در دسترس بصورت الکترونیک @ www.jscw.icrc.ac.ir

نشریه علمی ترویجی مطالعات در دنیای رنگ، جلد ۷، شماره ۴، (۱۳۹۶) ۳۶-۱۹

نشریه علمی ترویجی مطالعات در دنیای رنگ
Journal of Studies in Color World
www.jscw.icrc.ac.ir

وزارت علوم، تحقیقات و فناوری
موسسه پژوهشی علوم و فناوری رنگ و پوشش

مروری بر روش‌های تجزیه‌ای مواد رنگزای آزو در صنعت مواد خوراکی

شهره روحانی[1*]، اعظم پیرکرمی[2]

۱- دانشیار، الف) گروه پژوهشی مواد رنگزای آلی، موسسه پژوهشی علوم و فناوری رنگ و پوشش، ب) قطب علمی رنگ، موسسه پژوهشی علوم و فناوری رنگ و پوشش، تهران، ایران، صندوق‌پستی: ۶۵۴-۱۶۷۶۵.

۲- دانشجوی دکتری، گروه پژوهشی نانوفناوری رنگ، موسسه پژوهشی علوم و فناوری رنگ و پوشش، تهران، ایران، صندوق پستی: ۶۵۴-۱۶۷۶۵.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۰۷/۰۳ تاریخ بازبینی نهایی: ۱۳۹۶/۰۸/۳۰ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۹/۰۱ در دسترس به‌صورت الکترونیک: ۱۳۹۶/۱۲/۰۷

چکیده

مواد رنگزای آزو برای رنگ‌دهی به فرآورده‌های خوراکی افزوده می‌شوند تا نه تنها ظاهر مواد خوراکی را زیبا جلوه دهد بلکه ظاهر اصلی آن در طی فرآیند تولید ثابت بماند. با این وجود، کشورهای بسیاری در سرتاسر جهان استفاده از اکثر مواد رنگزای آزو در مواد خوراکی را ممنوع کرده‌اند و استعمال این ترکیبات به شدت از طریق عرضه مواد خوراکی داخلی و صادراتی بررسی و کنترل می‌شود. متخصصین کنترل مواد خوراکی روش‌های کاملا دقیق و حساس تجزیه‌ای را برای نظارت و تضمین کیفیت و سلامت فرآورده‌های خوراکی اتخاذ می‌کنند. مقاله حاضر بررسی جامعی از روش‌های تجزیه‌ای گوناگون مورد استفاده در مطالعه مواد رنگزای آزو مصرفی در صنایع خوراکی نقاط مختلف دنیا را ارائه می‌دهد.

واژه‌های کلیدی

مواد رنگزای آزو، صنایع خوراکی، روش‌های تجزیه‌ای، استخراج، کروماتوگرافی.

چکیده تصویری

نویسنده مسئول: rouhani@icrc.ac.ir

Ministry of Science, Research and Technology
Institute for Color Science and Technology

Available online @ www.jscw.icrc.ac.ir

Journal of Studies in Color World, Vol. 7, No. 4, (2018) 19-36

نشریه علمی ترویجی
مطالعات در دنیای رنگ
Journal of Studies in Color World
www.jscw.icrc.ac.ir

A Review on Analytical Procedures Azo Dyes in the Food Industry

Shohre Rouhani[1*], Azam Pirkarami[2]

1- a) Department of Organic Colorants, Institute for Color Science and Technology, b) Center of Excellence for Color Science and Technology, Institute for Color Science and Technology, Tehran, Iran, P.O.Box:16765-634.

2- Department of Nanomaterials and Nanocoatings, Institute for Color Science and technology, Tehran, Iran, P. O. Box: 16765-654.

Abstract

Azo dyes for coloring food products are added to food to not only look beautiful, but the original appearance of its effects remain constant during the manufacturing process. However, many countries around the world have banned the majority of azo dyes in food and the use of these colors heavily through the food supply domestic and export reviewed and controlled. Accurate and sensitive analytical methods for food control experts to monitor and ensure the quality and safety of food products adopt. This article is a comprehensive review of various analytical techniques used in the study azo dyes used in the food industry around the world offers

Keywords

Azo dyes, Food industry, Analytical techniques, Extraction, Chromatography.

Graphical abstract

Corresponding author: rouhani@icrc.ac.ir

۱- مقدمه

فام یکی از ویژگی‌های مهمی است که معمولا مواد خوراکی را به وسیله آن ارزیابی می‌کنند. طیف گسترده‌ای از مواد رنگزای خوراکی با هر دو منشا طبیعی و مصنوعی به مواد خوراکی افزوده می‌شود تا آنها را از نظر ظاهری برای مصرف‌کنندگان زیباتر جلوه دهد و ظاهر اصلی آن‌را که در طول فرآیند تولید از بین رفته بود، به حالت اول برگرداند. لیکن، بیشتر مواد رنگزای حاصل از منابع طبیعی ناپایدار هستند و می‌توانند به آسانی در طی فرآوری ماده خوراکی کیفیت خود را از دست دهند. بنابراین، به طور کلی مواد رنگزا با منشا مصنوعی، نه تنها به واسطه ثباتشان بلکه به دلیل هزینه تولید بسیار کم در مقایسه با مواد رنگزای طبیعی مورد استفاده قرار می‌گیرند [۱]. از میان مواد رنگزای مصنوعی مصرف شده در صنعت مواد خوراکی، مواد رنگزای آزو یکی از بزرگترین گروه مواد رنگزا را به خود اختصاص داده‌اند [۲]. مواد رنگزای آزو مواد رنگی آلی مصنوعی هستند که بر اساس گروه‌های آزو (-N=N-) به عنوان بخشی از ساختار خود مشخص می‌شوند.

این ترکیبات متنوع و درخشان هستند و برای رنگ‌آمیزی انواع محصولات خوراکی استفاده می‌شوند. مواد رنگزای آزو معمولا در برابر شرایط هوازی مقاوم هستند اما می‌تواند با تشکیل آمین‌های آروماتیک احیا گردد [۳] که ممکن است موجب بروز سردردهای مکرر در بزرگسالان [۴]، اختلال عصبی [۵]، اختلال ژنی [۶] و سرطان زایی [۷] شود. بواسطه چنین مشکلاتی، بسیاری از کشورهای جهان استفاده از بسیاری از مواد رنگزای آزو در مواد خوراکی را ممنوع کرده‌اند. در طول چند دهه گذشته، استفاده از مواد رنگزای آزو در مواد خوراکی به شدت تحت نظارت واردات و صادرات مواد خوراکی هر کشور است. بسیاری از کشورها به طور کلی از مقررات هفت بازار عمده جهان تبعیت می‌کنند. جدول ۱ و ۲ اطلاعات دقیق درباره مواد رنگزای آزو تایید شده برای رنگی‌کردن مواد خوراکی[1] توسط کشورهای مختلف را نشان می‌دهد.

گزارشاتی درباره تعیین مقدار مواد رنگزای مصنوعی در مواد خوراکی منتشر شده است [۲] و توسعه دستورالعمل‌های تجزیه‌ای برای تعیین مواد رنگزای آزو ممنوع شده در کالاهای مصرفی را ارائه کرده‌اند [۸]. اثر جهش‌زایی مواد رنگزای آزو و رابطه ساختار آن بررسی شده و نتایج نشان می‌دهد که مواد رنگزای فعال زیستی عمدتا محدود به ترکیبات دارای قسمت‌های مساوی از فنیلن دی‌آمین و بنزیدین هستند [۹]. تعیین مواد خوراکی محلول و نامحلول در آب را با طیف‌سنجی مورد بررسی قرار می‌دهند [۱۰]. روش‌های کروماتوگرافی برای تعیین و تشخیص مواد رنگزا مصنوعی بررسی شده است [۱۱]. روش‌های LC-UV-Vis[2]و LC-MS[3] برای تجزیه مواد رنگزای I-IV سودان همراه با روش استخراج آن‌ها در بسترهای مختلف مواد خوراکی را مورد مطالعه گرفت. با این وجود، حتی یک تحقیق جامع وجود ندارد که تمام روش‌های تحلیلی را که عموما برای تعیین مواد رنگزای آزوی موجود در فرآورده‌های خوراکی استفاده می‌شوند به وضوح شرح دهد که برای نه تنها پژوهشگران محصولات خوراکی بلکه برای متخصصین کنترل مواد خوراکی ارزشمند هستند. مقاله حاضر مرور جامعی بر روش‌های مختلف به کار رفته برای استخراج مواد رنگزای آزوی موجود در غذا و تجزیه آن‌ها از بسترهای خوراکی پیچیده می‌باشد.

۲- روش‌های تجزیه‌ای

۲-۱-استخراج مواد رنگزای آزو از بسترهای خوراکی[4]

طیف گسترده‌ای از مواد رنگزای آزو در محصولات خوراکی استفاده می‌شود. در نتیجه، هیچ روش کاملا استانداردی جهت استخراج آنها در آزمایشگاه‌ها وجود ندارد. با این وجود، بسیاری از روش‌های استخراج از یک مسیر متعارف شامل آزادسازی نمونه مورد نظر از بستر خود، به دنبال حذف ماده غیراصلی از یک روش استخراج مناسب (استخراج جامد-مایع و یا استخراج مایع-مایع) تبعیت می‌کند [۱۲، ۱۳].

۲-۱-۱-صاف‌کردن غشایی[5]

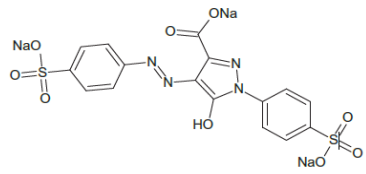
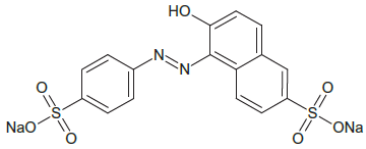
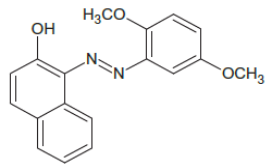
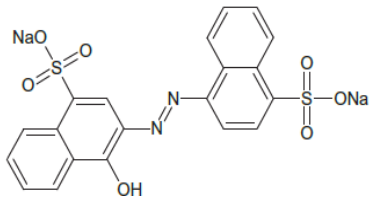
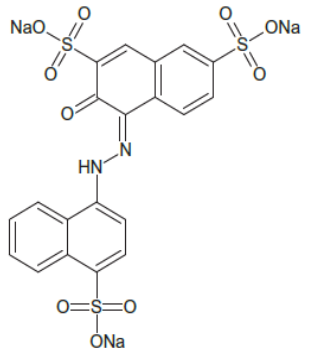
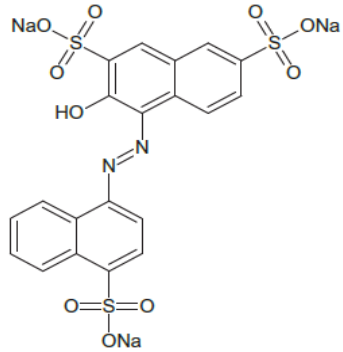
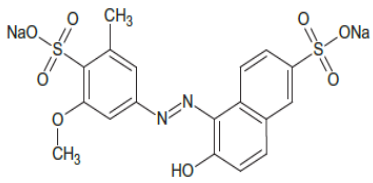
غشا یک لایه نازک از مواد نیمه‌تراوا است که مواد را زمانی از هم جدا می‌کند که یک نیروی محرکه خارجی در سراسر غشاء استفاده شود. برای تعیین مقدار مواد رنگزای آزو موجود در نوشابه‌ها، رایج‌ترین روش برای جمع‌آوری نمونه‌ها جهت تجزیه شامل استخراج یک فاز با صافی غشایی با استفاده از آب به عنوان رقیق‌کننده است [۱۴، ۱۵].

۲-۱-۲-استخراج فاز جامد (SPE)[6]

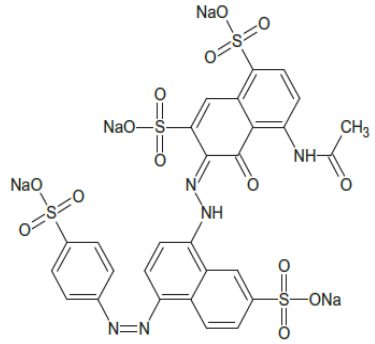
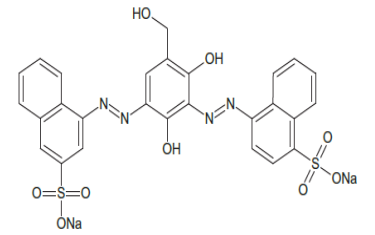
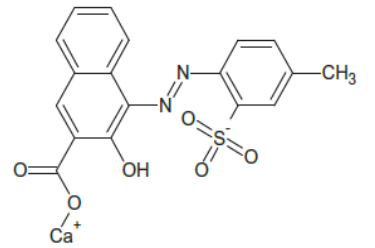
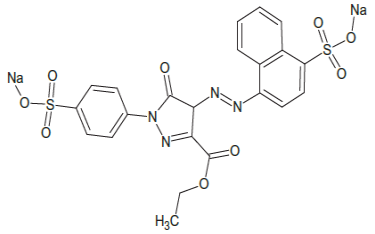
استخراج فاز جامد (SPE) به واسطه مزایایی مانند سهولت و سرعت، پرکاربردترین روش برای تعیین مقدار مواد رنگزای موجود در غذا است. این روش از توانایی پالایش حجم زیادی از نمونه‌های بدون مواد آلاینده با بازدهی بالا برخوردار است. جاذب‌های معمولی برای SPE شامل C18 هستند. استفاده از مقدار کمی پلیمر مغناطیسی آمین عامل‌دار (NH_2-LDC-MP)، [۱۶] پلی آمید و یا کروماتوگرافی تراوایی ژل (GPC)[۱۷، ۱۸] و پلیمر استیرن-دی وینیل بنزن جهت تعیین ماده رنگزای موجود در محصولات خوراکی نیز گزارش شده است [۱۹]. حلال‌های آلی مختلفی در استخراج مواد رنگزای خوراکی مورد استفاده قرار گرفته‌اند و انتخاب حلال مناسب همیشه آسان نیست. ساختار بستر و اجزای آن نقش کلیدی در انتخاب حلال برای استخراج ایفا می‌کند. حلال‌هایی مانند متانل، اسید استیک، اتانل، استن، اتیل استات، تترا-ان-بوتیل فسفات آمونیم و غیره برای استخراج مواد رنگزای آزو موجود در غذا مناسب‌تر هستند. انواع مختلفی از روش‌های SPE برای استخراج ماده رنگزا از محصولات خوراکی در (جدول ۳) گزارش شده‌اند [۲۰].

[1] Azo dyes for coloring food (ADF)
[2] Liquid chromatography ultra voilet -visible
[3] Liquid chromatography-mass spectroscopy
[4] Extraction of azo dye from food matrices
[5] Membrane filtration
[6] Solid-phase extraction (SPE)

جدول ۱- اسامی، کدها، فرمول شیمیایی، ساختار، فام، حلالیت و متوسط وزن ملکولی مواد رنگزای آزوی مصرف شده در بسترهای خوراکی.

اسامی، کدها و فرمول‌های شیمیایی	ساختار	فام	حلالیت	MW (g/mol)
تارترازین (E102)، C.I. 19,140, FD&C مواد رنگزای زرد ۵، زرد اسیدی ۲۳ / تری سیدم (4E)-5-oxo-1-{(۴-سولفوناتوفنیل) (۴-سولفوناتوفنیل ۱)-۴- سولفوناتوفنیل) هیدرازونو}-۳-پیرازول کربوکسیلات $C_{16}H_9N_4Na_3O_9S_2$		زردلیمویی	آب	۵۳۴/۳۶
مواد رنگزای زرد پرتقالی و مواد رنگزای زرد ۶، ۶- دی سدیم ۶-هیدروکسی-۵-{(۴-سولفوفنیل)آزو}-۲-نفتالن سولفونات $C_{16}H_{10}N_2Na_2O_7S_2$		زرد	آب و اتانل	۴۵۲/۳۷
مواد رنگزای محلول قرمز (E121),۸۰ C.1.12,156/۱-(۲،۵) دی متوکسیل-فنیلازو)-نفتالن-ال $C_{18}H_{16}N_2O_3$		زرد مایل به نارنجی یا قرمز تیره	غیر محلول در آب و محلول در حلال آلی	۳۰۸/۳۳
کارموزین (E122)، آزوروبین، مواد رنگزای قرمز خوراکی۳، آزوروبین S، بریلانتکارموزین O، قرمز خوراکی ۱۴ یا C.I. 14,720/دی سیدم ۴-هیدروکسی-۲-{(E)-(۴-سولفوناتو-۱-نفتیل) دی آزنیل} نفتالن-۱-سولفونات $C_{20}H_{12}N_2Na_2O_7S_2$		قرمز بلوطی	آب	۵۰۲/۴۴
قرمز خوراکی ۹۰ و قرمز خوراکی ۲۷ و قرمز خوراکی ۲۷، ۲ آزوروبین S یا C.I 16,185/تری سیدم (4E)-۳-اکسو-۴-{(۴-سولفوناتو-۱-نفتیل) هیدرازون نفتالن-۲-۷-دی سولفونات $C_{20}H_{11}N_2Na_3O_{10}S_3$		قرمز مایل به قهوه‌ای و قرمز تیره مایل به بنفش	آب و اتانل	۶۰۴/۷۳
قرمز خوراکی ۱۷ و قرمز خوراکی اسیدی ۱۸ و قرمز خوراکی ۳، قرمز روشن مایل به زرد 3R، قرمز روشن مایل به زرد 4R/تری سیدم (8Z)- ۷-اکسو-۸-{(سولفوناتونفتالن-۱-یل) هیدرازینیلیدن} نفتالن-۱، ۳- دی سولفونات $C_{20}H_{11}N_2Na_3OQS_3$		قرمز	غیرمحلول در آب اما محلول در بسیاری از حلال‌های آلی	۶۰۴/۴۷
قرمز خوراکی ۱۷ قرمز خوراکی ۴۰ /دی سیدم ۶-هیدروکسی-۵- (۲-متوکسی-۵-متیل-۴-سولفوفنیل)آزو)-۲-نفتالن سولفونات $C_{18}H_{14}N_2Na_2O_8S_2$		قرمز	آب	۴۹۶/۴۲

جدول ۱ (ادامه).

اسامی، کدها و فرمول‌های شیمیایی	ساختار	فام	حلالیت	MW (g/mol)
خاکستری BN (E151)، خاکستری PN، خاکستری A، سیاه PN، سیاه خوراکی ۱، سیاه نفتول، C.I قهوه‌ای خوراکی یا C.I. 28,440/تتراسدیم -۴-استامیدو-۵-اکسو-۴-(۴-سولفوناتوفنیل) آزو-۱-نفتیل) هیدرازونو) نفتالین-۱، ۷-دی سولفونات $C_{28}H_{17}N_5Na_4O_{14}S_4$		سیاه	آب	۸۶۷/۶۸
قهوه‌ای(E154) FK ، قهوه‌ای دودی، قهوه‌ای شکلاتی FK و .C.I، قهوه‌ای خوراکی ۱ قهوه‌ای (E155) HT، قهوه‌ای شکلاتی HT، قهوه‌ای خوراکی ۳ و C.I. ۲۰.۲۸۵/دی سیدم ۴- -3- 2E)- 2-[(5Z)- (هیدروکسی متیل)- ۲، ۶-دی اکسو-۵- {(۴-سولفوناتونفتالن-۱-یل) هیدرازینلیدن}- ۱-سیکلوهکس-۳-انیلیدن}هیدرازینیل} نفتالن-۱-سولفونات $C_{27}H_{18}N_4Na_2O_6S_2$		قهوه‌ای	آب	۶۵۲/۵۶
لیتوروبین (E180) BK، رنگدانه روبین، کارمین 6B، کارمین روشن 6B، روبین دائمی L6B، لیتوروبین، لاتول روبین، .C.I، رنگدانه قرمز 57, C.I.، رنگدانه قرمز D&C Red No. 57:1, or C.I. 15,850:1 /7 کلسیم -(4Z)- ۴- {(۴- متیل-۲-سولفوناتوفنیل)هیدرازونو}-۳-اکسو-۲-نفتالن کربوکسیلات $C_{18}H_{12}CaN_2O_6S$		قرمز	دی متیل/فرمامید	۴۲۴/۴۴
نارنجی B۱۳۷ /دی سیدم ۴-{N^0 -۳-اتوکسی کربونیل-۵-اکسو-۱-(۴-سولفوناتوفنیل-۴- پیرازولیلیدن} هیدرازینو}-۱- نفتالن سولفونات $C_{22}H_{16}N_4Na_2O_9S_2$		نارنجی	آب	۵۹۰/۴۹

جدول ۲- فهرست مواد رنگزای خوراکی آزو تایید و ممنوع شده در کشورهای مختلف.

کشور	E102	E110	E121	E122	E123	E124	E129	E151	E154	E155	E180	Orange B	Refs.
امریکا	+	+	+	-	-	-	-	–	–	–	-	+	[۳۱]
اتحادیه اروپا	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	-	[۳۲]
هند	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	[۳۳]
چین	+	+	_	+	+	+	+	–	–	-	-	-	[۳۴]
ژاپن	+	+	–	–	+	–	+	–	–	–	–	–	[۳۵]
استرالیا و نیوزلند	+	+	–	+	–	+	+	+	–	+	–	–	[۳۶]

(+) مواد رنگزای تاییدشده و (–) مواد رنگزای ممنوع‌شده.

جدول ۳- روش‌های تحلیلی برای تخمین مواد رنگزای آزو در بسترهای مختلف مواد خوراکی.

بستر	مواد رنگزای آزو	روش تحلیلی		منابع
		روش عصاره‌گیری	سیستم تشخیص یا آشکارسازی	
نوشیدنی	زرد پرتقالی	بدون روش عصاره‌گیری	ستون: اتر (-) HPLC-MS-ESI C18-(۱۵۰ mm× ۴/۶ mm ،۵ im) فاز متحرک: الف) ۶۳٪ محلول آبکی ۲۰ میلی‌مول بر لیتر استات آمونیم و B) ۳۷٪ متانل، شوینده ایزوکراتیک	[۵۹]
نوشابه پیش‌غذا	زرد پرتقالی و قرمز خوراکی ۳	نمونه‌ها با آب شسته شدند و از طریق غشای پلی پروپیلن ۰/۲ میکرومتر تصفیه شدند.	ستون: (-) HPLC-DAD-MS/MS-ESI C18(۲۵۰ mm ×۲ mm ،۴ im) مجهز به کارتریج محافظ، فاز متحرک: الف) متانل و ب) ۱۰ میلی مول بر لیتر آمونیاک آمونیم فرمات (۵۵:۴۵ v/v)، شوینده ایزوکراتیک	[۱۵]
نوشیدنی	ماده رنگزای قرمز خوراکی ۴۰	نمونه ها از طریق صافی نایلون ۰/۴۵ میکرومتر تصفیه شدند و (۱:۲۰ v/v) در آب مقطر رقیق شدند.	ستون: UHPLC-MS/MS-DuoSpray/(-) HSS-T3 (۲/۱ mm ×۱۰۰ mm ،۱/۸ im) فاز متحرک: الف) مخلوط ۱ میلی مول بر لیتر استات آمونیم در آب مقطر و ب) ۱ میلی مول بر لیتر استات آمونیم در متانل؛ حلال‌شویی گرادیان	[۶۰]
شیرینی‌سازی و داروی آرام‌بخش	ماده رنگزای مصنوعی	۲۵ میلی‌لیتر متانل و آب متانل-آب (۸۰:۲۰ v/v)، با دقت به مدت ۵ دقیقه مخلوط و هم‌زده شد یک میلی مول از ۰/۰۵ مولار محلول تترا-ان-بوتیل آمونیم فسفات صاف‌شده و سپس SPE (C18 Sep-Pak قبلا با متانل و ۱٪ اسیداستیک فعال شده)؛ با متانل شستشو شود.	بافر ستون موئینی ترکیب‌شده با سیلیس بدون روکش MEKC cm ۵۰μm×۶۵: ۱۵٪ استونیتریل و ۰/۰۵ مولار دی‌اکسیکولات سدیم ۵۵ درصد ۰/۰۰۵ مولار پتاسیم دی-هیدروژن ارتوفسفات ۰/۰۰۵ مولار سدیم بورات pH=۸/۶ در Kv ۳۰	[۱۲]
نوشابه، قند و ژله و شیرینی‌جات	۶ ماده رنگزای سنتز شده	۲۵ میلی مول آب دیونیزه (۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه، ۲۵ میلی مول محلول بافر استات ۰/۲ مول بر لیتر در pH برابر ۵) و صاف‌شده. ۱۰ میلی مول محلول فوق +۳۵۰ میلی‌لیتر RTIL + هم زدن با دست (۳۰ بار در ۲۰ ثانیه) + سانتریفوژ (به مدت ۸ دقیقه در ۳۵۰۰ دور بر دقیقه)، خروج ماده شناور و IL باقیمانده با متانل مخلوط می شود تا به حجم حدود ۳۰۰ میلی‌لیتر آنالیتهای غنی شده برسد،	فاز متحرک: الف) ۰/۱ مول بر لیتر محلول آبی استات آمونیوم (pH=۷/۵) تنظیم شده با ۱۰ مول بر لیتر هیدروکسید سدیم): متانل استونیتریل (۷۰:۳۰ v/v)؛ شوینده گرادیان. ستون: LC-UV C18 (۲۵۰ mm× ۴/۶ mm، ۵ im)	[۱۳]
نوشابه با طعم میوه، نوشیدنی‌های الکلی، مربا، شکر و شیرینی	سنتز ۱۳ ماده رنگزای خوراکی	۱۰ میلی‌لیتر نمونه ماده رنگزا + ۴۰ میلی‌لیتر آب مقطر، گاززدایی شده (۱۵ دقیقه) و فیلترشده از طریق یک کاغذ صافی تاشده برای جمع‌آوری مواد باقی‌مانده و مواد صاف‌شده از طریق صافی‌های سرنگ قبل از تزریق	ستون LC-PDA C18 (۲۵۰ mm ×۴/۶ mm، ۵ μm) به همراه ستون محافظ C18 (۲۵ mm× ۴/۶ mm، ۵ im) استفاده می‌شود. فاز متحرک: الف) v/v , ۲۰:۸۰ مخلوط استونیتریل/متانل و ب) (M/V) ۱٪ استات آمونیم، (PH=۷/۵) شوینده گرادیان	[۱۴]

جدول ۳ (ادامه).

بستر	موادرنگزای آزو	روش تحلیلی		منابع
		روش عصاره‌گیری	سیستم تشخیص یا آشکارسازی	
شکلات، نوشابه، کیک تجاری، افزودنی‌های خوراکی و بستنی (مواد رنگزای بستنی ویلتون) و آب‌لیمو	ماده رنگزای زرد خوراکی ۴، ماده رنگزای زرد خوراکی ۳، ماده رنگزای زرد پرتقالی، ماده قرمز خوراکی ۳ و ماده رنگزای آبی خوراکی ۹	بدون روش عصاره‌گیری	رنگ‌سنج نوری دوگانه مبتنی بر LED (625 و 465, 525)	[۳۰]
شراب و نوشابه	ماده رنگزای خوراکی ۹، ماده رنگزای زرد خوراکی ۴، ماده رنگزای زرد خوراکی ۳، ماده رنگزای زرد پرتقال، ماده رنگزای قرمز خوراکی ۳، ماده رنگزای آبی خوراکی ۹ و ماده رنگزای خوراکی صورتی ۳	عصاره‌گیری فاز جامد پراکنده مغناطیسی (M-dSPE): ۱ مول بر لیتر نمونه در یک ظرف تبخیر باز، تا زمان خشک‌شدن در وان قرار گرفته و آب ۸۰ درجه سانتی‌گراد بخار می‌شود. باقیمانده با آب خالص جدا می‌شود. (نمونه در pH=۹ تنظیم شده با ۰/۵ مول بر لیتر آمونیاک) حل می شود و به یک لوله سانتریفوژ پلی پروپیلن ۲ میلی‌لیتر حاوی NH_2، و ۱۵ میلی گرم LDC-MP انتقال می‌یابد، به مدت یک دقیقه در حرکت چرخشی آب قرار می‌گیرد، NH_2-LDC-MP جذب شده زیر میدان مغناطیسی ایزوله می‌شود و کسر ۰/۵ مول بر لیتر ماده شناور با استفاده از یک غشای im ۰/۲۲ قبل از تزریق آن صاف شد.	ستون UFLC-MS/MS-ESI (-) ODS II (۱۰۰ mm ×۲/۰ mm ،۲/۲ µm) فاز متحرک: الف) ۵/۰ mmol/L استات‌آمونیم در استونیتریل و ب) ۵/۰ mmol/L استات آمونیم در آب، شوینده گرادیان	[۱۶]
ادویه	سنتز ۱۶ رنگزای خوراکی	۵ گرم نمونه و ۲۰ میلی‌لیتر متانل-استن (۱: ۱v/v) و در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد در وان آب به مدت ۲۰ دقیقه حرارت داده می‌شود، ۲ دقیقه در چرخش آب قرار می گیرد و ۵ دقیقه در ۵۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ می‌شود، عصاره‌گیری با ۲۰ میلی‌لیتر متانل-استن ۱ v/v ، ۱۵ میلی مول محلول ۲ مولار کربامید حاوی ۵٪ آمونیاک (محلول در آب) تکرار می‌شود. دو عصاره تا زمان خشکی در یک دستگاه تبخیر در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد ترکیب و تلغیظ می‌شوند، با ۱۰ میلی‌لیتر اتیل استات- سیکلوهگزان ۱:۱=v/v، ۲ میلی‌لیتر آب مقطر شستشو می‌شوند و سانتریفوژ می‌شوند. لایه آلی خشک‌شده در ۴۰ درجه سانتی‌گراد خشک می‌شوند و در ۵ میلی‌لیتر اتیل استات- سیکلوهگزان (۱:۱v/v) حل می شوند و فاز آبکی با ۱ میلی‌لیتر محلول اسید فسفریک ۵۰٪ پر می‌شود تا pH=۳ تنظیم شود. این دو فاز از طریق کروماتوگرافی نفوذ ژل بیشتر در معرض فرآیند تصفیه قرار می‌گیرند و ستون عصاره‌گیری فاز جامد به ترتیب با پلی آمید رزین بسته‌بندی می‌شوند.	ستون LC-DAD C18 (۴/۶ mm ×۲۵۰ mm ،۵ µm) فاز متحرک: الف) متانل و ب) ۰/۰۱ مول بر لیتر محلول بافر فسفات، pH ۷/۵، کروماتوگرافی تراوایی ژل شوینده گرادیان مجهز به یک ستون تصفیه (۴۰۰ mm، ۲۵mm) بسته‌بندی‌شده با BioBeads (۳۸-۷۵ دقیقه)	[۱۸]
مواد خوراکی و نوشیدنی‌ها	۱۷ ماده رنگزای خوراکی سنتزشده	بسترهای خوراکی جامد ۴ گرم ۲۰ میلی‌لیتر اتانل-آب (۱:۱v/v)، هموژنیزه و به مدت یک ساعت همزده می‌شود، و به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۵۰۰۰ دور بر دقیقه تحت سانتریفیوژ قرار می‌گیرد. باقیمانده جامد جمع‌آوری شده و با ۲۰ میلی‌لیتر مخلوط حلال عصاره‌گیری می‌شود، pH با H_3PO_4 قطره قطره تا ۲ تنظیم می‌شود و با کارتریج پلی آمید SPE با استفاده از ۴/۵ محلول ۱٪ متانل/ آمونیاک (۱:۱v/v) به عنوان شوینده عصاره‌گیری می‌شود. نوشیدنی: نمونه گاززدایی شده با آب دیونیزه شده به مدت ۱۰ دقیقه در ۱۵۰۰۰ دور بر دقیقه تحت سانتریفیوژ قرار می‌گیرد.	ستون LC-DAD C8 (۱۵۰ mm ×۴/۶ mm ،۳ µm) فاز متحرک: الف) استنیتریل و ب) ۱۰۰ mmol/L استات سدیم pH=۷، شوینده گرادیان	[۱۷]

جدول ۳ (ادامه).

بستر	موادرنگزای آزو	روش تحلیلی		منابع
		روش عصاره‌گیری	سیستم تشخیص یا آشکارسازی	
آب	قرمز خوراکی ۱۷	۲۵ میلی‌لیتر نمونه صاف‌شده با صافی ۰/۴۵ میلی متر، pH تنظیم شده تا ۴/۰ و عصاره‌گیری‌شده با ۳/۵ میلی مول ACN به عنوان شوینده در ستون شیشه‌ای عصاره‌گیری فاز جامد (رزین MCI GEL CHP20P)	طیف‌سنج پرتو فرابنفش قابل‌رویت در ۵۰۶ نانومتر	[۱۹]
مواد خوراکی	ماده رنگزای خوراکی ۹، ماده رنگزای زرد خوراکی ۴، ماده رنگزای زرد خوراکی ۳، ماده رنگزای زرد پرتقالی، قرمز خوراکی ۱۷، قرمز نارنجی خوراکی	عصاره‌گیری حلال با کمک امواج فراصوت: ۲۰ گرم نمونه در لوله آزمایش ۱۵ میلی‌لیتر اتانل در ۵۰ میلی‌لیتر آب برهم زده می شود. پروب (۱۵ دقیقه) در مخلوط نمونه غوطه‌ور می شود تا عصاره‌گیری حلال به کمک امواج فراصوت انجام شود. سپس برای جمع‌آوری لایه شناور شده در لوله آزمایش سانتریفوژ شد. عصاره‌گیری در متانل تکرار شد. تمام مواد شناور ترکیب شدند، باقیمانده ته‌نشین شد و با استن استخراج (عصاره‌گیری) شد. لایه‌های استن ترکیب می‌شوند و با استفاده از تبخیرکننده خلاء سانتریفوژ تبخیرشده، و ماده شناور متانل+ عصاره استن خشک شده به همراه تبخیر بدست میاید. عصاره خشک شده + ۲ میلی‌لیتر متانل صاف می‌شود و به شیشه کوچک منتقل می‌شود.	ستون: LC-PDA C18 (۲۵۰ mm ×۴/۶۰ mm، ۵ µm) فاز متحرک: استات آمونیم ۱٪، متانل و استن، شوینده گرادیان	[۲۹]
محصولات لبنی و غذاهای چرب	۱۰ ماده رنگزای خوراکی سنتز شده	سیستم خودکار عصاره‌گیری فاز جامد با استفاده از ستون‌های کتان و RP-C18 برای ماندگاری متوالی مواد رنگزای مصنوعی و طبیعی	ستون LC-PDA Spherisorb ODS-2 RP-C18 (۵µm ،۲۵ Cm × ۴/۶ mm i.d.) متناسب با یک ستون محافظ Spherisorb ODS-(۵µm، ۷/۵ Cm × ۴/۶ mm i.d.) برای مواد رنگزای طبیعی: فاز متحرک: متانل و آب حاوی ۰/۰۷ گرم بر لیتر ستیل-تری متیل آمونیم برومید (به عنوان معرف تعامل یون)، تنظیم شده تا pH =۶ با اسید ارتوفسفریک. برای مواد رنگزای مصنوعی: فاز متحرک: ACN و آب حاوی ۰/۲۹ گرم بر لیتر ستیل-تری متیل‌آمونیم برومید (به عنوان معرف تعامل یون)، تنظیم شده تا pH=۵/۵ با اسید ارتوفسفریک، حلال‌شویی گرادیان.	[۲۰]
گوشت	۲۱ ماده رنگزای خوراکی سنتزشده	عصاره‌گیری با کمک مایکروویو: ۱۰ گرم نمونه های هموژنیزه + ۱/۵ میلی‌لیتر از ۱۰ میلی‌گرم بر لیتر مواد رنگزای استاندارد هر آنالیت + هموژنیره (۱۰ دقیقه)، عصاره‌گیری شده با ۱۵ میلی‌لیتر متانل: آب (۵:۹۵ v/v) با استفاده از عصاره‌گیری مایکروویو بر اساس ۱۰۰ W ۵۰ psi در دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۵ دقیقه، مدت ۱۰ دقیقه در ۱۵۰۰۰ دور بر دقیقه تحت سانتریفیوژ قرار می‌گیرد. سه دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد. ماده شناور جمع‌آوری شده و با استفاده از ستون C18 برای SPE فرآوری می شود و با ۴ میلی‌لیتر متانل-اسید استیک (۵:۹۵ v/v) شستشو می‌شود. شوینده‌های جمع‌آوری شده تا زمان رسیدن به خشکی در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد تبخیر شدند و فقط باقیمانده‌ها دوباره با ۰/۵ میلی‌لیتر متانل ترکیب شده و قبل از تجزیه از طریق صافی غشای صاف شدند.	ستون UHPLC-DAD C18 (۲/۱ ×۴/۶۰ mm، ۵ µm) فاز متحرک: الف) ۲۰ میلی مول استیک آمونیم-۰/۰۲ اسید استیک (pH=۵) و ب) استونیتریل، حالت گرادیان	[۲۸]

جدول ۳ (ادامه).

بستر	موادرنگزای آزو	روش تحلیلی		منابع
		روش عصاره‌گیری	سیستم تشخیص یا آشکارسازی	
نوشیدنی، شربت و آب‌نبات	۴۰ ماده رنگزای سنتز شده خوراکی	برای نوشیدنی‌ها و شربت‌ها: ۱۰ گرم نمونه + گاززدایی در مورد نوشیدنی‌ها (۵ دقیقه)/ تبخیر (در صورت وجود نوشابه الکلی) و تشکیل حجم با ۱۰ میلی‌لیتر آب ، مخلوط و تنظیم با ۶ درصد اسید استیک در pH=۳ برای آب نبات و خمیرها: ۱۰ گرم نمونه پودر شده +با ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر، حل شدن با حرارت و تنظیم با ۶ درصد اسید استیک در pH=۳ تنظیم شده. عصاره‌گیری: تفکیک ستون پلی آمید برای عصاره‌گیری استفاده شد. ۱۵ میلی‌لیتر محلول آمونیاک ۱٪ اتانل (۱:۱ v/v) به عنوان شوینده استفاده شد، ماده شوینده جمع‌آوری و صاف شد و با ۶٪ اسید استیک خنثی‌سازی و خشک شد. باقی‌مانده بدست آمده مجددا با ۲ میلی‌لیتر متانل/آب (۱:۱ v/v) ترکیب شد.	ستون LC-DAD C18 (۵۰ mm ×۴/۶ mm، ۱/۸ µm) فاز متحرک: الف) ۰/۱ مول بر لیتر استات آمونیم با pH=۶/۷ و ب) متانل- استونیتریل (۵۰:۵۰ v/v)؛ شستشوی گرادیان.	[۲۲]
گوشت و علوفه دامی	زرد پرتقالی، قرمز ۸۸، قرمز خوراکی ۱۷، نارنجی ۲، و صورتی خوراکی ۲	۲ گرم گوشت جوجه هموژنیزه شده که با مجموعه محلول‌های استاندارد ترکیب ۷رنگی مخلوط شده و با ۱۰ میلی بر لیتر آب ، $C_2HSOH:NHs$ (v/v/v)۱۹:۱:۸۰ عصاره‌گیری شده و به مدت ۱۰ دقیقه با ۱۲۰۰۰ دور بر دقیقه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد. سانتریفوژ شده است. جمع‌آوری ماده شناور و خشک‌کردن آن در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد زیر بخار نیتروژن. ترکیب مجدد باقیمانده با ۰۵ میلی‌مول $v/v/19:1:80\ C_2H_5OH:NH_3:H_2O$	ستون LC-DAD-ESI /MS/MS C18 (۲/۱ mm ×۱۵۰ mm، ۵ pm) فاز متحرک: الف) ۲۰ میلی مول بر لیتر استات آمونیم: ACN، حلال شویی گرادیان	[۲۳]
تخم ماهی	۱۴ ماده رنگزای خوراکی	۵ گرم نمونه در ۲۰ میلی‌گرم آمونیاک مخلوط شده (۱۰دقیقه)، سانتریفوژشده در ۳۵۰۰ دور بر دقیقه، لایه مایع جمع‌آوری شد. تکرار عصاره‌گیری تا اینکه لایه مایع بی‌رنگ شود. ترکیب لایه‌های آبی و چربی‌زدایی با ۰/۳ میلی‌لیتر ان-هگزان، تنظیم pH تا ۲) و ۱ مولار HCl ۲ گرم پلی آمید، هم‌زدن در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد (۲۰ دقیقه)، صاف‌کردن و تکرار همین مرحله تا اینکه محلول بی‌رنگ شود. مواد رنگی با استفاده از ۱:۲ v/v محلول آمونیاک (۲۵٪) و متانل واجذب شدند.	ستون LC-DAD C18 (۱۲۵ mm ×۴۴ mm، ۵ pm) فاز متحرک: الف) ۱۰۰ میلی مول بر لیتر بافر استات سدیم (pH=۷) و ب) استونیتریل، حلال‌شویی گرادیان	[۲۴]
۴۴ محصول خوراکی	۷ ماده رنگزای خوراکی	برای نوشیدنی‌ها، غذاهای منجمد، مخلوط‌های پودری و محصولات ژلاتینی: ۵ گرم نمونه (نوشابه‌های کربنات‌دار قبل از وزن کشی به منظور ایجاد یکنواختی برهم زده شدند) + ۱۰۰ میلی‌لیتر آمونیم هیدراکساید با ۱۰ میلی‌لیتر اتانل و بعد صاف‌کردن. پودر ۰/۰۱ گرم نمونه حل شده در یک محلول متانل ۵۰٪ حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر هیدروکسید آمونیم با هم‌زدن و سپس صاف‌کردن. نمونه ۰/۵ گرم محصول ژلاتینی + ۵۰٪ محلول متانل حاوی ۱۰۰ میلی‌لیتر هیدروکسید آمونیم. برای آب‌نبات، بستنی، ژله، ادویه، سس گوجه فرنگی، سس‌ها، محصولات پخته شده، و فرآورده‌های لبنی: ۵ گرم نمونه هموژنیزه شده +۱۰۰ میلی‌لیتر آمونیم هیدراکساید و متانل v/v ۳:۷ به مدت ۱ دقیقه در هم‌زن آب قرار گرفت، به مدت ۱ ساعت در ۳۸ درجه سانتی‌گراد با هم‌زدن متناوب برهم زده شد و به مدت ۵ دقیقه در ۸۵۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ شد. عصاره محلول به یک لوله سانتریفوژ تمیز ۵۰ میلی‌لیتر منتقل شد. محصول باقیمانده با افزودن ۱۰میلی‌لیتر۷:۳ متانل و هیدروکسید آمونیم شستشو می‌شود، به مدت ۵ دقیقه برهم زده می‌شود و به مدت ۵ دقیقه سانتریفوژ می‌شود. عصاره محلول با عصاره قبلا جمع آوری شده مخلوط میشود. مرحله شستشو دوبار دیگر تکرار می‌شود و به مدت ۵ دقیقه در صورت نیاز با افزودن ۲ میلی‌لیتر ان-هگزان در ۸۵۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ شد. تقریبا ۲۰ میلی‌لیتر اسید استیک تغلیظ شده به عصاره محلول افزوده می‌شود، عمل صاف‌کردن انجام شده و برای تحلیل به یک شیشه کوچک LC منتقل می‌شود.	ستون LC-PA Xterra RP18 (۲۵۰×۴/۶ mm، ۵ pm) فاز متحرک: الف) ۰/۱ مولار استات آمونیم در آب و ب) ۰/۱ مولار استات آمونیم در متانل: حالت گرادیان	[۲۵]

جدول ۳ (ادامه).

بستر	موادرنگزای آزو	روش تحلیلی		منابع
		روش عصاره‌گیری	سیستم تشخیص یا آشکارسازی	
۴۷ محصول خوراکی	۱۷ ماده رنگزای خوراکی	برای نوشیدنی‌ها و ترکیبات پودری، ژل میوه و آب‌نباتهای سفت: ۲۵ تا ۳۰ میلی‌لیتر نمونه (نوشیدنی) یا ۵ تا ۱۰ گرم (ترکیب پودر و ژله میوه یا دو یا چند واحد آب نبات سفت) + ۵۰ میلی‌لیتر آب هم زده شد و در صورت لزوم در معرض حرارت ملایم (~۶۰ درجه سانتی‌گراد) قرار گرفت و تصفیه شد. برای کوکی‌ها، غلات، ویفرها، چیپس، رشته فرنگی، آب نبات آدامسی: ۱۵ گرم نمونه پودر شده +۲۰۰ میلی‌لیتر اسید استیک یخی ۱۵ درصد + حرارت‌دهی ۶۰ درجه سانتی‌گراد و صاف‌کردن و سانتریفوژ (۱۰ دقیقه در ۴۵۰۰ دور بر دقیقه). جمع‌کردن ماده شناور، صاف‌کردن و تغلیظ شدن تا ۵۰ میلی‌لیتر با استفاده از حرارت ملایم ۶۰ درجه سانتی‌گراد با همزدن مداوم به همراه پاک‌سازی ایزولاسیون و مراحل بازیابی با استفاده از SPE ایزولاسیون و مرحله پاک‌سازی: ۵ میلی‌لیتر (اسید استیک ۱٪ در ۵ میلی‌لیتر متانل در ۵-۲ میلی‌لیتر نمونه و ۵ میلی‌لیتر آب. مرحله بازیابی: ۲ میلی‌لیتر هیدروکسید آمونیم ۱۰٪ در ۲ میلی گرم متانل و تبخیر تا خشک‌شدن + ۱:۱(v/v) متانل/آب برای ترکیب مجدد آنالیت‌ها.	LC-PDA RP-C18 (۵μm، ۲۵ Cm× ۴/۶ mm i.d.) و ستون محافظ مربوطه فاز متحرک: شوینده الف) ۰/۱ مولار استات آمونیم A در آب و شوینده و ب) ۰/۱ مولار استات آمونیم در متانل، حلال‌شویی گرادیان	[۲۱]
مواد خوراکی و دارو	زرد خوراکی ۴، قرمز خوراکی ۳، زرد پرتقالی، آبی خوراکی ۳، قرمز خوراکی ۱۷، قرمز اسید ۸۸	نوشیدنی و شربت: ۲۵ میلی‌لیتر نمونه و ۲۵ میلی‌لیتر آب دیونیزه شده. آب نبات و ژله: ۵ گرم (پودر آب نبات یا ژله) محلول در بطری ۲۵ میلی‌لیتری و تشکیل حجمی با آب مقطر دیونیزه‌شده شکلات با پوسته ترد شکر: ۵ گرم پودر+ (۰/۲۵ v/v) ۲۰ میلی‌لیتر آمونیاک به آرامی برای حذف مواد رنگزای تکان داده می شود و سپس باقیمانده بیرنگ شده جدا می‌شود. پفک: ۵ گرم پودر+ (۰/۲۵ v/v) ۲۰ میلی‌لیتر آمونیاک عصاره‌گیری شده با استفاده از (۰/۲۵ v/v) ۲۰ میلی‌لیتر آمونیاک با همزدن زیاد و صاف‌کردن. تکرار این دستورالعمل برای حل‌کردن ماده رنگزای باقیمانده از ترکیب و مخلوط شدن محلول‌ها	ستون LC-UV C8 (۲۵۰ mm ×۴/۶ mm، ۵ pm) فاز متحرک: مخلوط ۵۰ میلی مول بافر فسفات (pH=۷) و تریتون X- 100 (۰/۲۵ v/v) حلال‌شویی ایزوکراتیک	[۲۶]
نمونه‌های آبمیوه مصنوعی و ژلاتین	زرد خوراکی ۴، آبی خوراکی ۱، زرد پرتقالی	۲ گرم نمونه هموژنیزه در آب گرم ۶۰ درجه حل می‌شود، خنک گشته و حجم ۵۰ میلی‌لیتر با آب را تشکیل می‌دهد و تصفیه می‌گردد (صافی غشای ۰/۴۵ pm)	ستونLC-PDA C18 (۲۵۰ mm ×۴/۶ mm، ۵ pm) و ستون محافظC18 (۱۰ mm ×۴ mm، ۵ pm) فاز متحرک: الف) تریتون X-100 (۰/۲۵ v/v) و ب) ۵۰ میلی مول بر لیتر بافر فسفات (pH) برابر ۷ حلال شویی ایزوکراتیک	[۲۷]
نوشیدنی‌ها granulated	ماده رنگزای خوراکی قرمز ۸۸، ماده رنگزای خوراکی قرمز ۱۷	برای طیف‌سنجی اشتقاق عبور صفر (ZCDS)- طیف‌سنجی مشتق نسبت (RDS) و روش جبران خسارت (CT) روش‌ها: ۲ گرم نمونه پودر شده حل شده در ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر، به مدت ۵ دقیقه با همزن مغناطیسی همزده می‌شود و محلول ۳:۱۰ (v/v) با آب رقیق می‌شود. برای طیف‌سنجی اختلاف-مشتق (DDS) روش: ۲ گرم نمونه پودر شده در ۵۰ میلی گرم آب مقطر حل می‌شود، ۵ دقیقه با همزن همزده می‌شود و محلول ۳:۷ (v/v) به طور مجزا با اسید هیدروکلریدریک ۱ مولار و سود ۰/۱ مولار رقیق می‌شود. نیازی به عصاره‌گیری یا تبخیر بیشتر نیست.	طیف‌سنجی UV-قابل‌مشاهده	[۴۰]

جدول ۳ (ادامه).

بستر	موادرنگزای آزو	روش تحلیلی		منابع
		روش عصاره‌گیری	سیستم تشخیص یا آشکارسازی	
نوشابه	ماده رنگزای زرد خوراکی ۵، زردپرتقالی، آبی خوراکی ۳	عصاره‌گیری فاز جامد (SPE): ۳ میلی‌لیتر نمونه‌های هموژنیزه‌شده و گاززدایی‌شده به کارتریج‌های SPE منتقل شدند و مواد رنگزای مصنوعی با ۱۸ درصد (v/v) ۱۰ میلی‌لیتر ایزوپروپیل الکل عصاره‌گیری شدند و برای رسیدن به ترکیبات رنگی خشک تبخیر شدند.	TLC و HPLC-IP-PDA تصفیه شده با صفحات کروماتوگرافی ژل سیلیس TLC-PET۲۰× ۲۰ با فاز متحرک (۸ میلی‌لیتر ایزوپروپیل الکل و ۳ میلی‌لیتر هیدروکسید آمونیم) ستون C18 (۱۵۰ mm ×۴/۶ mm، ۵ pm) و ستون محافظ (۲۰ mm ×۴ mm، ۵ pm) فاز متحرک ۱: الف) آب و ب) متانل (۷۰:۳۰، ۶۱:۳۹، ۶۳:۳۷، v/v) فاز متحرک ۲: الف) محلول استات آمونیم ۰/۰۸ مول: ب) متانل (۷۰:۳۰، ۶۱:۳۹، ۶۳:۳۷، v/v)	[۴۲]
محصولات خوراکی	ماده رنگزای زرد خوراکی ۵، سبز خوراکی ۳، ماده رنگزای آبی خوراکی ۱، قرمز خوراکی ۸۸، زرد پرتقالی، زرد خوراکی ۳، ماده رنگزای قرمز طبیعی ۴	به ندرت مورد نیاز است	روش تفکیک MEEKC محلول میکرو امولسیون pH ۲ حاوی ۳/۳۳٪ سولفات دودسیل سدیم، ۰/۸۱٪ اکتان، ۶/۶۱٪ بوتانل و ۱۰٪ استونیتریل	[۴۴]
نوشیدنی‌های الکلی	سنتز ۱۸ ماده رنگزای خوراکی	نمونه‌های گاززدایی‌شده با تحریک مکانیکی و صاف‌شده از طریق صافی غشایی با اندازه حفره ۰/۴۵ pm	CE-UV/vis موئینه سیلسی ترکیب شده با ۷۵ سانتی‌متر محلول ۱۰ میلی مول بافر فسفات با pH ۱۰ میلی مول سولفات دودیسل سدیم، برابر ۱۱و ۲۵ kV ولتاژ	[۴۵]
بستنی	زرد پرتقالی، قرمز خوراکی ۱۷، قرمز خوراکی ۳، قرمز خوراکی ۸۸	۳۰ میلی‌لیتر محلول نمونه و ۱۰ میلی‌لیتر اتانل آمونیاکی (اتانل+آمونیاک) عصاره‌گیری با ۱۵ میلی‌لیتر اتانل آمونیاکی انجام می‌شود و سپس صاف می‌شود.	ستون موئینی CE-PDA (۵۰Cm × ۷۰ pm I.D.) بافر الکتروفورز: الف) ۲۵ میلی مول بر لیتر فسفات سدیم و ب) ۲۵ میلی مول بر لیتر بورات سدیم(۱: ۱) pH برابر ۱	[۴۶]
نوشابه	ماده رنگزای قرمز ۸۸، ماده رنگزای زرد پرتقالی و قرمز خوراکی ۳	۲ میلی‌لیتر نمونه در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب، ۱۰ دقیقه حرارت می‌گیرد و ۳۰ دقیقه در ۳۵۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ می‌شود و صاف می‌شود.	روش HLA/GO: به عنوان روش کالیبراسیون چندمتغیری (طرح فاکتوریل کسری ۲۴) روش LC: فاز متحرک: الف) ۱۰۰ میلی‌مول بر لیتر بافر فسفات (pH= ۷) و ب) متانل، حلال‌شویی گرادیان خطی	[۵۳]
نوشابه	ماده رنگزای قرمز ۸۸، ماده رنگزای پرتقالی و قرمز خوراکی	نمونه گاززدایی شده با فراصوت و صاف‌شده (صافی ۰/۴۵ pm)	ستون LC-UV/Vis C18 (۲۵۰ mm ×۴/۶ mm، ۱۰ pm) فاز متحرک: الف) ۰/۱ مول بافر فسفات (pH=۴) و ب) متانل، برنامه حلال‌شویی گرادیان	[۵۵]
شیرینی سازی	قرمز خوراکی ۳ و قرمز خوراکی ۱۷	۱ گرم نمونه + ۱۰ میلی‌مول متانل که تا زمان رنگ‌زدایی کامل هم‌زده می‌شود، عصاره قرمز به‌دست‌آمده با ۱:۱۰(v/v) آب مقطر رقیق می‌شود و قبل از تزریق از طریق ۰/۴۵ pm صاف می‌شود.	LC-UV-Vis ODS-2 Spherisorb C18 (۲۵۰ mm ×۴/۶ mm، ۵ pm) پیش ستون محافظ LiChrospher RP-C18 (۱۵ mm ×۴/۶ mm، ۵ pm) فاز متحرک: آب، ACN ۷۰:۳۰ v/v ، ۵ میلی‌مول محلول اکتیل‌آمین pH=۶/۴ تنظیم‌شده با اسید ارتوفسفریک	[۴۷]

جدول ۳ (ادامه).

بستر	موادرنگزای آزو	روش تحلیلی		منابع
		روش عصاره‌گیری	سیستم تشخیص یا آشکارسازی	
نوشابه	قرمز خوراکی ۱۷ و قرمز خوراکی ۸۸، زرد پرتقالی، قرمز خوراکی ۵	نمونه‌ها صاف و در صورت کربناته‌شدن، گاززدایی شدند، pH برابر ۶/۵	LC-PDA نوکلئوسیل MOS C8 ۵P ،۲۵۰ ×۴/۶ mm، id، در یک ستون تحلیلی فاز متحرک: آب-ACN ؛ حالت حلال شویی گرادیان	[۴۹]
نوشیدنیهای غیر الکلی		نمونه ها هموژنیزه‌شده و از طریق صافی‌های غشای ۰/۴۵ pm صاف و تزریق شدند.	الگوریتم‌های درجه دوم HPLC-DAD ستون C18 (MCR-ALS and U-PLS/RBL) فاز متحرک: الف) متانل و ب)۰/۰۸ میلی‌مول استات آمونیم (۷۷:۳۳ v/v)؛ حلال‌شویی ایزوکراتیک	[۵۰]
نوشیدنی و غذا	ماده رنگزای زرد خوراکی ۴، ماده رنگزای قرمز خوراکی ۱۷، ماده رنگزای زرد پرتقالی، ماده رنگزای قرمز خوراکی ۳ و ماده رنگزای آبی خوراکی ۹	نوشیدنی: ۱۰ گرم نمونه رقیق‌شده با ۵۰ میلی‌لیتر آب، و در صورت لزوم گاززدایی‌شده و صاف‌شده. نوشیدنیهای تغلیظ شده با طعم میوه: ۲ گرم نمونه رقیق شده با ۵۰ میلی گرم آب و صاف‌شده. مربا و شیرینی‌جات: ۲ گرم نمونه هموژنیزه محلول در ۵۰ میلی‌لیتر آب که ۱۵ دقیقه برهم زده و صاف شد.	ستون IP-LC-PDA C18 (۱۲۵ mm ×۴/۶ mm، ۵ pm) مجهز به ستون محافظ (۲۵ mm ×۴/۶ mm، ۵ pm) فاز متحرک: الف) آب و استونیتریل (۵۰:۵۰ v/v) مخلوط با ۰/۳۵ مولار (۱- هگزادسیل تریمتیل آمونیم برومید ((CTAB) pH=۷.۵ (تعدیل‌شده با سود ۱۰ درصد) و ب) آب و استونیتریل (۵۰:۵۰v/v) برنامه حلال‌شویی گرادیان	[۵۱]
نوشابه، زنجبیل و ادویه فلفل قرمز خوشمزه	ماده رنگزای قرمز خوراکی ۹ ، ماده رنگزای زرد خوراکی ۴، ماده رنگزای قرمز خوراکی ۱۷، ماده رنگزای زرد پرتقالی	برای نوشابه ها: نمونه ها قبل از تزریق به سیستم LCMS صاف و گاززدایی شدند. برای زنجبیل و ادویه فلفل قرمز: ۲۰ گرم نمونه هموژنیزه‌شده + ۵۰ میلی‌لیتر و ۵۰ میلی‌لیتر DMSO؛ ۱۵ دقیقه برهم زده می‌شود، ۵ دقیقه در ۴۰۰۰ دور بر دقیقه سانتریفوژ می‌شود، ماده شناور جمع می‌شود، از طریق صافی غشای ۰/۴۵ pm صاف می‌شود و حجم ۵۰ میلی‌لیتر (DMSO) را تشکیل می‌دهد.	ستون تحلیلی LC-MS Spherigel C18 (۴/۶ mm ×۲۵۰ mm، ۵ pm) فاز متحرک: الف) ۲۰ میلی مول استات آمونیم و ۱٪ اسید استیک و ب) حالت گرادیان متانل	[۵۸]

در این روش های استخراج مواد رنگزای مصنوعی و طبیعی در محصولات غذاهای چرب[1] را مشخص کرده‌اند، که در آن از یک سامانه استخراج خودکار فاز جامد با استفاده از مخلوط آمونیاک، متانل به عنوان حلال‌های شوینده و RP-C18[2] به عنوان فاز ثابت استفاده می‌کنند. در این گزارش استخراج هفده ماده رنگزای خوراکی در ۴۷ محصول خوراکی که از یک فرآیند SPE استفاده می‌کنند ارائه شده است [۲۱]. اخیرا، تانگ[3] و همکارانش استخراج شانزده ماده رنگزای مصنوعی در چاشنی مرکب با مقدار زیادی چربی را بررسی کرده‌اند. آنها گزارش دادند که ترکیب متانل، استن (۱:۱v/v) و ۲ مول/لیتر محلول کاربامید حاوی ۵٪ آمونیاک در متانل از کارآیی استخراج فوق‌العاده‌ای در حین تصفیه‌سازی با یک ستون GPC برخوردار است [۱۸]. در سال‌های اخیر ، استفاده از NH_2-LDC-MP به عنوان جاذب در SPE تحت میدان مغناطیسی برای افزایش بازدهی استخراج هفت ماده رنگزای مصنوعی با استفاده از آب خالص در pH=۹ به‌عنوان یک حلال استخراج گزارش شده است [۱۶].

۲-۱-۳-استخراج مایع-مایع (LLE)[4]

استخراج مایع-مایع (که به استخراج حلال نیز موسوم است) شامل تفکیک مواد مرکب بر مبنای حلالیت نسبی آنها در دو مایع غیرقابل امتزاج مختلف، معمولا فاز آلی و آب است. رایج‌ترین حلال‌ها (به تنهایی یا به صورت مرکب) برای استخراج ماده رنگزای آزوی موجود در محصولات خوراکی شامل آب، اتانل، متانل، ایزوپروپیل الکل، اتانل آمونیم، اتیل استات، آمونیاک، سیکلو

[1] lyophilized
[2] Reversed phase column
[3] Tang
[4] Liquid–liquid extraction (LLE)

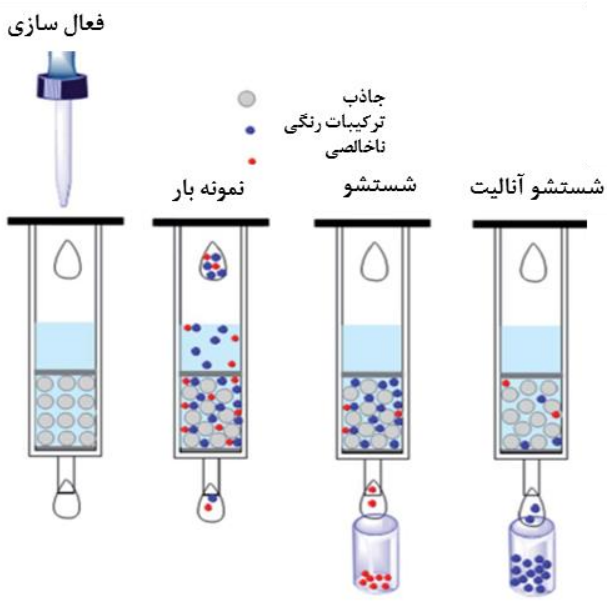
هگزان و تترا-ان-بوتیل فسفات آمونیم هستند (جدول ۳).

روش‌های LLE مختلفی در منابع برای استخراج مواد رنگزای موجود در محصولات خوراکی گزارش شده‌اند [۲۲]. از حلال‌های مختلفی برای استخراج همزمان چهل ماده رنگزای خوراکی در نوشابه‌ها و شکلات‌ها استفاده کرده‌اند و متوجه شدند که مخلوط حلال آمونیاک و اتانل (۱:۱ v/v) از کارآیی استخراج مناسبی پس از امواج فراصوتی و تبخیر نمونه برخوردار هستند [۲۳]. مخلوط سه‌گانه اتانل، آمونیاک و آب (۸۰:۱:۱۹ v/v/v,) بازدهی استخراج مناسبی برای هفت ماده رنگزا در نمونه‌های گوشت و علوفه دام دارد. کروس[1] و همکارانش [۲۴] چهارده ماده رنگزای مصنوعی در تخم ماهی را با استفاده از ترکیب محلول آمونیاک (۲۵٪) و متانل (۱:۹ v/v) تجزیه کردند. به همین نحو، [۲۵] هفت ماده رنگزای خوراکی مجاز در ۴۴ محصول خوراکی را با روش LC تعیین کردند که در آن از هیدروکسید آمونیم و متانل به‌عنوان حلال‌های استخراج استفاده شده بود.

در سال‌های اخیر، استفاده از حلال‌های استخراج سازگار با محیط زیست به علت ویژگی سمیت اندکشان افزایش یافته است. خانووی[2] و همکارانش در سال ۲۰۱۲ یک روش استخراج سبز با استفاده از حلال‌های غیرآلی مانند آمونیاک (۰/۲۵٪ v/v) و آب را برای استخراج مواد رنگزا از محصولات خوراکی و داروها ارائه دادند [۲۶]. ویدوتی[3] و همکارانش در سال ۲۰۰۶ یک روش سبز ساده را برای استخراج مواد رنگزای خوراکی از آب‌میوه مصنوعی و نمونه های ژلاتین با استفاده از آب به عنوان حلال توسعه داده بودند که در جدول ۳ ارائه شده است [۲۷] .

۲-۱-۴- سایر روش‌های استخراج

اگرچه استخراج جامد-مایع و مایع-مایع پرکاربردترین روش‌های مربوط به نمونه‌های خوراکی است اما سایر روش‌های استخراج برای تجزیه‌ی ماده رنگزای موجود در محصولات خوراکی، مثلا استخراج با کمک مایکروویو (MAE) و استخراج با کمک فراصوت (UAE) نیز به عنوان جایگزین‌های استخراج سازگار با محیط‌زیست مورد استفاده قرار گرفته‌اند. این گزینه ها در آزمایشگاه مقرون به صرفه هستند زیرا ویژگی استخراج‌های متعارف با حلال‌های آلی، استفاده از حجم زیاد حلال زمان بر هستند و اغلب دارای بازدهی پایین برای مواد رنگزای موجود در مواد خوراکی هستند و همچنین انتخاب‌پذیری و دقت کمی دارند. سون[4] و همکارانش به بررسی استخراج ۲۱ ماده رنگزای مصنوعی با استفاده از متانل-اسید استیک (۹۵:۵ v/v) با (MAE) در گوشت به عنوان یک حلال پرداختند. به همین نحو [۲۸]، روش استخراجی با استفاده از دو فاز حلال (متانل و استن) و UAE را ارائه داده اند که منجر به بهبود بازدهی استخراج مواد رنگزای آب‌دوست و آب‌گریز شده است [۲۹، ۳۰]. شکل ۱ شمایی از جداسازی مواد رنگزا توسط فاز جامد را نشان می‌دهد.



شکل ۱- شمایی از جداسازی مواد رنگزا توسط فاز جامد [۳۰].

۲-۲- تعیین مواد رنگزای خوراکی در بستر های خوراکی[5]

حضور مواد رنگزای آزو در ترکیبات پیچیده خوراکی موجب افزایش مشکلات جدی برای توسعه روش‌های تجزیه‌ای جهت شناسایی و اندازه‌گیری آنها در نمونه‌های واقعی می‌شود. روش‌های مختلف تجزیه‌ای مانند طیف‌سنجی، کروماتوگرافی لایه نازک، الکتروفورز موئینه، کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا و طیف‌سنجی جرمی برای تعیین مواد رنگزای آلی موجود در محصولات خوراکی در هر دو روش استاندارد و نمونه واقعی استفاده می‌شوند.

۲-۲-۱-روش طیف‌سنجی[6]

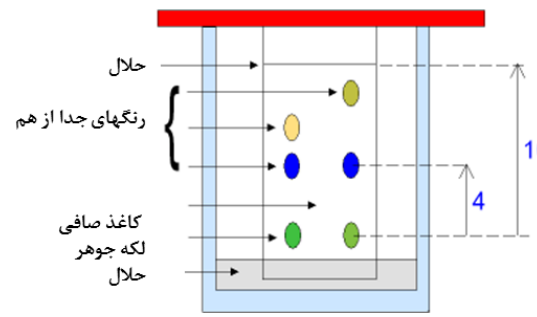
مواد رنگزای خوراکی در ناحیه مرئی کاملا جاذب نور هستند از این رو، روش‌های طیف‌سنجی مناسب‌ترین روش برای تجزیه و تحلیل کمی آن‌ها است. طیف‌سنجی یکی از رایج ترین روش‌های تحلیلی به کار رفته به علت هزینه کم است و نیازی به اپراتورهای کاملا مجرب ندارد. با این حال، عدم وجود ویژگی جذب قابل مشاهده معمولا به علت هم‌پوشانی طیفی مانع استفاده از این روش در حالت مخلوط گونه‌های جاذب می‌شود. روش‌های مختلفی مبتنی بر طیف‌سنجی برای تعیین کمی مواد رنگزای خوراکی در بسترهای خوراکی مختلف منتشر شده‌اند [۳۷] سویلاک[7] و همکارانش اخیرا با روش حساس SPE در یک ستون شیشه‌ای حاوی رزین MCI GEL CHP20P با روش تعیین طیف‌سنجی قرمز خوراکی ۱۷ در نمونه‌های آب پرداختند [۳۸]. آنها یک روش ساده با دقت بسیار زیاد و هزینه تجزیه‌ای کم ارائه دادند. از سوی دیگر، پژوهشگران یک روش اقتصادی را برای تخمین و تعیین همزمان پنج ماده رنگزای خوراکی متعارف در محصولات خوراکی

[1] Krause
[2] Khanavi
[3] Vidotti
[4] Sun
[5] Determination of ADF in food matrices
[6] Spectrophotometry
[7] Soylak

تجاری را با روش رنگ‌سنج نوری متحرک مطرح کرده‌اند که مبتنی بر اختلاف نسبت قابلیت جذب با حداکثر جذب مخلوط‌های سه تایی/دوتایی است [۳۹]. اخیرا توراک و همکارانش دو ماده رنگزای قرمز خوراکی ۱۷ و قرمز خوراکی اسید ۱۸ را همزمان در نوشابه‌ها با استفاده از روش‌های طیف‌سنجی مشتقی تعیین کرده و نتایج را با روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا مقایسه کردند [۴۰] و مشاهده نمودند که روش طیف‌سنجی ساده‌تر، مستقیم‌تر است (زیرا آنها هر یک از ماده رنگزای خوراکی را مستقل از یکدیگر بررسی می‌کردند).

۲-۲-۲-کروماتوگرافی لایه نازک (TLC)[1]

کروماتوگرافی لایه نازک نوعی کروماتوگرافی جذبی جامد–مایع است و اصول آن مانند کروماتوگرافی ستونی است. ولی در این مورد جسم جاذب جامد را به صورت یک لایه نازک در روی یک قطعه شیشه یا پلاستیک محکم پخش می‌کنند. یک قطره از محلول نمونه یا مجهول را در نزدیکی لبه صفحه می‌گذارند و صفحه را همراه مقدار کافی از حلال استخراج‌کننده در ظرفی قرار می‌دهند. همانطور که در شکل ۲ مشخص شده، مقدار حلال باید آنقدر باشد که فقط به سطح زیر لکه برسد. حلال به طرف بالای صفحه می‌رود و اجزاء مخلوط را با سرعت‌های متفاوت با خود می‌برد. در نتیجه ممکن است تعدادی لکه روی صفحه ظاهر شود. این لکه‌ها روی یک خط عمود بر سطح حلال قرار می‌گیرند. این روش کروماتوگرافی بسیار آسان است و به سرعت هم انجام می‌شود. این روش برای تفکیک اجزاء یک مخلوط بسیار مفید است و همچنین می‌توان از آن برای تعیین بهترین حلال استخراج کننده جهت کروماتوگرافی ستونی استفاده کرد. TLC به واسطه امکان دستیابی به نتایج بهتر در فاصله زمانی نسبتا کوتاه، ساده‌ترین، اقتصادی ترین و مناسب‌ترین روش کروماتوگرافیکی برای تجزیه کیفی مخلوط آنالیت‌ها است. چند روش کروماتوگرافی لایه نازک برای تحلیل مواد رنگزای خوراکی توسط کوچاراسکا[2] گزارش شده است. روش‌های مختلف آماده سازی نمونه و شرایط مختلف کروماتوگرافی را برای تجزیه مواد رنگزای خوراکی با استفاده از کروماتوگرافی لایه نازک در بسترهای خوراکی مختلف بررسی کرده‌اند [۴۱].



شکل ۲- شمایی از کروماتو گرافی لایه نازک [۴۲].

[1] Thin layer chromatography (TLC)
[2] Kucharska

اخیرا، دی آندرد[3] و همکارانش با استفاده از روش SPE به بررسی تجزیه مواد رنگزای خوراکی مصنوعی در نوشابه‌ها پرداختند که در این روش آنالیت‌ها با مخلوط الکل ایزوپروپیل و هیدروکسید آمونیم به عنوان فاز متحرک شسته می‌شوند [۴۲].

۲-۲-۳-الکتروفورز موئینی (CE)[4]

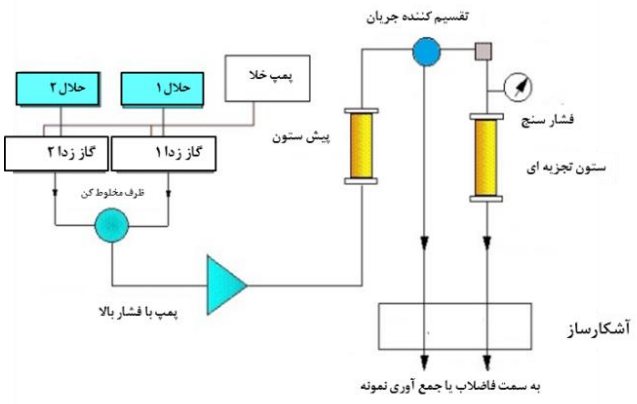
الکتروفورز مویین یک روش جداسازی و تجزیه‌ای است که در این روش مهاجرت اجزای نمونه با سرعت‌های متغیر در اثر میدان الکتریکی بکار رفته در یک لوله مویین با قطر کوچک و از جنس سیلیکا که با پلی آمید پوشش داده شده است، صورت می‌گیرد. برای آشکارسازی اجزای نمونه از آنالیز فلورسانس یا طیف‌سنجی بوسیله دریچه‌ای در لوله مویین استفاده می‌گردد. الکتروفورز مویین دارای کاربردهای بسیاری از جمله آنالیز پروتیین‌ها، پپتیدها، ترکیبات کایرال، داروها، یون‌های معدنی و به‌ویژه اندازه و مشخصه‌سازی نانو مواد می‌باشد. الکتروفورز مویین (CE) یک روش نسبتاً جدید جداسازی در مقایسه با روش‌های جداسازی قدیمی مانند کروماتوگرافی مایع با فشار بالا (HPLC) یا کروماتوگرافی گازی (GC) می‌باشد. یکی از مزایای مهم الکتروفورز مویین نسبت به دیگر روش‌های جداسازی، توانایی آن در جدا کردن مولکول‌های باردار و بدون بار است. آنالیز الکتروفورز مویین به سرعت انجام می‌شود و نسبت به الکتروفورز و کروماتوگرافی متعارف، مقرون به صرفه‌تر است. الکتروفورز مویین مدرن برگرفته از توسعه سیستم‌های تشخیص بر خط HPLC شدیدا حساس است. الکتروفورز مویین دارای یک سری حالات تفکیک است که شامل الکتروفورز منطقه موئینی، کروماتوگرافی مویینی الکتروسینتیک مایسل (MEKC)[5] و ایزوتاکوفورز موئینی و غیره است که از ولتاژ بالا برای رسیدن به تفکیک‌های کارآمد استفاده می‌کند [۴۳]. روش‌های گوناگونی برای تحلیل مواد رنگزای خوراکی با الکتروفورز مویین منتشر شده‌اند [۱۲]. هوانگ[6] در سال ۲۰۰۵ یک روش سریع و اقتصادی را برای تخمین و تشخیص ده ماده رنگزای خوراکی مصنوعی پرکاربرد مجاز در صنعت شیرینی‌سازی و داروی آرام‌بخش با MEKC پیشنهاد کرد [۴۴]. پرادو[7] نیز یک روش کروماتوگرافی الکتروکینتیک میکروامولسیون (MEEKC) با استفاده از یک محلول میکروامولسیون برای تجزیه هشت ماده رنگزای خوراکی بررسی کرد [۴۵]. جیووین[8] و همکارانش یازده ماده رنگزای خوراکی مصنوعی در مشروبات الکلی را بدون پیش تصفیه نمونه با استفاده از CE-UV/Vis[9] گزارش کردند و یک روش CE-PDA را برای مطالعه زرد پرتقالی، کارموزین[10] و قرمز خوراکی ۸۸ را در بستنی مطرح کرده و کمیت آن‌ها را با استفاده از یک استاندارد خارجی ارائه دادند [۴۶].

[3] De Andrade
[4] Capillary electrophoresis (CE)
[5] Micellar electrokinetic capillary chromatography
[6] Huang
[7] Prado
[8] Giovine
[9] Capillary electrophoresis ultraviolet-visible spectrophotometry
[10] Carmusin

۲-۲-۴-کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا (HPLC)[1]

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا یکی از پرکاربردترین روش‌های کروماتوگرافی است. فرآیند کروماتوگرافی به عنوان یک روش جداسازی که شامل انتقال جرم بین یک فاز ساکن و یک فاز متحرک است، تعریف می‌شود. روش کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا با بهره‌گیری از یک فاز متحرک مایع، ترکیبات یک مخلوط را روی فاز ساکن جدا می‌کند. شکل ۳ شمایی از کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا را نشان می‌دهد. فاز ساکن می‌تواند مایع یا جامد باشد. ترکیبات ابتدا در یک حلال حل می‌شوند. سپس درون یک ستون کروماتوگرافی تحت فشار بالا جریان می‌یابند. در ستون، ترکیبات مخلوط از هم جدا می‌شوند. میزان تفکیک‌پذیری بسیار اهمیت دارد و به میزان برهم‌کنش بین ترکیبات حل‌شده و فاز ساکن بستگی دارد. فاز ساکن به عنوان مواد متراکم‌شده درون ستون تعریف می‌شود. برهم‌کنش جسم حل شده با فازهای متحرک و ثابت می‌تواند از طریق انتخاب حلال‌ها و فازهای ساکن مختلف تغییر کند. در نتیجه کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا درجه بالایی از جداسازی را که در دیگر روش‌های کروماتوگرافی یافت نمی‌شود، فراهم می‌کند و توان آن را دارد تا به آسانی گستره وسیعی از مخلوط‌های شیمیایی را جدا نماید.

طیف وسیعی از روش‌های مبتنی بر کروماتوگرافی مایع برای تجزیه مواد رنگزای خوراکی موجود در محصولات خوراکی استفاده شده‌اند که اغلب آن‌ها با آشکارسازهای PDA[2]، UV- Vis[3] یا MS[4] همراه هستند. فازهای ثابت اکتادسیل (C18) و اکتیل منومری (C8) پرکاربردترین روش کارآمد برای تفکیک‌های فاز معکوس هستند. از آنجا که مواد رنگزای خوراکی به شدت قطبی هستند در نزدیکی حجم مرده به سرعت شسته می‌شوند. در چنین مواردی، استفاده از ستون C18 اتر معمولا زمان ماندگاری یا زمان حبس‌شدن ترکیبات مواد رنگزای آزو را افزایش می‌دهد [۴۶].



شکل ۳- شمایی از کروماتوگرافی مایع [۱۵].

به همین نحو، کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالای دو یونی (IP-HPLC[5]) را نیز می‌توان با اضافه کردن عوامل جفت کننده یون‌ها (عوامل یونی آب‌گریز) مانند بافر آمونیم استات بافر، ۱-هگزادسیل تری متیل آمونیم (CTAB) و غیره اضافه کرد تا فاز متحرک مناسب ایجاد شود و مطالعه آنالیت‌های یونی بهبود پیدا کند [۱۵]. جنارو[6] مواد رنگزای قرمز صنعت شیرینی‌سازی را با LC تعامل یونی با استفاده از اکتیل آمونیم فسفات به عنوان معرف تعامل یونی تعیین کرد [۴۷]. گنزالس[7] و همکارانش از یک روش استخراج خودکار مبتنی بر حلال‌شویی و استخراج فاز-جامد با کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا برای تعیین و تشخیص مواد رنگزای مصنوعی و طبیعی در محصولات لبنی و غذاهای چرب استفاده کرده‌اند.

تفکیک مواد رنگزا در یک ستون C18 انجام شد که از ستیل-تری متیل آمونیم برمید در آب و متانل به عنوان یک فاز متحرک در حالت گرادیان شوینده استفاده می‌کند [۴۸]. جورکووان[8] با استفاده از آب و استونیتریل به عنوان یک فاز متحرک، روش ساده‌ای را برای مطالعه هم‌زمان ماده رنگزای خوراکی قرمز ۱۷ و ماده رنگزای خوراکی قرمز ۸۸ ارائه داد [۴۹]. محققین با استفاده از RP-UFLC-PDA[9]، دو الگوریتم درجه دو را برای تحلیل ۲۰ ماده رنگزای خوراکی در غیرنوشیدنی‌ها مقایسه کرده‌اند [۵۱، ۵۰]. از ۱-هگزا دسیل تری متیل آمونیم برمید به عنوان یک عامل جفت‌ساز یونی در فاز متحرک برای افزایش زمان ماند هفت روزه استفاده کرد. به عبارت دیگر، بیشتر روش‌های کروماتوگرافی مایع که در این مقاله بررسی شدند از استات آمونیم به عنوان یک عامل جفت‌ساز یونی استفاده می‌کنند (جدول ۳).

پرکاربردترین حالت در کروماتوگرافی مایع، فاز معکوس است که فاز ثابت در آنجا تقریبا غیرقطبی و فاز متحرک، قطبی است. بونان[10] و همکارانش [۵۲] تجزیه هم‌زمان مواد رنگزای زرد و قرمز در بسترهای خوراکی جامد و مواد رنگزای قرمز، زرد و آبی در نوشیدنی‌ها را در یک فاز ثابت در حالت شویندگی گرادیان پیشنهاد کرده‌اند. الدگز[11] در سال ۲۰۰۹ کمیت زرد پرتقالی، قرمز خوراکی ۱۷ و قرمز خوراکی ۹ در نوشابه‌ها را با استفاده از روش تجزیه ترکیبی خطی Goicoechea و Olivieri (HLA/GO[12])، یک روش مبتنی بر سیگنال نمونه‌ها خالص بدون تفکیک هر محلول تعیین کردند [۵۳]. روش ارائه شده در مقابل یک روش HPLC استاندارد مقایسه شد. نتایج حاکی از آن بود که روش HLA/GO دارای دستورالعمل ساده و سریعی برای تعیین مقدار مواد رنگزای خوراکی در نوشابه‌های پودری در مقایسه با کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا است. به همین نحو، مواد رنگزای مصنوعی به‌کاررفته در تخم ماهی را با LC-DAD گرادیان تحلیل کردند و پی بردند که بازدهی آنالیت‌ها در یک ستون پلی آمید تابع گروه‌های پلی آمیدهای ارائه شده توسط محققان مختلف است [۵۴]. یک روش RP-LC گرادیانی برای مطالعه هم‌زمان

[1] High performance liquid chromatography (HPLC)
[2] Photo diod array
[3] Ultra voilet -visible
[4] Mass spectroscopy

[5] Ion-pair high performance liquid chromatography
[6] Gennaro
[7] González
[8] Jurcovan
[9] Reverse phase ultra-fast liquid chromatography Photo diode Array
[10] Bonan
[11] Al-Degs
[12] Hybrid linear analysis method of Goicoechea and Olivieri

افزودنی‌های خوراکی نظیر مواد رنگزای خوراکی، شیرین‌کننده‌های مصنوعی و نگهدارنده‌های با حداقل آماده سازی نمونه ارائه شده است [۵۵]. اخیرا، تانگ[1] و همکارانش [۱۸] مطالعه هشت ماده رنگزای مصنوعی محلول در آب و هشت ماده رنگزای مصنوعی محلول در چربی در ادویه را با یک روش حساس LC-DAD با استفاده از فاز ثابت و مخلوطی از بافر متانل و فسفات به عنوان یک فاز متحرک در حالت شویندگی گرادیان بررسی کرده‌اند. بیشتر روش‌های LC از حلال‌های آلی به عنوان فاز متحرک استفاده می‌کنند که تاثیر منفی بر سلامت انسان و محیط زیست دارد. با توسعه روش‌های تحلیلی سبز می‌توان این مشکل را برطرف کرد، راه حل این مسئله، استفاده از ماده فعال سطح (triton X-100) به‌عنوان یک فاز متحرک است [۵۶، ۵۷].

۲-۲-۵-طیف‌سنجی جرمی-کروماتوگرافی مـایع (LC-MS و LC-MS/MS)[2]

کروماتوگرافی مایع-طیف‌سنجی جرمی یک روش شیمی تجزیه‌ای برای شناسایی، تعیین مقدار و آنالیز جرمی مواد است. این روش امکان تعیین ساختار مولکول‌های ناشناخته را از طریق قطعه‌قطعه‌شدن فراهم می‌کند. طیف‌سنج‌های جرمـی با منابع تولید یون مختلف ابتدا مولکول‌های بـزرگ را قطعـه قطعه و به اجزای کوچک‌تر تبدیل می‌کنند تـا در نهایت وارد تجزیه‌گر جرمی‌شده و جداسازی می‌شوند و سپس به سمت ثبات هدایت می‌شوند تا ساختار آن‌ها بر این اساس مشخص شود. دستگاه‌های کروماتوگرافی مجهـز به طیف‌سـنج‌های جرمی می‌توانند اطلاعات با ارزشـی را در مورد وزن مولکولی، ساختار، شناسایی، تعیین مقدار و خلوص نمونه‌های گوناگون در اختیـار ما قرار دهند. به دلیل اختصاصی بودن طیف‌هـای جرمی، نتایج به دسـت آمده از آنالیـز کیفی و کمی آن‌ها بسـیار قابل اطمینان اند و هر گونه‌ای طیف جرمی خاص خود را دارد که در واقع شناسنامه‌ی آن ماده محسوب می‌گردد. طیف‌سنج‌های جرمی برای بیشتر ترکیب‌ها، نسبت به سایر آشکارسازهای کروماتوگرافـی مایع، حسـاس‌ترند و اختصاصی‌تر عمل می‌کنند. با آشکارسازهای جرمی با آنالیزورهای جرمی مختلف (چهارقطبی یگانه و سه‌گانه، قطاع مغناطیسی، لوله زمان پرواز، تله یونی) غلظت هایی در حد نانو مولار اندازه‌گیری می شود.

اگرچه کروماتوگرافی مایع توأم با UV-Vis بهترین ترین روش تحلیلی برای تعیین کمیت و کیفیت مواد رنگزای خوراکی بوده است، طیف‌های بسیاری از مواد رنگزای خواکی بسیار مشابه هستند و در نتیجه محققان زیادی شناسایی مواد رنگزای خوراکی را با استفاده از آشکارساز جرمی تکمیل کرده‌اند. با سیستم‌های آشکارساز PDA[3] یا UV-Vis، ارائه اطلاعات ساختاری برای شناسایی مواد رنگزای خوراکی بخصوص در بسترهای خوراکی پیچیده کار دشواری است. اسپکترومترهای جرمی برای رفع مشکل تداخلات طیفی آشکارسازهای PDA/UV-Vis[4] نه تنها برای رسیدن رسیدن به حساسیت بالا در بسترهای نمونه بلکه برای کسب اطلاعات ساختاری بر مبنای جرم ملکولی و الگوی قطعه‌بندی با استفاده از طیف‌سنجی متوالی جرم (MS/MS) نیز مورد استفاده قرار می‌گیرند. از جمله روش‌های یونیزاسیون سازگار با کروماتوگرافی مایع، به‌عنوان موفق‌ترین روش برای مطالعات مواد رنگزای خوراکی، یونیزاسیون الکتروافشانه‌ای (ESI[5]) بوده است. همان‌طور که قبلا گفته شد، مواد رنگزای رنگزای خوراکی دارای ماهیت کاملا قطبی است، بنابراین، ESI برای یونی‌کردن آنها مناسب‌تر است. کارآیی یونیزاسیون مرکبات بستگی به تداخل‌های بستر موجود در فاز متحرک و نمونه دارد. ما و گروهش نشان دادند که بیشتر مواد رنگزای خوراکی را می‌توان با استفاده از استات آمونیم و فرمات آمونیم به عنوان بافر در حالت یون منفی به طور کارآمد یونیزه کرد [۵۸]. گوزتی[6] و همکارانش توانستند مواد رنگزای مصنوعی محلول در آب، چربی و نوشابه، زنجبیل، پودرهای خوراک لوبیای پرادویه و ادویه‌جات ترشی فلفل قرمز را با LC-PDA-MS[7] به طور همزمان مشخص کنند. آن‌ها آن‌ها از حالت اسکن تناوبی مثبت/منفی برای یونیزاسیون همزمان مواد رنگزای مصنوعی استفاده کرده‌اند [۵۹]. همین محقق کاهش کیفیت زرد پرتقالی در نوشیدنی‌های تجاری را با قرارگیری آن در معرض نور آفتاب مورد بررسی قرار داد. در این تحقیق، از HPLC-MS استفاده شد تا مشخص شود که کاهش رنگ ناشی از معدنی‌شدن نیست بلکه ناشی از فرآیند کاهش کیفیت است و تجزیه گر شناسایی شده ممکن است فرم دیمری ۵-آمینو-۶-هیدروکسیل-۲-نفتالن سولفونات باشد. به همین نحو، کارموزین و زرد پرتقالی موجود در نوشابه پیش غذا در معرض نور آفتاب قرار داده شد و با HPLC-DAD-MS/MS[8] با استفاده از ستون C18 و مخلوط متانل و استات آمونیم به عنوان فاز متحرک مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت. این آزمایش منجر به شکل‌گیری ناخالصی و کاهش کیفیت با ساختارهای مبتنی بر نفتالن شد [۱۵]. اخیرا، چن[9] و همکارانش [۱۶] روش UFLC- MS/MS[10] را برای تحلیل هفت ماده رنگزای خوراکی در شراب و نوشابه با استفاده از ستون C18 و مخلوط استات آمونیم در استونیتریل و آب به عنوان فاز متحرک ارائه داده‌اند. استات آمونیم و استونیتریل را به شوینده افزودند تا کارآیی هفت ماده رنگزای خوراکی با ESI در حالت یونیزاسیون منفی را افزایش دهند [۲۳].

۳- نتیجه گیری

اثرات جانبی و سنتز نادرست مواد رنگزای آزو مورد استفاده در محصولات خوراکی منجر به توسعه روش‌های تحلیلی کاملا حساس و گزینشی برای

[1] Tang
[2] Liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS and LC–MS/MS)
[3] Diode array detector
[4] Diode array detector/ ultraviolet-visible spectrophotometry
[5] Electro spray ionization
[6] Gosetti
[7] Liquid chromatography coupled with photodiode array - mass spectrometry
[8] High-performance liquid chromatographic/diode array detector-tandem mass spectrometry
[9] Chen
[10] Ultra fast liquid chromatography/tandem mass spectrometry

تشخیص آن‌ها در بسترهای مختلف خوراکی شده است. آماده‌سازی نمونه شامل استفاده از انواع روش‌های مختلف استخراج مانند صاف‌کردن غشا، روش‌های استخراج فاز مایع-مایع و جامد مانند الکتروفورز موئینی و کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا، طیف‌سنجی جرمی-کروماتوگرافی مایع در محیط کاملا پیچیده مواد خوراکی بوده است. روش‌های استاندارد می‌بایست برای جلوگیری از تداخل بستر نمونه توسعه یابد و با نوع ماده خوراکی مورد آزمایش نیز سازگار باشد. بنابراین، توسعه و بهره‌برداری روش‌های ساده، گزینشی و سازگار با محیط‌زیست درآماده‌سازی نمونه از اهمیت زیادی همراه است و همچنین استفاده از روش‌های حساس و دقیق نظیر روش‌های طیف‌سنجی و کروماتوگرافی برای تشخیص آن‌ها در فرآورده‌ها و محصولات خوراکی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است. مقاله حاضر به توصیف و بررسی جامعی از روش‌های تجزیه‌ای برای مواد رنگزای آزو مصرف‌شده در صنعت مواد خوراکی پرداخته است. در بین روش‌های ذکر شده روش‌های کروماتوگرافی بخصوص HPLC دارای دقت و حساسیت بالا بوده و برای جداسازی، تشخیص و اندازه‌گیری مواد رنگزای خوراکی حتی مقادیر کم کابرد وسیعی دارد. اگرچه روش‌های کامل‌تر مانند اسپکترومتری جرمی-کروماتوگرافی مایع که مجهز به سیستم تشخیص حساس‌تری هستند پیشنهاد شده‌اند اما گران قیمت بوده و از این‌رو برای آنالیزهای معمول توصیه نمی‌شوند. از طرفی روش‌های کروماتوگرافی دارای دقت بالا و توانایی جداسازی اجزای موجود در بستر نمونه‌ها را دارند که در روش‌های طیف‌سنجی وجود ندارد.

۴-مراجع

1. S. Ramalingam, R. R. Jonnalagadda, "Tailoring Nanostructured Dyes for Auxiliary Free Sustainable Leather Dyeing Application", Sustainable Chem. Eng. 6, 5537–5549, **2017**.
2. م. روشنی، م. صادقی،"تخریب فوتوکاتالیستی ماده رنگزای اورسنازو (III) به وسیله نقاط کوانتمی گرافن تحت نور مرئی"، نشریه علمی پژوهشی علوم و فناوری رنگ. ۱۱، ۱۷۲-۱۶۳، **۱۳۹۶**.
3. F. Rafii, J. D. Hall, C. E. Cerniglia, "Mutagenicity of azo dyes used in foods, drugs and cosmetics before and after reduction by Clostridium species from the human intestinal tract", Food. Chem Toxicol. 35, 897–901, **1997**.
4. C. Hawley, R. E. Buckley, "Hyperkinesis and sensitivity to aniline food dyes", J. Orthomol. Med. 5, 129–137, **1976**.
5. T. N. Nagaraja, T. Desiraju, "Effects of chronic consumption of metanil yellow by developing and adult rats on brain regional levels of noradrenaline, dopamine and serotonin, on acetylcholine esterase activity and on operant conditioning", Food. Chem Toxicol. 31, 41–44, **1993**.
6. P. Mpountoukas, A. Pantazaki, E. Kostareli, P. Christodoulou, D. Kareli, S. Poliliou, "Cytogenetic evaluation and DNA interaction studies of the food colorants amaranth, erythrosine and tartrazine", Food. Chem Toxicol. 48, 2934–2944, **2010**.
7. M. S. Khehra, H. S. Saini, D. K. Sharma, B. S. Chadha, S. S. Chimni, "Biodegradation of azo dye CI Acid Red 88 by an anoxic–aerobic sequential bioreactor", Dyes Pigm. 70, 1–7. **2006**.
8. K. T. Chung, C. E. Cerniglia, "Mutagenicity of azo dyes: Structure–activity relationships", Mutat Res-Rev Genet. 277, 201–220, **1992**.
9. A. D. Kaur, U. Gupta," The review on spectrophotometric determination of synthetic food dyes and lakes", GU J Sci. 25, 579–588. **2012**.
10. M. Kucharska, J. Grabka, "A review of chromatographic methods for determination of synthetic food dyes", Talanta 80, 1045–1051. **2010**.
11. P. Qi, Z. Lin, G. Chen, J. Xiao, Z.A. Liang, "Fast and Simultaneous Determination of Eleven Synthetic Color Additives in Flour and Meat Products by Liquid Chromatography Coupled with Diode-Array Detector and Tandem Mass Spectrometry", Food Chem. 181, 101–110, **2015**.
12. م. حسین نژاد، ک. قرنجیگ، "مروری بر آخرین تحقیقات درباره کاربردهای مواد رنگزای طبیعی در رنگرزی، مواد خوراکی سلول های خورشیدی" نشریه علمی ترویجی مطالعات در دنیای رنگ، ۷، ۲۷-۱۷، **۱۳۹۶**.
13. M. Jacobson, S. Kobylwski. Food Dyes: "A Rainbow of Risks", Washington, D.C. Center for Science in the Public Interest, 2010. https://cspinet.org/ sites/ default/ files/attachment/food-dyes-rainbow-of-risks.pdf [accessed Jan 30, Public report, **2017**.
14. B.W.J. Pirok, J. Knip van, M.R. Bommel, P.J. Schoenmakers, "Characterization of Synthetic Dyes by Comprehensive Two-Dimensional Liquid Chromatography Combining Ion-exchange Chromatography and Fast Ion-pair Reversed-phase Chromatography", J. Chromatogr. A. 1436, 141–146, **2016**.
15. S. Kromidas: "HPLC für Neueinsteiger, from the Internet", Novia GmbH. **2000**.
16. X. H. Chen, Y. G. Zhao, H. Y. Shen, L. X. Zhou, S. D. Pan, M. C. Jin, "Fast determination of seven synthetic pigments from wine and soft drinks using magnetic dispersive solid-phase extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry", J. Chromatogr. A. 1346, 123–128. **2014**.
17. A. Jangju, K. Farhadi, M. Hatami, S. Amani, F. Esma-ali, A. Moshkabadi, F. Haj, " Application of zein-modified magnetite nanoparticles in dispersive magnetic micro-solid-phase extraction of synthetic food dyes in foodstuffs", J. Sep. sci. 1343–1352, **2017**.
18. B. Tang, C. Xi, Y. Zou, G. Wang, X. Li, L. Zhang, et al. "Simultaneous determination of 16 synthetic colorants in hotpot condiment by high performance liquid chromatography", J. Chromatogr. B. 960, 87–91, **2014**.
19. M. Soylak, Y. E. Unsal, M. Tuzen, "Spectrophotometric determination of trace levels of allura red in water samples after separation and preconcentration", Food. Chem. Toxicol. 49, 1183–1187, **2011**.
20. M. González, M. Gallego, M. Valcárcel, "Liquid chromatographic determination of natural and synthetic colorants in lyophilized foods using an automatic solid-phase extraction system", J. Agr. Food Chem. 51, 2121–2129. **2003**.
21. B. P. Harp, E. Miranda-Bermudez, C. I. Baron, G. I. Richard, "Qualitative identification of permitted and non-permitted colour additives in food products", Food Addit. Contam. A. 29, 886–896. **2012**.
22. N. Yoshioka, K. Ichihashi, "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, 1408–1413, **2008**.
23. T. Zou, P. He, A. Yasen, Z. Li, Determination of seven synthetic dyes in animal feeds and meat by high performance liquid chromatography with diode array and tandem mass detectors", Food Chem. 138, 1742–1748, **2013**.
24. J. Kirschbaum, C. Krause, H. Brückner, "Liquid chromatographic quantification of synthetic colorants in fish roe and caviar", Eur. Food Res. Technol. 222, 572–579, **2006**.

25. B. P. Harp, E. Miranda-Bermudez, J. N. Barrows, "Determination of seven certified color additives in food products using liquid chromatography", J. Agr. Food. Chem. 61, 3726–3736, **2013**.
26. M. Khanavi, M. Hajimahmoodi, A. M. Ranjbar, M. R. Oveisi, M. R. S. Ardekani, G. Mogaddam, "Development of a green chromatographic method for simultaneous determination of food colorants", Food Anal. Method. 5, 408–415, **2012**.
27. E. C. Vidotti, W. F. Costa, C. C. Oliveira, "Development of a green chromatographic method for determination of colorants in food samples", Talanta. 68, 516–521, **2006**.
28. H. Sun, , N. Sun, H. Li, J. Zhang, Y. Yang, "Development of multiresidue analysis for 21 synthetic colorants in meat by microwave-assisted extraction– solid-phase extraction–reversed-phase ultrahigh performance liquidchromatography", Food Anal. Methods. 6, 1291–1299, **201**3.
29. Y. Shen, X. Zhang, W. Prinyawiwatkul, Z. Xu, "Simultaneous determination of red and yellow artificial food colourants and carotenoid pigments in food products", Food Chem. 157, 553–558. **2014**.
30. S. Ping, W. Ruoyu, Y. Yang, Y. Yi, "Microwave-assisted synthesis of ionic liquidmodified silica as a sorbent for the solid-phase extraction of phenolic compounds from water" Food Anal. Method. 6, 704. **2014**.
31. Code of Federal Regulations, title 21, parts 73, 74, and 82 and section 101.22(k), Washington, DC: U.S. Government Printing Office.<http://www.fda.gov/ForIndustry/ColorAdditives/ColorAdditiveInventories/default.htm> Accessed 13.08.14. **2012**.
32. European Community Regulation (EC) No. 1333/2008 of the European Parliament and of the Council of 16 December on food additives, **2008**.
33. Food Safety and Standards Authority of India (FSSAI), Food Safety and Standards (Food Product Standards and Food Additives) Regulation (Part II), <http://www.fssai.gov.in> Accessed 18.08.14, **2011**.
34. The Ministry of Health of the People's Republic of China GB 2760–2011 of 13 May on food safety national standards – Standards for use of food additives, **2011**.
35. The Japan Food Chemical Research Foundation, Article 12 of the Enforcement Regulations under the Food Sanitation Law, List of designated food additives, http://www.ffcr.or.jp/zaidan/FFCRHOME. nsf/ TrueMainE/ OpenFrameSet, Accessed 30.05.15, **2015**.
36. Australia New Zealand Food Standards Code-Standard 1.3.1-Food Additives, <https://www.comlaw.gov.au/ Details/F2014C01335/Download> Accessed.17.08.14. **2014**.
37. A. D. Kaur, U. Gupta, "The review on spectrophotometric determination of synthetic food dyes and lakes", Gazi University Journal of Science. 25, 579–588, **2012**.
38. M. Soylak, Y. E. Unsal, M.Tuzen, "Spectrophotometric determination of trace levels of allura red in water samples after separation and preconcentration", Food Chem. Toxicol. 49, 1183–1187, **2011**.
39. M. H. Sorouraddin, A. Rostami, M. A Saadati, "simple and portable multicolour light emitting diode based photocolourimeter for the analysis of mixtures of five common food dyes", Food Chem. 127, 308–313, **2011**.
40. E. Arroz, M. Jordan, G. G. Dumancas, "Development of a Direct Spectrophotometric and Chemometric Method for Determining Food Dye Concentrations", Appl. Spectrosc. 71, 1633-1639, **2017**.
41. M. Kucharska, J.Grabka, "A review of chromatographic methods for determination of synthetic food dyes", Talanta. 80, 1045–1051, **2010**.
42. http://www.gcsescience.com/e8-chromatography.htm
43. Y. Xu, Tutorial "Capillary electrophoresis" Chem. Educ. 1, 11–14, **1996**.
44. H. Y. Huang, C. L. Chuang, C. W. Chiu, M. C. Chung, "Determination of food colorants by microemulsion electrokinetic chromatography", Electrophoresis. 26, 867–877, **2005**.
45. M. A. Prado, L. F. V. Boas, M. R. Bronze, H. T. Godoy, "Validation of methodology for simultaneous determination of synthetic dyes in alcoholic beverages by capillary electrophoresis", J. Chromatogr. A. 1136, 231–236, **2006**.
46. M. Faraji, B. N. Sahneh, R. Javanshir, " An Ion-pair Dispersive Liquid-Liquid Microextraction for Simultaneous Determination of Synthetic Dyes in Ice Cream Samples by HPLC", Anal. Bioanal. Chem. Res. 2, 213-225, **2017**.
47. M. C. Gennaro, E. Gioannini, S. Angelino, R. Aigotti, D. Giacosa, Identification and determination of red dyes in confectionery by ion-interaction high-performance liquid chromatography. J. Chromatogr. A 767, 87–92. **1997**.
48. M. González, M. Gallego, M. Valcárcel, "Liquid chromatographic determination of natural and synthetic colorants in lyophilized foods using an automatic solid-phase extraction system", J. Agr. Food. Chem. 51, 2121–2129. **2003**.
49. M. M. Jurcovan, E. Diacu, "Development of a reversed-phase high performance liquid chromatographic method for simultaneous determination of allura red ac and ponceau 4r in soft drinks", Rev. Chim-Bucharest. 65, 137–141. **2014**.
50. M. J. Culzoni, A. V. Schenone, N. E. Llamas, M. Garrido, M. S. Di Nezio, B. S. F. Band, et al, "Fast chromatographic method for the determination of dyes in beverages by using high performance liquid chromatography–diode array detection data and second order algorithms", J. Chromatogr. A. 1216, 7063–7070, **2009**.
51. N. A. Zatar, "Simultaneous determination of seven synthetic water-soluble food colorants by ion-pair reversed-phase high-performance liquid chromatography", J. Food. Technol, 5, 220–224, **2007**.
52. S. Bonan, G. Fedrizzi, S. Menotta, C. Elisabetta, "Simultaneous determination of synthetic dyes in foodstuffs and beverages by highperformance liquid chromatography coupled with diode-array detector", Dyes Pigm. 99, 36–40, **2013**.
53. Y. S. Al-Degs, "Determination of three dyes in commercial soft drinks using HLA/GO and liquid chromatography", Food Chem. 117, 485–490, **2009**.
54. J., Kirschbaum, C. Krause, H. Brückner, Liquid chromatographic quantification of synthetic colorants in fish roe and caviar", Eur. Food Res. Technol. 222, 572–579, 2006.
55. N. Dossi, R. Toniolo, S. Susmel, A. Pizzariello, G. Bontempelli, "Simultaneous RP-LC determination of additives in soft drinks", Chromatographia. 63, 557–562, **2006**.
56. X. H. Chen, Y. G. Zhao, H. Y. Shen, L. X. Zhou, S. D. Pan, M. C. Jin, Fast determination of seven synthetic pigments from wine and soft drinks using magnetic dispersive solid-phase extraction followed by liquid chromatography–tandem mass spectrometry", Food Anal. Method. 1346, 123–128, **2014**.
57. M. Khanavi, M. Hajimahmoodi, A. M. Ranjbar, M. R. Oveisi, M. R. S. Ardekani, G. Mogaddam, "Development of a green chromatographic method for simultaneous determination of food colorants", Food Anal. Method. 5, 408–415, **2012**.
58. M. Ma, X. Luo, B. Chen, S. Su, S. Yao, "Simultaneous determination of water-soluble and fat-soluble synthetic colorants in foodstuff by highperformance liquid chromatography–diode array detection–electrospray mass spectrometry", Food Anal. Method, 1103, 170–176, **2006**.
59. F. Gosetti, V. Gianotti, S. Polati, M. C. Gennaro, "HPLC–MS degradation study of E110 Sunset Yellow FCF in a commercial beverage", Food Anal. Method. 1090, 107–115, **2005**.
60. F. Gosetti, U. Chiuminatto, E. Mazzucco, G. Calabrese, M. C. Gennaro, E. Marengo, "Non-target screening of Allura Red AC photodegradation products in a beverage through ultra high performance liquid chromatography coupled with hybrid triple quadrupole/linear ion trap mass spectrometry", Food Chem. 136, 617–623, **2013**.