

استخراج و اندازه گیری همزمان رنگهای مصنوعی از نمونه های بستنی عرضه شده در بازار به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

سمانه اخلاق دوست^۱، دکتر افشین جعفر پور^۲

۱- گروه علوم و صنایع غذایی، واحد دامغان، دانشکده کشاورزی، دانشگاه آزاد اسلامی، دامغان، ایران

۲- گروه علوم صنایع غذایی، واحد گرمسار، دانشگاه آزاد اسلامی، گرمسار، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۵/۴/۱۶

تاریخ دریافت: ۹۴/۹/۱۴

چکیده

در این پژوهش روشی ساده برای شناسایی و اندازه گیری رنگ های مصنوعی کارمیوزین، سان ست یلو، تارتارازین، برلیانت بلو و کینولین یلو به طور همزمان در بستنی و ژله با دستگاه HPLC مجهز به ستون کروماتوگرافی C-18 ارائه گردید. پارامترهای موثر بر جداسازی و آشکارسازی رنگ ها بررسی و بهینه شدند. مقادیر بهینه به این صورت بدست آمدند: شویش گرادینت با ترکیب دو فاز متحرک مختلف با ترکیب درصد های مختلف از بافر آمونیوم استات (اسیدیته: ۷)، استونیتریل و متانول؛ فاز A (۸۰:۱۰:۱۰) و فاز B (۲۵:۲۰:۵۵)، سرعت جریان (۱ ml/min) و طول موج های ۴۲۰، ۴۸۰، ۵۱۵ و ۶۲۵ نانومتر. سپس تحت شرایط بهینه ارقام شایستگی روش مانند گستره خطی ($0.2-60 \text{ mg L}^{-1}$) و ضریب همبستگی (0.999)، حد تشخیص (0.2 mg L^{-1}) بدست آمد. تکرار پذیری روش (RSD) برای رنگ های کارمیوزین، سان ست یلو، برلیانت بلو، کینولین یلو و تارتارازین با شش تکرار برای غلظت 10 mg L^{-1} به ترتیب ۷/۱٪، ۷٪، ۶/۹٪، ۶/۹٪، ۷/۱٪ و ۷/۱٪ بدست آمد. در نهایت کارایی روش ارائه شده جهت شناسایی و اندازه گیری هم زمان رنگ سانست یلو، کارمیوزین، برلیانت بلو، تارتارازین و کینولین یلو در تعدادی از بستنی های اسکویی، یخمک، بستنی یخی و ژله مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج رضایت بخشی با درصد بازیابی $< 90\%$ به دست آمد.

واژه های کلیدی: رنگ های مصنوعی، کارمیوزین، تارتارازین، برلیانت بلو، کینولین یلو.

۱ - مقدمه

اولین ویژگی کیفی ماده غذایی که توسط مصرف کننده مورد توجه قرار می گیرد خصوصیات ظاهری آن است (ام لردز و همکارانش، ۲۰۰۷).[□] در حقیقت مصرف کننده قبل از آن که اطلاعاتی از سایر خصوصیات از قبیل طعم یا بو داشته باشد، به ظاهر خوراک توجه می نمایند (مینگ و همکارانش، ۲۰۰۶).[□] بنابراین، مشخصات ظاهری یک فراورده غذایی عامل مهمی است که مخصوصا در اولین برخورد خریدار نقش اساسی و تعیین کننده دارد (القمیدی، ۲۰۰۲).[□] سایر خصوصیات کیفی مانند عطر، بافت و غیره معیارهایی هستند که پس از مصرف محصول غذایی، و احیانا پس از یک بار خرید و تجربه کردن آن مورد توجه واقع می شوند (روبرتو سباستینو و همکارانش، ۲۰۱۲).^{**} خصوصیات ظاهری محصول شامل مشخصاتی مانند رنگ، شکل، نوع بسته بندی، اندازه و یکنواختی است (لانگ چ و همکارانش، ۲۰۱۱).^{□□} رنگ یکی از مهمترین خصوصیت کیفی ظاهری محصول است، که در بدو امر توسط مصرف کننده مشاهده می شود (یوشیکاوا و همکارانش، ۲۰۰۸).^{□□} رنگ عامل موثر در جلب نظر و انتخاب ماده غذایی است، که از طریق احساس دریافت می گردد، و وجود آن در تشخیص سریع پذیرش نهایی هر فراورده موثر است، اگرچه ممکن است رابطه علمی بین رنگ و عطر و طعم مواد غذایی از نظر نوع ترکیب در خصوصیات فیزیکی و شیمیایی وجود نداشته باشد، ولی آزمایش های چشمایی نشان داده است که در اکثر مواد رنگ مطلوب، بر اساس عطر و طعم ماده غذایی اثر مثبت و قابل ملاحظه ای دارد (مینوتی و همکارانش، ۲۰۰۷).^{□□} لذا پس از خرید و مصرف یک فراورده غذایی نیز رنگ از اهمیت خاصی برخوردار است (سارا اس صالح و همکارانش،

۲۰۱۲).^{**} طبق تعریف اف.دی.ای.^{□□□} اصطلاح رنگ غذا^{□□□} عبارتست از "رنگریزه رنگ مصنوعی یا سایر مواد ساخته شده توسط فرآیند صنعتی و استخراج و جدا کردن و یا مشتقات مواد رنگی میوه ها و سبزی ها، حیوانات، مواد معدنی یا منابع دیگر، که به منظور ایجاد رنگ در مواد خوراکی، آشامیدنی و آرایشی برای مصرف انسان به آن ها اضافه می شود (زو و همکارانش، ۲۰۱۳).^{□□□} طبق این، رنگ های غذایی به دو دسته رنگ های با مجوز مصرف^{****} (یعنی برای مصرف نیاز به کسب مجوز می باشد) و رنگ های بدون مجوز مصرف^{□□□□} (یعنی برای مصرف مورد نیاز به کسب مجوز نمی باشد) تقسیم می شوند (توبا ارکای و همکارانش، ۲۰۱۲).^{□□□□} اخیرا محدودیت بسیاری از جانب سازمان بین المللی وانستیتو ملی سرطان در مورد استفاده از رنگ های قرمز خوراکی بیان شده است (مینوتی و همکارانش، ۲۰۰۷). در ایران، در سال های اول دهه ۱۳۶۰ به دلیل استفاده از رنگ های غیر مجاز در اغلب فراورده های غذایی، ابتدا مصرف رنگ ممنوع اعلام گردید. ولی با توجه به لزوم استفاده گسترده از رنگ ها در انواع فراورده های غذایی، این ممنوعیت موثر واقع نشد و مشکلات زیادی را به وجود آورد (یوشیکاوا و همکارانش، ۲۰۰۷). در نتیجه چند نوع رنگ، از جمله کارمویزین به عنوان رنگ مجاز اعلام شد (وود و همکارانش، ۲۰۰۴).^{□□□□} اهمیت سلامت افزودنی های غذایی و مدارکی که مدعی مضر بودن بعضی از رنگ های مصنوعی برای سلامتی انسان هستند، نیازمند دقت در دوز مصرفی رنگ های مصنوعی و پیگیری های بیشتری از طرف مسئولین ذیل ربط می باشد (وو و همکارانش، ۲۰۱۳).^{*****} به همین دلیل در این تحقیق سعی شده تا در

*** Sarah S Saleh et al

††† U.S.FDA (United States Food and Drug Administration), 1986

††† colorant

§§§ Zou et al

**** certified

†††† uncertified

†††† Tuba Erkaya et al

§§§§ Wood et al

***** Wu et al

† M Lourdes Gonza lez-Miret et al

‡ Ming et al

§ Alghamdi

** Roberto Sebastiano et al

†† Long, Ch et al

‡‡ Yoshioka et al

§§ Miniotti et al

گاززدایی به دستگاه اولترا سونیک منتقل شد. بعد از این مرحله از کاغذ صافی عبور داده تا ناخالصی ها ولخته هایی درون ترکیب جدا سازی شود. بعد از مرحله صاف کردن از فیلتر سر سرنگی ۴۵ / ۰ میکرو متر استفاده گردید تا ریز ترین ناخالصی در ترکیب باقی نمانده باشد. ۲۰ میکرو لیتر از ترکیب بدست آمده را برای تشخیص رنگ به دستگاه کروماتوگرافی تزریق کرده.

برای آماده سازی پودر ژله، ابتدا ۱۰ گرم از پودر ژله را توزین و با ۱۰۰ سی سی آب ۱۰۰ درجه سانتی گراد ترکیب شد. کمی محلول را تکان داده تا به خوبی ترکیب گردد. برای گاززدایی به دستگاه اولترا سونیک منتقل گردید و تا مدت ۲۵ دقیقه گاززدایی شد. از روی کاغذ صافی عبور داده تا ناخالصی ها جدا گردد. محلول شفاف با سرنگ به دستگاه تزریق شد.

برای آماده سازی یخچک کافی بود ۵۰ سی سی از نمونه یخچک را توزین گردد و به مدت ۲۵ دقیقه توسط اولتراسونیک گاز زدایی گردد. از روی کاغذ صافی عبور داده و محلول شفافی که بدست آورده شده را به دستگاه کروماتوگرافی تزریق گردد تا نوع رنگ به کار برده شده توسط دستگاه کروماتوگرافی مشخص شود.

برای آماده سازی محلول استاندارد از هر یک از پودر رنگ های سانست یلو، کینولین یلو، تارترازین، برلیانت یلو، کارموزین که دارای خلوص ۹۳ درصد می باشند، جداگانه با استفاده از فرمول $V_1 M_1 = V_2 M_2$ سی سی از رنگ ۲۰۰۰ ppm برداشته و در بالن ۵۰ با آب مقطر به حجم می رسانیم. رنگ به غلظت ۱۰۰ ppm بدست آید. سپس مجدداً با فرمول قبلی ۵ سی سی از رنگ ۱۰۰ ppm برداشته و در بالن ۵۰ با آب مقطر به حجم رسانیده تا رنگ ۱۰ ppm بدست آید. این مراحل را برای هر کدام از رنگها به طور جداگانه انجام داده. رنگ های مورد بررسی شامل تارترازین و سانست یلو و کینولین یلو و کارموزین و برلیانت یلو می باشند.

برای تهیه بافر آمونیوم استات ۷/۷۰۸ گرم آمونیوم استات را با ترازوی دیجیتالی توزین کرده و درون بالن ژوژه ی به

مدت زمان کوتاهی، نوع و مقدار چندین رنگ به کار برده شده در ماده غذایی به صورت همزمان ارزیابی شود. این روش کاربردی برای اداره استاندارد و بهداشت جهت تأیید صلاحیت ماده غذایی بسیار کارآمد می باشد (فو هکارانش، ۲۰۰۲).

۲- مواد و روش

نمونه های غذایی از سوپر مارکت های در سطح شهر کرج خریداری شدند و این نمونه ها شامل بستنی میوه ای اسکویی (شامل بستنی هلو، بستنی انار، بستنی طالبی، آلبالویی، زعفرانی، بلوبری، موزی، زغال لخته، پرتقالی، سیب ترش) از سه فروشگاه از نقاط مختلف شهر کرج خریداری گردید. پودر ژله (ژله طالبی و ژله هلو)، یخچک (با طعم توت فرنگی)، بستنی یخی (دو رنگی پرتقالی توت فرنگی، پرتقالی، آلویی، شاتوتی)، بستنی فالوده ای (با شربت توت فرنگی). در این تحقیق از معرف ها و مواد شیمیایی همچون آمونیوم استات، استو نیتریل، متانول با درجه کروماتوگرافی ۹۸٪ و اتانول ۹۸٪ و آمونیاک غلیظ و سدیم هیدروکسید را از شرکت مرک خریداری کرده. آب دیونیزه شده نیز با استفاده از دستگاه ۴۰۰۰۰ مدل ساخت کشور تایوان در آزمایشگاه تهیه گردید.

۳- روش آماده سازی نمونه

نحوه آماده سازی برای نمونه های بستنی میوه ای و بستنی یخی به دلیل داشتن شیر و برای جدا شدن رنگ از نمونه غذایی ابتدا ۱۰ گرم نمونه را توسط ترازو توزین کرده ۵۰ میلی لیتر اتانول آمونیاکی (۵ درصد آمونیاک و ۹۵ درصد اتانول) به آن اضافه گردید. به محض ریختن اتانول آمونیاکی نمونه بستنی لخته شد و رنگ موجود در بستنی از بستنی خارج گردید. به مدت ۳۰ دقیقه به ترکیب بدست آمده استراحت داده شد و درون یخچال قرار داده شد تا به خوبی محلول با نمونه بستنی ترکیب گردد. بعد از این مدت ترکیب از یخچال خارج و به مدت ۲۵ دقیقه جهت

متحرک و فیلتر سر سرنگی از جنس استات سلولز جهت صاف کردن محلول های نمونه

۵- نتایج

به منظور دستیابی به بیشترین حساسیت در اندازه گیری رنگ ها، طول موج دستگاه روی ۴۲۰ نانومتر تنظیم شد و رنگها به صورت تک تک با فاز متحرک متانول: بافر آمونیوم استات (۵۰:۵۰) به دستگاه تزریق شدند. نتایج نشان داد که تحت این شرایط رنگهای تارتارازین و کینولین یلو از حساسیت خوبی برخوردارند ولی سانسیت یلو، کارمیوزین و برلیانت یلو از حساسیت بسیار کمی برخوردارند. بر اساس مروری بر منابع و دستیابی به بیشترین حساسیت، طول موج ها در طول موج های max تنظیم شدند. در گستره ۴۰۰ تا ۶۵۰ نانومتر، طول موج های مختلف بررسی شدند. (وو و همکارانش، ۲۰۱۳) لذا بر این اساس، از هر چهار کانال uv به طور همزمان استفاده شد. طول موج های نهایی که روی دستگاه تنظیم شدند به صورت زیر می باشد.

حجم ۱۰۰۰ میلی لیتر توسط آب دیونیزه به حجم رسانیده. توسط pH متر میزان اسیدیته بافر مشخص گردید عددی که در دستگاه PH متر دیده شد ۴/۸ بوده در حالی که بافر باید خنثی باشد. در این صورت با استفاده از سدیم هیدروکسید اسیدیته بافر را خنثی کرده و به ۷ رسانیده. محلول استاندارد آماده سازی شده را نیازی نیست در یخچال نگه داری کرد. لازم است قبل از شروع کار با دستگاه کروماتوگرافی ابتدا محلول بافر را فیلتر کرده و بعد توسط دستگاه اولترا سونیک گاززدایی نمود. این کار را صرفاً جهت گاز زدایی وعدم تشکیل حباب در دستگاه ضروری می باشد. در برنامه شویشی از محلول A (۸۰ درصد آمونیم استات و ۱۰ درصد استون نیتریل و ۱۰ درصد متانول) و در محلول B (۵۵ درصد آمونیوم استات و ۲۰ درصد استون نیتریل و ۲۵ درصد متانول) استفاده شد. تهیه محلول اتانول آمونیاکی به این صورت که ۹۵ CC اتانول ۹۸٪ را توسط استوانه مدرج برداشته و با ۵ سی سی آمونیاک غلیظ ترکیب کرده از این ترکیب (اتانول آمونیاکی) برای جداسازی رنگ از نمونه بستنی مورد استفاده قرار می دهیم.

۴- تجهیزات دستگاهی

- دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا ***** ساخت کشور آلمان توسط شرکت KNAUER مجهز به پمپ چهار کاناله مدل k11۰۰ و آشکارساز UV-Vis مدل C-۲۶۰۰-۲۶۰۰ بود. جداسازی ها در ستون کروماتوگرافی C-18 با طول ۲۵ سانتیمتر، قطر درونی ۴/۶ میلی متر و پر شده با ذرات به ابعاد ۵ میکرومتر (250mm × 4.6mm, 5µm) دستگاه هواگیری مدل K-۲۶۰۰ صورت گرفت. حجم تزریقی ۲۰µl و دمای ستون، دمای محیط بودند. همچنین سرعت جریان فاز متحرک ۱ ml/min بود. سرنگ تزریق SGE با حجم ۱۰۰ میکرو لیتر ساخت کشور اندونزی بود.

- مجموعه ای از فیلترها شامل فیلترهای نایلونی با قطر منافذ ۰/۴۵ میکرو لیتر از جنس استات سلولز ساخت کشور آلمان، ارلن خلأ و پمپ خلأ جهت صاف کردن حلال های فاز

***** KNAUER EuroChrom مدل

جدول_ شرایط اولیه ی جداسازی با HPLC به همراه متغیرها

ستون	ترکیب فاز متحرک	نوع شویش	سرعت جریان	طول موج انتخابی nm	زمان بازداری	حجم تزریق
			ml/min		Min	μl
C-18	متانول و بافرامونیوم	گرادیانت	۱ و ۱/۵	۶۲۴, ۴۲۰	۲۵	۲۰
	استات و استونیتریل	ایزوکراتیک		۵۱۶, ۴۸۲		

خارج شدن برلیانت بلو برطرف گردید. حضور استونیتریل به عنوان یک حلال آلی قطبی توانست حلالیت آنالیت ها را در فاز استخراجی به شدت افزایش دهد. شرایطی را فراهم کند که راندمان استخراج بیشینه گردد. ولی همچنان مشکل رو هم افتادگی پیک ها حل نگردیده است. از جدول گرادیانت برای رفع مشکل رو هم افتادگی پیک ها استفاده گردید. مقدار بافر ها باید طوری تنظیم گردند که علاوه بر ایجاد حالت بهینه، رنگها طوری از ستون خارج شوند که پیکها کاملا از یکدیگر متمایز بوده و قابل تشخیص باشند. با جدولی که تعیین شد مخلوطی از ۴ رنگ تزریق گردید. رنگ برلیانت بلو (پیک چهارم) در دقیقه ۱۶/۲ در جدول UV 4 پیک داد و رنگ کارمیوزین (پیک سوم) در دقیقه ۱۵ در جدول UV3 و رنگ تارترازین (پیک اول) در دقیقه ۹ / ۱ در جدول UV1 و رنگ سان ست (پیک دوم) در دقیقه ۲ / ۱۲ در جدول UV2 پیکها نمایان شدند. پیک هایی که دیده شد خیلی به هم نزدیک بوده و در فاصله های زمانی کم از ستون خارج گردیدند. به همین دلیل از برنامه شویی دیگری استفاده گردید برنامه شویی بعدی جدول زیر می باشد.

پارامترهای اولیه مورد بررسی در جدول آورده شده است. به منظور دست یابی به زمان های جداسازی کوتاه و جلوگیری از مصرف زیاد حلال شست و شو و نیز تفکیک مناسب و متقارن پیک های آنالیتها، اثر ترکیب فاز متحرک و نیز سرعت جریان فاز متحرک بر زمان بازداری و نیز قدرت جداسازی آنالیت ها بررسی و بهینه گردید. کار با سرعت جریان بالا در طی جداسازی به دستگاه کروماتوگرافی فشار زیادی وارد خواهد آمد سعی شد تا از سرعت جریان ۱ ml/min در طی جداسازی استفاده شود. با مشخص شدن سرعت جریان به نوع شویش (گرادیانت و ایزو گرادیانت) پرداخته شد. در ابتدا از جدول ایزو گرادیانت استفاده شد. در روش ایزو گرادیانت مقدار آمونیوم استات و متانول را بارها تغییر دادیم. مشاهده شد که برلیانت بلو در دقیقه ۱۷/۹ خارج می شود به همین دلیل سعی شد از استونیتریل استفاده گردد. با استفاده از استونیتریل برلیانت بلو در دقیقه ۱۰/۹ از ستون خارج گردید. با استفاده از استونیتریل فاصله زمانی پیکها بیشتر شده در نتیجه مشکل رو هم افتادگی پیک ها و عدم جداسازی کمتر مشاهده شد. با افزودن مقدار استونیتریل برلیانت بلو در دقیقه ۶/۱ از ستون خارج گردید به این طریق مشکل دیر

جدول- بهینه سازی زمان جداسازی رنگها توسط درصد مناسبی از بافر

دقیقه	flow(ml/min)	محلول A (۸۰٪ امونیوم استات و ۱۰٪ استونیتریل و ۱۰٪ متانول)	محلول B (۶۵٪ امونیوم استات و ۲۵٪ استونیتریل و ۱۰٪ متانول)
۰	۱	۱۰۰	۰
۶	۱	۱۰۰	۰
۶/۲	۱	۰	۱۰۰
۱۰	۱	۰	۱۰۰
۱۰/۱۰	۱	۱۰۰	۰
۱۵	۱	۱۰۰	۰

آنالیز طولانتری داشت. در این حالت نیز تنها دو پیک تارتارازین و سانست یلو آشکارسازی شد. در ادامه از برنامه شویشی دیگری استفاده شد که در جدول زیر آورده شده است.

با این برنامه شویشی ذکر شده تنها رنگ تارتارازین در دقیقه ۴ و رنگ سانست یلو در دقیقه ۸/۵ آشکارسازی شدند و دو رنگ دیگر پیک ندادند. لذا از برنامه شویشی دیگری استفاده شد که مشابه برنامه شویشی قبلی بوده ولی زمان

جدول_بهینه سازی زمان جداسازی رنگها توسط درصد مناسبی از بافر

دقیقه	flow(ml/min)	محلول A (۰.۸٪ امونیوم استات و ۰.۱٪ استونیتریل و ۰.۱٪ متانول)	محلول B(۰.۶۵٪ امونیوم استات و ۰.۲۵٪ استونیتریل و ۰.۱٪ متانول)
۰	۱	۱۰۰	۰
۴	۱	۱۰۰	۰
۴/۵	۱	۰	۱۰۰
۱۷/۸	۱	۰	۱۰۰
۱۸	۱	۱۰۰	۰
۲۵	۱	۱۰۰	۰

برای رنگ برلیانت یلو بدست آمد. در ادامه با توجه به اهمیت آنالیز کینولین یلو، تحت شرایط بهینه جداسازی، به مخلوط ۴ رنگ مطالعه شده کینولین یلو هم اضافه شد و نتایج نشان داد که در این حالت کینولین یلو هم جداسازی خوبی دارد.

در نهایت با استفاده از برنامه شویسی ذکر شده در جدول زیر شرایط بهینه جداسازی مخلوط رنگ ها با تفکیک مناسب و بطور همزمان فراهم شد. زمان های بازداری تحت شرایط جداسازی بهینه برای رنگ ها به ترتیب در دقایق ۳/۵ برای رنگ تارترازین، ۴/۵ برای رنگ کینولین یلو، ۶/۵ برای رنگ سان ست یلو، ۱۱/۰ برای کارموزین و ۱۲/۰

جدول- بهینه سازی زمان جداسازی رنگها توسط درصد مناسبی از بافر

دقیقه	flow(ml/min)	محلول A (۰.۸٪ امونیوم استات و ۰.۱٪ استونیتریل و ۰.۱٪ متانول)	محلول B(۰.۶٪ امونیوم استات ۰.۲٪ استونیتریل و ۰.۱٪ متانول)
۰	۱	۱۰۰	۰
۳	۱	۱۰۰	۰
۴	۱	۰	۱۰۰
۱۸	۱	۰	۱۰۰
۱۹/۵	۱	۱۰۰	۰
۲۵	۱	۱۰۰	۰

۶- نمودار کالیبراسیون $R^2 \geq 0.99$ رنگها

در این تحقیق منحنی درجه بندی در نمونه های آبی تهیه شدند. جهت رسم منحنی، محلول های استاندارد مخلوط پنج رنگ با غلظت های ۱، ۲، ۴، ۶، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰ ppm تهیه شدند. سپس تحت شرایط بهینه جداسازی، محلول های استاندارد یک به یک به سیستم کروماتوگرافی تزریق شدند. با بررسی ارتباط بین سطح زیر منحنی حاصل از هر تزریق و غلظت هر یک از رنگ ها، معادله کالیبراسیون هر رنگ به صورت جداگانه جهت تعیین مقدار رنگ ها در نمونه های بستنی و پودر ژله و یخچک تعیین گردید.

طبق منحنی های استاندارد به دست آمده از هر رنگ، ضریب همبستگی برای رنگ سانسیت یلو، برلیانت بلو، کینولین یلو، تارترازین و کارموزین $R^2 \geq 0.99$ به دست آمد.

۶-۱ کمترین حد قابل تشخیص (LOD)

برای تعیین مقدار کمترین حد قابل تشخیص (LOD) برای هر رنگ پس از تزریق غلظت های مختلف از مخلوط دو رنگ، اولین پیک تشخیص رنگ در غلظت ۰/۲ که پیک بسیار کوچکی بود قابل مشاهده بود و حد تشخیص روش (LOD) نیز ۰/۲ تعیین شد.

+++++ Coefficient Variability
 §§§§§ Limit of Detection

+++++ Calibration Curve

پس از آن با افزایش غلظت، پیک های واضح تر و بلندتری مشاهده شد. به این ترتیب گستره خطی به دست آمد ۶۰-۰/۲ میلی گرم بر لیتر تعیین شد.

جدول_ نتایج حاصل از معتبر سازی و ارقام شایستگی

معادله کالیبراسیون	حد تشخیص روش (mg/L)	ضریب همبستگی (R ²)	گستره خطی (mg/L)	آنالیت
y = 39330X-3126	۰/۲	۰/۹۹۶	۰/۲ - ۶۰	سانست یلو
y = 40677X-1566	۰/۲	۰/۹۹۹	۰/۲ - ۶۰	تارترازین
y = 134947X+39023	۰/۲	۰/۹۹۸	۰/۲ - ۶۰	برلیانت بلو
y = 46410X+39532	۰/۲	۰/۹۹۷	۰/۲ - ۶۰	کارمیوزین
y = 60672X+67642	۰/۲	۰/۹۹۹	۰/۲ - ۶۰	کینولین یلو

۲-۶ تعیین تکرار پذیری (RSD)*****

تکرار پذیری روش که معیاری از دقت روش می باشد با پارامتری به نام انحراف استاندارد نسبی بیان می شود. برای محاسبه انحراف نسبی در یک روز کاری، تحت شرایط بهینه از محلول های استاندارد با غلظت های ۱ و ۱۰ میلی لیتر بر کیلو گرم از آنالیت ها ۶ بار تکرار شد. سپس انحراف استاندارد بدست آمده از سطح زیر پیک ها را در فرمول زیر قرار داده شدند. انحراف نسبی در ۷ روز متوالی به همین طریق از غلظت های ذکر شده برای آنالیت ها نیز طبق فرمول محاسبه شدند.

$$RSD = SD/X * 100$$

SD: انحراف استاندارد مطلق

X: میانگین داده ها

۳-۶ تعیین تکرار پذیری:

در این مرحله برای معتبر سازی روش استخراج و بررسی قابلیت کاربرد عملی روش پیشنهادی پارامتر های تجزیه ای

***** - Relative Standard Deviation

جدول-نتایج حاصل از معبرسازی و ارقام شایستگی

RSD	غلظت PPM	AVERAGE	STDEV	آنالیت
در یک روز				
۶/۹	۱	۴۵۸۶۹/۵۶	۳۱۶۵	سان ست یلو
۷	۱	۴۶۹۵۹/۶	۳۲۸۹/۴۲۱	تارترازین
۷/۵	۱	۵۰۱۴۰/۶۷	۳۷۸۵/۸۸	کارمیوزین
۵/۸	۱	۲۵۲۶۳۶/۷	۱۴۸۵۶/۱۱	برلیانت بلو
۷/۱	۱	۴۷۰۶۰/۸۵	۳۳۴۱/۳۲۱	کینولین یلو

جدول-نتایج حاصل از معبرسازی و ارقام شایستگی

RSD	غلظت PPM	AVERAGE	STDEV	آنالیت
در یک روز				
۶/۹	۱۰	۲۳۴۳۹۰/۶	۱۶۰۹۷/۴۳	سان ست یلو
۷/۱	۱۰	۲۴۷۸۶۰/۴	۱۷۸۱۶/۱۵	تارترازین
۷/۱	۱۰	۴۹۵۹۶۳	۳۵۵۰۹/۳۷	کارمیوزین
۶/۹	۱۰	۱۷۳۶۹۰۰	۱۲۰۷۶۲/۹	برلیانت بلو
۷	۱۰	۱۸۶۶۱۵۸/۵	۱۳۰۶۳۱/۱	کینولین یلو

۷- آنالیز نمونه های غذایی

برای بررسی کارایی روش پیشنهاد شده، نمونه های کنترلی نیز به این صورت تهیه شدند که مقدار مشخصی از مخلوط پنج رنگ (تارترازین، سان ست، کینولین، کارمیوزین، برلیانت) به آن افزوده شدند تا تطابق مقدار افزوده شده و بررسی شده را مشخص کند. برای استاندارد سازی از نمونه های غذایی (spike sample) که هیچ گونه رنگ مصنوعی در آنها به کار برده نشده بود ابتدا ۱۰۰ میکرولیتر از رنگ استخراج شده از ماده غذایی برداشته و با ۱۰۰ میکرو لیتر رنگ ۲۰ ppm ترکیب کرده. این ترکیب را درون ویال

ریخته. ترکیب بدست آمده را به دستگاه کروماتوگرافی تزریق کرده تا از صحت و درستی آزمون وعدم داشتن رنگ در نمونه اطمینان حاصل کنیم. برای استاندارد سازی نمونه های غذایی که دارای رنگ مصنوعی بودند ۱۸۰ میکرو لیتر از رنگ ماده غذایی آماده سازی شده را ۲۰ میکرو لیتر از رنگ ۱۰۰ppm ترکیب کرده. این ترکیب را درون ویال ریخته و بعد ترکیب بدست آمده را به دستگاه کروماتوگرافی تزریق کرده. با این روش میتوانیم از داشتن رنگ مصنوعی و محل پیک ها و اینکه نوع رنگ را درست حدس زده ایم اطمینان کامل حاصل می کنیم. این روش

زمینه بود. درصد بازیابی رنگ هایی که در محدوده ۹۰ تا ۱۱۰ به دست آمده اند نشان دهنده دقت و صحت در روش کار می باشد.

۸- نتایج مربوط به نمونه ها

نمونه های غذایی مورد آزمون شامل انواع بستنی، یخچک و پودر ژله بودند که کروماتوگرام های مربوط به نمونه بستنی یخی پس از آماده سازی نمونه، قبل از افزودن و بعد از افزودن مقدار کنترلی، آورده شده است.

در کروماتوگرام بدست آمده تنها دو پیک قبل از افزودن مقدار کنترلی مشاهده شد. این دو که مربوط به رنگ سان ست یلو که در دقیقه ۷/۷ و رنگ کارمیوزین در دقیقه ۲۰/۲۰ از ستون خارج شده اند. این کروماتوگرام مربوط به بستنی یخی دو رنگی (پرتقالی توت فرنگی) بوده و بعد از اندازه گیری سطح زیر منحنی و محاسبات صورت گرفته مشخص گردید که در این بستنی از رنگ کارمیوزین و سان ست یلو استفاده شده که استفاده از هر گونه رنگ مصنوعی خوراکی غیر مجاز بوده. همچنین پیک رنگ کارمیوزین و سان ست یلو بلندتر و با مساحت بیشتری نسبت به تزریق قبل از افزودن مقدار کنترلی تشکیل شده که به علت افزودن رنگ کنترلی به نمونه می باشد و اینکه مقدار رنگ کارمیوزین و سان ست افزایش پیدا کرده است.

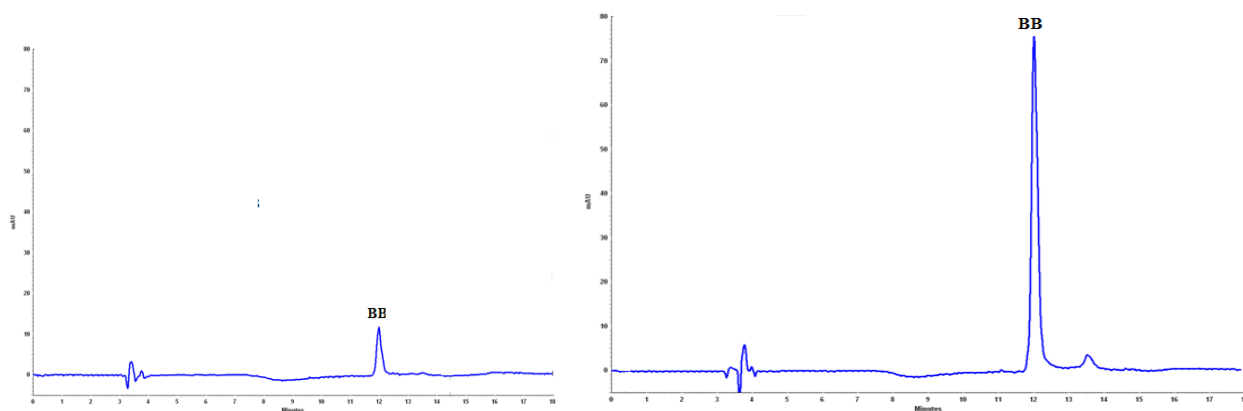
جهت اثبات درستی و صحت آزمون صورت گرفت تا از هر گونه خطای احتمالی مبرا گردد. مواد غذایی که فاقد رنگ مصنوعی بودند به آنها مقداری رنگ افزودیم و مورد آزمون مجدد قرار دادیم تا متوجه شویم اگر فرضاً این ماده غذایی دارای رنگ مصنوعی بود باید در این زمانها بر روی نمودار کروماتوگرام این پیک ها به ثبت می رسیدند.

نتایج بدست آمده از آنالیز داده ها بعد از تزریق نمونه های استاندارد شده به صورت زیر بوده، به گونه ای که بعضی از بستنی ها قبل از اسپیک در آنها هیچ یک از رنگها در آنها دیده نشده. مانند بستنی سیب ترش، آلویی، شاتوتی، زعفرانی میهن، فالوده ای، اسکویی چند رنگ، موزی k و پرتقالی و یخچک و ژله طالبی. در جدول زیر نمونه هایی که قبل از اسپیک دارای رنگ بوده اند آورده شده.

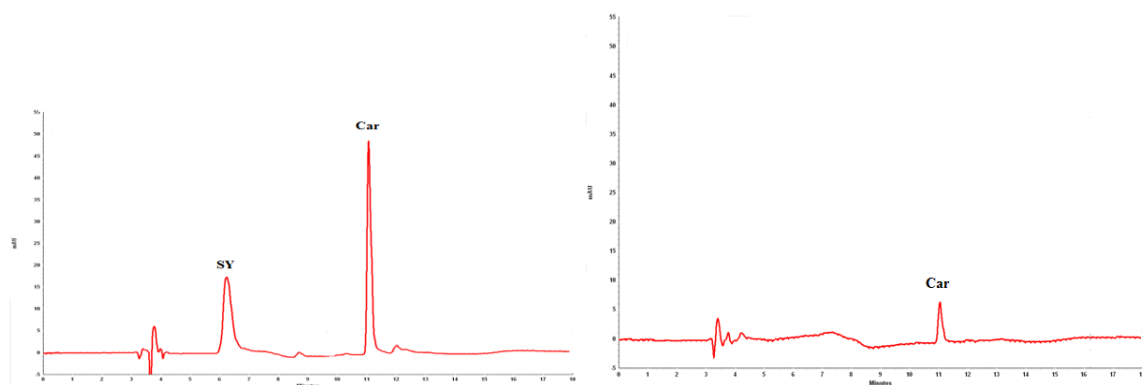
برای ارزیابی صحت روش مقادیری از استانداردهای رنگ های مذکور به صورت دستی (۲۰ ppm از مخلوط ۵ رنگ) به نمونه های حاوی رنگ اضافه شد به عنوان نمونه های کنترلی (Spike Samples) برای بررسی صحت نتایج اضافه شد. و درصد بازیابی رنگ ها مورد ارزیابی قرار گرفت. فرمول درصد بازیابی به صورت زیر است.

$$\text{درصد بازیابی} = \text{غلظت بدست آمده بر غلظت افزوده} * 100$$

با توجه به داده های جدول مقادیر استاندارد نمونه ها خارج از محدوده استاندارد نبوده که نشان دهنده ی این است که با استفاده از روش طراحی شده می توان به تقلبات صنایع غذایی پی برد. به دنبال تدوین راه حل های مؤثر در این



شکل - بستنی یخی دو رنگ قبل و بعد افزودن ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم مخلوط ۵ رنگ در طول موج ۶۲۰



شکل-بستنی بخی دو رنگ قبل و بعد افزودن ۱۰ میلی گرم بر کیلوگرم مخلوط ۵ رنگ طول موج ۵۱۶ نانومتر

محلول تزریقی به دست می آید. سپس با در نظر گرفتن مراحل مختلف آماده سازی و رقت های انجام شده می توان مقدار رنگ در نمونه های بستنی و ژله را بدست آورد. رنگ های به کاررفته در هر نمونه مورد آزمایش و غلظت هر رنگ در نمونه آورده شده است.

وجود هر گونه رنگ مصنوعی در بستنی غیر مجاز بوده ولی وجود رنگ خوراکی در ژله طبق شماره استاندارد ۷۴۰ که در سایت رسمی اداره استاندارد ایران (استاندارد ملی ایران، ش ۷۴۰، ۱۳۹۲) بیان شده بلا مانع است. مقدار رنگ ها در حد چند (mg/kg) می باشد. در ژله بیشینه مصرف کارمیوزین ۴ میلی گرم به ازای هر کیلو وزن فرد و بیشینه مصرف کینولین یلو در ژله ۵ میلی گرم به ازای هر کیلو وزن هر فرد بوده.

۹- تعیین غلظت رنگ های موجود در هر یک از

نمونه ها به وسیله HPLC

از مزایای روش کروماتوگرافی مایع توانایی تشخیص مقادیر ناچیز مواد می باشد. در مجموع این روش به دلیل حساسیت بالا، دقت، تکرارپذیری و کم بودن نقش خطای انسانی در آن برای تعیین کیفی و کمی رنگ ها بسیار مناسب است.

هر یک از محلول های به دست آمده از نمونه های بستنی و ژله ویخمک پس از آماده سازی به دستگاه تزریق شدند. پس از به دست آمدن کروماتوگرام حاصل از آن ها، با مقایسه زمان بازداری هر یک از پیک ها با زمان بازداری پیک های رنگ های استاندارد، نوع رنگ موجود در نمونه شناسایی می شود.

با جایگزینی سطوح زیر منحنی به دست آمده از هر تزریق در معادله کالیبراسیون رنگ مورد نظر، غلظت رنگ در

جدول_غلظت رنگ های به کار رفته در هر یک از نمونه های بستنی وژله

نمونه	تارترازین	کینولین ۱	سان ست یلو	کینولین ۲	کارمیوزین	برلیانت بلو	مقدار مجاز
بستنی هلویی	-	-	-	-	۶/۵۵	-	غیر مجاز
بستنی زعفرانی	-	-	-	-	-	-	مجاز
بستنی موزی	-	-	-	-	-	-	مجاز
بستنی بلوبری	-	-	-	-	-	۶/۶	غیر مجاز
بستنی آلبالویی	-	-	-	-	۱۱/۸۵	-	غیر مجاز
بستنی انار	-	-	-	-	۹۲/۱۵	-	غیر مجاز
بستنی پرتغالی	-	-	-	-	-	-	مجاز
بستنی سیب ترش	-	-	-	-	-	-	مجاز
بستنی آلویی	-	-	-	-	-	-	مجاز
اسکوپي چند رنگ	-	-	-	-	-	-	مجاز
بستنی فالوده ای	-	-	-	-	-	-	مجاز
بستنی شاتوتی	-	-	-	-	-	-	مجاز
یخچک	-	-	-	-	-	-	مجاز
ژله طالبی	-	-	-	-	-	-	مجاز
ژله هلو	-	۱۳/۰۵	-	۵/۹	۱۱/۴۵	-	مجاز

۱۰- نتیجه گیری

این مطالعه نشان داد عرضه کنندگان محصولات صنعتی بستنی خیلی کمتر امروزه از رنگهای مصنوعی خوراکی استفاده می کنند. خوشبختانه سطح آگاهی و سواد مردم بالا رفته و تنها به ظاهر مواد غذایی توجه نمی کنند و به سلامت خود و کودکانشان بیشتر اهمیت می دهند. با نظارت دقیق سازمانهای استاندارد و بهداشت اجازه گسترش کار به متخلفین در صنعت غذا که با سلامت و آینده جامعه در ارتباط است را نخواهد داد. در این تحقیق مشخص شد درصد بالایی از نمونه هایی که بر روی آنها بررسی صورت گرفت کمتر از رنگهای مصنوعی استفاده شده. با استانداردهای جامعه منطبق بوده است. اصلاح در زمان

نتایج موجود در جدول نشان می دهد که از میان ۱۳ نمونه بستنی که مورد بررسی قرار گرفت ۴ نمونه دارای رنگ مصنوعی کارمیوزین و برلیانت بلو بودند که مصرف رنگ مصنوعی در بستنی غیرمجاز بوده. از دو نمونه ژله ای که مورد بررسی قرار گرفت ژله هلو دارای رنگ کارمیوزین و کینولین یلو بوده که طبق استاندارد (استاندارد ملی ایران، ش ۷۴۰، ۱۳۹۲) مقداری که مصرف شده مجاز بوده. روی بسته بندی نمونه درج شده بود که از رنگ مصنوعی استفاده نشده که نمونه ها نیز فاقد رنگ مصنوعی بودند. با توجه به نتایج به دست آمده با این روش می توان به تقلبات صنایع غذایی پی برد.

Gordillo, Isabel M Vicario, Antonio J Meléndez-Martínez. 2012. Lycopene isomers in fresh and processed tomato products Correlations with instrumental color measurements by digital image analysis and spectroradiometry. *Food research international*. 50, p111-120.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2012.10.011>

1

5. Fuh, M R, Chia, K J. 2002. Determination of sulphonated azo dyes in food by ion-pair liquid chromatography with photodiode array and electrospray mass spectrometry detection. *Talanta*. 56, P. 663-671.

6. Guler Z. 2005. Determination of synthetic colorants in confectionery and instant drink powders consumed in turkey using uv/vis spectrophotometry. *Food Qual.No.* 28, P. 98-108.

7. Iranian standard organization site. 2011. Available from: <http://www.isiri.org>.

8. Long, Ch, [etal]., 2011, A new liquid-liquid extraction method for determination of 6 azo-dyes in chilli products by high-performance liquid chromatography, *Food Chemistry*. 126, P. 1324-1329

9. Minioti, S K, Sakellariou, FC, Thomaidis SN. 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*, No. 583, P. 103-110.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.aca.2006.10.002>

10. Ming Maa, Xubiao Luoa, Bo Chen, Shengpei Su, Shouzhuo Yao. 2006. Simultaneous determination of water-soluble and fat-soluble synthetic colorants in foodstuff by high-performance liquid chromatography-diode array detection-electrospray mass spectrometry, *Journal of Chromatography A*. 1103, p170-176

<http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2005.11.061>

1

11. MS El-Shahawi, A Hamza, AA Al-Sibaa, AS Bashammakh, HMc Al-Saidi. 2013. A new method for analysis of sunset yellow in food samples based on cloud point extraction prior to spectrophotometric determination. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*. 19, p.529-535

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jiec.2012.09.008>

فرایند تولید و همچنین ارتقای سطح فرهنگ تولید کنندگان و سخت گیری های صورت گرفته از طرف سازمانهای مسئول بر تولید مواد غذایی تولید شده سبب شده تا بر سلامت محصول تولید شده بیفزاید. افزودن رنگ های طبیعی خوراکی (مانند بتاکاروتن، آنتوسیانین، کلروفیل، زعفران رنگ های قرمز چغندر ...) مطابق استاندارد ملی ایران شماره ۷۴۰ (استاندارد ملی ایران، ش ۷۴۰، ۱۳۹۲)، در تهیه انواع بستنی یخی میوه ای، بستنی شیری (بدون چربی نباتی) میوه ای و بستنی میوه ای طعم دار یا در روکش آنها متناسب با طعم یا نوع میوه مصرفی مجاز می باشد. استفاده از رنگ های مجاز خوراکی سنتتیک در بستنی و کلیه مواد به کاررفته در آن، اکیداً ممنوع می باشد.

۱۱- پیشنهادات

در جهت رسیدن به اهداف فوق پیشنهادات زیر مطرح می شود:

- ۱- بررسی به کارگیری روش ارائه شده برای سایر رنگ ها
- ۲- بررسی امکان استفاده از سایر ستون های کروماتوگرافی به منظور جداسازی بهتر
- ۳- بررسی استفاده از آشکارسازهای مختلف به منظور اندازه گیری مقادیر پایین تر

۱۲- منابع

1. Alghamdi, A H. 2002. Binding ability of Allura Red with food proteins and its impact on protein digestibility, *AOAC intl.* 88, P. 93-1387.
2. Bonan, S, Fedrizz, G, Menotta, S, Elisabetta C. 2013. Simultaneous determination of synthetic dyes in foodstuffs and beverages by high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector, *Dyes and Pigments*. 99, P. 36-40.
3. CFSAN/office of cosmetic and color, 2003, Color Additive, FDA's Regulatory Process and Historical Perspectives, Available from: <http://www.cfsan.fda.gov/~dms/dms/colregu.html>.
4. Carla M Stinco, Francisco J Rodríguez-Pulido, María Luisa Escudero-Gilete, Belén

<http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2007.09.015>
 19.Zou T, He P, Yasen, A, Li, Zh. 2013. Determination of seven synthetic dyes in animal feeds and meat by high performance liquid chromatography with diode array and tandem mass detectors. Food Chemistry. No. 138, P. 1742–1748
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.11.084>

12.M Lourdes Gonza'lez-Miret , Fernando Ayala , Anass Terrab , J Federico Echa'varri ,A Ignacio Negueruela , Francisco J Heredia.2007.Simplified method for calculating colour of honey by application of the characteristic vector method. Food Research International .40,1080–1086.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2007.06.001>

13.Roberto Sebastiano, Nunzia Contiello, Stanislao Senatore, Pier Giorgio Righetti, Attilio Citterio.2012. Analysis of commercial Acid Black 194 and related dyes by micellar electrokinetic chromatography.Dyes and Pigments.94,258-265.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.dyepig.2011.12.014>

14.Sarah S Saleh, Hayam M Lotfy , Nagiba Y Hassan , Samia M Elgizawy.2012. A comparative study of validated spectrophotometric and TLC-spectrodensitometric methods for the determination of sodium cromoglicate and fluorometholone in ophthalmic solution. Saudi Pharmaceutical Journal .21, 411–421.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.jsps.2012.11.001>

15.Tuba Erkaya, Elif Dağdemir, Mustafa Şengül.2012. Influence of Cape gooseberry (*Physalis peruviana* L.) addition on the chemical and sensory characteristics and mineral concentrations of ice cream.food research international.45.331-335.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.09.013>

3

16.Wood R, Foster L, Damant, A, Key P. 2004, Analytical methods for food Additives.Wood head Publishing Ltd. P. 35-72.

17.Wu, H, [etal]. 2013. A rapid shaking based ionic liquid dispersive liquid phase microextraction for the simultaneous determination of six synthetic food 48. colourants in soft drinks, sugar and gelatin-based confectionery by high-performance liquid chromatography. Food Chemistry.141, P. 182–186.

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.03.015>

18.Yoshioka, N, Ichihashi, K. 2008. Determination of 40 synthetic food colors in drinks and candies by high-performance liquid chromatography using a short column with photodiode array detection. Talanta. 74, P.1408–1413.