltan Dallal, M. M., Vahedi, S., Najjarian, A., Dastbaze, A., Kaffashi, T., Pirhadi, Kamkar, E. A., Faramarzi, T., Mahdavi, V., (2008) Study of concentration of added colors to juice of black cherry and juice of barberry on display in shop in the city of Tehran, *journal of peyavard salamat*, 2, 55-62.
- [12] Lin, H., Li, G., (2008). Electrochemical determination of Sudan I using montmorillonite calcium modified carbon paste electrode. *Food Chemistry*. 107, 531-536.
- [13] Capitan, L.F., Fernandez, M. D. I., Orbie, D., (1998). Simultaneous determination of the

- performance liquid chromatography. *J. Chromatography. A.*, 825, 37-44.
- [25] Regulation of the European Parliament and of the Council on official controls performed to ensure the verification of compliance with feed and food law, animal health and animal welfare rules., (2004). Includes requirements for official control laboratories and designation and duties of reference laboratories., 882, 1-14.
- [26] Miller, J. N., Miller, J. C., (2005). *Statistics and Chemometrics for Analytical Chemistry*, 6th Ed., Pearson, pp 1-150.
- [27] AOAC., (2002). *AOAC Guidelines for Single Laboratory Validation of Chemical Methods for dietary Supplements and Botanical.*, 1-3.
- colorants in food samples., *Talanta.* 68, 516-521.
- [22] Kirschbaum, J., Krause, C., Pfalzgraf, S., Bruckner, H., (2003). Development and evaluation of an HPLC-DAD method for determination of synthetic food colorants. *Chromatographia.*, 57, S115- S119.
- [23] Dinc, E., Aktas, A.H., Ustundag, O., (2005). New Liquid Chromatographic-Chemometric Approach for the Determination of Sunset Yellow and Tartrazine in Commercial Preparation., *AOAC Int.* 88, 1748-1755.
- [24] Chen, M., Moir, D., Benoit, F.M., Kubwabo, C., (1998). Purification and identification of several sulphonated azo dyes using reversed-phase preparative high-

Quantitative measurement of synthetic dyes in food: Increasing health and food safety

Hassanzadeh, K. ¹, Korani A. ^{2*}

1. Cellular and Molecular Research Center, Research Institute for Health Development, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran
2. Food laboratory, Vice chancellor for Food and Drug, Kurdistan University of Medical Sciences, Sanandaj, Iran

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

Synthetic colors are additives which can affect the health and safety of food directly. As a result of the increase of synthetic dyes usage in industry and harmful effects of excessive consumption of synthetic colors on human health, we have attempted to propose a valid method by the simplest laboratory equipment for control dose of synthetic colors in foods. In this study, we have selected ice products as the real sample because of its simple matrix. Here, we have attempted to the determination of all allowed synthetic colors in ice samples as individual and mixtures of them (yellow-red, yellow-blue and red-blue) in one run simultaneously. All validation parameters of the method were calculated for each color and compared with international standards. Obtained results are in accordance with international standards and confirm that this method has a good potential to apply as a valid laboratory method not only for qualitative but also the measurement of synthetic colors in food.

Keywords: Health and food safety, Quantitative measurement, allowed synthetic food colors, Ice products.

* Correseponding Author E-Mail Address: Azam.korani@gmail.com