



سیستم مدیریت ایزو  
www.isomanagement.ir

تماس تلفنی جهت دریافت مشاوره:

۱. مشاور دفتر تهران (آقای محسن ممیز)

☎ ۰۹۱۲ ۹۶۳ ۹۳۳۶

۲. مشاور دفتر اصفهان (سرکار خانم لیلا ممیز)

☎ ۰۹۱۳ ۳۲۲ ۸۲۵۹

مجموعه سیستم مدیریت ایزو با هدف بهبود مستمر عملکرد خود و افزایش رضایت مشتریان سعی بر آن داشته، کلیه استانداردهای ملی و بین المللی را در فضای مجازی نشر داده و اطلاع رسانی کند، که تمام مردم ایران از حقوق اولیه شهروندی خود آگاهی لازم را کسب نمایند و از طرف دیگر کلیه مراکز و کارخانه جات بتوانند به راحتی به استانداردهای مورد نیاز دسترسی داشته باشند.

این موسسه اعلام می دارد در کلیه گرایشهای سیستم های بین المللی ISO پیشگام بوده و کلیه مشاوره های ایزو به صورت رایگان و صدور گواهینامه ها تحت اعتبارات بین المللی سازمان جهانی IAF و تامین صلاحیت ایران می باشد.

هم اکنون سیستم خود را با معیارهای جهانی سازگار کنید...





جمهوری اسلامی ایران  
Islamic Republic of Iran  
سازمان ملی استاندارد ایران

Iranian National Standardization Organization



استاندارد ملی ایران  
۱۵۶۵۴  
چاپ اول  
۱۳۹۷

INSO

15654

1st Edition

2018

افزودنی‌های خوراکی مجاز - تعیین مقدار  
رنگ‌های مصنوعی مجاز خوراکی در  
فرآورده‌های حجیم شده بر پایه بلغور و آرد  
غلات به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی  
بالا - روش آزمون

**Permitted food additives- Food colors-  
Determination of artificial food colors in  
puffed products based on cereal grit and  
flour by High Performance Liquid  
Chromatography- Test method**

ICS: 67.220.20

سازمان ملی استاندارد ایران

تهران، ضلع جنوب غربی میدان ونک، خیابان ولیعصر، پلاک ۲۵۹۲

صندوق پستی: ۶۱۳۹-۱۴۱۵۵ تهران - ایران

تلفن: ۵-۸۸۸۷۹۴۶۱

دورنگار: ۸۸۸۸۷۰۸۰ و ۸۸۸۸۷۱۰۳

کرج، شهر صنعتی، میدان استاندارد

صندوق پستی: ۱۶۳-۳۱۵۸۵ کرج - ایران

تلفن: ۸-۳۱۰۶۰۳۱(۰۲۶)

دورنگار: ۸۱۱۴۰۳۲۸(۰۲۶)

رایانامه: [standard@isiri.gov.ir](mailto:standard@isiri.gov.ir)

وبگاه: <http://www.isiri.gov.ir>

**Iranian National Standardization Organization (INSO)**

No.2592 Valiasr Ave., South western corner of Vanak Sq., Tehran, Iran

P. O. Box: 14155-6139, Tehran, Iran

Tel: + 98 (21) 88879461-5

Fax: + 98 (21) 88887080, 88887103

Standard Square, Karaj, Iran

P.O. Box: 31585-163, Karaj, Iran

Tel: + 98 (26) 32806031-8

Fax: + 98 (26) 32808114

Email: [standard@isiri.gov.ir](mailto:standard@isiri.gov.ir)

Website: <http://www.isiri.gov.ir>

## به نام خدا

## آشنایی با سازمان ملی استاندارد ایران

سازمان ملی استاندارد ایران به موجب بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱ تنها مرجع رسمی کشور است که وظیفه تعیین، تدوین و نشر استانداردهای ملی (رسمی) ایران را به عهده دارد.

تدوین استاندارد در حوزه‌های مختلف در کمیسیون‌های فنی مرکب از کارشناسان سازمان، صاحب‌نظران مراکز و مؤسسات علمی، پژوهشی، تولیدی و اقتصادی آگاه و مرتبط انجام می‌شود و کوششی همگام با مصالح ملی و با توجه به شرایط تولیدی، فناوری و تجاری است که از مشارکت آگاهانه و منصفانه صاحبان حق و نفع، شامل تولیدکنندگان، مصرف‌کنندگان، صادرکنندگان و واردکنندگان، مراکز علمی و تخصصی، نهادها، سازمان‌های دولتی و غیردولتی حاصل می‌شود. پیش‌نویس استانداردهای ملی ایران برای نظرخواهی به مراجع ذی‌نفع و اعضای کمیسیون‌های مربوط ارسال می‌شود و پس از دریافت نظرها و پیشنهادهای در کمیته ملی مرتبط با آن رشته طرح و در صورت تصویب، به‌عنوان استاندارد ملی (رسمی) ایران چاپ و منتشر می‌شود.

پیش‌نویس استانداردهایی که مؤسسات و سازمان‌های علاقه‌مند و ذی‌صلاح نیز با رعایت ضوابط تعیین شده تهیه می‌کنند در کمیته ملی طرح، بررسی و در صورت تصویب، به‌عنوان استاندارد ملی ایران چاپ و منتشر می‌شود. بدین ترتیب، استانداردهایی ملی تلقی می‌شود که بر اساس مقررات استاندارد ملی ایران شماره ۵ تدوین و در کمیته ملی استاندارد مربوط که در سازمان ملی استاندارد ایران تشکیل می‌شود به تصویب رسیده باشد.

سازمان ملی استاندارد ایران از اعضای اصلی سازمان بین‌المللی استاندارد (ISO)<sup>۱</sup>، کمیسیون بین‌المللی الکتروتکنیک (IEC)<sup>۲</sup> و سازمان بین‌المللی اندازه‌شناسی قانونی (OIML)<sup>۳</sup> است و به‌عنوان تنها رابط<sup>۴</sup> کمیسیون کدکس غذایی (CAC)<sup>۵</sup> در کشور فعالیت می‌کند. در تدوین استانداردهای ملی ایران ضمن توجه به شرایط کلی و نیازمندی‌های خاص کشور، از آخرین پیشرفت‌های علمی، فنی و صنعتی جهان و استانداردهای بین‌المللی بهره‌گیری می‌شود.

سازمان ملی استاندارد ایران می‌تواند با رعایت موازین پیش‌بینی شده در قانون، برای حمایت از مصرف‌کنندگان، حفظ سلامت و ایمنی فردی و عمومی، حصول اطمینان از کیفیت محصولات و ملاحظات زیست‌محیطی و اقتصادی، اجرای بعضی از استانداردهای ملی ایران را برای محصولات تولیدی داخل کشور و/یا اقلام وارداتی، با تصویب شورای عالی استاندارد، اجباری کند. سازمان می‌تواند به‌منظور حفظ بازارهای بین‌المللی برای محصولات کشور، اجرای استانداردهای کالاهای صادراتی و درجه‌بندی آن را اجباری کند. هم‌چنین برای اطمینان بخشیدن به استفاده‌کنندگان از خدمات سازمان‌ها و مؤسسات فعال در زمینه مشاوره، آموزش، بازرسی، ممیزی و صدور گواهی سیستم‌های مدیریت کیفیت و مدیریت زیست‌محیطی، آزمایشگاه‌ها و مراکز واسنجی (کالیبراسیون) وسایل سنجش، سازمان ملی استاندارد این‌گونه سازمان‌ها و مؤسسات را بر اساس ضوابط نظام تأیید صلاحیت ایران ارزیابی می‌کند و در صورت احراز شرایط لازم، گواهینامه تأیید صلاحیت به آن‌ها اعطا و بر عملکرد آن‌ها نظارت می‌کند. ترویج دستگاه بین‌المللی یکاها، واسنجی وسایل سنجش، تعیین عیار فلزات گرانبها و انجام تحقیقات کاربردی برای ارتقای سطح استانداردهای ملی ایران از دیگر وظایف این سازمان است.

1- International Organization for Standardization

2- International Electrotechnical Commission

3- International Organization for Legal Metrology (Organisation Internationale de Metrologie Legals)

4-Contact point

5- Codex Alimentarius Commission

## کمیسیون فنی تدوین استاندارد

«افزودنی‌های خوراکی مجاز - تعیین مقدار رنگ‌های مصنوعی مجاز خوراکی در فرآورده‌های

حجیم شده بر پایه بلغور و آرد غلات به‌روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا - روش آزمون»

### سمت و/یا محل اشتغال:

### رئیس:

فرجی، محمد  
(دکتری شیمی تجزیه)  
عضو هیئت علمی پژوهشکده صنایع غذایی و کشاورزی -  
پژوهشگاه استاندارد

### دبیر:

نصیری صحنه، بنفشه  
(کارشناسی ارشد فیزیولوژی و اصلاح گیاهان دارویی،  
ادویه‌ای و معطر)  
کارشناس پژوهشکده صنایع غذایی و کشاورزی - پژوهشگاه  
استاندارد

### اعضا: (اسامی به ترتیب حروف الفبا)

آریا منش، خوشنود  
(کارشناسی ارشد شیمی آلی)  
مدیر فنی آزمایشگاه پرتوبشاش (سهامی خاص)

اسکندری، سیروس  
(کارشناسی علوم صنایع غذایی)  
دبیر انجمن تولیدکنندگان افزودنی‌های صنایع غذایی (سهامی  
خاص)

جوانشیر، ریکا  
(کارشناسی شیمی کاربردی)  
کارشناس پژوهشکده صنایع غذایی و کشاورزی - پژوهشگاه  
استاندارد

حمزه تاش، داریوش  
(دکتری شیمی)  
مدیر عامل اسانس و رنگ ابیض شیمی (سهامی خاص)

خداداد، منا  
(کارشناسی ارشد مهندسی علوم و صنایع غذایی)  
کارشناس کانون انجمن‌های صنایع غذایی ایران (سهامی خاص)

درستی، صدیقه  
(کارشناسی ارشد صنایع غذایی)  
کارشناس دفتر نظارت بر استاندارد صنایع غذایی، آرایشی،  
بهداشتی و حلال - سازمان ملی استاندارد ایران

علوی، مینا  
(کارشناسی ارشد فیزیولوژی و اصلاح گیاهان دارویی،  
ادویه‌ای و معطر)  
کارشناس پژوهشکده صنایع غذایی و کشاورزی - پژوهشگاه  
استاندارد

### ویراستار:

رشیدی، لادن  
(دکتری تخصصی مهندسی شیمی - بیوتکنولوژی)  
عضو هیئت علمی پژوهشکده صنایع غذایی و کشاورزی -  
پژوهشگاه استاندارد

فهرست مندرجات

صفحه	عنوان
ز	پیش‌گفتار
ح	مقدمه
۱	۱ هدف
۱	۲ دامنه کاربرد
۱	۳ مراجع الزامی
۲	۴ اصطلاحات و تعاریف
۴	۵ روش آزمون
۹	۶ گزارش آزمون
۱۰	پیوست الف (آگاهی دهنده) معتبرسازی روش آزمون

## پیش‌گفتار

استاندارد «افزودنی‌های خوراکی مجاز- تعیین مقدار رنگ‌های مصنوعی مجاز خوراکی در فرآورده‌های حجیم شده بر پایه بلغور و آرد غلات به‌روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا- روش آزمون» که پیش‌نویس آن بر اساس پژوهش انجام شده تهیه و تدوین شده است، پس از بررسی در کمیسیون‌های مربوطه، در یک هزار و ششصد و پنجاهمین اجلاس هیئت کمیته ملی استاندارد خوراک و فرآورده‌های کشاورزی مورخ ۹۷/۵/۲۴ تصویب شد. اینک این استاندارد به استناد بند یک ماده ۳ قانون اصلاح قوانین و مقررات مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، مصوب بهمن ماه ۱۳۷۱، به‌عنوان استاندارد ملی ایران منتشر می‌شود.

استانداردهای ملی ایران بر اساس استاندارد ملی ایران شماره ۵ (استانداردهای ملی ایران- ساختار و شیوه نگارش) تدوین می‌شوند. برای حفظ همگامی و هماهنگی با تحولات و پیشرفت‌های ملی و جهانی در زمینه صنایع، علوم و خدمات، استانداردهای ملی ایران در صورت لزوم تجدیدنظر خواهند شد و هر پیشنهادی که برای اصلاح و تکمیل این استانداردها ارائه شود، هنگام تجدیدنظر در کمیسیون‌های مربوطه مورد توجه قرار خواهد گرفت. بنابراین، باید همواره از آخرین تجدیدنظر استانداردهای ملی ایران استفاده کرد.

نتایج پژوهشی که برای تهیه و تدوین این استاندارد مورد استفاده قرار گرفته به شرح زیر است:

۱- فرجی، محمد و همکاران، شناسایی و تعیین مقدار رنگ سانست‌یلو و کارمویزین در نوشابه‌های پرتقالی به‌روش کروماتوگرافی با کارایی بالا، ۱۳۹۴، آزمایشگاه افزودنی‌های خوراکی، پژوهشکده غذایی و کشاورزی، پژوهشگاه استاندارد.

۲- فرجی، محمد و همکاران، تعیین مقدار رنگ سانست‌یلو در فرآورده‌های حجیم شده بر پایه بلغور و آرد غلات به‌روش اسپکتروفتومتری، ۱۳۹۴، آزمایشگاه افزودنی‌های خوراکی، پژوهشکده غذایی و کشاورزی، پژوهشگاه استاندارد.

۳- فرجی، محمد و همکاران، شناسایی و تعیین مقدار رنگ‌های مصنوعی مجاز خوراکی در فرآورده حجیم شده بلغور ذرت به‌روش کروماتوگرافی با کارایی بالا، ۱۳۹۷، آزمایشگاه افزودنی‌های خوراکی، پژوهشکده غذایی و کشاورزی، پژوهشگاه استاندارد.

## مقدمه

رنگ‌های مصنوعی به‌طور گسترده‌ای برای جبران از دست دادن رنگ‌های طبیعی مواد غذایی که در طول فرآوری و نگهداری از بین می‌روند استفاده می‌شوند. استفاده از رنگ‌های مصنوعی به‌شدت توسط قوانین در سراسر جهان کنترل می‌شود. فهرست رنگ‌های مواد غذایی مجاز از کشوری به کشور دیگر متفاوت است. مزیت رنگ‌های سنتزی این است که از دوام رنگ، روشنی و پایداری بهتر از رنگ‌های طبیعی برخوردار هستند، با این حال برخی از این مواد می‌توانند اثرات سوء جدی برای سلامتی انسان به‌ویژه هنگامی که بیش از حد مصرف می‌شوند را به‌دنبال داشته باشند. این امکان وجود دارد که رنگ‌های افزوده شده به مواد غذایی و نوشیدنی‌ها بیش‌تر از حد مجاز باشند که استفاده از این رنگ‌ها می‌تواند روی اندام‌های بدن انسان اثرات سمی و عوارضی نظیر آسم، آلرژی، تضعیف سیستم ایمنی را به‌دنبال داشته باشد. برای مثال رنگ‌ها می‌توانند توسط فلور طبیعی روده ایجاد آمین‌های آروماتیک و سردردهای مکرر در بزرگسالان و تغییرات رفتاری نظیر بیش‌فعالی در کودکان شوند.

اگر چه حد مجاز رنگ‌های مصنوعی در سال‌های اخیر به‌منظور سلامتی مصرف‌کننده‌ها کاهش یافته است اما به‌دلیل قیمت کم، کارایی و پایداری بالا، هنوز هم به‌صورت گسترده در دنیا استفاده می‌شوند.



## افزودنی‌های خوراکی مجاز - تعیین مقدار رنگ‌های مصنوعی مجاز خوراکی در فرآورده‌های حجیم شده بر پایه بلغور و آرد غلات به‌روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا - روش آزمون

### ۱ هدف

هدف از تدوین این استاندارد، تعیین روش آزمون اندازه‌گیری رنگ‌های مصنوعی مجاز خوراکی سانست یلو و کارموزین در فرآورده‌های حجیم شده بر پایه بلغور و آرد غلات به‌روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا است.

### ۲ دامنه کاربرد

این استاندارد برای تعیین مقدار رنگ‌های مصنوعی مجاز خوراکی سانست یلو و کارموزین در فرآورده‌های حجیم شده بر پایه بلغور و آرد غلات کاربرد دارد.

**یادآوری** - نظر به این که در این دسته از فرآورده‌ها معمولاً از ترکیب دو رنگ سانست یلو و کارموزین (آزوروبین) استفاده می‌شود روش آزمون بر پایه تعیین مقدار این دو رنگ استوار شده است و در صورتی که رنگ‌های دیگر نظیر کینولین یلو، بریلیانت بلو، ایندیگوتین (ایندیگوکارمین)، آلورا رد و پونسیو ۴ آر مدنظر باشد می‌توان از استاندارد ملی افزودنی‌های خوراکی مجاز - رنگ‌های خوراکی - اندازه‌گیری رنگ‌های مصنوعی مجاز (کینولین یلو، سانست یلو، بریلیانت بلو، ایندیگوتین، آلورا رد، پونسیو ۴ آر و کارموزین) در نوشیدنی‌ها، ژله‌ها، پاستیل‌ها و فرآورده یخی خوراکی به‌روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا به شماره استفاده شود.

### ۳ مراجع الزامی

در مراجع زیر ضوابطی وجود دارد که در متن این استاندارد به‌صورت الزامی به آن‌ها ارجاع داده شده است. بدین ترتیب، آن ضوابط جزئی از این استاندارد محسوب می‌شوند.

در صورتی که به مرجعی با ذکر تاریخ انتشار ارجاع داده شده باشد، اصلاحیه‌ها و تجدیدنظرهای بعدی آن برای این استاندارد الزام‌آور نیست. در مورد مراجعی که بدون ذکر تاریخ انتشار به آن‌ها ارجاع داده شده است، همواره آخرین تجدیدنظر و اصلاحیه‌های بعدی برای این استاندارد الزام‌آور است.

استفاده از مراجع زیر برای کاربرد این استاندارد الزامی است:

۱-۳ استاندارد ملی ایران شماره ۷۴۰، افزودنی‌های خوراکی مجاز- رنگ‌های خوراکی- لیست و ویژگی‌های عمومی

۲-۳ استاندارد ملی ایران شماره ۲۱۲۱۹، افزودنی‌های خوراکی مجاز- رنگ‌های خوراکی- تعیین مقدار سانست یلو و کارمویزین در نوشابه‌های گازدار رنگی با طعم پرتقال به‌روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

۳-۳ استاندارد ملی ایران شماره ۱۹۹۲۱، افزودنی‌های خوراکی مجاز- تعیین مقدار رنگ سانست یلو در فرآورده‌های حجیم شده بر پایه بلغور و آرد غلات به‌روش اسپکتروفتومتری

۴-۳ استاندارد ملی ایران شماره ۱۷۲۸، آب مورد مصرف در آزمایشگاه تجزیه- ویژگی‌ها و روش‌های آزمون

۵-۳ استاندارد ملی ایران شماره ۲۶۳۴، رنگ‌های مصنوعی در مواد خوراکی، شناسایی به‌روش کروماتوگرافی لایه نازک- روش آزمون

۶-۳ استاندارد ملی ایران شماره ۵۳۱۷، روش آزمون رنگ‌های مصنوعی مجاز خوراکی

۷-۳ استاندارد ملی ایران شماره ۲۸۸۰، فرآورده حجیم شده بر پایه بلغور و آرد غلات- ویژگی‌ها و روش‌های آزمون

#### ۴ اصطلاحات و تعاریف

در این استاندارد، اصطلاحات و تعاریف زیر به‌کار می‌رود:

۱-۴

#### رنگ‌های خوراکی

##### food colors

ماده افزودنی‌است که به‌منظور ایجاد، حفظ و /یا تشدید رنگ ماده غذایی به‌آن اضافه می‌شود.

۲-۴

#### سانست یلو

##### sunset yellow

یکی از رنگ‌های مصنوعی مجاز خوراکی اسیدی محلول در آب می‌باشد که به‌صورت پودر و یا گرانول قرمز- نارنجی عرضه می‌شود. شماره بین‌المللی آن ۱۱۰ و حد مجاز دریافت روزانه (ADI یا Acceptable Daily Intake) آن ۴ mg/kg/bw می‌باشد.

۳-۴

کارمویزین (آزوروبین)

**carmoisine (azorobine)**

یکی از رنگ‌های مصنوعی مجاز خوراکی اسیدی محلول در آب می‌باشد که به‌صورت پودر و یا گرانول قرمز تیره عرضه می‌شود. شماره بین‌المللی آن ۱۲۲ و حد مجاز دریافت روزانه (ADI یا Acceptable Daily Intake) آن ۴ mg/kg/bw می‌باشد.

۴-۴

کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا

**High Performance Liquid Chromatography (HPLC)**

یکی از روش‌های کروماتوگرافی است که در آن فاز ساکن، در یک ستون فلزی پر شده و فاز متحرک (مایع) با فشار از آن عبور می‌کند. تمایل متفاوت ترکیبات مختلف نسبت به فازهای ساکن و متحرک، منجر به جداسازی اجزای مخلوط می‌شود.

۵-۴

قدرت تفکیک

**resolution**

به قدرت جداسازی روش کروماتوگرافی در ایجاد فاصله میان دو پیک مجاور گفته می‌شود که از تقسیم اختلاف زمان بازداری دو پیک مجاور، به مجموع عرض آن به‌دست می‌آید.

۶-۴

صحت

**accuracy**

به نزدیکی نتیجه به‌دست آمده از آزمون با میزان مورد انتظار موجود در نمونه گفته می‌شود.

۷-۴

بازیافت

**recovery**

عبارت است از نسبت مقدار ماده به‌دست آمده از آزمون به‌میزان ماده افزوده شده که به‌صورت درصد بیان می‌شود.

۸-۴

دقت

**precision**

به نزدیکی بین نتایج به دست آمده از آزمون‌های مستقل روی یک نمونه یکنواخت که تحت شرایط یکسان و معین انجام شده باشد گفته می‌شود.

۹-۴

#### تکرارپذیری

##### repeatability

به نزدیکی نتایج حاصل از تکرار آزمون یک نمونه در یک آزمایشگاه با یک روش آزمون، تحت شرایط مشابه از نظر آزمایش کننده و دستگاه در فاصله زمانی کوتاه گفته می‌شود. این ویژگی با محاسبه انحراف استاندارد (SD)<sup>۱</sup> بیان می‌شود.

۱۰-۴

#### تجدیدپذیری

##### reproducibility

به نزدیکی نتایج حاصل از تکرار آزمون یک نمونه که با یک روش آزمون، تحت شرایط مختلف از نظر آزمایش کننده، دستگاه و آزمایشگاه انجام شده باشد گفته می‌شود. این ویژگی نیز با محاسبه انحراف استاندارد (SD) بیان می‌شود.

۱۱-۴

#### حد تشخیص

##### Limit of Detection (LOD)

حد تشخیص معادل غلظتی از نمونه مورد اندازه‌گیری است که پاسخی برابر با ۳ برابر پاسخ به نوفه<sup>۲</sup> ایجاد نماید.

۱۲-۴

#### حد اندازه‌گیری کمی

##### Limit of Quantification (LOQ)

حد اندازه‌گیری کمی یا کم‌ترین غلظت قابل اندازه‌گیری، معادل مقدار غلظتی از نمونه که پاسخی برابر با ۱۰ برابر پاسخ به نوفه ایجاد نماید.

#### ۵ روش آزمون

#### ۱-۵ مواد و/یا واکنشگرها

1 -Standard deviation

2 - Signal to noise

یادآوری - محلول‌ها و مواد مورد استفاده دارای کیفیت مناسب برای آزمایش بوده و آب مورد استفاده آب درجه یک مطابق با استاندارد ملی ایران شماره ۱۷۲۸، آب- مورد مصرف در آزمایشگاه تجزیه- ویژگی‌ها و روش‌های آزمون می‌باشد.

۱-۱-۵ پودر رنگ سانس‌تیلو با خلوص % ۸۵ یا بیشتر

۲-۱-۵ پودر رنگ کارمویزین با خلوص % ۸۵ یا بیشتر

۳-۱-۵ استونیتریل با درجه خلوص مناسب HPLC

۴-۱-۵ آمونیوم استات با خلوص آزمایشگاهی

۵-۱-۵ محلول سدیم هیدروکسید ۰/۱ M

۶-۱-۵ محلول هیدروکلریک اسید ۰/۱ M

۷-۱-۵ بافر آمونیوم استات ۰/۱ M با pH = ۶/۷

به‌دقت ۷/۷ g از پودر آمونیوم استات را توزین کرده و به بالن حجمی ۱۰۰۰ ml منتقل کنید. حدود ۹۵۰ ml آب به آن اضافه کرده و به‌طور کامل آن را حل نمایید، سپس با استفاده از محلول سدیم هیدروکسید و/ هیدروکلریک اسید ۰/۱ M، pH آن را روی pH = ۶/۷ تنظیم کرده و سپس به حجم ۱۰۰۰ ml برسانید.

۸-۱-۵ ترکیب فاز متحرک

مخلوطی از استونیتریل و بافر آمونیوم استات با نسبت ۲۲ به ۷۸ تهیه کرده و سپس کاملاً آن را یکنواخت کنید. در صورتی که دستگاه کروماتوگرافی مجهز به سیستم گاززدایی نیست، فاز متحرک حداقل به مدت ۳۰ min در حمام فرا صوت ده گاززدایی شود.

۹-۱-۵ محلول ذخیره ۵۰۰ mg/l رنگ سانس‌تیلو

به‌دقت ۰/۰۵۴ g از پودر رنگ سانس‌تیلو (خلوص % ۹۳) را توزین کرده و به بالن حجمی ۱۰۰ ml منتقل کنید و با آب به حجم ۱۰۰ ml برسانید.

یادآوری - در صورتی که از رنگ با خلوص متفاوت استفاده شود، مقدار رنگ از فرمول یک با در نظر گرفتن خلوص محاسبه می‌شود:

$$M = 50 / p \quad (1)$$

که در آن:

$M$  گرم رنگی که باید توزین شود؛

$p$  درصد خلوص رنگ.

۱۰-۱-۵ محلول ذخیره ۵۰۰ mg/l رنگ کارمویزین

به دقت ۰/۰۵۴ g از پودر رنگ کارمویزین (خلوص ٪ ۹۳) را توزین کرده و به بالن حجمی ۱۰۰ ml منتقل کنید سپس با آب به حجم ۱۰۰ ml برسانید.

۱۱-۱-۵ محلول ذخیره ۱۰۰ mg/l مخلوط دو رنگ سانست یلو و کارمویزین

به دقت ۲۰ ml از هر یک از محلول های ذخیره سانست یلو (طبق زیر بند ۵-۱-۹) و کارمویزین (طبق زیر بند ۵-۱-۱۰) را برداشته و به بالن حجمی ۱۰۰ ml منتقل کنید و با آب به حجم ۱۰۰ ml برسانید.

۱۲-۱-۵ آمونیاک ٪ ۲۵

۱۳-۱-۵ اتانل ٪ ۹۹

۱۴-۱-۵ محلول اتانلی آمونیاک

محلول اتانلی آمونیاک به نسبت حجمی زیر تهیه می شود:

۱/۵ حجم آمونیاک را با ۴/۵ حجم آب مقطر و ۶/۵ حجم اتانل مخلوط کنید. به عنوان مثال برای تهیه ۲۵۰ ml محلول اتانلی آمونیاک، ۳۷/۵ ml آمونیاک، ۱۱۲/۵ ml آب و ۱۶۲/۵ ml اتانل را با یکدیگر مخلوط کنید.

۱۵-۱-۵ n- هگزان

۲-۵ تجهیزات و وسایل

۱-۲-۵ دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) با ملحقات زیر:

۱-۱-۲-۵ پمپ چهار کاناله

۲-۱-۲-۵ آشکارساز<sup>۱</sup> UV-Vis

۳-۱-۲-۵ سیستم گاز زدا<sup>۲</sup>

۴-۱-۲-۵ ستون کروماتوگرافی فاز معکوس C-۱۸ با ابعاد ۵ μm , ۴/۶ mm × ۲۵۰ mm

یادآوری - استفاده از سایر ستون های مشابه در صورت داشتن قدرت تفکیک مناسب نیز قابل کاربرد می باشد.

1 -Detector

2 -Degasser

- ۵-۱-۲-۵ لوپ تزریق با حجم ۲۰ μl
- ۲-۲-۵ سرنگ تزریق با حجم ۱۰۰ μl
- ۳-۲-۵ ترازوی آزمایشگاهی با دقت ۰,۰۰۰۱ g
- ۴-۲-۵ حمام فرا صوت ده<sup>۱</sup>
- ۵-۲-۵ سیستم قیف میلی پور، برای صاف کردن فاز متحرک با صافی دارای قطر منافذ ۰,۴۵ μm
- ۶-۲-۵ pH-متر
- ۷-۲-۵ شیشه آلات معمول آزمایشگاهی

یادآوری - این روش قابلیت انجام با دستگاه‌های کروماتوگرافی مایع با پمپ‌های ایزوکراتیک و گرادینانی را نیز دارد.

- ۳-۵ شرایط دستگاه برای تزریق نمونه‌ها
- ۱-۳-۵ سرعت جریان فاز متحرک ۱ ml/ min
- ۲-۳-۵ طول موج اندازه‌گیری ۵۰۰ nm
- ۳-۳-۵ زمان اجرا<sup>۲</sup> ۱۰ min
- ۴-۳-۵ حجم تزریق ۲۰ μl
- ۵-۳-۵ دمای ستون ۲۵ °C (شرایط عادی آزمایشگاه)
- ۴-۵ رسم منحنی کالیبراسیون

با استفاده از محلول ذخیره مخلوط دو رنگ سانستیلو و کارمویزین (طبق زیربند ۵-۱-۱۱)، حداقل ۵ رقت مختلف در گستره ۰,۵ mg/l تا ۵۰ mg/l را برای رسم منحنی کالیبراسیون تهیه کنید. سپس هر یک از محلول‌های به‌دست آمده را به ترتیب از غلظت کم‌تر به غلظت بیشتر به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا تزریق کنید. پیک رنگ سانستیلو و پیک رنگ کارمویزین به راحتی از هم تفکیک می‌شوند (شکل الف- ۱ را ببینید). با محاسبه سطح زیر پیک هریک از غلظت‌های تهیه شده، معادله خط هر یک از رنگ‌ها به‌دست

1- Ultrasonic  
2- Run time

می‌آید (شکل الف-۲ و الف-۳ را ببینید). لازم به ذکر است که ضریب همبستگی نقاط منحنی کالیبراسیون باید بزرگتر از ۰/۹۹ باشد.

**یادآوری** - معادله خط منحنی کالیبراسیون بسته به نوع دستگاه متفاوت می‌باشد و هر آزمایشگاه باید از معادله خط دستگاه خود برای انجام محاسبات استفاده نماید.

#### ۵-۵ شناسایی پیک‌ها

ترتیب شویش دو رنگ سانستیلو و کارموزین به ترتیب زیر است:

پیک سانستیلو در دقیقه ۳/۵ و پیک کارموزین در دقیقه ۹ از دستگاه شویش و خارج می‌شود.

#### ۵-۶ اصول آزمون

ابتدا نمونه چربی‌زدایی گردد، رنگ‌های استفاده شده در فرآورده با استفاده از محلول اتانلی آمونیاک استخراج شده و مقدار آن به روش کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) تعیین شود.

#### ۵-۷ آماده‌سازی نمونه

نمونه را کاملاً پودر و همگن نمایید و با استفاده از ترازوی الکتریکی، به‌دقت ۲/۰ g از آن را توزین کرده و درون یک بشر تمیز بریزید. چربی نمونه را با استفاده از n- هگزان حذف نمایید (۴ بار و هر بار با ۱۰ ml n- هگزان). به‌منظور چربی‌زدایی نمونه را به مدت ۲ min با هگزان تکان دهید و سپس فاز روئی که حاوی هگزان است را دور بریزید. نمونه چربی‌زدایی شده را در محیط آزمایشگاه در زیر هود قرار داده تا حلال n- هگزان آن تبخیر شود و حالت پودری پیدا کند. رنگ موجود در نمونه را با استفاده از محلول اتانل آمونیاکی (طبق زیر بند ۵-۱-۱۴) استخراج کنید، به‌این منظور ۲۵ ml اتانل آمونیاکی را به نمونه چربی‌زدایی شده اضافه کرده و محلول نمونه را به مدت ۱۰ min در دستگاه فرا صوت‌ده قرار دهید تا رنگ نمونه استخراج شود. مخلوط به‌دست آمده را از صافی معمولی آزمایشگاهی عبور داده و سپس مقداری از نمونه صاف شده را با استفاده از صافی سرسرنگی صاف کرده تا آماده تزریق به دستگاه HPLC شود.

#### ۵-۸ محاسبه غلظت رنگ‌های موجود در نمونه

با استفاده از معادلات خط هر یک از رنگ‌های مورد آزمون غلظت رنگ‌های سانستیلو و کارموزین در نمونه را با استفاده از فرمول ۲ بر حسب mg/l محاسبه کنید.

$$C = \frac{(Y-b)}{a} \quad (2)$$

که در آن :

C مقدار عددی غلظت سانستیلو/کارموزین در نمونه بر حسب میلی گرم در لیتر (mg/l)؛



$Y$  مقدار عددی سطح زیر پیک مربوط به سانست یلو/کارموزین در نمونه مورد نظر؛  
 $b$  مقدار عددی عرض از مبدأ منحنی کالیبراسیون رنگ سانست یلو/کارموزین؛  
 $a$  مقدار عددی شیب منحنی کالیبراسیون رنگ سانست یلو/کارموزین.

به منظور محاسبه میزان رنگ در محصول نهایی بر حسب  $\mu\text{g/g}$  از فرمول ۳ استفاده کنید:

$$\mu\text{g/g} \text{ بر حسب رنگ} = \frac{0.025 \times C}{W} \quad (۳)$$

که در آن :

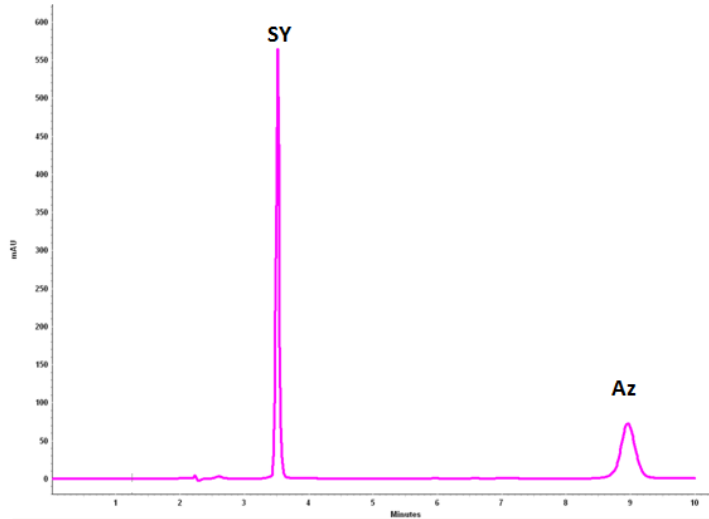
$C$  مقدار عددی غلظت سانست یلو/کارموزین در نمونه بر حسب میلی گرم در لیتر (mg/l)؛  
 $w$  وزن نمونه بر حسب kg.

## ۶ گزارش آزمون

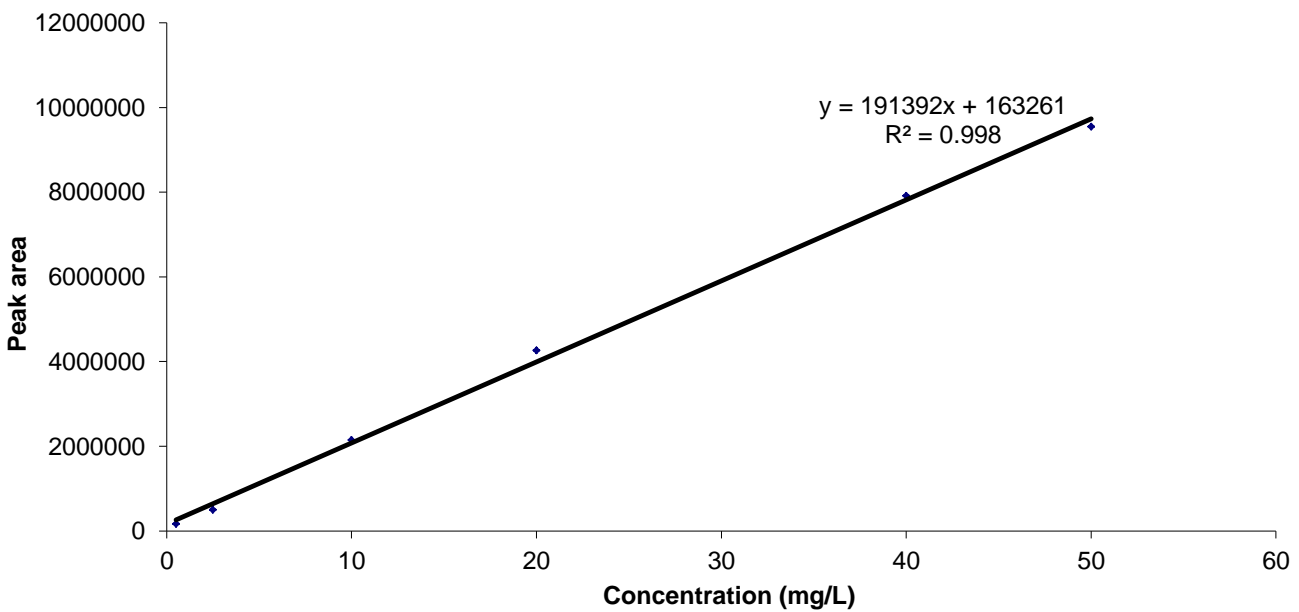
گزارش آزمون باید حداقل دارای آگاهی‌های زیر باشد:

- ۱-۶ مشخصات نمونه
- ۲-۶ روش آزمون به کار رفته با ارجاع به این استاندارد
- ۳-۶ هرگونه فعالیت دیگری که در این استاندارد نوشته نشده است و آزمایشگر آن را انجام داده است و هر آن چه که ممکن است روی نتیجه آزمون تأثیر داشته باشد.
- ۴-۶ نتایج آزمون به دست آمده
- ۵-۶ تاریخ انجام آزمون
- ۶-۶ نام، نام خانوادگی و امضا آزمایش کننده
- ۷-۶ نام، نام خانوادگی و امضا تأیید کننده

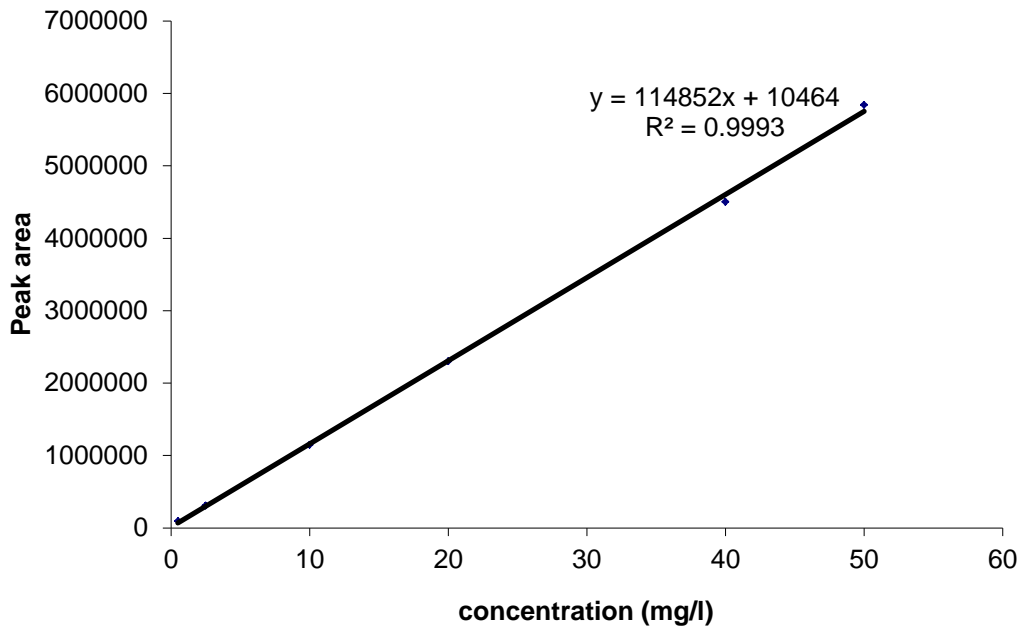
پیوست الف  
(آگاهی دهنده)  
معتبرسازی روش آزمون



شکل الف - ۱ - کروماتوگرام محلول مخلوط ۱۰mg/l سانسیت یلو و کارمویزین تحت شرایط بهینه



شکل الف - ۲ - منحنی استاندارد، معادله کالیبراسیون و ضریب همبستگی رنگ سانسیت یلو



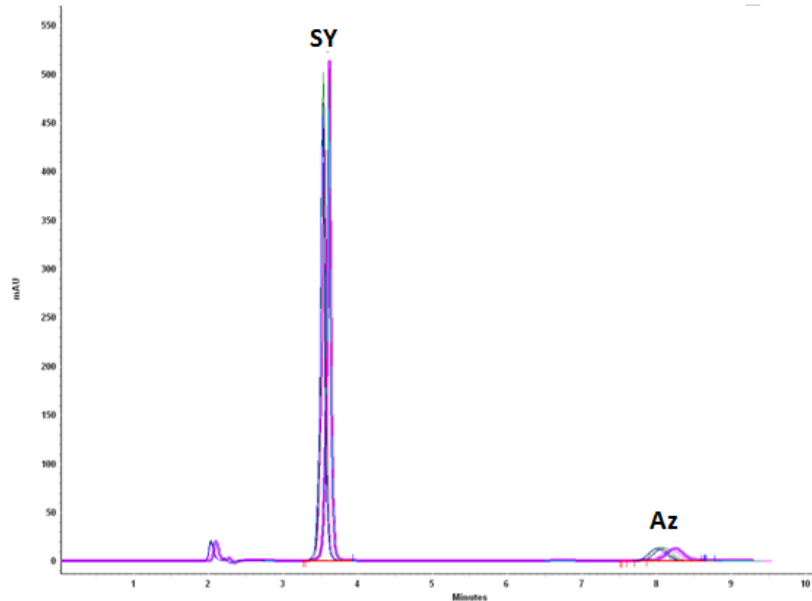
شکل الف - ۳ - منحنی استاندارد، معادله کالیبراسیون و ضریب همبستگی رنگ کارموزین

جدول الف - ۱ - نتایج حاصل از معتبر سازی و ارقام شایستگی<sup>۱</sup>

آنالیت	گستره خطی mg/l	ضریب همبستگی R <sup>2</sup>	حد تشخیص روش mg/l	معادله کالیبراسیون
سانست یلو	۰.۲۵ - ۵۰	۰.۹۹۸۳	۰.۱	y = 191392x + 163261
کارموزین	۰.۲۵ - ۵۰	۰.۹۹۹۳	۰.۱	y = 114852x + 104164

جدول الف - ۲ - نتایج حاصل از تکرار پذیری روش در یک روز و در چند روز (RSD)

آنالیت	تکرار پذیری روش در یک روز n=۶	تکرار پذیری روش در چند روز n=۶
سانست یلو	۳.۵	۸.۷
کارموزین	۲.۸	۶.۴



شکل الف - ۴ - کروماتوگرام‌های مربوط به تکرار پذیری روش در یک روز

جدول الف - ۳ - نتایج مطالعه درصد بازیابی رنگ نمونه‌ها

ردیف	کد نمونه	مقدار اضافه شده µg/g	درصد بازیابی	
			سانست یلو	کارموزین
۱	۱۸	۱۰	۹۶	۹۷
۲	۵	۱۰	۹۲	۱۰۱
۳	۱۴	۱۰	۹۸	۹۴
۴	۱۰	۱۰	۱۰۲	۹۵
۵	۱	۱۰	۹۴	۹۲
۶	۹	۱۰	۹۸	۹۷
۷	۲۱	۱۰	۹۶	۹۴
۸	۳۲	۱۰	۹۳	۹۹
۹	۴۲	۱۰	۹۷	۹۳
۱۰	۲۴		۹۹	۹۶

جدول الف - ۴ - نتایج مقایسه بین آزمایشگاهی اندازه‌گیری رنگ سه نمونه

نمونه ۳		نمونه ۲		نمونه ۱		نام آزمایشگاه
کارموزین mg l <sup>-1</sup>	سانست یلو mg l <sup>-1</sup>	کارموزین mg l <sup>-1</sup>	سانست یلو mg l <sup>-1</sup>	کارموزین mg l <sup>-1</sup>	سانست یلو mg l <sup>-1</sup>	
<۰٫۱	۴۶٫۶	۲٫۵	۲۶٫۲	<۰٫۱	۵۷٫۹	۱
<۰٫۱	۴۶٫۹	۲٫۳	۲۵٫۴	<۰٫۱	۵۶٫۱	۲
<۰٫۴	۴۳٫۸	۲٫۹	۲۴٫۴	<۰٫۴	۵۱٫۷	۳
<۰٫۱	۴۵٫۱	۲٫۹	۲۴٫۳	<۰٫۱	۵۲٫۹	۴
-	۴۵٫۶	۲٫۶۵	۲۵٫۰۸	-	۵۴٫۶۵	میانگین
-	۳٫۱	۱۱٫۳	۳٫۶	-	۵٫۲	RSD%

یادآوری - نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که روش آزمون از تجدیدپذیری بسیار مناسبی برخوردار است و درصد انحراف استاندارد نسبی برای نتایج به‌دست آمده از چهار آزمایشگاه مختلف بسیار مناسب (< ۱۲) می‌باشد.