

تطوير طريقة تحليلية باستعمال تقانة RP-HPLC لتحديد أصبغة السودان I,II,III,IV في بعض العينات الغذائية

تقوى كريم، د. أحمد حليبي

جامعة إدلب، كلية العلوم، قسم الكيمياء

الملخص:

طُوِّرت طريقة حساسة دقيقة بسيطة وموثوقة وخضراء بالكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC مع كاشف الأشعة فوق البنفسجية، لفصل كمية بعض من أنواع أصبغة السودان الأكثر شيوعاً وهي السودان I,II,III,IV وتقديرها في عينات التوابل المستوردة إلى مناطق شمال غرب سوريا، والتي عدّتها بعض الهيئات الغذائية المتخصصة_وأشهرها FDA الأمريكية_ أنها عوامل مسببة للسرطان ذات سمية جينية. فمن الضروري تقييم خطورة أصبغة السودان في التوابل ووجودها، فطُوِّرت الطريقة من خلال دراسة الشروط التجريبية المؤثرة في عملية الفصل مثل نوع العمود الكروماتوغرافي وبنية الطور المتحرك وتدفق الطور المتحرك ودرجة حرارة عمود الفصل. إذ قيس عند الطول الموجي 230nm، وكان وقت التحليل أقل من 6 دقائق. و وُصِل إلى الشروط التجريبية المُثلى ثم دُرست مصداقية الطريقة التحليلية من خلال دراسة الانتقائية والدقة والخطية والاسترجاعية، وكانت جميع النتائج التحليلية مطابقة لمعايير المصداقية التحليلية، إذ تراوح مجال الخطية بين 0.25- 15µg/mL بمعاملات ارتباط ($R^2 > 0.9983$) وكان حد الكشف (LOD) (0.0036، 0.0116، 0.0039، 0.0011) للأصبغة I، II، III، IV على الترتيب، و (LOQ) (0.0109، 0.0351، 0.0120، 0.0033) للأصبغة I، II، III، IV على الترتيب، وكانت قيم (RSD%) لدى حساب الدقة في يوم لم تتجاوز (3.26%) وفي أيام عدة لم تتجاوز (2.80%)، وتراوحت قيم الاسترجاعية في الكرم (99.2-103.9) وفي الكاري (98.7-103.9)، وعليه يمكن عدّ هذه الطريقة التي طُوِّرت قابلةً لكشف أصبغة السودان في العينات الحقيقية و طبقت هذه الطريقة على بعض عينات التوابل التجارية ولُوْحظ وجود كميات من أصبغة السودان في هذه العينات.

الكلمات المفتاحية:

أصبغة السودان، RP-HPLC، التوابل، الكيمياء الخضراء

Development of an Analytical Method Using RP-HPLC Technology for The Determination of Sudan Dyes I, II, III, IV in Food Samples

Taqwa Krayem, Dr. Ahmad Halabi

Idlib University, Faculty of Science, Department of Chemistry

Abstract:

A simple, accurate, reliable and green sensitive method was developed using high performance liquid chromatography (HPLC) with UV detector, to separate some of the most common Sudan dyes, namely Sudan IV, III, II and I, in imported spice samples to Northwestern Syria. Some specialized food agencies, the most famous of which is the US FDA, have considered these dyes to be carcinogenic agents with genotoxicity. Therefore, it is necessary to evaluate the risk and presence of Sudan dyes in spices. The analytical method was developed by studying the experimental conditions affecting the separation process such as the type of chromatographic column, the composition of the mobile phase, the flow of the mobile phase and the temperature of the separation column. The measurements were made at a wavelength of 230nm, and the analysis time was less than 6 minutes. The optimal experimental conditions were reached, then the validity of the analytical method was studied by studying selectivity, accuracy, linearity and recovery. All the analytical results we obtained were in accordance with the analytical validity criteria, as the linearity ranged between 0.25-15µg/mL with good correlation coefficients ($R^2 > 0.9983$). The limit of detection (LOD) was (0.0704, 0.0116, 0.0039, 0.0249) for Sudan dyes IV, III, II, I, respectively, and the limit of quantification (LOQ) was (0.2132, 0.0351, 0.0120, 0.0754) for Sudan dyes IV, III, II, I, respectively. The relative standard deviation values when calculating the accuracy within a day did not exceed (3.26%), and when calculating the accuracy over several days did not exceed (2.80%). The recovery values in the sample ranged Turmeric (99.2-103.9) and in the curcumin sample (98.7-103.9), therefore, this developed method can be considered capable of detecting Sudan dyes in real samples. This method has been applied to some commercial spice samples and quantities of Sudan dyes were observed in these samples.

Key Words:

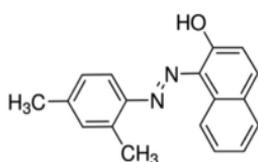
Sudan dyes, RP-HPLC, spices, Green Chemistry

1. مقدمة:**Introduction**

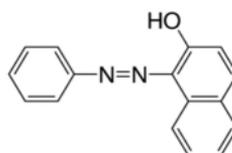
يُعدُّ تلويين المنتجات الغذائية كالمشروبات والتوابل والصلصات والزيوت وإلخ ... أمراً مهماً، لأنه يتيح للمُصنِّعين الحصول على الجودة الجمالية المرغوبة. ومن عيوب المنتجات الغذائية الملونة أنَّها تفقد لونها بمرور الوقت [1]. وتُستعمل بعض الأصبغة الاصطناعية المسموح بها لتضفي على المنتجات الغذائية غير الملونة لوناً ومظهراً مقبولاً، وللأسف بعض هذه الأصبغة غير مُصرح باستعمالها لتلويين المنتجات الغذائية وإخفاء بعض عيوب التصنيع فيها [2]. من أشهر هذه الملونات أصبغة السودان (Sudan I, II, III, IV)، التي تنتمي إلى زُمرة أصبغة الأزو الاصطناعية [1]، ويُبيِّن الشكل رقم (1) الصيغ المنشورة لأصبغة السودان [3]، ويُوضِّح الجدول رقم (1) أهم الخصائص الفيزيائية والكيميائية لهذه الأصبغة [4], [5], [6]، إذ إنَّ هذه الأصبغة تُعطي ألواناً أكثر جاذبية من أي أصبغة شائعة أخرى [7]. وتُستعمل أصبغة السودان على نطاق واسع لتلويين العديد من المنتجات مثل (البلاستيك والشموع والزيوت والأقمشة والأحذية ومنتجات النسيج وللتطبيقات العلمية)، إضافة لاستعمال أصبغة السودان في تلويين بعض المنتجات الغذائية مثل التوابل بُغية إكسابها ألواناً مُميّزة بهدف تسويقها تجارياً، إذ إن هذه الأصبغة رخيصة الثمن وتتمتع بألوان زاهية تدوم لفترة طويلة [1]. وبسبب التنوع القليل للأصبغة الصناعية المُعتمدة وارتفاع أسعارها، أُضيفت مثل هذه الأصبغة غير المُعتمدة بشكل غير قانوني، وتتميز بقدرة تلويين عالية وسعر منخفض، إلى المنتجات الغذائية في السنوات الأخيرة من قبل بعض مصنعي الأغذية الفاسدين [4]، ونظراً لازدياد استهلاك التوابل في جميع أنحاء العالم فإنَّ غش التوابل بهذه الأصبغة يعود على الشركات المنتجة بأرباح اقتصادية عالية، لذلك فإنَّ التوجه نحو اختبار جودة التوابل بشكل عام وخصوصاً الشائعة الاستخدام كالفلفل الحار أصبح أمراً بالغ الأهمية من قبل الهيئات المعنية بصحة المستهلك [8]. وقد عُثر على هذه الأصبغة بشكل رئيس لأول مرة في مسحوق الفلفل الحار وفي الأطعمة المُحضّرة به في 9 مايو 2003، إذ نقلت فرنسا معلومات عبر نظام الإنذار السريع بأنها اكتشفت صبغة السودان I في منتجات الفلفل الحار الواردة من الهند [9]. وصُنفت أصبغة السودان على أنها مواد مسرطنة من الفئة الثالثة من قبل الوكالة الدولية لأبحاث السرطان (IARC1975)، لأنها يمكن أن تُولّد نواتج استقلابية ذات تأثير مُطفر ومُسرطن للبشر [1]، ولأنها كانت سبباً لبعض سرطانات المثانة

والكبد في الحيوانات [10]. كما تبيّن أن أصبغة السودان تتحول ضمن الجسم إلى أمينات عطرية تستهدف خلايا الكبد وتسبب أذية كبدية، ولم تُعتمد أصبغة السودان مضافاتٍ غذائية قانونية، وقد حُظر استعمالها في الأغذية من قبل إدارة الغذاء والدواء الأمريكية (FDA US Food and Drug Administration) والاتحاد الأوروبي [2]. وبالنظر إلى آلية تأثير هذه المركبات فإنه لا يمكن تحديد الجرعة التي تؤدي لحدوث الفعل المُسرطن وما بعده LOEL (Lowest observed adverse effect level). ولا يمكن تحديد المدخول اليومي المسموح به من هذه المواد (Acceptable Daily Intake) ADI [9]. وقد أُجريت دراسات عدة لتحديد أصبغة السودان في أنواع عدة من الغذاء، منها استعملت التحليل الطيفي بالأشعة المرئية وفوق البنفسجية لتحديد أصبغة السودان I,II,III,IV [11] [12]، كما استُعملت كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة مع القياس الطيفي في المجال المرئي وطريقة اختبار اللون السريع لتحديد صبغة سودان مع صبغة رودامين B [13]، كما طوّرت بعض الدراسات طريقة للكشف عن هذه الأصبغة بمطيافية الأشعة تحت الحمراء المتوسطة (FT-MIR) [8]، وأيضاً استُعملت مطيافية الكتلة عالية الدقة لتحديد هذه الأصبغة في بعض العينات الغذائية [2]، واستُعملت العديد من تقنيات الكروماتوغرافيا في تحديد أصبغة السودان منها الكروماتوغرافيا الكهروحرارية (Micellar) [14]، والكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) مع كروماتوغرافيا نفاذية الهلام [15]، و الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء (HPLC) مع مقياس الطيف الكتلي الترادفي [16]، وكروماتوغرافيا السوائل فوق الحرجة فائقة الأداء (UHPSFC) [17]، إذ إنها مركبات كربونية ذات قطبية منخفضة ومن ثم تُفصل على عمود لا قطبي بشكل أفضل من الأعمدة القطبية [18]، كما استُعملت الطرائق الالكتروكيميائية لتحديد أصبغة السودان وذلك بقياس الكمون باستعمال قطب كهربائي جديد مطبوع على الشاشة من MnO_2 واستعماله مستشعراً فولتاميترياً لتحديد السودان، وأُجريت القياسات الكهروكيميائية باستعمال قياس الفولتاميتري الدوري (CV)، وقياس الفولتاميتري الخطي (LSV)، وقياس الفولتاميتري النبضي التفاضلي (DPV)، وقياس الكرونوأمبيروميتر (CA) [19].

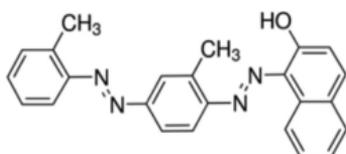
ومع ازدياد الحاجة لتطوير طرائق تحليلية تتميز بالحساسية والانتقائية العالية لتحديد أصبغة السودان في العينات الغذائية، بإضافة إلى أن تكون هذه الطرائق سهلة التطبيق وبسيطة وأقل تكلفة اقتصادية والأهم من ذلك أنها صديقة للبيئة، نتيجة لذلك توجّه هذا البحث لتطوير طريقة كروماتوغرافية فعّالة ودقيقة وسهلة التطبيق إضافة إلى أنها اقتصادية وصديقة للبيئة، من أجل تحديد أصبغة السودان في عينات التوابل الغذائية المستوردة في السوق المحلية.



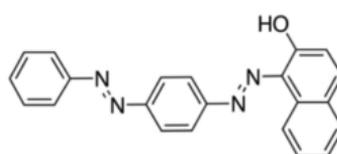
Sudan II



Sudan I



Sudan VI



Sudan III

الشكل (1) البنية الكيميائية لأصبغة السودان I، II، III، IV.

الجدول (1): الخصائص الفيزيائية والكيميائية لأصبغة السودان I، II، III، IV.

Sudan IV	Sudan III	Sudan II	Sudan I	Dyes
$C_{24}H_{20}N_4O$	$C_{22}H_{16}N_4O$	$C_{18}H_{16}N_2O$	$C_{16}H_{12}N_2O$	الصبغة الجزيئية
380.43	352.40	276.34	248.29	الكتلة المولية M_w (g/mol)
مسحوق أحمر داكن	مسحوق أحمر داكن	مسحوق برتقالي	مسحوق برتقالي	الوصف أو
186 – 233	195 – 199	156 - 158	129 - 134	درجة الانصهار MP (°C)
361 – 619	361- 585	334 - 477	333 - 444	درجة الغليان B.P (°C)
1.331	غير محدد	0.47	غير محدد	الكثافة d
غير قابل للذوبان في الماء، قابل للذوبان في المذيبات العضوية	غير قابل للذوبان في الماء، قابل للذوبان في المذيبات العضوية	غير قابل للذوبان في الماء، قابل للذوبان في المذيبات العضوية	غير قابل للذوبان في الماء، قابل للذوبان في المذيبات العضوية	الانحلالية S (g/L)

الجدول (2): أنواع أعمدة الفصل الكروماتوغرافي المستعملة ومواصفاتها.

الرمز	العمود	الشركة المصنعة	بلد المنشأ
ODS ₁	C18(5 μm, 250×4.6mm)	KNAUER	Germany
ODS ₂	EC C18(5 μm, 250×4.6mm)	Macherey-nagel	Germany
ODS ₃	EC C18(5 μm, 150×4.6mm)	Macherey-nagel	Germany
C8	C8(5 μm, 250×4.6mm)	Teknokroma	Spain
NH ₂	NH ₂ (5 μm, 250×4.6mm)	Macherey-nagel	Germany

2. القسم العملي: Experimental section

1.2. الأجهزة والأدوات: Apparatuses and Tools

استُعمل جهاز الكروماتوغرافيا السائلة عالية الأداء HPLC مجهزاً بمضخة بمعدل تدفق يصل إلى 5ml/min، وضغط إلى 50MPa، ودرجة حرارة الفرن تصل إلى 80°C، وحجم خلية الحاقن 20μL، وكاشف يعمل في مجال الأشعة فوق البنفسجية يقيس ضمن المجال (180-900)nm من إنتاج شركة WUFENG الصينية، وتحكم به عن طريق برنامج (Wufeng HPLC)، واستُعملت أعمدة الفصل الكروماتوغرافي كما هو موضح بالجدول رقم (2)، جهاز تحليل طيفي UV-Vis Spectrophotometer أحادي الحزمة الضوئية إنتاج شركة (DRAWELL) الصينية يقيس ضمن المجال (190-1100) nm بدقة قياس (0.8) ±nm، مُجهز بحجرة قياس تتسع خلية كوارتز واحدة حجمها 3cm³، عرض الحزمة 2nm وسرعة المسح 1nm/sec، مزود بحاسوب، ويُتحكم بالجهاز عن طريق برنامج (UV-PRO analysis software)، وميزان تحليلي حساس دقته ±0.001g إنتاج شركة (DENSI) التركية، وجهاز الأمواج فوق الصوتية Ultra Sonic إنتاج شركة (ALEX.MACHIN) التركية، ومرشحات ميكرونية 0.45μm من شركة (ISOLAB)، وماصات حجمية آلية متغيرة الحجم (micropipette) من شركة (JONALAB) بحجوم متغيرة ضمن المجال (10-1000)μL، ودوارق حجمية مختلفة السعة وأدوات مخبرية زجاجية مختلفة.

2.2. المواد الكيميائية: Materials

سودان I نقاوته (98%)، سودان II نقاوته (98%)، سودان III نقاوته (93%)، سودان IV نقاوته (95%)؛ وجميعها من إنتاج شركة Solarbio، وكلوروفورم، أسيتونتريل، ميثانول،

إيتانول، إيزوبروبانول، هكسان خاصة بالـ HPLC ذات نقاوة عالية >99% جميعها من إنتاج شركة (Merck)، وماء مقطر مخصص لـ HPLC. وُجِّعت عينات التوابل (بابريكا- كركم-كتشب) من السوق المحلية ومن مصادر مختلفة.

Preparation of Solutions

3.2. تحضير المحاليل:

- المحاليل العيارية الأم لأصبغة السودان II, III, IV بتركيز 1 mg/mL: وُزِنَتْ كمية من أصبغة السودان II والسودان III والسودان IV العيارية تكافئ 20mg لكل منها، ووُضعت كل كمية في دورق حجمي خاص سعته 20mL، وأُضيف 3mL من الكلوروفورم لكل منها، وحُرِكت جيداً حتى تمام الانحلال، ثم أُكْمِل الحجم بالأسيتونتريل حتى الدائرة العيارية، وبعد وُضعت ضمن جهاز الأمواج فوق الصوتية لمدة ربع ساعة حتى تمام الانحلال، وبذلك يكون تركيز المحاليل العيارية الأم لأصبغة السودان IV,III,II هو 1 mg/mL، وتُحفظ المحاليل في عبوات عاتمة مغلقة.
- المحلول العياري الأم للسودان I بتركيز 0.1 mg/mL: وُزِنَتْ كمية من سودان I العياري تكافئ 10mg ووُضعت في دورق حجمي سعة 100mL، وأُضيف 15mL من الكلوروفورم وحُرِكت جيداً حتى تمام الانحلال، ثم أُكْمِل الحجم بالأسيتونتريل حتى الدائرة العيارية، وبعد وُضعت ضمن جهاز الأمواج فوق الصوتية لمدة ربع ساعة حتى تمام الانحلال، وبذلك يكون تركيز المحلول العياري الأم للسودان I هو 0.1 mg/mL، ويُحفظ المحلول في عبوة عاتمة مغلقة.
- المحلول العياري المشترك من أصبغة السودان الأربعة بتركيز 0.01 mg/mL: أُخِذَ 0.1 mL من المحاليل العيارية الأم لكل من السودان II، السودان III، والسودان IV، وأُخِذَ 0.4mL من المحلول العياري للسودان I، ووُضعت جميعها في دورق حجمي سعة 10 mL ومن ثم أُكْمِل الحجم حتى الدائرة العيارية بالأسيتونتريل، وبذلك جرى الحصول على محلول مزيج عياري مشترك ذي تركيز 0.01 mg/mL.

4.2. تحضير الطور المتحرك الأمثل: Preparation of Optimal mobile phase

أخذ 950mL من الأسيتونتريل ووضِع في دورق حجمي 1000mL وأكمل الحجم بالماء المقطر (الذي جرت فلترته باستعمال فلتر ميكروني مساميته $0.45\mu\text{m}$) حتى الدائرة العيارية، ومن ثم وُضِع الدورق ضمن جهاز الأمواج فوق الصوتية حتى تمام الانحلال وطرد الغازات المنحلة، وبذلك يكون قد جرى الحصول على الطور المتحرك: Acetonitrile: Water (95:5).

5.2. تحضير محلول العينة: Preparation of sample Solution

وُزِن 1gr من العينة بدقة كافية، ثم نُقلت إلى ببشر، وأضيف إليها 2mL من الكلوروفورم و6mL من الأسيتونتريل، ومن ثم وُضِع الببشر ضمن جهاز الأمواج فوق الصوتية لمدة 20min بحيث يُضمن انحلال أصبغة السودان، ثم يُرشح المحلول باستعمال ورق ترشيح، ثم تُنقل الرشاحة إلى أنبوب اختبار ويوضع في المثقلة لمدة 10min بسرعة دوران 12000rpm، ثم أُخذ السائل الطافي بشكل كامل ونُقل إلى دورق حجمي سعة 10mL، ومن ثم يُتمم الحجم بالأسيتونتريل حتى الدائرة العيارية، وبذلك يُحصل على محلول العينة، وتُملأ العينة ضمن السرنغ المُخصَّص للحقن والمُجهَّز بفلتر ميكروني $0.45\mu\text{m}$.

6.2. طريقة القياس: Measurement method

بناءً على الدراسات المرجعية للأبحاث السابقة لتحديد أصبغة السودان الأربعة تم تطبيق الشروط الكروماتوغرافية الآتية: العمود (C18 (4.6 mm × 250 mm, 5 μm)، والطور المتحرك ميتانول 0.5% 3:97 حمض الخل، ومعدل تدفق الطور المتحرك 1mL/min، درجة حرارة العمود هي درجة حرارة الغرفة، وعند الطول الموجي 480nm [20].

7.2. الخط البياني العياري: Standard Graph Line

في سلسلة دوارق حجمية سعة 10mL تُوضع الحجوم (25, 50, 250, 500, 750, 1000, 1250, 1500) μL من المحلول العياري الأم للسودان I، والحجوم (2.5, 5, 25, 50, 75, 100, 125, 150) μL من المحاليل العيارية للسودان II, III, IV المُحضَّرة سابقاً بالتراكيز المذكورة، ويُكمل الحجم بالأسيتونتريل حتى الدائرة العيارية، للحصول على التراكيز التالية (0.25-0.5-2.5-5-7.5-10-12.5-15) μg/mL، وتُمزج المحاليل جيداً، وتُحقن تباعاً

في جهاز HPLC بوجود فلتر ميكروني $0.45\mu\text{m}$ على سرغ المحقن، ويُرسَم الخط البياني العياري للمواد العيارية الأربعة لحساب تراكيز مجهولة منها.

Results and Discussion

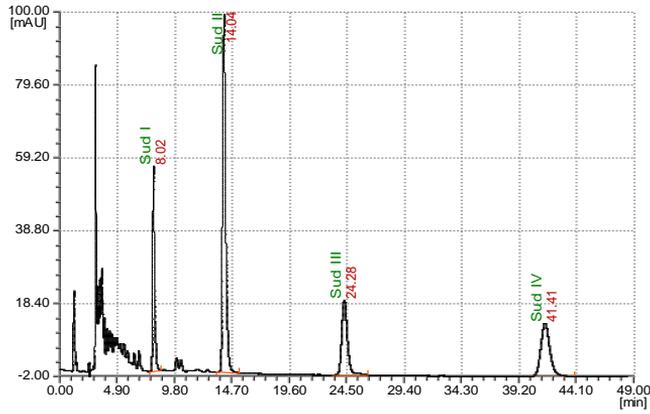
3. النتائج والمناقشة:

3.1. الكروماتوغرام المرجعي لأصبغة السودان الأربعة:

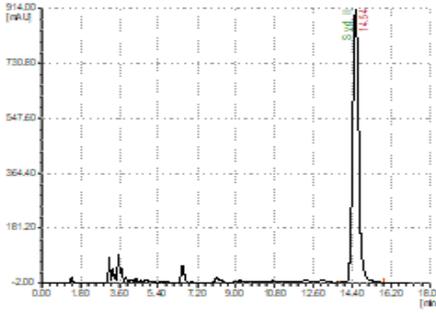
يعرض الشكل رقم (2-a) الكروماتوغرام الموافق للمزيج العياري لأصبغة السودان الأربعة تركيز كل منها 0.01mg/mL ، والأشكال رقم (2-a, 2-b, 2-c, 2-d) الكروماتوغرامات الفردية للأصبغة الأربعة، إذ إن زمن الاحتفاظ للسودان I كان $R_T=8.05\text{min}$ وللسودان II كان $R_T=14.54\text{min}$ وللسودان III كان $R_T=24.89\text{min}$ وللسودان IV كان $R_T=40.28\text{min}$ ، وقد جرى التأكد من ذلك من خلال مطابقة أزمنة الاحتفاظ هذه مع أزمنة الاحتفاظ لمحاليل عيارية مفردة لكل صباغ من أصبغة السودان الأربعة تم وُحِّقَت بالشروط التجريبية السابقة نفسها.

ومن مناقشة النتائج التي حُصل عليها من الكروماتوغرام المشترك يتبين أن القمم مفصولة تماماً بعضها عن بعض إلا أن أزمنة الاحتفاظ لكل من سودان IV, III كبيرة نسبياً وهو ما

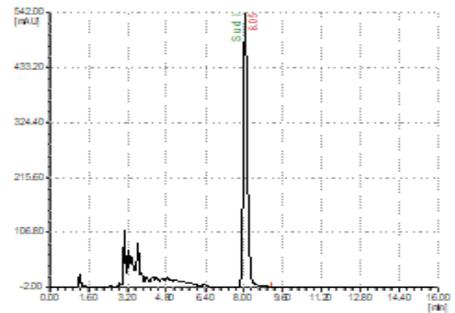
يعطي إطالة لزمّن التحليل إضافة إلى أن القمم المرافقة كانت عريضة ويوجد فيها تذبذب fronting واضح.



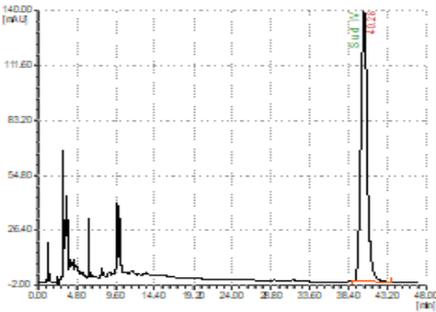
الشكل (2-a): كروماتوغرام المزيج العياري المشترك لأصبغة السودان الأربعة بتركيز 0.01mg/ml بمحل الأسيتونتريل مع الكلوروفورم بتطبيق الشروط الكروماتوغرافية المرجعية.



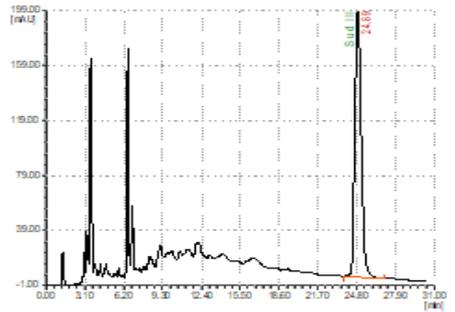
(2-c)



(2-b)



(2-e)



(2-d)

كروماتوغرامات أصباغ السودان العيارية الفردية: (2-b) السودان I، (2-c) السودان II، (2-d) السودان III، (2-e) السودان IV.

2.3 تطوير الطريقة الكروماتوغرافية لتحديد أصبغة السودان الأربعة:

Development of a chromatographic method for the determination of the four Sudan dyes

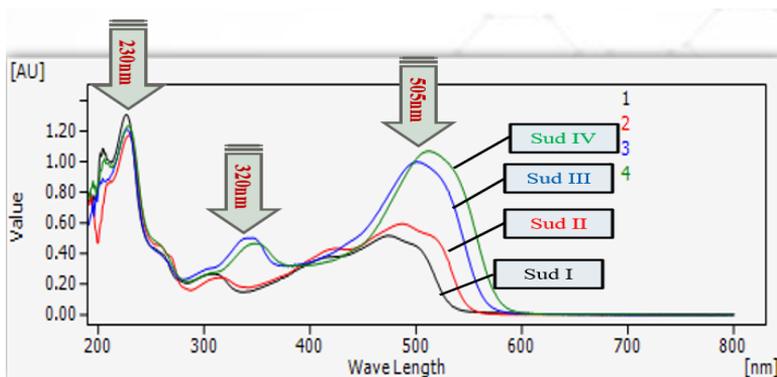
1.2.3 دراسة الشروط الكروماتوغرافية المؤثرة على فصل أصبغة السودان الأربعة:

Study of chromatographic conditions affecting the separation of the four Sudan dyes

1.1.2.3 انتقاء الطول الموجي الأمثل للقياس:

Selecting the optimal wavelength for measurement

لاختيار طول موجة الكاشف الأمثل التي تعطي أفضل قيمة امتصاصية لأصبغة السودان الأربعة معاً، مُسحت طيوف أصبغة السودان العيارية الأربعة المُحصَّرة بتركيز 0.01mg/mL بمحل التمديد المكوّن من الأسيتونتريل والكلوروفورم ضمن المجال nm (200-800)، وقد جرى التصفير على محل التمديد نفسه المُستعمل في التحضير. ويَعرض الشكل رقم (3)، مراكبة طيوف امتصاص الأشعة في المجال المرئي وفوق البنفسجي لأصبغة السودان العيارية الأربعة ضمن مجال المسح 200-800 nm، أبدت هذه الطيوف قمم امتصاص عُظْمى لكل صباغ من أصبغة السودان الأربعة كما هو موضح بالجدول رقم (3).

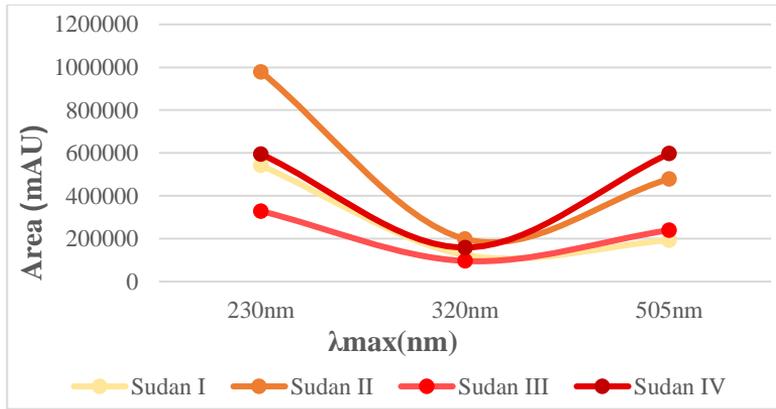


الشكل (3): طيوف الامتصاص المرئي وما فوق البنفسجي للأصبغة العيارية الأربعة تركيز كل منها 0.01mg/mL.

الجدول (3): قمم الامتصاص العظمى لأصبغة السودان الأربعة.

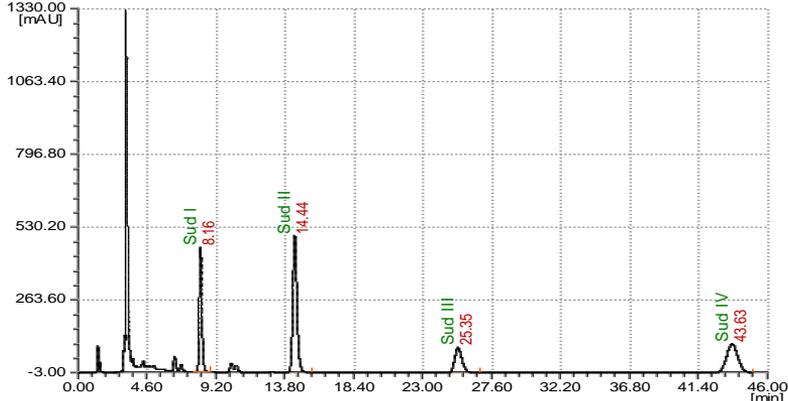
$\lambda_{\max 3}(\text{nm})$	$\lambda_{\max 2}(\text{nm})$	$\lambda_{\max 1}(\text{nm})$	صباغ السودان
476	311	229	S I
489	314	233	S II
501	348	204	S III
513	351	206	S IV

إذ نلاحظ أن طيوف المواد الأربعة جميعها تُبدي ثلاث قمم امتصاص ضمن مجالات متقاربة جداً، ووفقاً لذلك فقد دُرست ثلاثة أطوال موجية وهي (230,320,505) nm، وعليه فإنه جرى حقن محلول عياري مشترك لأصبغة السودان الأربعة تركيز كل منها 0.01mg/mL وفق الشروط الكروماتوغرافية المرجعية السابقة في جهاز HPLC عند كل طول موجي من هذه الأطوال الثلاثة، لتحديد أي طول موجي من هذه الأطوال يُعطي حساسية أعلى ويُختار للقياس، ويوضح الشكل رقم (4)، تأثير الأطوال الموجية الثلاثة المدروسة في مساحة القمم الكروماتوغرافية لأصبغة السودان الأربعة.



الشكل (4): تأثير طول موجة الكاشف على مساحة قمم أصبغة السودان الأربعة.

إذ تبيّن أنه عند الطول الموجي 230nm تكون مساحة قمم الأصبغة الأربعة أكبر ما يمكن، وتكون مساحة القمم أقل عند الطول الموجي 505nm، في حين تكون قليلة جداً عند الطول الموجي 320nm، ولذلك سيُعمد طول موجة الكاشف 230nm للقياس في الدراسات اللاحقة، ويوضح الشكل رقم (5) كروماتوغرام العياري المشترك عند الطول الموجي المعتمد.

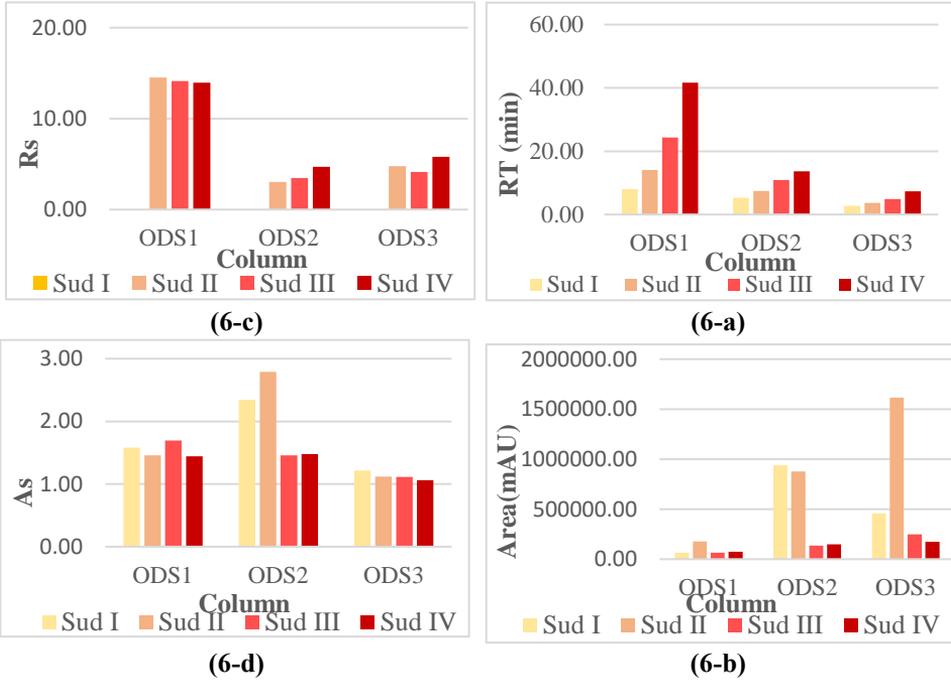


الشكل (5) كروماتوغرام المحلول العياري المشترك لأصبغة السودان الأربعة بتطبيق الشروط الكروماتوغرافية المرجعية وعند طول موجة الكاشف 230nm.

2.1.2.3 اختيار العمود الأمثل: Selection the Optimal column

دُرِس تأثير نوع العمود الكروماتوغرافي ومواصفاته في كفاءة عملية الفصل للأصبغة الأربعة، وعلى مساحة القمم، وتناظرها، وعلى أزمنة الاحتفاظ لها، ولأجل ذلك استُعملت أنواع عدة من الأعمدة تملك مواصفات مختلفة من حيث نوع الطور الساكن وأبعاد العمود وهي موضحة بالجدول رقم (2)، وُخِّن مزيج عياري مشترك لأصبغة السودان الأربعة تركيز كل منها 0.01mg/mL وبتطبيق الشروط الكروماتوغرافية المرجعية المذكورة سابقاً.

يُبيِّن الشكل رقم (6-d, 6-c, 6-b, 6-a) تأثير نوع العمود في زمن الاحتفاظ ومساحة القمة الكروماتوغرافية والقدرة على الفصل وتناظر القمة.



الشكل (6) يوضح العلاقة بين تغيير نوع العمود و مواصفاته بدلالة البارامترات الأربعة R_T , R_s , Area, A_s .

تُبيّن النتائج الموضحة بالشكل (6-c) أن الأعمدة ODS_1 , ODS_2 , ODS_3 وهي أعمدة ODS قد أعطت تبايناً واضحاً لقمم أصبغة السودان بعضها عن بعض من خلال قيم R_s ، إلا أن العمودين (C8) و $(-NH_2)$ لم يُعطيا أي فصل لأصبغة السودان بعضها عن بعض، ومن خلال مقارنة أزمنة الفصل لأصبغة السودان في الشكل (5-a) باستعمال أعمدة ODS تبيّن أن العمود ODS_3 (EC C18 150×4.6mm, 5µm) قد أعطى أزمنة فصل أقل من الأعمدة ODS_1 , ODS_2 ، كما أن مساحات القمم كانت أفضل الشكل (6-b)، إضافة إلى أن تناظر القمم كان جيداً الشكل (6-d)، وعليه يتبيّن أن استعمال عمود EC C18 يُعطي أفضل النتائج من حيث كفاءة الفصل وزمن الفصل المناسب وقيم A_s , Area الأمثل، وسوف يتم يُستعمل في الدراسات اللاحقة.

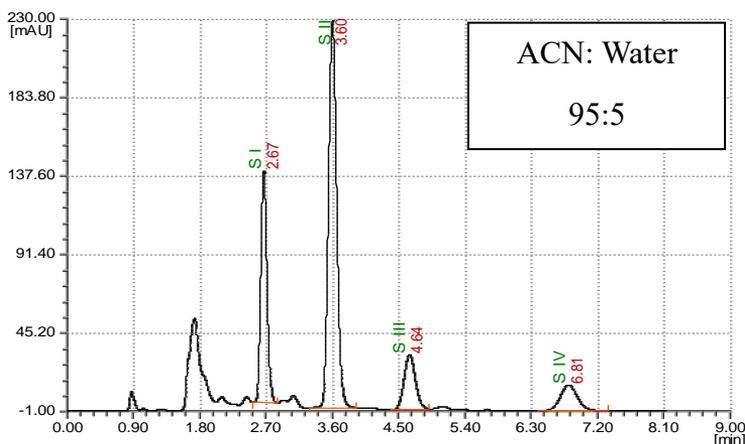
2.2.3 اختيار الطور المتحرك الأمثل: Selection of the optimal mobile phase

أُستعملت تراكيب مختلفة من الطور المتحرك اعتمد في اختيارها على الدراسات المرجعية الخاصة بدراسة الخواص الفيزيائية والكيميائية لكل من أصبغة السودان الأربعة، ومن المُحلات المستعملة في تركيب الطور المتحرك نذكر (الماء، الميثانول، الأسيتونتريل)، إذ استُعملت هذه المُحلات بشكلها النقي طوراً متحركاً، كما استُعمل مزيج من أكثر من محل وينسب مختلفة بحيث يحقق الطور المتحرك الفصل الأمثل لكل من أصبغة السودان IV,III,II,I في زمن فصلي مثالي ويحافظ على كفاءة الفصل. ويوضح الجدول رقم (4) تراكيب الأطوار المتحركة المستعملة ونسب المزج الخاصة بها.

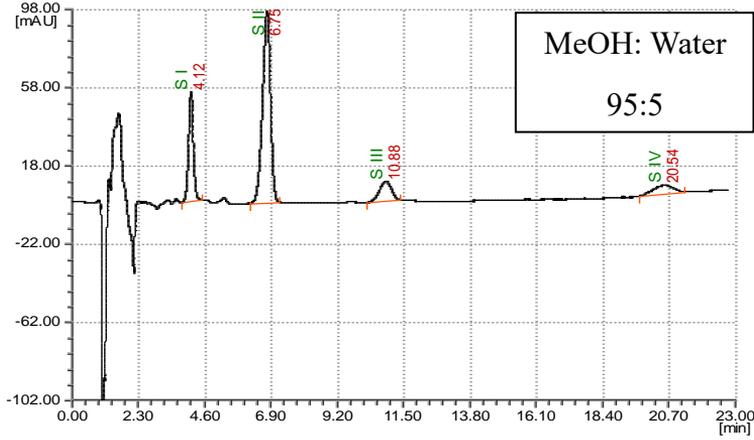
الجدول (4): تراكيب المزج للطور المتحرك المُستعمل في هذا البحث ونسبهُ.

التركيب الثالث		التركيب الثاني		التركيب الأول		No
ACN	MeOH	MeOH	Water	ACN	Water	
100	0	100	0	100	0	1
95	5	95	5	95	5	2
90	10	90	10	90	10	3
80	20	80	20	80	20	4
70	30	70	30	70	30	5

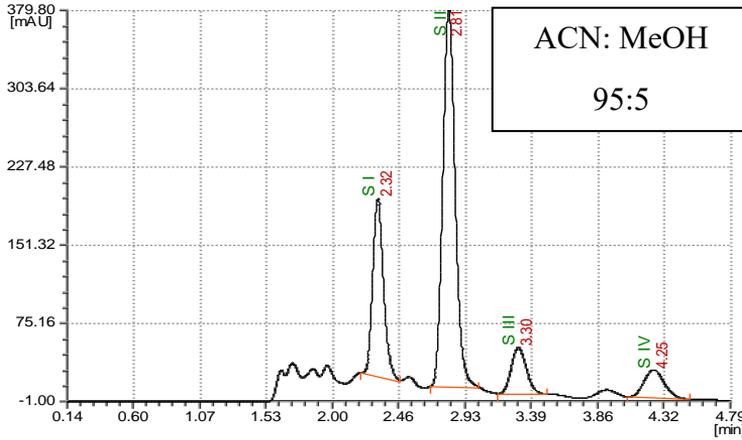
تُوضَّح الأشكال رقم (7-a) (7-b) (7-c) الكروماتوغرامات الموافقة لمزيج عياري مشترك من أصبغة السودان الأربعة تركيز كل منها 0.01mg/mL جرى حقنها بالشروط الكروماتوغرافية السابقة مع استعمال تراكيب للطور المتحرك (ACN: Water)، ثم (MeOH: Water)، ثم (ACN: MeOH)، بنسبة مزج (95:5) لكل منها على الترتيب.



الشكل (7-a)



الشكل (7-b)



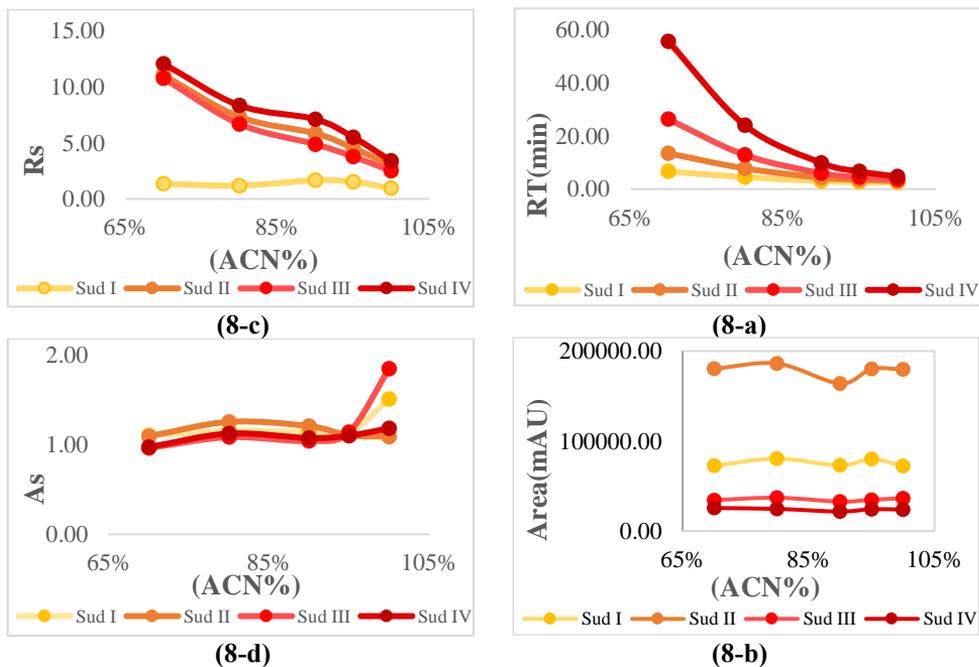
الشكل (7-c)

الشكل (7) الكروماتوغرامات الموافقة لمزيج عياري مشترك من أصبغة السودان الأربعة مع تراكيب مختلفة للطور المتحرك بتطبيق الشروط الكروماتوغرافية المرجعية.

إذ تُبيّن النتائج الكروماتوغرافية السابقة أن استعمال طور متحرك مكوّن من ACN: Water قد أعطى قمماً مفصول بعضها عن بعض ومتناظرة إضافة إلى أن أزمنة الاحتفاظ لها مناسبة.

في حين أن استعمال طور متحرك مكوّن من MeOH: Water يُعطي قمماً مفصول بعضها عن بعض إلا أن قمة S_{IV}, S_{III} تكون متأخرة وعريضة وغير متناظرة، واستعمال طور متحرك من ACN: MeOH لم يُعطِ فصلاً جيداً ولم تكن القمم متناظرة، وعليه سوف يُستعمل طور متحرك مكوّن من ACN: Water.

يعرض الشكل رقم (8) تأثير تغيير نسبة تركيب الطور المتحرك ACN: Water على مساحة القمم الكروماتوغرافية (8-a)، وعلى أزمنا الاحتفاظ (8-b)، وعلى القدرة على الفصل (8-c)، وعلى تناظر القمم (8-d)، إذ تبين أنه لدى استعمال طور متحرك ACN بنسبة 100% كانت أزمنا الاحتفاظ لأصبغة السودان صغيرة جداً، وهو أمر غير مناسب، إذ إنه من المحتمل أن تتداخل قمم الأصبغة مع قمم المركبات الأخرى التي قد تكون موجودة في تركيب العينات أو الطور المتحرك. ويُلاحظ أنه لدى استعمال طور متحرك بنسبة ACN: Water (95: 5) كان الكروماتوغرام الناتج مثالياً من حيث إن قمم الأصبغة الأربعة كانت مفصولة تماماً بعضها عن بعض وأزمنا الاحتفاظ لها مناسبة، كما أن تناظر القمم كان ممتازاً إضافة إلى أن مساحة القمم كانت جيدة، كما يتبين أنه مع ازدياد نسبة الماء في تركيب الطور المتحرك تزداد قطبية الطور المتحرك وهذا يُضعف تأثيره على امتلاص الأصبغة الأقل قطبية بشكل أسرع، ومن ثم يزداد زمن عملية الفصل أكثر ومن ثم إطالة عمر التحليل، لذلك سيعتمد تركيب الطور المتحرك ACN: Water (95: 5) للدراسات اللاحقة.



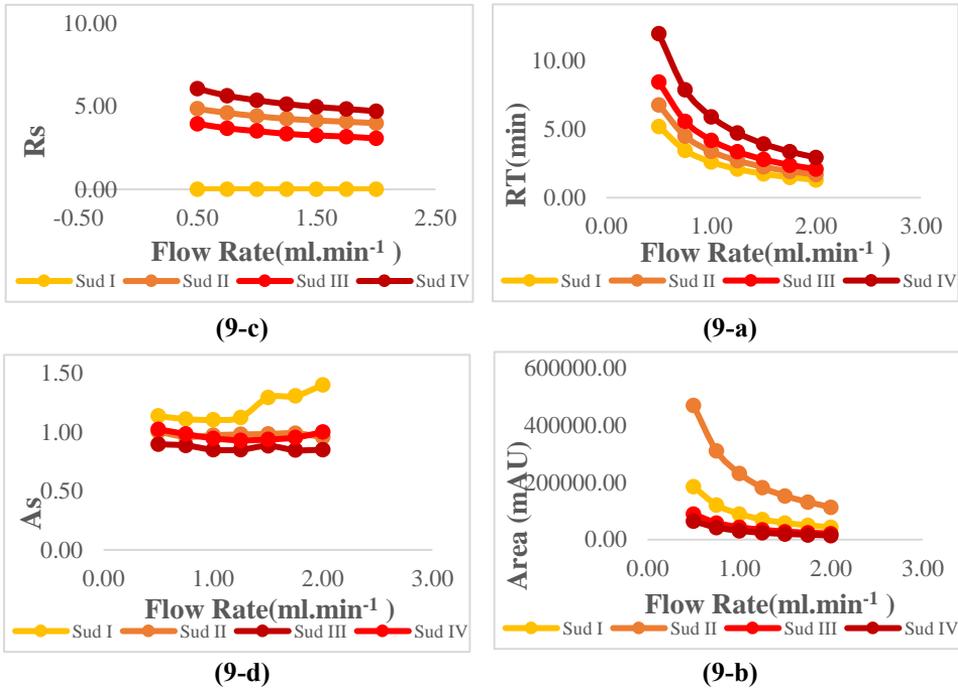
الشكل (8) يوضح العلاقة بين تأثير تغيير نسبة تركيب الطور المتحرك بدلالة البارامترات الأربعة RT , Rs , $Area$, AS .

.Area, AS

3.2.3 اختيار معدل تدفق الطور المتحرك الأمثل:

Choose the optimal mobile phase flow rate

دُرس تأثير تغير تدفق الطور المتحرك في كفاءة عملية الفصل لأصبغة السودان الأربعة، وفي مساحة القمم الكروماتوغرافية وفي تناظرها وأزمنة الاحتفاظ الخاصة بها، ومن أجل ذلك دُرست تغيرات التدفق (0.5-0.75-1-1.25-1.5-1.75-2) mL/min، وحُقن مزيج عياري مشترك لأصبغة السودان الأربعة ضمن جهاز HPLC بتهيئة الشروط الكروماتوغرافية الأخرى التي اختيرت. ولدراسة تأثير تغير تدفق الطور المتحرك في أهم المقادير الكروماتوغرافية؛ رُسمت العلاقة بين تغيرات Area, RT, As, Rs بدلالة تغير تدفق الطور المتحرك كما هو مبين بالشكل رقم (9).



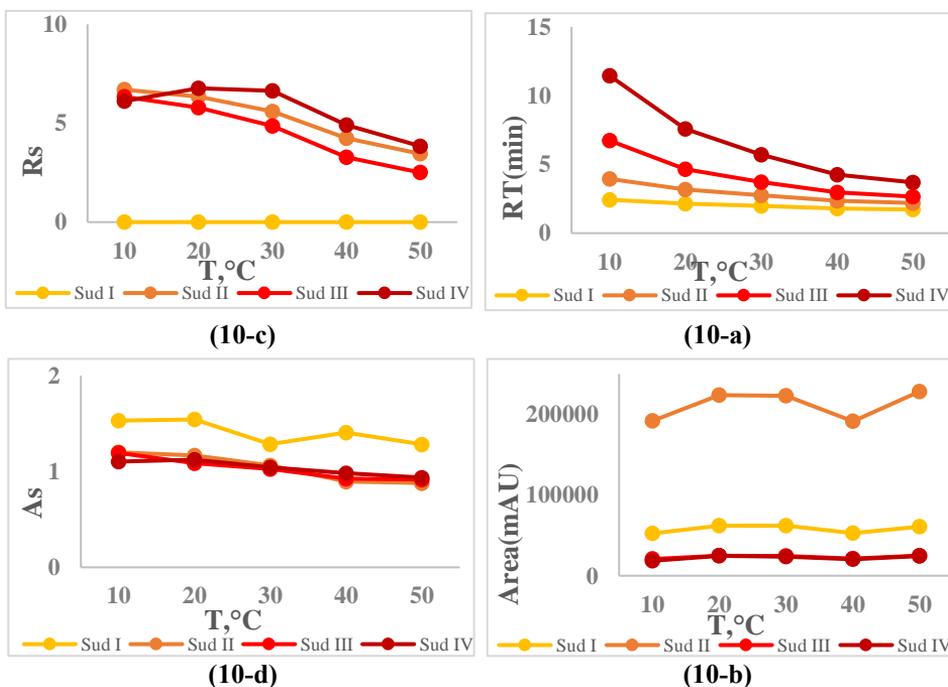
الشكل (9) يوضح العلاقة بين تغير تدفق الطور المتحرك بدلالة البارامترات الأربعة RT, Rs, Area, AS.

يتبين من النتائج السابقة أنه بازياد سرعة تدفق الطور المتحرك تنقص أزمنة الاحتفاظ لقمم الأصبغة الأربعة جميعها ما يزيد من سرعة التحليل، كما أنه تتناقص مساحة القمة

الكروماتوغرافية ولكن بشكل طفيف، وكذلك يحصل تناقص طفيف لمعامل الفصل إلا أنها ضمن المقبول، ولكن عند التدفقات العالية للطور المتحرك تُمتلص القمم بشكل مبكر (زمن احتفاظ قصير) وهو أمر غير مُحبَّذ، إذ من الممكن أن تتداخل قمم الأصبغة مع قمم مواد أخرى في العينات. ونتيجة لذلك تم اختيارت قيمة التدفق 1.5mL/min كأفضل نتيجة من حيث البارامترات الأربعة.

4.2.3 اختيار درجة الحرارة المثلى: Optimum temperature selection

دُرِس تأثير تغير درجة حرارة العمود في كفاءة عملية الفصل لأصبغة السودان الأربعة، وفي مساحة القمم الكروماتوغرافية وفي تناظرها وأزمنة الاحتفاظ الخاصة بها، ومن أجل ذلك دُرِسَت تغيرات درجة الحرارة (10-20-30-40-50) °C، وخُفِن مزيغ عياري مشترك لأصبغة السودان الأربعة ضمن جهاز HPLC بتثبيت الشروط الكروماتوغرافية الأخرى التي اختيرت. ولدراسة تأثير تغير درجة الحرارة في أهم المقادير الكروماتوغرافية؛ رُسمت العلاقة بين تغيرات Area, RT, As, Rs بدلالة تغير درجة حرارة العمود كما هو مُبين بالشكل (10).



الشكل (10) يوضح العلاقة بين تغير درجة حرارة العمود بدلالة البارامترات الأربعة .Rt, Rs, Area, AS

وثبّين النتائج السابقة أنه بارتفاع درجة الحرارة يتناقص زمن الاحتفاظ، وهذا قد يكون بسبب انخفاض لزوجة الطور المتحرك عند رفع درجة حرارة العمود، إضافة إلى تناقص مفعول الادمصاص للمادة على الطور الساكن، وإن أزمنا الاحتفاظ الصغيرة جداً غير مرغوبة بسبب إمكانية حدوث تداخلات قمم أصبغة السودان مع قمم المواد الأخرى الموجودة في العينات. وتوضّح النتائج أن مساحة القمم كانت أكبر ما يمكن ضمن المجال (20-30) °C، وأن تناظر القمم يتناقص بارتفاع درجة الحرارة، وقد تبين أن قيمة معامل الفصل تتناقص بشكل كبير بارتفاع درجة الحرارة، وبناءً على ما سبق وعند مفاضلة النتائج بعضها مع بعض اختير المجال الحراري من °C (20-30) للقياس (يُمكن عدّها درجة حرارة الغرفة).

خُلاصة دراسة الشروط التجريبية:

يُعرض الجدول رقم (5) الشروط الكروماتوغرافية الأمثل التي تُوصّل إليها لتُعطي فصلاً مثالياً لأصبغة السودان الأربعة من حيث التفريق الكبير للقمم وأزمنا الاحتفاظ المناسبة إضافة إلى أن القمم تملك مساحات جيدة قابلة للقياس بدقة عالية وتملك معامل تناظر عالياً.

الجدول (5): الشروط الكروماتوغرافية المثلى لفصل أصبغة السودان I, II, III, IV بتقانة HPLC.

EC C18(5µm, 150×4.6 mm)	العمود المستخدم
ACN: Water (95:5)	الطور المتحرك %
(20 - 30)	درجة حرارة العمود T, °C
1.5	معدل تدفق الطور المتحرك mL/min
230	طول موجة الكاشف nm
20 وهو حجم الخلية	حجم حقنة الكاشف µL

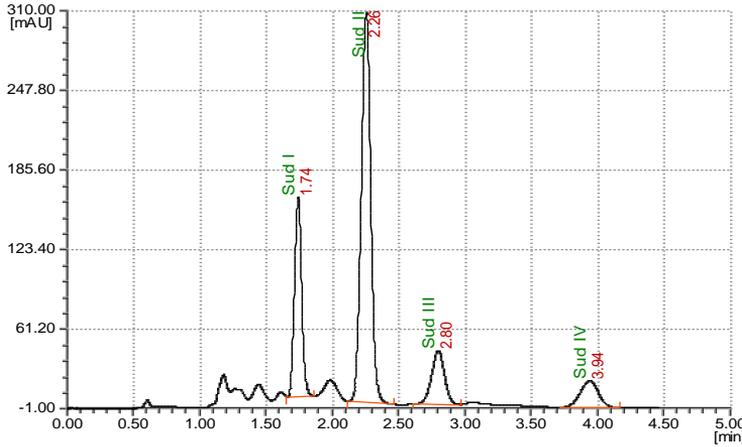
3.3. التحقق من مصداقية الطريقة: Validation of the Method

اختُبرت مصداقية الطريقة التحليلية المطوّرة بتحقيق متطلبات المؤتمر الدولي للمواءمة (ICH) منها (النوعية- الخطية - الدقة - الاسترجاعية).

1.3.3 النوعية:

Specificity/Selectivity

من أجل التأكد من انتقائية الطريقة التحليلية المطورة في تحديد أصبغة السودان الأربعة وفصل بعضها عن بعض، حُقن مزيج عياري مشترك لأصبغة السودان تركيز كل منها 0.01mg/mL، وذلك بتطبيق الشروط الكروماتوغرافية المثلى، ويوضح الشكل رقم (11) الكروماتوغرام الموافق للمزيج العياري المحقون، إذ نلاحظ أنه أعطى أربع قمم مفصول بعضها عن بعض تماماً، إضافة إلى أنها متناظرة وحادة كما أن أزمنة الاحتفاظ للأصبغة كانت صغيرة ومناسبة، وهذا يؤكد قدرة الطريقة المطورة على فصل الأصبغة الأربعة بعضها عن بعض بكفاءة عالية.



الشكل (11) كروماتوغرام مزيج عياري لأصبغة السودان بتطبيق الشروط الكروماتوغرافية المطورة.

2.3.3 الخطية:

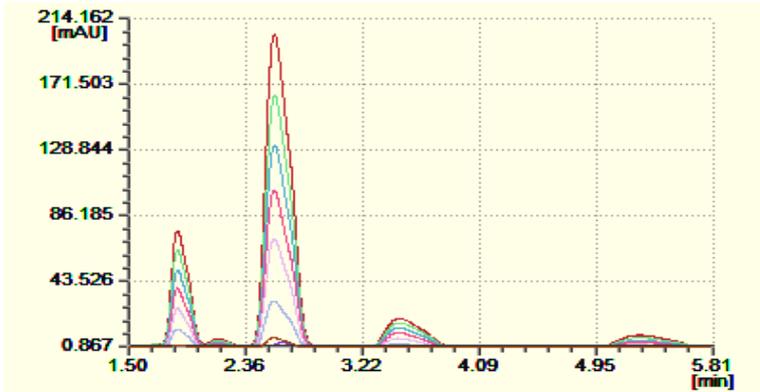
Linearity

لدراسة خطية الطريقة رُسم المجال الخطي لتغيرات إشارة الكاشف (مساحة القمة الكروماتوغرافية) بدلالة تركيز أصبغة السودان العيارية، وحُضرت أربع سلاسل من المحاليل العيارية لأصبغة السودان الأربعة بتركيزات متزايدة مقدرة بالـ $\mu\text{g/mL}$ لكل صباغ وذلك انطلاقاً من المحاليل العيارية الأم لكل صباغ. وحُضرت خمسة مكررات من كل تركيز، ثم حُقنت ضمن جهاز HPLC بتطبيق الشروط التجريبية المطورة، ومن ثم أخذ المتوسط الحسابي لمساحات القمم لكل منها، ويوضح الجدول رقم (6) التراكيز المأخوذة ومساحة القمم الموافقة لكل تركيز، ويعرض الشكل رقم (12) الكروماتوغرامات المترابطة الموافقة

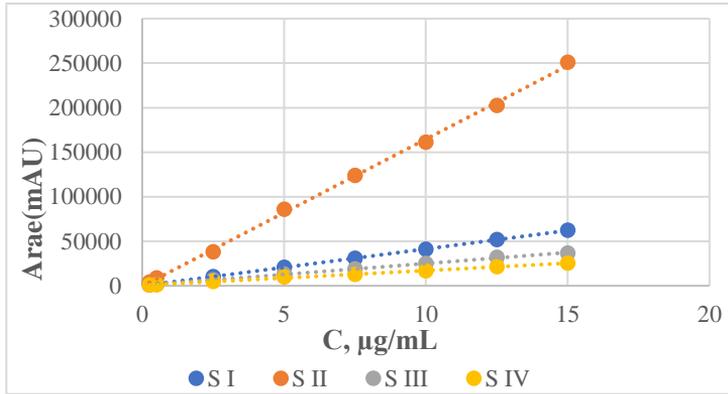
للسلاسل العيارية للتركيز المختلفة لأصبغة السودان العيارية، كما يعرض الشكل رقم (13) المنحني العياري الذي يُمثل العلاقة بين تغيرات مساحة القمم الكروماتوغرافية لكل صباغ من أصبغة السودان بدلالة تغيرات التركيز لكل منها.

الجدول (6): التركيز المأخوذة ومساحات القمم الموافقة لها.

Area (mAU)				التركيز ($\mu\text{g/mL}$)
S IV	S III	S II	S I	
660	809.6	3991.9	1124.5	0.25
1184.1	1440.3	8632.9	1984	0.5
4530	6366.4	38028	10302	2.5
9605.3	12868.4	85768.9	20736.2	5
12707.2	18951	123839.1	30690.3	7.5
16711.4	25112.4	161274.6	40882.1	10
21262.7	31764.2	202419.1	51792.6	12.5
25450.9	36702.5	251038.4	62341.2	15



الشكل (12): الكروماتوغرام المُعبر عن المجال الخطي لتركيز أصبغة السودان المدروسة بعد تطبيق الشروط الكروماتوغرافية المثلى.



الشكل (13) المنحنيات العيارية التي تمثل العلاقة بين تغير مساحة القمة الكروماتوغرافية لكل صباغ من أصبغة السودان الأربعة بدلالة تغير التركيز لكل منها.

ويُبين الجدول رقم (7) المعاملات التحليلية لتحديد أصبغة السودان الأربعة بالطريقة المطوّرة.

الجدول (7): المعاملات التحليلية لتحديد أصبغة السودان I,II,III,IV بالطريقة المطوّرة.

Sudan I	Sudan II	Sudan III	Sudan IV	المعامل (Parameter)
0.25-15	0.25-15	0.25-15	0.25-15	المجال الخطي (µg/mL)
$y = 4141.5x - 85.245$	$y = 16506x - 492.09$	$y = 2469.5x + 314.43$	$y = 1663.2x + 443.13$	معادلة الخط البياني العياري
0.9999	0.999	0.9993	0.9984	معامل الارتباط (R^2)
0.0011	0.0039	0.0116	0.0036	حد الكشف (LOD, µg/mL)
0.0033	0.0120	0.0351	0.0109	حد التحديد الكمي (LOQ, µg/mL)

Recovery

3.3.3 الاسترجاعية:

دُرست استرجاعية الطريقة التحليلية لتقييم الطريقة التحليلية المطورة بطريقة العيار الداخلي IS، حُصرت ثلاثة محاليل من كل من الكركم والكاربي بوزن 1gr منهما مادة جافة، ومن ثم أُضيفت المحاليل العيارية لأصبغة السودان بحجوم مختلفة، بحيث يكون تركيز أصبغة السودان العيارية في المحلول الأول 5µg/mL وفي المحلول الثاني 10µg/mL وفي

المحلول الثالث 15µg/mL لكل منهما، إذ تقع هذه التراكيز ضمن المجال الخطي، ومن ثم حُقنت هذه المحاليل ضمن جهاز HPLC بتطبيق الشروط الكروماتوغرافية المثلى، ورسم الكروماتوغرامات الموافقة، ومن ثم حُسبت مساحة القمة الموافقة لكل قمة من قمم أصبغة السودان الأربعة في المحاليل الثلاثة للعينتين، وذلك بتعويض قيم مساحات القمم في معادلة المستقيم الخطي لكل صباغ وحساب تركيزه. وكُررت التجربة ثلاث مرات (n=3) لكل تركيز من هذه التراكيز، وأخذ متوسط المساحات لكل محلول ولكل قمة من قمم أصبغة السودان الأربعة، ويُبين الجدول رقم (8) النتائج التحليلية التي توصل إليها، إذ كانت الاسترجاعية جيدة كما هي مبينة في الجدول (8)، وهذا يُعطي مؤشراً جيداً عن الطريقة الكروماتوغرافية المطوّرة، وصحة النتائج التحليلية لتحديد أصبغة السودان الأربعة في عينات التوابل المختلفة.

الجدول (8): نتائج الاسترجاعية لأصبغة السودان المُحددة بتطبيق الطريقة المطوّرة في عيني الكرم والكاري.

R%				RSD%				التركيز المحدد لأصبغة السودان ± SD n=3 (µg/mL)				التركيز المأخوذ من أصبغة السودان (µg/mL)	العينة
S IV	S III	S II	S I	S IV	S III	S II	S I	S IV	S III	S II	S I		
100.8	103.1	99.9	103.9	1.12	1.61	0.63	0.85	0.08±5.04	0.12±5.15	0.10±4.99	0.12±5.19	5	كرم
101.3	101.1	99.2	100.7	1.23	0.77	0.30	1.05	0.07±10.13	0.03±10.11	0.16±9.92	0.10±10.07	10	
100.9	100.4	100.5	100.5	0.90	0.69	0.94	0.68	0.13±15.13	0.13±15.05	0.13±15.07	0.24±15.07	15	
103.9	99.3	101.9	102.8	0.90	0.18	0.37	3.44	0.05±5.20	0.01±4.97	0.02±5.21	0.18±5.14	5	كاري
102.2	101.9	98.7	100.6	1.27	1.22	1.15	1.06	0.13±10.22	0.12±10.19	0.12±9.99	0.11±10.06	10	
101.3	101.6	100.5	100.3	0.33	0.88	0.13	0.52	0.05±15.19	0.13±15.24	0.02±15.20	0.08±15.04	15	

Precision

4.3.3 الدقة:

قُيِّمت دقة الطريقة التحليلية المطوّرة من خلال اختبار الدقة خلال اليوم (Intra- day)، والدقة لأيام عدّة (Inter-day)، فقيمت الدقة خلال اليوم من خلال تحديد ثلاثة مكررات لثلاثة تراكيز مختلفة لأصبغة السودان تقع ضمن المجال الخطي في اليوم نفسه. وقُيِّمت الدقة لأيام عدّة من خلال تحديد ثلاثة مكررات لثلاثة تراكيز مختلفة لأصبغة السودان تقع ضمن المجال الخطي وذلك لثلاثة أيام متتالية، ويُبين الجدول رقم (9) نتائج تحديد الدقة

خلال اليوم، ونتائج تحديد الدقة لأيام عدة. إذ لم تتجاوز قيم الانحراف المعياري النسبي المئوي %RSD لدى حساب الدقة خلال اليوم %3.26، وحساب الدقة لأيام عدة %2.80، وهذا يؤكد دقة الطريقة التحليلية المطورة.

الجدول (9): نتائج التكرارية لأصبغة السودان العيارية المدروسة المحددة بالطريقة المطورة.

Intra-day precision n=3								
RSD %				التركيز المحدد للأصبغة المدروسة µg/mL				التركيز المأخوذ µg/mL
S IV	S III	S II	S I	SD±Sud IV	SD±Sud III	SD±Sud II	SD±Sud I	
2.73	3.26	2.34	3.16	0.14±4.95	0.17±5.23	0.12±5.22	0.17±5.25	5
2.73	1.26	1.15	1.72	0.29±10.48	0.13±10.09	0.12±10.43	0.18±10.29	10
1.71	1.07	2.02	2.12	0.27±15.80	0.16±15.08	0.31±15.36	0.34±15.83	15
Inter-day precision n=3								
RSD %				التركيز المحدد للأصبغة المدروسة µg/mL				التركيز المأخوذ µg/mL
S IV	S III	S II	S I	SD±Sud IV	SD±Sud III	SD±Sud II	SD±Sud I	
1.26	1.25	0.81	1.80	0.064±5.10	0.065±5.23	0.043±5.29	0.095±5.26	5
0.46	0.86	2.80	2.58	0.05±10.0	0.09±10.7	0.29±10.2	0.26±10.2	10
2.20	1.24	2.05	1.28	0.33±14.95	0.19±51.21	0.32±15.52	0.2±15.66	15

Method Application

5.3.3 تطبيق الطريقة:

طبقت الطريقة المطورة لتحديد أصبغة السودان الأربعة في التوابل التي جمعت من السوق المحلية وهي ((الكركم-البابريكا-الكتشب))، وقد قيست ثلاثة مكررات لكل عينة ومن ثم حُسب متوسط التركيز الموجود في كل عينة. وتُبين النتائج الموضحة في الجدول رقم (10) أن (الكركم والبابريكا) تحوي بعض أنواع أصبغة السودان المدروسة، أما عينة (الكتشب) فلا يُوجد فيها أي من هذه الأصبغة.

الجدول (10): نتائج التحديد الكمي لأصبغة السودان الأربعة في عينات التوابل باستخدام الطريقة المطورة

RSD%				التركيز±SD				العينة
S IV	S III	S II	S I	S IV	S III	S II	S I	
3.26	-	3.75	-	1.19±36.42	-	0.07±1.77	-	Paprika ₁
1.26	-	-	1.21	0.29±23	-	-	0.1±8.34	Paprika ₂
-	-	-	-	-	-	-	-	Paprika ₃
12.89	-	0.54	-	1.18±9.12	-	0.01±2.6	-	Turmeric ₁
-	-	0.46	-	-	-	0.09±19.42	-	Turmeric ₂
-	-	-	-	-	-	-	-	Ketchup

4.3 تقييم الخضرة للطريقة المطوّرة: Green Chemistry

زاد الاهتمام في السنوات الأخيرة بتطوير طرائق تحليلية تكون صديقة للبيئة وتُستعمل لهذا الغرض أساليب تحليلية عدّة، منها المقياس البيئي التحليلي (PPS)، الذي يعتمد على تعيين نقاط جزائية لكل معلمة تحليلية مثل نوع الكاشف، وكميته، الأدوات والأجهزة [21]. وطُبّق هذا المقياس لتحديد اضرار الطريقة الطيفية المطوّرة من خلال تحديد مجموع النقاط الجزائية لجميع المَعلمات المُستخدمة في هذا البحث كما هو مُوضّح في الجدول (11)، إذ أثبتت الدرجة التحليلية للمقياس البيئي البالغة (87%) درجة الخضرة الممتازة للطريقة المطوّرة.

الجدول (11): تقييم تحليلي للمقياس البيئي (PPS) لخضرة الطريقة المطوّرة.

PPS			
1	<10g	أصبغة السودان	الكواشف
4	<10ml	الأسيتونتريل	
1	<10g	الكلوروفورم	
6			مجموع النقاط
1	1	HPLC	الجهاز المستعمل
5	≥10ml		النفايات
1	<1.5KWh	HPLC	الطاقة الكهربائية
0			المخاطر المهنية
13			المجموع النهائي

4. الخلاصة:**Conclusion**

طُوِّرت طريقة تحليلية بتقانة HPLC لتحديد أصبغة السودان I, II, III, IV في التوابل الغذائية، تتمتع بصحة ودقة كافية، إذ اعتمدت الطريقة على فصل أربع مواد معاً وتحديدها، بعد اختيار الشروط الكروماتوغرافية الأمثل لذلك، وحُصل على زمن تحليل كلي قصير بكفاءة عالية. إن ما يُميز هذه الطريقة الدقة العالية والقدرة على كشف تراكيز منخفضة جداً من أصبغة السودان، كما تتميز باتساع المجال الخطي لها، كما أنها تصلح للتحديد النوعي والكمي للأصبغة السودانية الأربعة معاً في التوابل الغذائية بالطريقة نفسها دون الحاجة إلى تطبيق أكثر من طريقة. وكذلك تتميز بالسهولة إذ لا حاجة لشروط معقدة (استعمال مواد أو كواشف مُكلفة أو غير متوفرة، نظام تدفق متدرج....)، وهذه الطريقة مناسبة للتطبيق المباشر في مخابر الرقابة الغذائية من أجل كشف غش التوابل المستوردة، وإن هذا البحث هو الأول من نوعه في سوريا عموماً وفي مناطق شمال غرب سوريا خاصةً. وبما أنه كُشف عن الغش بهذه الأصبغة السامة والمسرطنة في أنواع عدة من التوابل المستوردة فهنا تكمن أهمية هذا البحث وضرورة تطبيقه على جميع التوابل التي تدخل إلى مناطق شمال غرب سوريا. ومن المتوقع أن تزداد حساسية الطريقة بإجراء مُعالجات إضافية للعينات باستعمال تقنيات التحضير الحديثة.

5. المراجع:**References**

- [1] Di Anibal C, Rodriguez MS, Albertengo L. UV-Visible Spectroscopy and Multivariate Classification as a Screening Tool to Identify Adulteration of Culinary Spices with Sudan I and Blends of Sudan I + IV Dyes. *Food Analytical Methods*. 2014;7(5):1090–1096. doi:10.1007/s12161-013-9717-2
- [2] Sciuto S, Esposito G, Dell'Atti L, Guglielmetti C, Acutis PL, Martucci F. Rapid screening technique to identify Sudan dyes (I to IV) in adulterated tomato sauce, chilli powder, and palm oil by innovative high-resolution mass spectrometry. *Journal of Food Protection*. 2017;80(4):640–644. doi:10.4315/0362-028X.JFP-16-313
- [3] Khalikova MA, Šatinský D, Solich P, Nováková L. Development and validation of ultra-high performance supercritical fluid chromatography method for determination of illegal dyes and comparison to ultra-high performance liquid chromatography method. *Analytica Chimica Acta*. 2015;874(May):84–96.

doi:10.1016/j.aca.2015.03.003

- [4] Li Y, Yang Y, Yin S, Zhou C, Ren D, Sun C. Inedible azo dyes and their analytical methods in foodstuffs and beverages. *Journal of AOAC International*. 2018;101(5):1314–1327. doi:10.5740/jaoacint.18-0048
- [5] Chca OF, Risk C. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to man. Vol 8: Some aromatic a20 compounds. *Who, Geneva*. 1975;(357p.) Sw. doi:10.1136/jcp.29.4.367-c
- [6] Identification C. Section 1 - CHEMICAL PRODUCT AND COMPANY IDENTIFICATION. *SubStance*. Published online 1910:1–8.
- [7] Confidence N, Fortune A. TOXICOLOGICAL EFFECT OF SUDAN III AZO DYE IN PALM OIL ON KIDNEY PARAMETERS OF ALBINO RATS. Published online 4 Mars , 2019.
- [8] Horn B, Esslinger S, Pfister M, Fahl-Hassek C, Riedl J. Non-targeted detection of paprika adulteration using mid-infrared spectroscopy and one-class classification – Is it data preprocessing that makes the performance? *Food Chemistry*. 2018;257(November 2017):112–119. doi:10.1016/j.foodchem.2018.03.007
- [9] Insitute F, Assessment R, Recently B, Manual IL, Committee C, Tea-tree R. Federal Institute for Risk Assessment (BfR). 2003;(September):1–5.
- [10] Lohumi S, Joshi R, Kandpal LM, et al. Food Additives & Contaminants: Part A Quantitative analysis of Sudan dye adulteration in paprika powder using FTIR spectroscopy. 2017;0049(February). doi:10.1080/19440049.2017.1290828
- [11] Di Anibal C V., Odena M, Ruisánchez I, Callao MP. Determining the adulteration of spices with Sudan I-II-II-IV dyes by UV-visible spectroscopy and multivariate classification techniques. *Talanta*. 2009;79(3):887–892. doi:10.1016/j.talanta.2009.05.023
- [12] Anibal CV Di, Rodríguez S, Albertengo L, Rodríguez MS. UV-Visible Spectroscopy and Multivariate Classification as a Screening Tool for Determining the Adulteration of Sauces. 2016;1253. doi:10.1007/s12161-016-0485-7
- [13] Shah R. Identification and Estimation of Non-Permitted Food Colours (Metanil Yellow and Aniline Dyes) in Turmeric Powder By Rapid Color Test and Thin Layer Chromatography. *World Journal*

- of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2017;6(7):2034–2045. doi:10.20959/wjpps20178-9867
- [14] Fukuji TS, Castro-Puyana M, Tavares MFM, Cifuentes A. Fast determination of Sudan dyes in chilli tomato sauces using partial filling micellar electrokinetic chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2011;59(22):11903–11909. doi:10.1021/jf203201b
- [15] Sebaei AS, Youssif MI, Abdel-Maksoud Ghazia A. Determination of seven illegal dyes in Egyptian spices by HPLC with gel permeation chromatography clean up. *Journal of Food Composition and Analysis*. 2019;84(March):103304. doi:10.1016/j.jfca.2019.103304
- [16] Mohamed SH, Salim AI, Issa YM, Atwa MA, Nassar RH. Evaluation of Different Sudan Dyes in Egyptian Food Samples Utilizing Liquid Chromatography/Tandem Mass Spectrometry. *Food Analytical Methods*. 2021;14(10):2038–2050. doi:10.1007/s12161-021-02036-x
- [17] Nie X, Xie Y, Wang Q, وآخ. Rapid Determination of Sudan Dyes in chilli products using ultra high performance supercritical fluid chromatography-photodiode array detection. *CYTA - Journal of Food*. 2021;19(1):560–570. doi:10.1080/19476337.2021.1925746
- [18] Žuvela P, Skoczylas M, Jay Liu J, et al. Column Characterization and Selection Systems in Reversed-Phase High-Performance Liquid Chromatography. *Chemical Reviews*. 2019;119(6):3674–3729. doi:10.1021/acs.chemrev.8b00246
- [19] Jahani PM, Ahmadi SA. MnO₂ nanorods modified screen-printed electrode for the electrochemical determination of Sudan dye in food sample. *Journal of Electrochemical Science and Engineering*. 2022;12(6):1121–1131. doi:10.5599/jese.1415
- [20] Mahmoudi Alami F, Zavvar Mousavi H, Khaligh A. Filter-Based Low-Toxic Emulsification Microextraction Followed by High-Performance Liquid Chromatography for Determination of Sudan Dyes in Foodstuff Samples. *Food Analytical Methods*. 2018;11(8):2287–2295. doi:10.1007/s12161-018-1196-z
- [21] Gałuszka A, Migaszewski ZM, Konieczka P, Namieśnik J. Analytical Eco-Scale for assessing the greenness of analytical procedures. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*. 2012;37:61–72. doi:10.1016/j.trac.2012.03.013