مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال یازدهم، شماره 1، بهار 1395، صفحات 106-95

توسعه و معتبرسازی روش میکرواستخراج مایع - مایع پخشی جفت شده با اسپکتروفتومتری برای استخراج و اندازه‌گیری رنگ کارموزین در مواد غذایی

پریسا امینی کادیجانی[1]، محمد فرجی[2]، مریم سلامی[3]

1- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی گرایش شیمی مواد غذایی، دانشکده علوم و فناوری‌های نوین، دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم دارویی، تهران، ایران
2- نویسنده مسئول: استادیار گروه پژوهشی مواد غذایی، پژوهشکده صنایع غذایی و کشاورزی، پژوهشگاه استاندارد، کرج، ایران. پست الکترونیکی: mfaraji@standard.ac.ir
3- گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، پردیس کشاورزی دانشکده مهندسی و فناوری کشاورزی، دانشگاه تهران، ایران

تاریخ دریافت: 94/2/25 تاریخ پذیرش: 94/6/10

چکیده

سابقه و هدف: رنگ‌های مصنوعی گروهی بسیار مهمی از افزودنی‌های خوراکی هستند. آنها به طور گسترده‌ای در سراسر جهان در صنایع غذایی و خوراک دام به دلیل قیمت پایین، اثر بخشی بالا و پایداری فوق‌العاده، به کار برده می‌شوند. در این تحقیق، روش ساده، سریع و حساسی با عنوان میکرو استخراج مایع-مایع پخشی جفت شده با اسپکتروفتومتری برای اندازه‌گیری مقادیر کم کارموزین در مواد غذایی پیشنهاد شد.

مواد و روش‌ها: در ابتدا عوامل مؤثر برکارایی استخراج کارموزین شامل نوع و مقدار حلال استخراج کننده و پخش شونده، pH محلول رنگ، درصد نمک، مقدار معرف زوج یون کننده مطالعه و بهینه شدند. در ادامه به‌منظور اعتباربخشی روش پیشنهادی، از سیستم کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا استفاده شد.

یافته‌ها: تحت شرایط بهینه، رفتار خطی خوبی در کل گستره غلظتی (10-2000 μg/L) با ضریب همبستگی خوب (0/ 9993) به دست آمد. انحراف استاندارد نسبی بر پایه شش اندازه‌گیری مکرر در سطح غلظتی 250 μg/L، 6% بود. درصد استخراج 90% بود و همچنین حد تشخیص روش پیشنهادی 2 μg/L بود.

نتیجه گیری: روش استخراجی میکرواستخراج مایع-مایع پخشی جفت شده با اسپکتروفتومتری در اندازه‌گیری کارموزین (درصد بازیابی‌های بالاتر از 95%) در غلظت‌های کم (در حد μg/L)، از صحت خوبی برخوردار است.

واژگان کلیدی: کارموزین، میکرواستخراج مایع-مایع پخشی، اسپکتروفتومتری،کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

• مقدمه

رنگ‌های مصنوعی گروهی از افزودنی‌های خوراکی هستند که به دلیل کمبود منابع رنگ‌های طبیعی و پایداری کم و قیمت بالای این‌گونه رنگ‌ها به‌تدریج پا به عرصه صنعت غذا گذاشتند. گرچه در سال‌های اخیر مقدار مجاز رنگ‌های مصنوعی به دلیل اثراتی که روی سلامتی مصرف‌کننده می‌گذارند، کاهش یافته است ولی این رنگ‌ها در سراسر جهان به‌طور گسترده استفاده می‌شود. این دسته از ترکیبات از سال 1880 به‌صورت قانونی به‌منظور فراهم آوردن ظاهری مطلوب در ماده غذایی که موجب جذاب‌تر شدن و اشتهاآور شدن آن برای مصرف‌کننده می‌شود، به مواد غذایی اضافه می‌شوند. همچنین برای جبران از دست دادن رنگ طبیعی غذا که در طول فرایند و ذخیره‌سازی از بین می‌رود استفاده می‌شود و مقاومت بالایی که در برابر تجزیه نور برای حفظ طعم و ویتامین‌ها دارند، کاربرد دارند (2، 1).

بسیاری از رنگ‌های مصنوعی مقاومت خوبی در برابر تجزیه شدن داشته و خطر زیادی برای سلامتی انسان و حیوان ندارند، اما ممکن است برخی از این مواد و متابولیت‌های آن به‌ویژه هنگامی که در مقادیر بیش از حد مصرف شوند خطرات سلامتی بالقوه‌ای را برای انسان ایجاد کنند. اثرات جانبی که رنگ‌های مصنوعی روی سلامتی انسان می‌گذارند شامل واکنش‌های آلرژیک و آسم، پیش فعالی کودکان، آسیب DNA، سرطان می‌باشند. به همین دلیل استفاده از رنگ‌های

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-02-02]

مصنوعی در مواد غذایی در سراسر جهان به‌طور جدی کنترل می‌شود، در نتیجه روش‌های دقیق و قابل اعتماد برای اطمینان از ایمنی مواد غذایی مورد نیاز است (4، 3). روش‌های آنالیز متعددی برای تعیین رنگ‌های مصنوعی در نوشیدنی‌ها، آبمیوه‌ها، ژله‌های میوه، شیرینی‌جات، بافت‌های خوراکی حیوانی و ادویه‌جات ارائه شده است. برخی از این روش‌ها عبارت است از: الکتروفورز لوله موئین (5)، ولتامتری (6)، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، کروماتوگرافی فاز معکوس، کروماتوگرافی لایه نازک، الکتروشیمی، اسپکترو فوتومتری و غیره (7).

کارموزین (آزوروبین) یک رنگ مصنوعی محلول در آب است که از آن جهت تولید رنگ قرمز مایل به آبی استفاده می‌شود و در طبقه رنگ‌های آزو دسته‌بندی می‌شود. این رنگ با ترکیبی از رنگ‌های دیگر برای تولید یک رنگ مطلوب استفاده می‌شود. رنگدانه خالص قدرت رنگی بالایی با ماکزیمم جذب 516 نانومتر در آب دارد.کارموزین برای پایداری در برابر نور مناسب است. مقدار مصرف روزانه قابل قبول آن mg/Kg 0-4 به ازای هر کیلوگرم وزن انسان است که توسط JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives) تعیین شده است (8). این رنگ در ایالات متحده و کانادا مصرف ندارد (9) اما مطابق استاندارد ملی ایران به شماره 740 یکی از رنگ‌های مجاز برای محصولات قنادی و دسرها در ایران می‌باشد. گزارشاتی از طرف سازمان ملی استاندارد و سازمان غذا و دارو مبنی بر استفاده غیر مجاز یا بیش از حد از رنگ کارموزین در محصولات غذایی مختلف وجود دارد که تاکنون روش آزمون معتبری برای اندازه‌گیری کمی آن راه اندازی نشده است. همچنین لازم به ذکر است که کارموزین یکی از پرمصرف‌ترین رنگ‌های مصنوعی مجاز خوراکی در صنایع غذایی ایران و جهان نیز می‌باشد.

با وجود پیشرفت‌های قابل توجه در زمینه فناوری‌های آنالیزی، اکثر دستگاه‌های تجزیه‌ای نمی‌توانند به‌طور مستقیم برای آنالیز ماتریس نمونه‌های پیچیده به کار روند. در نتیجه مرحله آماده‌سازی نمونه، قبل از آنالیز دستگاهی الزامی می‌باشد. از جمله روش‌های استخراجی که برای تعیین و شناسایی آنالیت مورد استفاده قرار گرفته است استخراج مایع مایع LLE (Liquid Liquid Extraction) و نیز استخراج فاز جامد SPE (Solid Phase Extraction) می‌باشند. امروزه روش‌های استخراجی فوق به دلیل مصرف زیاد حلال آلی و نیاز به حلال پراکنی آن و در نتیجه امکان هدر رفت آنالیت و همچنین طولانی بودن مدت زمان انجام آزمایش، کمتر مورد استفاده قرار می‌گیرند. تحقیقات در جهت حذف و یا تقلیل معایب فوق، منجر به استفاده از روش‌های میکرواستخراجی از جمله تکنیک میکرواستخراج مایع-مایع پخشی DLLME (Dispersive liquid-liquid microextraction) به‌منظور استخراج و تعیین دقیق مقادیر بسیار کم انواع گونه‌ها در بافت‌های مختلف نمونه شده است (10).

استخراج مایع- مایع پخشی، اولین بار توسط رضایی و اسدی در سال 2006 ارائه شده است. این روش به‌منظور شناسایی ترکیبات آلی در آب مورد استفاده قرار گرفته است. این روش، روشی ساده و سریع بوده و در آن سه فاز مایع مورد استفاده قرار می‌گیرد: 1- فاز استخراج کننده: دارای دانسیته متفاوتی نسبت به آب است مانند تتراکلرو اتیلن، کلروفرم، تترا کلرید کربن (سنگین‌تر از آب)؛ اکتانول، آندودکانول (سبک‌تر از آب) 2- حلال پخش کننده: باید حلالیت بالایی در هر دو فاز استخراج کننده و فاز آبی را دارا باشد مانند متانول، اتانول، استون، استونیتریل 3- فاز آبی که گونه مورد نظر در آن قرار دارد.

هنگامی که فاز استخراج کننده و پخش کننده مخلوط شده و با سرعت به درون محلول نمونه تزریق شوند، حلال استخراج کننده به‌واسطه حلال پخش کننده به‌طور یکنواخت و کامل در فاز آبی پخش می‌شود و قطره‌های بسیار ریز حلال استخراج کننده منجر به کدر شدن محلول نمونه می‌شود. در این حالت سطح تماس بین حلال استخراج کننده و فاز آبی بسیار بزرگ شده در اثر ایجاد تعادل سریع، زمان استخراج بسیار کوتاه و در حد چند ثانیه می‌شود. سپس حلال استخراج کننده حاوی آنالیت به راحتی توسط سانتریفیوژ جداسازی و آنالیز می‌شود. از جمله مزایای این تکنیک می‌توان به حساسیت و گزینش پذیری بالای روش، بازده بالای استخراج، سرعت زیاد و استفاده از حجم کم حلال آلی اشاره کرد. با توجه به مزایای ذکر شده، این تکنیک می‌تواند کاربرد وسیعی را در زمینه آنالیز مواد غذایی داشته باشد (11).

در پژوهشی که در سال 2013 توسط Wu و همکاران انجام شد، از روش میکرو استخراج مایع-مایع پخشی همراه با کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا برای تعیین شش نوع رنگ مصنوعی در نوشیدنی‌ها و شیرینی‌های بر پایه شکر و ژلاتین استفاده کردند. این روش به‌صورت موفقیت‌آمیزی برای استخراج و آنالیز نمونه‌های حقیقی به کار برده شد و درصدهای بازیابی خوبی در گستره 95/8-104/5% به دست

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-02-02]

آمد (12). در پژوهش دیگر که در سال 2011 توسط Hongyuan و همکاران انجام شد از روش میکرو استخراج مایع-مایع پخشی برای تعیین چهار نوع رنگ سودان در زرده تخم‌مرغ استفاده کرده که درصد بازیابی‌های خوبی (87%) نیز به دست آوردند (13).

هدف از انجام این تحقیق، راه اندازی و معتبر سازی روش آزمون استاندارد بر اساس تکنیک میکرو استخراج مایع-مایع پخشی جفت شده با اسپکتروفتومتری برای شناسایی و تعیین مقدار رنگ کارموزین در برخی از مواد غذایی مانند نوشیدنی‌ها، دراژه‌ها، لواشک‌ها و ژله‌ها می‌باشد.

• مواد و روش‌ها

دستگاه‌ها: اندازه‌گیری‌های اسپکتروفتومتری با دستگاه اسپکتروفتومتری Varian مدل Cary 1e (ساخت کشور آلمان) مجهز به سل کوارتز 350 ماکرولیتری در طول موج ماکزیمم کارموزین (515 nm) انجام گرفتند. تنظیم pH محلول‌ها با دستگاه pH متر، مدل WTW Inolab (ساخت کشور آلمان)، صورت گرفت. آب یون زدائی شده توسط دستگاه خالص‌سازی آب ساخت شرکت Aqua Max-Ultra Youngling (کره جنوبی، سئول) تهیه گردید. جهت سانتریفیوژ نمونه‌ها از سانتریفیوژ ساخت شرکت پویا الکتریک ایران استفاده شد. دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) مورد استفاده KNAUER مدل EuroChrom ساخت کشور آلمان مجهز به پمپ چهار کاناله مدل K-1001 و آشکارساز UV-Vis و degasser مدل K-2600 بود. جداسازی‌ها در ستون کروماتوگرافی C-18 (250 میلی متر × 4/6 میلی متر، قطر ذرات 5 میکرومتر) انجام شد. حجم تزریقی 20 µl و دمای ستون، دمای محیط بود. همچنین سرعت جریان فاز متحرک 1 ml/min بود.

مواد شیمیایی و استانداردها: تمامی مواد شیمیایی به کار رفته دارای درجه‌ی خلوص تجزیه‌ای بودند. رنگ کارموزین با خلوص بالای 95% از شرکت ریدل-آروم (Seelze, Germany) تهیه شد. اتانول، کلروفرم، متانول، استون، استونیتریل، تتراکلرواتیلن و تترا کلرید کربن، هیدروکسید سدیم، تترا بوتیل آمونیوم بروماید (TBAB)، از شرکت مرک آلمان خریداری شدند. محلول استاندارد پایه (200 mg/l) کارموزین با توزین مقدار مناسبی از استاندارد رنگ و به حجم رساندن با آب مقطر تهیه شد. محلول‌های استاندارد کاری با رقیق‌سازی مناسب محلول پایه با آب مقطر تهیه شدند. همچنین محلول پایه‌ی TBAB (0/05 mol/L) با حل‌کردن مستقیم مقدار مناسبی از TBAB در آب مقطر تهیه شد. برای تنظیم pH محلول‌ها از محلول سدیم هیدروکسید و هیدروکلریک اسید 0/1 مولار استفاده شد.

تهیه و آماده‌سازی نمونه‌ها: نمونه‌های بستنی میوه‌ای، تافی، آدامس، ژله، لواشک، نوشیدنی‌های میوه‌ای که بر اساس اطلاعات و تجربیات قبلی موجود در سازمان ملی استاندارد، احتمال استفاده از رنگ کارموزین در آنها وجود داشت، از فروشگاه‌های مواد غذایی داخل شهر تهران تهیه شدند. محصولات از برندهای مختلف انتخاب شدند. لازم به ذکر است که به دلیل عدم امکان اندازه‌گیری همزمان چند رنگ توسط دستگاه اسپکتروفتومتر، نمونه‌های انتخابی باید همرنگ و تنها حاوی کارموزین باشند. به‌منظور حصول اطمینان از وجود یک رنگ (کارموزین) در نمونه‌ها قبل از آماده‌سازی نمونه‌ها برای فرآیند میکرواستخراج تست کروماتوگرافی لایه نازک TLC (Thin Layer Chromatography) انجام شد. در مورد نمونه‌های جامد مانند ژله‌ها، ابتدا 5 گرم نمونه ژله توزین شده و با 15 میلی‌لیتر آب مقطر رقیق شد. سپس 1/2 میلی‌لیتر از محلول رقیق شده در بالن ژوژه 50 میلی‌لیتری با آب مقطر به حجم رسانده شد. در مورد نمونه‌های مایع، ابتدا 0/5 میلی‌لیتر از نمونه با استفاده از پیپت برداشته شده و در بالن 50 به حجم رسانده شد. در نهایت محلول‌های تهیه شده بدون هیچ‌گونه آماده‌سازی اضافی مانند فیلتراسیون و سانتریفیوژ کردن تحت فرآیند میکرواستخراج قرار گرفتند.

روش استخراج: در هر آزمایش، 7/7 mL از محلول رنگ با غلظت $250\ \mu g/L^{-1}$ به یک بشر 50 میلی‌لیتری منتقل شده و pH آن روی 4 تنظیم می‌شود. سپس 0/3 میلی‌لیتر از محلول TBAB به بشر اضافه شده و بعد از هم زدن، محلول حاصل به یک لوله شیشه‌ای ته مخروطی (ظروف مخصوص روش میکرو استخراج مایع-مایع پخشی) انتقال داده شد. تحت این شرایط، مخلوط مناسب و یکنواخت شده حلال استخراج کننده و حلال پخش کننده با استفاده از سرنگ 5 mL به داخل محلول آبی تزریق شد. محلول کدر به وجود آمده به مدت 5 دقیقه با دور 4000 rpm سانتریفیوژ شد. بعد از سانتریفیوژ کردن، قطرات پخش شده حلال استخراج کننده در ته لوله ته‌نشین می‌شود. فاز ته‌نشین شده با سرنگ به‌طور کامل جداسازی شده و جهت آنالیز مقدار رنگ نمونه، به سل 350 میکرولیتری دستگاه اسپکترومتری منتقل شده و در طول موج 515 nm اندازه‌گیری‌ها انجام شد. در روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا فاز ته‌نشین شده تحت جریان گاز نیتروژن تبخیر

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-02-02]

شده و رنگ خشک شده، مجدداً در 350 میکرولیتر فاز متحرک مجدد حل شد و طبق روش Yoshioka و همکاران با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا آنالیز شد (4).

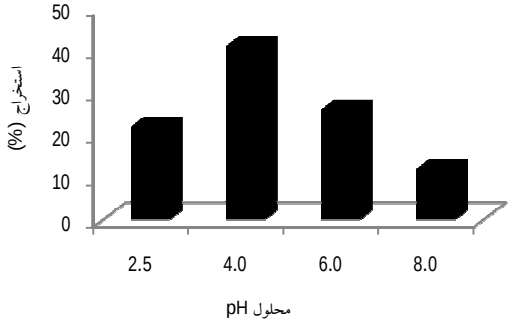
بهینه‌سازی عوامل مؤثر در راندمان استخراج: بهینه‌سازی پارامترهای مورد نظر شامل: pH نمونه استخراجی در چهار سطح (2/5 ، 4، 6، 8) انتخاب شد و اثر هر یک از مقادیر بر راندمان استخراج ارزیابی گردید. نوع و میزان حلال استخراج کننده و پخش شونده، حلال‌های استخراج کننده شامل: کلروفرم، تترا کلرواتیلن و تتراکلرید کربن که تحت شرایط یکسان مورد آزمایش قرار گرفتند. در ادامه برای بررسی اثر حجم حلال استخراج‌کننده بر کارایی استخراج، حجم‌های مختلفی از حلال استخراج کننده (500، ۶۰۰،۷۰۰، 800، 900 میکرولیتر) به 5 /1 میلی‌لیتر متانول اضافه شد. برای انتخاب نوع حلال پخش کننده از حلال‌های اتانول، متانول، استون و استونیتریل استفاده شد. . برای این منظور 1/5 میلی‌لیتر از هر کدام حلال‌های پخش‌کننده که حاوی 500 میکرولیتر از حلال استخراج کننده بودند، مورد استفاده قرار گرفت. برای بررسی اثر غلظت نمک بر درصد استخراج کارموزین، چون در فرآیندهای استخراج معمولاً افزایش نمک به دلیل پدیده خروج نمک منجر به افزایش راندمان استخراج می‌شود، از این‌رو تأثیر افزایش نمک بر کارایی استخراج در محدوده صفر تا 10 درصد وزنی - حجمی سدیم کلرید در فاز آبی بررسی شد. برای بررسی تأثیر افزودن زوج یون کننده بر درصد استخراج کارموزین، به دلیل اینکه رنگ کارموزین یک ترکیب آنیونی می‌باشد و امکان استخراج مستقیم آن به درون حلال‌های آلی وجود ندارد، بنابراین تترا بوتیل آمونیوم بروماید (TBAB) به‌عنوان زوج یون کننده کاتیونی مناسب به محلول رنگ اضافه شد. برای بررسی اثر حجم زوج یون کننده، حجم‌های مختلفی از زوج یون کننده (0، 2/5، 5/0، 10/0، 15/0، 20/0 و 25/0 میلی مول بر لیتر) تحت شرایط بهینه حلال استخراج کننده و پخش شونده به محلول رنگ اضافه شد.

آنالیز آماری: در این تحقیق پارامترهای آماری میانگین، انحراف استاندارد، ضریب تغییرات C.V. (Coefficient of Variation)، ضریب همبستگی منحنی کالیبراسیون با استفاده از نرم‌افزار EXCELL محاسبه و برای تجزیه و تحلیل آماری نتایج استفاده شدند. همچنین با استفاده از روش Paired t-test در سطح اطمینان 95 درصد (p=0/05) اختلاف نتایج دو روش اسپکتروفتومتری و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا محاسبه شد.

• یافته‌ها

از جمله پارامترهای مؤثر بر فرآیند میکرواستخراج کارموزین در آماده‌سازی نمونه‌های مواد غذایی pH محلول نمونه، نوع و حجم حلال استخراجی، نوع و حجم حلال پخش شونده، مقدار زوج یون کننده و مقدار نمک می‌باشند.

اثر pH بر راندمان استخراج کارموزین: شکل 1 نشان می‌دهد که بالاترین میزان استخراج در pH=4 حاصل شده است.



شکل1. اثر pH بر درصد استخراج کارموزین

اثر نوع و میزان حلال استخراج کننده و پخش شونده بر راندمان استخراج کارموزین: در به کارگیری تکنیک میکرواستخراج مایع- مایع پخشی، نوع حلال استخراج کننده و نوع حلال پخشی در مقدار استخراج آنالیت تأثیرگذار می‌باشند. پس از تزریق مشاهده شد بیشترین استخراج با کلروفرم صورت گرفت و با حلال‌های تترا کلرواتیلن و تتراکلرید کربن اصلاً استخراجی صورت نمی‌گیرد. بنابراین کلروفرم به‌عنوان حلال استخراج کننده انتخاب شد.

برای بررسی اثر حجم حلال استخراج‌کننده بر کارایی استخراج، مشاهده شد که با افزایش حجم کلروفرم از 500 به 900 میکرولیتر حجم فاز ته‌نشین شده از 360 به 860 میکرولیتر افزایش یافت. بر اساس نتایج، راندمان استخراج آنالیت در حجم کلروفرم در 500 میکرولیتر بیشینه است.

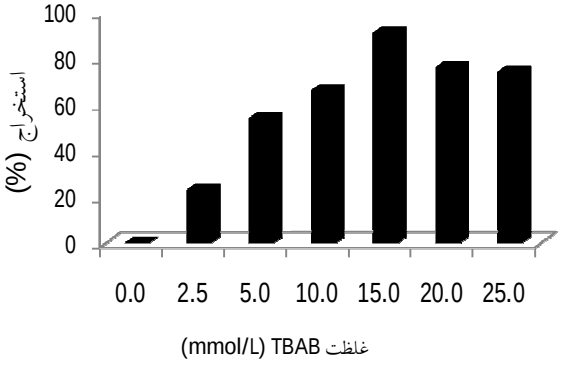
نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهد، با استفاده از اتانول به‌عنوان حلال پخش کننده به راندمان‌های بالاتری می‌توان دست یافت. در ادامه برای بررسی اثر حجم حلال پخش شونده، حجم‌های مختلفی از اتانول (0/5، 1، 1/5، 2 میلی‌لیتر) به 500 میکرولیتر کلروفرم افزوده شد. بر اساس

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-02-02]

نتایج به‌دست‌آمده، با افزایش حجم اتانول تا 1/5 میلی‌لیتر شاهد افزایش راندمان استخراج بودیم و سپس با کاهش مواجه شدیم.

اثر غلظت نمک بر درصد استخراج کارموزین: نتایج نشان می‌دهد که با افزایش درصد نمک، درصد استخراج کاهش می‌یابد.

تأثیر افزودن زوج یون کننده بر درصد استخراج کارموزین: با افزایش حجم تترا بوتیل آمونیوم بروماید(TBAB) مشاهده شد که بالاترین راندمان استخراج در حجم 15 میلی مول بر لیتر بیشینه است. نتایج در شکل 2 آورده شده است.



شکل2. تأثیر افزودن زوج یون کننده بر درصد استخراج کارموزین

معتبرسازی روش آزمون: جدول 1 برخی از پارامترهای تجزیه‌ای روش از قبیل فاکتور تغلیظ PF (Preconcentration Factor) ، راندمان استخراج ER% (Extraction Recovery)، حد تشخیص LOD (Limit of Detection)، درصد انحراف استاندارد نسبی (RSD%)، ضریب همبستگی نمودار کالیبراسیون و محدوده خطی را ارائه می‌دهد. به‌منظور رسم منحنی کالیبراسیون و تعیین گستره ی خطی روش،محلول‌های آبی استاندارد رنگ کارموزین در غلظت‌های 1 mg/l و 10 mg/l تهیه گردید و سپس رقت‌های مختلف محلول‌های رنگ (در محدوده 10-2000 µg/l) جهت رسم منحنی کالیبراسیون مورد استفاده قرار گرفت. درصد انحراف استاندارد نسبی روش با انجام 6 آزمایش تکراری در یک روز و در چند روز متوالی با استفاده از محلول استاندارد رنگ کارموزین در غلظت 250 µg/l تحت شرایط بهینه انجام گرفت. محاسبه درصد بازیابی روش با استفاده از نمونه‌های مواد غذایی که 250µg/l رنگ کارموزین به‌صورت دستی به آنها اضافه شده بود، محاسبه گردید. به‌منظور محاسبه فاکتور تغلیظ، محلول استاندارد رنگ کارموزین با غلظت‌های 1، 5، 10، 15 میلی‌گرم در لیتر در آب تهیه شد. سپس با تقسیم شیب منحنی کالیبراسیون پس از پیش تغلیظ به شیب منحنی کالیبراسیون بدون پیش تغلیظ (مستقیم) مقدار فاکتور تغلیظ 17 به دست آمد. مقدار حد تشخیص روش نیز با استخراج و اندازه‌گیری مقادیر بسیار کم‌رنگ در گستره 1-10 µg/l ، به‌صورت عملی 2 به دست آمد.

آنالیز نمونه‌های حقیقی: کاربرد روش DLLME (Dispersive Liquid Liquid Microextraction) در استخراج و اندازه‌گیری کارموزین در نمونه‌های مواد غذایی از برندهای مختلف که از فروشگاه‌های مواد غذایی در سطح شهر تهران تهیه گردیده بودند بررسی شد. به‌منظور ارزیابی کارایی روش پیشنهادی، نمونه‌ها تحت فرآیند میکرو استخراج مایع-مایع پخشی جفت شده با دستگاه اسپکتروفتومتری با 2 تکرار قرار گرفتند و مقادیر میانگین یافت شده از کارموزین موجود در نمونه‌ها گزارش گردید. نتایج حاصل از این بررسی در جدول2 آورده شده است. همچنین صحت روش با استفاده از مقدار مشخص اضافه شده به نمونه‌های انتخابی و محاسبه درصد بازیابی مورد بررسی و ارزیابی قرار گرفت.

$$\%Recovery= \frac{C_{found}}{C_{initial}+C_{added}} \times 100$$

C_{found}: غلظت به‌دست‌آمده (اندازه‌گیری شده) برای نمونه اسپایک شده

$C_{initial}$: غلظت اولیه به‌دست‌آمده برای نمونه قبل اسپایک

C_{added}: غلظت اضافه شده به نمونه

جدول1. ارقام شایستگی روش پیشنهادی

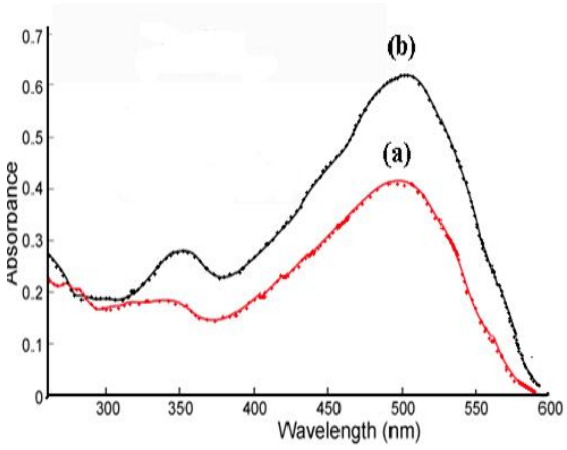
رنج خطی (µg/L)	ضریب همبستگی	فاکتور تغلیظ	حد تشخیص (µg/L)	درصد استخراج	درصد تکرارپذیری	
					یک روز (n=6)	چند روز (n=6)
10-2000	0/9993	17	2	91	4/5	6/6

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-02-02]

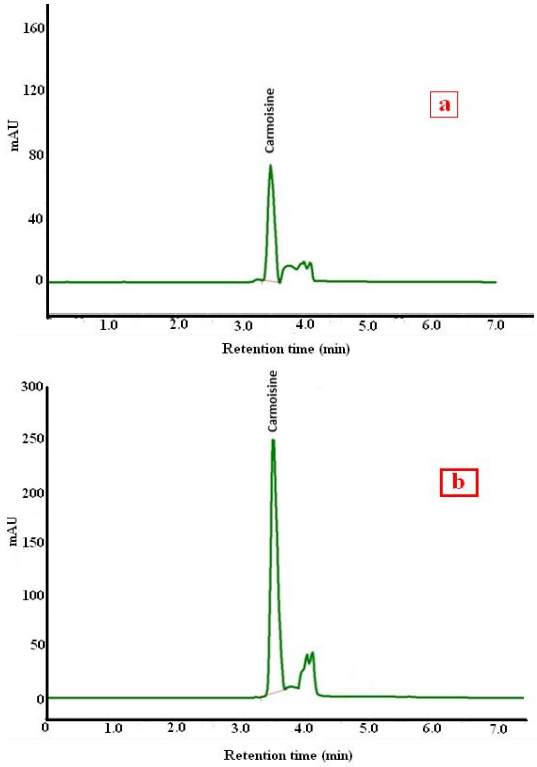
جدول2. اندازه‌گیری کارموزین در نمونه‌های غذایی به روش DLLME

نام نمونه	مقدار اضافه شده رنگ (µg/L)	مقدار اندازه‌گیری شده (µg/L)	درصد بازیابی
لواشک A	—	213	—
	250	486	105
لواشک B	—	230	—
	250	480	106
ژله A	—	349	—
	250	625	104
ژله B	—	399	—
	250	688	106
نوشیدنی A	—	316	—
	250	588	104
نوشیدنی B	—	337	—
	250	597	101
نوشیدنی C	—	337	—
	250	578	98
دراژه A	—	148	—
	250	439	110
دراژه B	—	323	—
	250	598	104

در شکل 3 طیف‌های حاصل از اسپکتروفتومتر مربوط به نمونه ژله A که دارای رنگ کارموزین به‌صورت مجاز بود، آورده شده است. همچنین در شکل 4 کروماتوگرام مربوط به نمونه ژله A قبل و بعد از اسپایک نشان داده شده است.



شکل3. طیف مرئی نمونه ژله A قبل (a) و بعد از اسپایک(b) 250 µg L^{-1} از محلول استاندارد کارموزین



شکل4. کروکاتوگرام نمونه ژله A قبل (a) و بعد از اسپایک (b) 250 µg L^{-1} از محلول استاندارد کارموزین

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-02-02]

پس از معتبرسازی و آنالیز نمونه‌های مختلف، جهت بررسی میزان استفاده از رنگ و رعایت حد مجاز رنگ، با در نظر گرفتن رقت‌ها، غلظت واقعی رنگ کارموزین در نمونه‌های مختلف محاسبه و نتایج در جدول 3 آورده شده است.

همچنین به‌منظور اعتباربخشی روش پیشنهاد شده تعدادی از نمونه‌ها پس از فرآیند میکرو استخراج با دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا نیز آزمون شدند. که نتایج در جدول 4 آمده است.

با استفاده از روش Paired t-test در سطح اطمینان 95 درصد (p=0/05) اختلاف دو روش اسپکتروفتومتری و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا محاسبه شد. پس از آنالیز آماری، از آنجایی که p به دست آمده از آنالیز نتایج نشان می‌دهد اختلاف معنی‌داری بین روش اسپکتروفتومتری و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا وجود ندارد.

جدول 5 مقایسه ارقام شایستگی روش DLLME با سایر روش‌ها از قبیل SALLE (Solvent Assisted Liquid Liquid Extraction)، CPE (Cloud Point Extraction) و SPE (Solid Phase Extracti) برای استخراج و تعیین رنگ در نمونه‌های مواد غذایی را نشان می‌دهد.

جدول3. غلظت واقعی رنگ کارموزین در نمونه‌های غذایی

نام نمونه	غلظت کارموزین mg/ml	نام نمونه	غلظت کارموزین mg/ml
ژله A	8/76	در اژه B	53/66
ژله B	29	در اژه C	31/16
ژله C	39/92	بستنی A	22/06
نوشیدنی A	31/54	بستنی B	25/06
نوشیدنی B	33/62	بستنی C	24/4
نوشیدنی C	35/58	پاستیل A	10/94
آدامس A	24/66	پاستیلB	15/32
آدامس B	22/58	لواشک A	mg/kg10/64
دراژه A	24/66	لواشکB	mg/kg11/94

جدول4. مقایسه روش اسپکتروفتومتری با روش کرماتوگرافی مایع با کارایی بالا

نام نمونه	ژله A	لواشک A	نوشیدنی A
مقادیر به‌دست‌آمده به‌وسیله DLLME-UV	8/76	10/12	31/54
مقادیر به‌دست‌آمده به‌وسیله DLLME-HPLC	8/25	10/64	30/6
اختلاف آماری دو روش		عدم اختلاف معنی‌دار [a]	

[a] p محاسبه شده (0/274) بزرگتر از p در نظر گرفته شده (0/05)

جدول5. مقایسه روش پیشنهادی با سایر روش‌ها

روش آماده‌سازی	آنالیت	گستره خطی (µg/l)	حد تشخیص (µg/l)	تکرارپذیری	درصد بازیابی	رفرنس
DLLME	Carmoisine	10-2000	2	<6	≥98	روش پیشنهادی
SPE	Allura red	1000-6000	2/35	<7	≥98	14
CPE	Amaranth	20-1600	13	3/17	>94	15
SALLE	sunset yellow	200-7000	60-70	3/8	≥90	16

DLLME: Dispesive Liquid-Liquid Microextraction; SPE: Solid Phase Extraction; CPE: Clouid Point Extraction; SALLE: Solvent Assisted Liquid-Lquid Microextraction

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-02-02]

• بحث

نتایج بهینه‌سازی اثر pH: کارایی استخراج به میزان زیادی تحت تأثیر pH ای است که در آن کمپلکس زوج-یون تشکیل می‌گردد، پس pH یکی از مهم‌ترین پارامترهای تجزیه‌ای است زیرا روی افزایش راندمان استخراج تأثیر می‌گذارد. همان‌طور که در نمودار 1 مشاهده می‌شود بالاترین میزان استخراج در pH=4 و کمترین میزان استخراج در pH= 8 حاصل شده است. در pHهای اسیدی به دلیل اینکه رنگ کاملاً به فرم آنیونی خود نمی‌باشد، بنابراین احتمال تشکیل زوج- یون کاهش می‌یابد که در نتیجه آن راندمان استخراج نیز کاهش می‌یابد. بنابراین pH=4 به‌عنوان pH بهینه انتخاب گردید.

تأثیر نوع و حجم حلال استخراج کننده و پخش شونده: انتخاب حلال استخراج‌کننده یکی از مهم‌ترین مراحل بهینه‌سازی در روش DLLME است. در کار حاضر حلال باید دانسیته بیشتری از آب داشته و قابلیت استخراج گونه مورد نظر را دارا بوده و همچنین باید حلالیت آن در آب کم باشد (10). در میان حلال‌های کلروفرم، تتراکلریدکربن و تترا کلرواتیلن تحت شرایط یکسان و پس از تزریق، مشاهده شد که تنها با کلرو فرم استخراج صورت گرفت و با حلال‌های تترا کلرواتیلن و تتراکلرید کربن استخراجی صورت نمی‌گیرد. بنابراین کلرو فرم به‌عنوان حلال استخراج کننده انتخاب شد. که این احتمالاً به علت حلالیت بالای کارموزین در کلروفرم که حلال نسبتاً قطبی‌تری در مقایسه با تتراکلریدکربن و تترا کلرواتیلن است، بوده باشد. همچنین تبخیر کلروفرم در مقایسه با دو حلال دیگر راحت‌تر است. بنابراین، کلروفرم به عنوان حلال استخراج‌کننده انتخاب گردید.

برای بررسی اثر حجم حلال استخراج‌کننده بر کارایی استخراج، حجم‌های مختلفی از کلروفرم (500، ۶۰۰،۷۰۰، 800، 900 میکرولیتر) به 1/5 میلی‌لیتر متانول اضافه شد. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده، راندمان استخراج آنالیت در حجم کلروفرم در 500 میکرولیتر بیشینه است و پس از آن با افزایش حجم، راندمان استخراج به دلیل کاهش فاکتور تغلیظ به دلیل افزایش حجم فاز ته‌نشین شده کاهش می‌یابد (12). بنابراین به منظور حصول فاکتور تغلیظ و راندمان بالا برای استخراج کارموزین، حجم 500 میکرولیتر از کلروفرم به‌عنوان حجم بهینه انتخاب گردید.

حلال پخش کننده باید امتزاج‌پذیری مناسبی را با هر دو فاز آبی و حلال استخراج‌کننده داشته باشد (10). برای این منظور از حلال‌های اتانول، متانول، استون و استونیتریل تحت شرایط یکسان استفاده شد. با استفاده از اتانول به‌عنوان حلال پخش کننده راندمان استخراج بیشینه است. و مشاهده شد که با استون محلول ابری تشکیل نشد و با استو نیتریل هم بلافاصله بعد از تزریق آنالیت به‌صورت گلوله‌های روغنی شکل در انتهای لوله جمع شد. در بررسی اثر حجم حلال پخش شونده، بر اساس نتایج به‌دست‌آمده با افزایش حجم اتانول تا 1/5 میلی‌لیتر، شاهد افزایش راندمان استخراج بودیم و سپس با کاهش مواجه شدیم. چرا که در هنگام استفاده از مقادیر کم اتانول، فاز شیری رنگ به‌طور کامل تشکیل نمی‌شود در نتیجه ER% کاهش می‌یابد از سوی دیگر با افزایش حجم اتانول به 2 میلی‌لیتر، حلالیت کارموزین در آن افزایش یافته، و در نتیجه به علت کاهش در ثابت توزیع گونه در کلروفرم، ER% کاهش می‌یابد (12-10). بنابراین حجم 1/5 میلی‌لیتر اتانول به‌عنوان حجم بهینه انتخاب شد.

تأثیر افزایش نمک: افزودن نمک باعث افزایش بازده استخراج در بسیاری از روش‌های استخراج معمول می‌شود زیرا به‌وسیله افزایش قدرت یونی نمونه محلول، می‌تواند ضریب توزیع فاز دهنده آبی افزایش یابد. این پدیده به افزایش میل ترکیبی فاز پذیرنده برای مولکول‌های آنالیت کمک می‌کند (13). سدیم کلرید معمولاً به نمونه‌های تحلیلی افزوده می‌شود. نتایج به‌دست‌آمده نشان می‌دهد که با افزایش درصد نمک، درصد استخراج کاهش می‌یابد. افزودن نمک موجب افزایش حجم فاز ته‌نشینی و کاهش پدیده پخش شدن شده، که در نتیجه آن راندمان استخراج کاهش می‌یابد (11، 10). به‌علاوه چون مکانیسم استخراج بر پایه تشکیل زوج-یون می‌باشد، در نتیجه وجود مقادیر بالای نمک برای تشکیل زوج-یون مزاحمت ایجاد می‌کند. بنابراین آزمایشات بدون حضور نمک انجام می‌گیرد.

تأثیر افزودن زوج یون کننده: رنگ کارموزین یک رنگ اسیدی و آنیونی است که حلالیت نسبتاً بالایی نیز در محیط آبی دارد. لذا امکان استخراج مستقیم آن به داخل حلال استخراجی آلی وجود ندارد. بنابراین برای افزایش راندمان استخراج رنگ به داخل حلال آلی می‌توان از یک ترکیب کاتیونی به‌عنوان زوج یون کننده استفاده نمود. ترکیب کاتیونی با تشکیل زوج-یون با گروهای سولفونات رنگ حلالیت آن را در فاز آبی به‌شدت کاهش داده و منجر به افزایش راندمان استخراج به حلال آلی شود. نتایج در نمودار 3 نشان می‌دهد که با افزایش مقدار زوج یون کننده تا 15/0

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-02-02]

میلی‌مول بر لیتر، درصد استخراج افزایش یافته و در غلظت‌های بالاتر درصد استخراج کاهش می‌یابد. در محلول‌های آبی، تترا بوتیل آمونیوم بروماید می‌تواند به‌عنوان سورفکتانت عمل نماید و در غلظت‌های بالاتر می‌تواند در درون محلول تشکیل مایسل دهد که ضمن کاهش تعداد زوج-یون کننده، به‌عنوان فرآیند رقابتی برای استخراج رنگ به درون حلال آلی استخراجی عمل کند، بنابراین درصد استخراج کاهش می‌یابد (12). همچنین عدم استخراج رنگ در غیاب تترا بوتیل آمونیوم بروماید تأیید می‌کند که استخراج به‌صورت کامل از طریق مکانیسم تشکیل زوج-یون صورت می‌گیرد.

مقایسه روش با دیگر روش‌ها: روش اسپکتروفتومتری روشی ساده، سریع، کم‌هزینه جهت تعیین مقدار رنگ‌های مصنوعی در نمونه‌های تک رنگ می‌باشد یکی از معایب این روش در آنالیز نمونه‌ها اثر بافت نمونه و یا در صورت وجود سایر رنگ‌ها، تداخل طیفی سایر رنگ‌ها با طیف رنگ مورد نظر می‌باشد.در مقابل روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا روش نسبتاً پیچیده، زمان‌بر و پر هزینه در آنالیز نمونه‌های حاوی رنگ می‌باشد ولی در صورتی که نمونه‌ها بافت پیچیده‌ای داشته باشند و یا از مخلوط چند رنگ در نمونه‌ها استفاده شده باشد، این روش نسبت به روش اسپکتروفتومتری از قابلیت و کارایی بالایی برخوردار بوده و نسبت به آن ارجح می‌باشد. از طرف دیگر زمانی که نمونه‌ها ساده و تنها حاوی یک رنگ باشند روش اسپکتروفتومتری به لحاظ ویژگی‌های تجزیه‌ای ارجع تر و مقرون به صرفه‌تر می‌باشد. با توجه به مطالب ذکر شده از آنجایی که نمونه‌های جمع آوری شده تک رنگ بودند لذا از سیستم اسپکتروفتومتری به‌عنوان روش ساده‌تر و کم‌هزینه‌تر در این تحقیق استفاده شده است.

مقایسه ارقام شایستگی روش DLLME با سایر روش‌ها از قبیل SALLE ، CPE و SPE برای استخراج و تعیین رنگ در نمونه‌های مواد غذایی نشان می‌دهد که دقت روش DLLME خوب بوده و قابل مقایسه با سایر روش‌ها است. همچنین حد تشخیص و رنج خطی بهتر از دیگر روش‌ها است. به‌علاوه به دلیل سهولت و سرعت بالای روش DLLME در مقایسه با سایر روش‌ها، یکی از مزیت‌های بسیار مهم این روش، زمان استخراج و آنالیز بسیار کوتاه آن بوده که در توسعه روش‌های تجزیه‌ای اهمیت فراوانی دارد.

الگوی کلی استفاده از رنگ ها در مطالعه حاضر نشان می‌دهد که در بعضی از فراورده ها مثل لواشک ها و نوشیدنی ها از رنگ های مصنوعی مجاز که استفاده آنها دراین فراورده ها ممنوع است، بصورت غیر مجاز استفاده شده است. لذا اجرای قوانین و مقررات مربوط به مواد غذایی نیاز به نظارت های شدیدتری دارد، با این حال در بسیاری از برندها، غلظت رنگ استفاده شده هنگامی که تعداد زیادی از محصولات باهم مقایسه شدند بطور گسترده متفاوت است. این امکان وجود دارد که عدم کنترل تولید و کیفیت محصولات تولیدی منجر به استفاده از مقدار زیادی از رنگ های غذایی در فرآورده هایی که اکثرا طرفداران زیادی در بین کودکان دارد، شود.

در مطالعه ای که توسط محمد مهدی سلطان دلال و همکاران در سال 1386 صورت گرفته است، وضعیت رنگ های مصرفی در شیرینی های خشک جنوب شهر تهران را با استفاده از روش کروماتوگرافی با لایه نازک، مورد بررسی قرار دادند. تعداد 191 نمونه شیرینی خشک از مناطق جنوبی شهر تهران به صورت تصادفی نمونه برداری و پس از استخراج رنگ توسط اسید کلریدریک و تخلیص مورد آنالیز نوع رنگ قرار گرفتند. 93/2 درصد از کل نمونه ها حاوی رنگ بودند. از میان کل نمونه های رنگی، 42 نمونه (22%) حاوی رنگ مصنوعی غیرمجاز خوراکی، 96 نمونه (50/3%) حاوی رنگ مصنوعی مجاز خوراکی برای تولید کننده های صنعتی و 40 نمونه (21%) حاوی رنگ طبیعی بود. رنگ سانست یلو بیشترین مورد مصرف در میان رنگ های مورد استفاده در شیرینی های بررسی شده بود (17).

در تحقیقی که توسط محمد مهدی سلطان دلال و همکاران در سال 1387 صورت گرفت، به بررسی نوع رنگ های مصرفی در آب آلبالو و آب زرشک عرضه شده در سطح شهر تهران به روش کروماتوگرافی با لایه نازک پرداختند. تعداد 336 نمونه آب آلبالو و آب زرشک سنتی از مناطق مختلف شهر تهران به صورت تصادفی نمونه برداری شد. نمونه ها پس از استخراج رنگ با اسید کلریدریک و تخلیص با روش کروماتوگرافی با لایه نازک (TLC) مورد آنالیز قرار گرفتند. 89% از کل نمونه ها حاوی رنگ بودند از میان کل نمونه های رنگی، 62 نمونه (18/5%) حاوی رنگ مصنوعی غیرمجاز خوراکی، 237 نمونه (70/5%) حاوی رنگ مصنوعی مجاز خوراکی برای تولید کننده های صنعتی و 37 نمونه (11%) حاوی رنگ طبیعی بود. رنگ کارمویزین بیشترین مورد مصرف در میان رنگ های مورد استفاده در آب آلبالو و آب زرشک بررسی شده بود (18) .

همچنین در مطالعه Arest و همکاران روی فرآورده های قنادی شهر قم مشخص شده که 26/7 درصد نمونه ها حاوی

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-02-02]

رنگ مصنوعی غیر مجاز و 21/3 درصد حاوی رنگ مصنوعی مجاز هستند (19).

نتایج مطالعات ذکر شده نشان می دهد که در نقاط مختلف کشور استفاده از رنگ در فرآورده های خوراکی رو به افزایش است و این مسئله اعلام هشدار و یا زنگ خطری برای مصرف کنندگان این گونه مواد غذایی است. همان طور که در این مطالعه نیز مشخص شد از کل نمونه های برداشتی حدود 50 درصد نمونه ها حاوی رنگ کارموزین بودند که در این میان در 25 درصد نمونه ها از این رنگ بصورت غیر مجاز استفاده شده بود. گرچه رنگ های مصنوعی غیر مجاز در مطالعات کمتر استفاده شده است ولی بالا بودن درصد مصرف رنگ های مصنوعی خوراکی مجاز نشان دهنده این مطلب است که صنف تولید کننده و مصرف کننده فاقد هر گونه اطلاع از عوارض سوء مصرف این گونه رنگ ها می باشند. بنابراین توسعه و معتبرسازی روش های آزمون جدید برای اندازه‌گیری رنگ‌های مصنوعی در مواد غذایی از اهمیت زیادی برخوردار است.

در این تحقیق، روش جدیدی بر اساس میکرو استخراج مایع-مایع پخشی جفت شده با دستگاه اسپکترو فتومتری برای اندازه‌گیری مقادیر بسیار کم کارموزین در مواد غذایی ارائه شد. روش پیشنهاد شده مزایایی مانند سادگی، دقت خوب، سرعت بالا، حساسیت بالا و قیمت کم را در استخراج و اندازه‌گیری کارموزین ارائه می‌کند. بررسی فاکتورهای مؤثر بر فرآیند استخراج نشان داد که مکانسیم اصلی در استخراج رنگ، تشکیل زوج-یون میان رنگ آنیونی و تترابوتیل آمونیم کاتیونی می‌باشد. روش ارائه شده می‌تواند به‌عنوان الگویی برای استخراج و اندازه‌گیری سایر رنگ‌های مصنوعی در مواد غذایی با مکانیسم مشابهی به کار برده شود. همچنین، نتایج آنالیز نمونه‌های حقیقی نشان داد که علیرغم غیر مجاز بودن استفاده از کارموزین و ادعاهای کارخانجات تولیدکننده در نوشیدنی‌ها و لواشک‌ها، مقادیر بالایی از این رنگ استفاده شده بود. در نهایت می‌توان گفت که این تکنیک می‌تواند به‌عنوان روشی مناسب، سریع و حساس برای نهادهای نظارتی جهت پایش رنگ کارموزین در نمونه‌های غذایی استفاده شود.

سپاسگزاری

نویسندگان مقاله از پژوهشگاه استاندارد سازمان ملی استاندارد جهت در اختیار قرار دادن امکانات آزمایشگاهی تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

1. El-Shahawi MS, Hamza A, Al-Sibaai AA, Bashammakh AS, and Al-Saidi HM. A new method for analysis of sunset yellow in food samples based on cloud point extraction prior to spectrophotometric determination. J Ind Eng Chem 2013; 19: 529–535.
2. Zou T, He P, Yasen A, and Li Zh.. Determination of seven synthetic dyes in animal feeds and meat by high performance liquid chromatography with diode array and tandem mass detector. Food Chem 2013; 138: 1742–1748.
3. Medeiros AR, Lourencao BC, Rocha-Filho RC, Fatibello-Filho O. Flow injection simultaneous determination of synthetic colorants in food using multiple pulse amperometric detection with a boron-doped diamond electrode. Talanta. 2012; 99: 883–889.
4. Yoshioka N, Ichihashi K. Determination of 40 synthetic food colors in drinks and candies by high-performance liquid chromatography using a short column with photodiode array detection. Talanta. 2008; 74:1408–1413.
5. Prado MA, Boas LFV, Bronze MR, Godoy HT.Validation of methodology for simultaneous determination of synthetic dyes in alcoholic beverages by capillary electrophoresis. J Chromatogr A 2006; 1136: 231-236.
6. Florian M, Yamanaka H, Carneiro PA, Zanoni MVB. Determination of brilliant blue FCF in the presence and absence of erythrosine and quinoline yellow food colours by cathodic stripping voltammetry. Food Addit Contam 2002;19: 803-809.
7. Ryvolova M, Taborsky P, Vrabe P, Krasensky P, Preisler J. Sensitive determination of erythrosine and other red food colorants using capillary electrophoresis with laser-induced fluorescence detection. Food Control. 2007; 1141: 206–211.
8. WHO, 1983. Evaluation of certain food additives and contaminants, TRS 696-JECFA 27/19.
9. Saltmarsh M, editor. Essential Guide to Food Additives. 4th Edition. UK: Cambridge 2013.p.103-120.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-02-02]

10. Rezaee M, Yamini Y, Faraji M. Evolution of dispersive liquid–liquid microextraction method. J Chromatogr A 2010; 1217: 2342–2357.

11. Asensio-Ramos M, Ravelo-Pérez LM, González-Curbelo MA, Hernández-Borges J. Liquid phase microextraction applications in food analysis (Review). J Chromatogr A. 2011;1218: 7415–7437.

12. Wu H, Guo J, Du Li, Tian H, Hao CH, Wang ZH, Wang J. A rapid shaking-based ionic liquid dispersive liquid phase microextraction for the simultaneous determination of six synthetic food colourants in soft drinks, sugar- and gelatin-based confectionery by high-performance liquid chromatography. Food Chem 2013; 141: 182-186.

13. Yan H, Wang H, Qiao J, Yang G. Molecularly imprinted matrix solid-phase dispersion combined with dispersive liquid–liquid microextraction for the determination of four Sudan dyes in egg yolk. J Chromatogr A 2011; 1218: 2182–2183

14. Soylak M, Unsal YE, Tuzen M. Spectrophotometric determination of trace levels of allura red in water samples after separation and preconcentration. Food Chem Toxicol 2011; 49: 1183–1187.

15. Pourreza N, Elhami S. Cloud Point Extraction and Spectrophotometric Determination of Amaranth in Food Samples Using Nonionic Surfactant Triton X-100 and Tetrabutylammonium Hydrogen Sulfate. J. Iran. Chem. Soc. 2009; 6: 784-788.

16. Razmara SR, Daneshfar A, Sahrai R. Determination of methylene blue and sunset yellow in wastewater and food samples using salting-out assisted liquid–liquid extraction. J Ind Eng Chem 2011; 17: 533–536.

17. Soltan Dalal M, Mohamadi H, Dastbaz A, Vahedi S, Salsali M, Arasteh M. The analysis of status of added colors to dried sweet in South of Tehran using thin layer chromatography. Gorgan Univ Med Sci J. 2007; 9:73–8.

18. Soltan Dallal M, Vahedi S, Najjarian A, Dastbaze A, Kaffashi T, Pirhadi E. Study of concentration of added colors to juice of black cherry and juice of barberry on display in shop in the city of Tehran Payavard salamat. 2008; 2:55–62.

19. Arast Y, Mohamadian M, Noruzi M, Ramuz Z. Surveillance on artificial colors in different confectionary products by chromatography in Qom. Zahedan J Res Med Sci. 2013; 15:62–4.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-02-02]

Development and Validation of Dispersive Liquid-liquid Microextraction Coupled to Spectrophotometry for Extraction and Determination of Carmoisine in Foodstuff

Amini Kadijani P[1], Faraji M [2], Salami M[3]*

1- Masters Student of Food Science and Technology, Food Chemistery Field, Islamic Azad University, Pharmaceutical Branch Advanced Science & Technology Factory, Tehran, Iran

*2- *Corresponding author: Assistant Prof, Dept. of Food Science & Technology, Faculty of Food Industry and Agriculture, Standard Research Institute (SRI), Karaj, Iran. Email: mfaraji@standard.ac.ir*

3- Dept. of Food Science and Engineering, University College of Agriculture & Natural Resources, University of Tehran, Iran

Received 15 May, 2015 **Accepted 1 Sept, 2015**

Background and Objectives: Synthetic colorants are very important class of food additives. They are widely used all over the world in food and feed industries due to their low price, high effectiveness and excellent stability. In this research, a simple, rapid and sensitive method termed as "dispersive liquid-liquid microextraction" combined with spectrophotometry determination is proposed for determining the trace amounts of carmoisine in food samples.

Materials and Methods: Several factors influencing the extraction efficiency of carmoisine including the type and amount of extraction solvent and disperser solvent, pH, ionic strength, and amount of ion-pairing reagent were studied and optimized. The proposed method was validated by high performance liquid chromatography technique.

Results: Under the optimal conditions, a good linear behavior over the investigated concentration ranges (10-2000 μg/L) with good correlation of determination, R^2> 0.9993, was obtained. The relative standard deviation (RSD) based on six replicate determinations at 250 μg/L level of carmoisine was 6%. The extraction percent was 90%, and the limit of detection (LOD) of the proposed approach was 2.0 μg/L.

Conclusion: Dispersive liquid-liquid microextraction method coupled with spectrophotometric has good accuracy (spike recoveries greater than 95%) for determining the trace amounts of carmoisine (μg/L).

Keywords: Carmoisine, Dispersive liquid-liquid microextraction, Spectrophotometry, High performance liquid chromatography

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-02-02]