

Trabajo completo

Cuantificación simultánea de colorantes en bebidas deportivas utilizando espectroscopia visible y PLS-1

RECIBIDO: 25/06/2013

ACEPTADO: 08/10/2013

Rodríguez, M.C.¹ • Schenone, A.V.² • Sobrero, M.S.³ • Marsili, N.R.

¹ Cátedra de Química Analítica II

² Cátedra de Química Analítica I

³ Cátedra de Química General, Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas, Universidad Nacional del Litoral. Ciudad Universitaria, Paraje El Pozo S/N, 3000, Santa Fe, Argentina.

E-mail: nmarsili@fcb.unl.edu.ar

RESUMEN: En este trabajo se propone un nuevo procedimiento para la cuantificación de cuatro colorantes artificiales: rojo allura, azul brillante, tartrazina y amarillo ocaso, presentes en bebidas hidratantes de la marca Gatorade y Powerade. Se aplicó espectroscopía visible y calibración multivariada. Los datos fueron tratados con el programa Matlab y la rutina MVC1 aplicando el método PLS-1. Los resultados de las predicciones aplicando este nuevo método, se compararon estadísticamente con los obtenidos aplicando el método de referencia (cromatografía líquida), en todos los casos los resultados fueron comparables. La desventaja es que el amarillo ocaso no pudo ser cuantificado por este método, aunque su presencia no interfiere con la determinación de los otros tres colorantes. Puede concluirse que este método es fácilmente aplicable para el control de calidad de colorantes

en bebidas comerciales en laboratorios de baja complejidad, sin necesidad de recurrir a técnicas separativas y reactivos contaminantes.

PALABRAS CLAVE: Colorantes alimentarios, Bebidas deportivas, Espectroscopía visible y PLS-1.

SUMMARY: *Simultaneous quantification of dyes in sport drinks using visible spectroscopy and the PLS method*

In this paper we propose a new quantification method of four artificial dyes: allura red, brilliant blue, tartrazine, sunset yellow, present in two sports drinks brands, Gatorade and Powerade. Visible spectroscopy and multivariate calibration were applied. The data were processed with the Matlab program and routine MVC1 applying the PLS-1 method. The results of applying this new prediction method

were statistically compared with those obtained using the reference method (liquid chromatography). In all cases the results were comparable. The disadvantage is that sunset yellow could not be quantified by this method, although its presence does not interfere with the determination of the other three dyes. It can be concluded

that this method is readily applicable to the quality control of commercial drinks dyes in laboratories with low complexity, without requiring separation techniques and contaminant reagents.

KEYWORDS: Food coloring, Sports drinks, Visible spectroscopy and PLS-1.

Introducción

El color es una de las primeras impresiones que se tienen de un alimento, este tiende a modificar subjetivamente otras sensaciones como el sabor y el olor, y puede llegar a definir el éxito o fracaso de un producto en el mercado. Los colorantes conforman el grupo de aditivos alimentarios que se encarga de proporcionar el color deseado y esperado de cada alimento. De acuerdo con su origen se pueden clasificar como colorantes sintéticos y naturales. Existe la creencia de que los colorantes naturales son inofensivos, sin embargo, el agregado de todos ellos está regulado según normas nacionales e internacionales y tienen un valor de concentración máximo aceptado, por lo que es necesario controlar que tipo de colorantes fueron adicionados a los productos comerciales y en qué cantidad.

Cuando son agregados en concentraciones mayores a las aceptadas pueden presentar riesgos para la salud humana (1,2). Durante las tres últimas décadas, varios estudios han demostrado que concentraciones moderadas de colorantes sintéticos en los alimentos pueden provocar hiperactividad y otros desordenes en el compor-

tamiento de los niños (3,4). También en personas con características orgánicas especiales puede presentarse intolerancia, intensificación de los síntomas de asma y alergias, etc. (5). Los códigos con los que se identifica a cada colorante deben figurar en la etiqueta de los productos comerciales que lo contienen. Estos son asignados por las organizaciones internacionales, para los colorantes estudiados, estos códigos son los siguientes: E110 para el amarillo ocaso, E133 para el azul brillante, E129 para el rojo Allura y E102 para la tartrazina (6).

Según el Código Alimentario Argentino, los colorantes en bebidas no deben exceder las siguientes concentraciones: tartrazina: 0,010 g/100g, amarillo ocaso: 0,010 g/100g, rojo allura: 0,010 g/100g y azul brillante: 0,010 g/100 g. La ingesta diaria máxima recomendada es de 2,5 mg / kg, 7,5 mg / kg, 7 mg / kg y 12,5 mg / kg de peso corporal para el amarillo ocaso, tartrazina, rojo allura y brillante azul, respectivamente (7,8).

Se encuentran publicados numerosos trabajos sobre técnicas analíticas aplicadas a la determinación de colorantes alimentarios, en ellos se describen técnicas como polarografía de pulso diferencial

(9,10), espectrofotometría (11,12), voltametría (13), electroforesis capilar (14,15), cromatografía de capa fina (16), y cromatografía líquida (HPLC) con detector UV-VIS (17-20) y espectroscopía UV-VIS-DAD (21). La técnica HPLC se utiliza en la mayoría de los trabajos publicados como un método de referencia, se caracteriza por su poder de resolución en el análisis de mezclas complejas, pero entre las desventajas deben considerarse el alto costo del equipo, el tiempo de análisis, y el uso de solventes contaminantes.

Todo lo expuesto anteriormente indica la importancia que tiene la cuantificación de colorantes en alimentos por parte de la industria y de los organismos oficiales, con el fin de proteger la salud de los consumidores.

El presente trabajo surge de la necesidad de contar con un método que permita cuantificar los cuatro colorantes (amarillo ocaso, azul brillante, rojo allura y tartrazina) simultáneamente, sin necesidad de utilizar previamente complejas técnicas separativas o equipamiento sofisticado, es decir una metodología adaptable a laboratorios con mediana infraestructura. Se propone la utilización de espectroscopia visible para la obtención de los espectros de absorción de las muestras y el uso de programas estadísticos para el procesamiento y análisis de los resultados.

Materiales y Métodos

• Materiales

- Espectrofotómetro UV-Vis Perkin Elmer Lambda 20 (Waltham, Massachusetts, EE UU), con cubetas de vidrio de 1,00 cm camino óptico.

- Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC) Agilent 1100 Series con detector de UV-DAD (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania).

- Filtros de jeringa de poro 0,45 μm tamaño HPLC (Centro de Química).

Reactivos y soluciones

Metanol, grado HPLC y ácido acético marca Merck; Acetato de amonio y acetato de sodio marca Mallinckrodt; tartrazina, azul brillante, rojo allura y amarillo ocaso marca Sigma Aldrich.

La solución reguladora de acetato de sodio (pH:5) se preparó mezclando: 643 mL de solución de acetato de sodio 0.1 M preparada a partir de droga sólida, con 357 mL de solución de ácido acético 0.1 M preparada a partir de ácido acético concentrado (18 M).

Las soluciones estándar de tartrazina, azul brillante, rojo allura y amarillo ocaso de 2000 mg L^{-1} se prepararon disolviendo cantidades apropiadas de cada compuesto en agua Milli-Q.

Las muestras comerciales seleccionadas fueron siete bebidas hidratantes de las marcas Gatorade® (Quaker Oats Company, EE UU) y Powerade® (Coca-Cola Company, EEUU), de diferentes sabores: cool blue, green mango, frutas tropicales, naranja, berry y lima-limón. A cada bebida se le asignó un rótulo (ver Tabla 1).

Tabla 1. Bebidas comerciales estudiadas

Bebidas comerciales	Colorantes declarados
1. Gatorade® Cool Blue	Azul brillante
2. Gatorade® Green Mango	Azul brillante – Tartrazina
3. Gatorade® Frutas tropicales	Rojo allura
4. Gatorade® Naranja	Amarillo ocaso
5. Powerade® Naranja	Amarillo ocaso – Tartrazina
6. Gatorade® Berry	Azul brillante – Rojo allura
7. Powerade® Lima–Limón	Tartrazina

Métodos

Método de HPLC: se aplicó el método desarrollado por Alves, Pereira. *et al.* (2008) (20). La fase móvil utilizada fue una mezcla de acetato de amonio (0,08 mol L⁻¹) – metanol puro (45:55). La columna seleccionada fue 18–C ODS Zorbax (4,6 x 250 mm), con 5 micras de tamaño de partícula. La velocidad de flujo se ajustó a 1 ml min⁻¹ a 20 °C.

Método espectrofotométrico: para la calibración se preparó un juego de diecinueve mezclas siguiendo un diseño central compuesto, para cuatro componentes en cinco niveles de concentración (entre 0,00 y 10,00 mg L⁻¹), con tres puntos centrales.

Para la validación del método se prepararon nueve mezclas de los cuatro colorantes en tres niveles de concentración (3,20; 6,40 y 9,60 mg L⁻¹).

En todos los casos, las soluciones se prepararon por triplicado, se utilizaron matraces aforados de 25 ml, agregando un volumen apropiado de solución estándar de cada colorante, 5 ml de solución reguladora de acetato (pH: 5), llevando a volumen final con agua Milli–Q. El registro de los espectros de absorción de todas las muestras, se realizaron en el

rango de longitudes de onda de 350 a 750 nm cada 2 nm. La velocidad de barrido, en todos los casos, fue 1920 nm.min⁻¹. *Tratamiento estadístico de los datos:* después de registrar los espectros de absorción, los datos se convirtieron a formato TXT utilizando el programa OriginPro 7.5. Para la calibración y las predicciones se utilizó el programa MATLAB, con la interfaz MVC–1 desarrollada por Olivieri (22), aplicando el método PLS–1.

• Validación

Para validar la exactitud del método desarrollado, se compararon los resultados de las predicciones obtenidas aplicando este nuevo método y el método de referencia (HPLC), aplicando el test estadístico de comparación de medias. Para poder aplicar este test, es necesario primeramente aplicar la prueba F, a fin de comparar las varianzas.

Se calcularon, los valores de **t** y **p**. Se consideró que si $p > 0,05$, se aceptaba la hipótesis nula: media 1 = media 2 y si $p < 0,05$, se rechaza la hipótesis nula y se aceptaba la hipótesis alternativa: media 1 ≠ media 2.

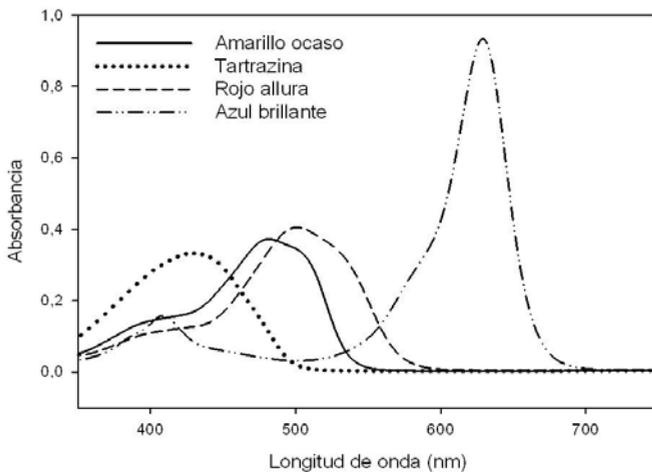
Resultados y discusión

• Estudio de la linealidad

Se estudio individualmente la linealidad de cada colorante mediante la realización de curvas de calibrado (absorbancia vs concentración), en un rango de concentraciones

de 0,00 a 20,00 mg L⁻¹; los valores de absorbancia se tomaron en los picos de absorción (482 nm para amarillo ocaso, 630 nm para azul brillante, 502 nm para rojo allura y 426 nm para tartrazina) (ver Figura 1).

Figura 1. Espectros de absorción de cada uno de los cuatro colorantes puros, adquiridos entre 350 y 750 nm; en concentración igual a 10 mgL⁻¹. Pueden observarse los picos de absorción para cada colorante (482 nm para amarillo ocaso, 630 nm para azul brillante, 502 nm para rojo allura y 426 nm para tartrazina).



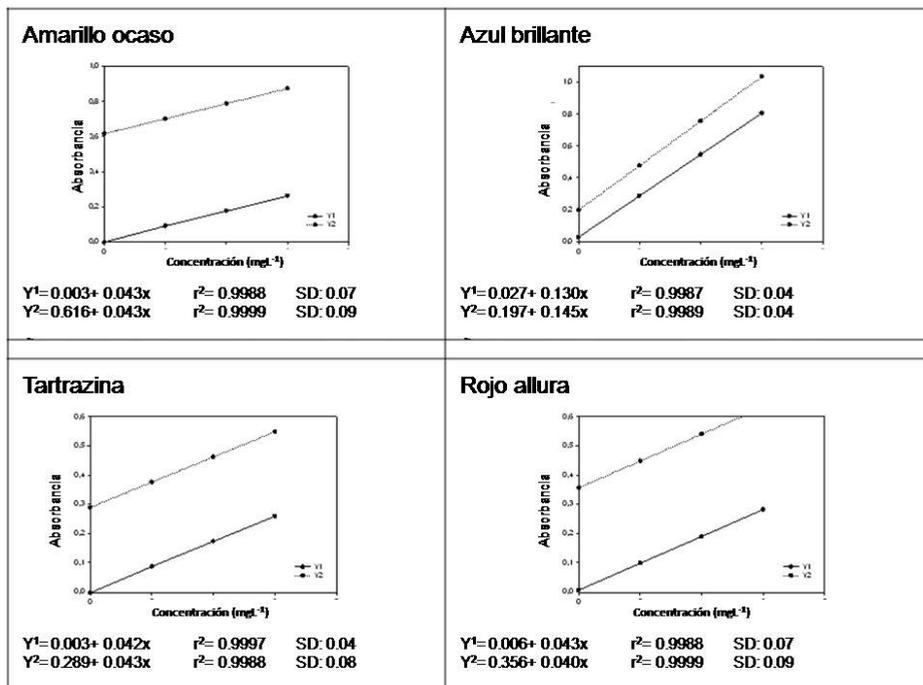
Se estudiaron los parámetros estadísticos obtenidos aplicando regresión lineal simple; los cuatro analitos mostraron respuesta lineal en el rango estudiado, ver Figura 2 (Y¹). Debido a que las absorbancias de las soluciones de concentraciones mayores a 10,00 mg L⁻¹ superaban el valor de 1, se decidió trabajar en un rango de 0,00 a 10,00 mg L⁻¹.

• Estudio efecto Matriz

Con el fin de estudiar la presencia, en la matriz de la muestra, de sustancias que podrían afectar la respuesta instrumental

de los colorantes estudiados, se utilizó el método de adición estándar. Se prepararon curvas de calibrado para cada uno de los cuatro colorantes puros, en concentraciones entre 0,00 y 8,00 mg L⁻¹ y se compararon con curvas similares a las que, además de la solución estándar, se añadió una cantidad constante de muestra. En la Figura 2 se muestran las ecuaciones y los parámetros de la regresión obtenidos para las curvas de calibración de cada uno de los cuatro colorantes puros (Y¹); además en la figura aparecen graficadas las curvas de adición estándar (Y²).

Figura 2. Curvas de calibrado (Y^1) y curvas de adición estándar (Y^2) para cada uno de los cuatro colorantes. Al pie de cada gráfico figuran la ecuación de la recta de regresión, el coeficiente r^2 y su correspondiente desviación estándar.



Mediante la comparación de las pendientes de las rectas estimadas, para cada colorante, pudimos demostrar que no existe efecto de la matriz, ya que en todos los casos las rectas tienen pendientes aproximadamente iguales.

• Calibración

Con los espectros de absorción correspondientes a cada una de las diecinueve mezclas de calibración, se construyó una matriz de datos 19 x 201. La información se procesó con el programa Matlab y la rutina MVC1 aplicando del método de calibración multivariado PLS-1. En la Tabla 2 se muestran los parámetros de calibración para

cada uno de los colorantes, donde figuran: número óptimo de factores (A), calculada por el método de validación cruzada de Haaland, Thomas (23), rango de longitudes de onda de trabajo (Δ (nm)), error relativo de la predicción (REP), suma de cuadrados de error de predicción (PRESS) y el coeficiente de correlación al cuadrado (r^2). Además, se calcularon las siguientes cifras de mérito: selectividad (SEL), sensibilidad (SEN), sensibilidad analítica (γ^{-1}), límite de detección (LOD) y límite de cuantificación (LOQ), los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 3. Como se puede observar en las Tablas 2 y 3, los parámetros de calibración y cifras de

mérito fueron aceptables para el azul brillante, la tartrazina y el rojo allura. Pero para el amarillo ocaso, el número de factores ($A = 5$) excede el número de componentes de las mezclas de calibración y presenta la

selectividad más baja ($SEL = 0,11$), lo que indica que el método no es capaz de predecir satisfactoriamente la concentración de este colorante.

Tabla 2. Parámetros de la calibración, obtenidos al aplicar PLS-1.

Colorante	A	Rango optimo (nm)	REP (%)	PRESS	r ²
Amarillo ocaso	5	430 – 550	0,7	0,0202	0,9998
Azul brillante	1	680 – 700	2,4	0,2227	0,9977
Rojo allura	4	460 – 588	2,1	0,1930	0,9978
Tartrazina	4	350 – 510	1,2	0,0538	0,9994

A: número optimo de factores; REP: error relativo de la predicción (Relative error of prediction); PRESS: suma de cuadrados de los errores de predicción (Sum of squares of prediction error); r²: coeficiente de correlación.

Tabla 3. Cifras de merito para cada uno de los cuatro colorantes.

	SEL	SEN (L mg ⁻¹)	γ^{-1} (mg L ⁻¹)	LOD (mg L ⁻¹)	LOQ (mg L ⁻¹)
Amarillo ocaso	0,11	0,026	0,009	0,10	0,35
Azul brillante	1,00	0,500	0,003	0,19	0,58
Rojo allura	0,39	0,098	0,005	0,29	0,90
Tartrazina	0,28	0,074	0,008	0,18	0,54

SEL: selectividad; SEN: sensibilidad; γ^{-1} : sensibilidad analítica; LOD: límite de detección; LOQ: límite de cuantificación.

• Validación

Se predijeron las concentraciones de los cuatro colorantes en las muestras de validación utilizando PLS-1, se calcularon los porcentajes de recuperación entre las concentraciones nomina-

les y las predichas, estos valores estuvieron comprendidos entre 97 y 101 % (ver Tabla 4); estos resultados son muy satisfactorios.

Tabla 4. Concentraciones nominales y predichas (mg L⁻¹) y su correspondiente porcentaje de recuperación para los cuatro colorantes en las muestras de validación.

Amarillo ocaso			Tartrazina		
Nominal	Predicha*	% Rec.	Nominal	Predicha*	% Rec.
3,2	3,12	97,6 ± 2,5	3,20	3,21	100,4 ± 0,7
6,4	6,26	97,8 ± 4,1	6,40	6,39	99,9 ± 0,2
9,6	9,56	99,6 ± 0,8	9,60	9,67	100,3 ± 0,9
Azul brillante			Rojo allura		
3,20	3,20	100,2 ± 1,2	3,20	3,16	98,7 ± 3,2
6,40	6,29	98,3 ± 7,5	6,40	6,42	100,4 ± 1,9
9,60	9,74	101,5 ± 0,5	9,60	9,55	99,5 ± 1,1

* promedio de tres muestras.

Rec: porcentaje de recuperación.

• Muestras comerciales

Las muestras reales mostraron turbidez debido a las sustancias presentes en su formulación. Esta turbidez generaba un efecto indeseable tanto para la espectroscopía visible, como para el método de referencia (18), por lo que las muestras se filtraron previamente dos veces con filtro de jeringa de HPLC. Después de este procedimiento, fue eliminada la interferencia, siendo la absorbancia de las soluciones debida exclusivamente a la presencia de los colorantes estudiados.

Se predijeron las concentraciones de los cuatro analitos aplicando el método propuesto y el método de referencia. Se compararon los resultados mediante el test estadístico de comparación de medias. En todos los casos, no se encontraron diferencias significativas entre las medias, con un nivel de confianza del 95 %.

Los resultados de las predicciones y los valores de probabilidad se muestran en la Tabla 5, así como los errores relativos de la

concentración y los errores porcentuales. Para el azul brillante, la tartrazina y el rojo allura los resultados de las predicciones realizadas con ambos métodos son estadísticamente comparables porque en estos casos $p > 0,05$ y el error relativo porcentual estuvo comprendido entre 1 y 5 %.

Pero, los resultados obtenidos para el amarillo ocaso aplicando el método propuesto difieren significativamente de los valores obtenidos por HPLC, con valores para el error relativo porcentual entre 17,5 y 48,4 %. Se aplicaron otros métodos de calibración multivariada de primer orden como PCR, HLA-GO y HLA-XS para predecir amarillo ocaso, pero ninguno fue capaz de mejorar las predicciones obtenidas por PLS-1. Se llegó a la conclusión de que para este tipo de muestras, el amarillo ocaso no puede ser cuantificado por este método. Aunque, su presencia no interfiere con la cuantificación de los otros tres colorantes.

Tabla 5. Concentraciones predichas mediante el método HPLC y PLS¹

Muestra	Colorante declarado	HPLC ^a	PLS-1 ^a	p ^b	E (%)
1	Azul brillante	2,46 ± 0,05	2,51 ± 0,21	0,687508	2,0
2	Azul brillante Tartrazina	1,81 ± 0,05	1,87 ± 0,03	0,113457	3,3
		4,98 ± 0,23	4,73 ± 0,05	0,132286	5,0
3	Rojo allura	7,48 ± 0,20	7,41 ± 0,20	0,697803	0,9
4	Amarillo ocaso	11,85 ± ,15	17,58 ± 0,28	0,000006	48,4
		8,73 ± 0,07	10,26 ± 0,11	0,001518	17,5
5	Amarillo ocaso Tartrazina	1,88 ± 0,03	1,84 ± 0,04	0,899647	2,1
		ND	ND		
6	Azul brillante	17,82 ± 0,11	18,11 ± 0,10	0,131918	1,6
7	Tartrazina	3,44 ± 0,24	3,40 ± 0,26	0,853964	1,1

^a media de tres valores con su correspondiente intervalo de confianza (mg L⁻¹). ND: no detectable.

^bp: probabilidad.

E (%): error porcentual

Conclusiones

Los límites de detección obtenidos mediante este nuevo método resultaron: 0,19 mg L⁻¹ para azul brillante, 0,29 mg L⁻¹ para rojo allura y 0,18 mg L⁻¹ para tartrazina, esto lo hace muy útil, ya que estos valores se encuentran por debajo de los niveles tolerados por los organismos oficiales.

A pesar de que el amarillo ocaso en las bebidas estudiadas (Gatorade y Powerade) no pudo cuantificarse por este método, los resultados obtenidos para rojo allura, azul brillante y tartrazina resultaron comparables estadísticamente a los obtenidos aplicando el método de referencia.

El método desarrollado es sencillo, solo requiere del agregado de solución reguladora de acetato de sodio y equipamiento de mediana complejidad, por lo que se presenta como una alternativa fácil de aplicar en laboratorios de control de calidad de empresas o entes oficiales.

Agradecimientos

El presente trabajo pudo llevarse a cabo gracias al apoyo financiero de la Universidad Nacional del Litoral (Proyecto CAI+D n° 12-61).

Referencias bibliográficas

1. Cubero, N.; Monferrer, A.; Villalta, J., 2002. Aditivos alimentarios. Madrid. España. 1: 24-44.
2. Madrid, A.; Cenzano, I.; Vicente, J.M., 1994. Nuevo manual de industrias alimentarias: Los aditivos en la preparación y conservación de los alimentos. AMV ediciones, Mundi-Prensa, Madrid.
3. Bateman, B.; Warner, J.; Hutchinson, E.; Dean, T.; Rowlandson, P.; Gant, C.; Grund, J.; Fitzgerald, C.; Stevenson, J., 2004. "The effects of a double blind, placebo controlled artificial food colourings and benzoate preservative challenge on hyperactivity in a general population sample of preschool children". US National Library of Medicine Natio-

- nal Institutes of Health (EE UU). Arch. Dis. Child.; **89**, 6: 506–1
4. McCann, D.; Barrett, A.; Cooper, A.; Crumpler, D.; Dalen, L.; Grimshaw, K.; Kitchin, E.; Lok, K.; Porteous, L.; Prince, E.; Sonuga-Barke, E.; Warner, J.O.; Stevenson, J., 2007. "Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomised, double-blinded, placebocontrolled trial". US National Library of Medicine National Institutes of Health. The Lancet **370**, 9598: 1560–1567.
5. Consejo Europeo de Información sobre la Alimentación, "Los aditivos alimentarios". Disponible en: <http://www.eufic.org/article/es/page/RARCHIVE/expid/review-aditivos-alimentarios/>
6. Institute for agriculture and trade policy, 2009. "Food and health program". Smart guide to food dyes. Published February, Copyright Institute for Agriculture and Trade Policy
7. Código Alimentario Argentino, 1995. Capítulo I. Artículo 6. "Disposiciones generales". RES. GMC n° 031/92 y RES. GMC n° 018/93. Incorporadas por Resolución MSyAS n° 003 del 11/01/95.
8. Multon, J.L., 1999. Aditivos auxiliares de fabricación en las industrias agroalimentarias. Acribia editorial. **1**: 102-373.
9. Becerro Domínguez, F.; González Diego, F.; Hernández Mendez, J., 1990. "Determination of sunset yellow and tartrazine by differential pulse polarography". Talanta, **37**, 6: 665–658.
10. Chanlon, S.; Joly-Pottuz, L.; Chatelut, M.; Vitori, O.; Cretier, J.L., 2005. "Determination of Carmoisine, Allura red and Ponceau 4R in sweets and soft drinks by Differential Pulse Polarography". Journal of Food Composition and Analysis, **18**, 6: 503–515.
11. Nevado JB, Flores JR, Llerena M, Fariñas NR, Fresen J. (1999). Rapid spectrophotometric method to resolve ternary mixtures of Tartrazine, Quinoline Yellow and Patent Blue V in commercial products. Journal of Analytical Chemistry, **365**, 4: 383–388.
12. Vidotti, E.C.; Cancino, J.C.; Oliveira, C.C.; Rollenberg, M., 2005. "Simultaneous determination of food dyes by first derivative spectrophotometry with sorption onto polyurethane foam". Analytical Sciences, **21**, 2: 149–153.
13. Nevado, J.J.B.; Flores, J.R.; Llerena, M., 1997. "Square wave adsorptive voltammetric determination of sunset yellow". Talanta, **44**, 3: 467–474.
14. Suzuki, S.; Shirao, M.; Aizawa, M.; Nakazawa, H.; Sasa, K.; Sasagawa, H., 1994. "Determination of synthetic food dyes by capillary electrophoresis". Journal of Chromatography A, **680**, 2: 541–547.
15. Dossi, N.; Toniolo, R.; Pizzariello, A.; Susmel, S.; Perennes, F.; Bontempelli, G., 2007. "A capillary electrophoresis microsystem for the rapid inchannel amperometric detection of synthetic dyes in food". Journal of Electroanalytical Chemistry, **601**, 1–2: 1–7.
16. Soponar, F.; Catalin Mot, A.; Sârbu, C., 2008. "Quantitative determination of some food dyes using digital processing of images obtained by thin-layer chromatography". Journal of Chromatography, **A 1188**, 2: 295–300.
17. García-Falcón, M.S.; Simal-Gándara, J., 2005. "Determination of food dyes in soft drinks containing natural pigments by liquid chromatography with minimal clean-up". Food Control, **16**, 3: 293–297.
18. Vachirapatama, N.; Mahajaroensiri, J.; Visessanguan, W. (2008). "Identification and determination of seven synthetic dyes in foodstuffs and soft drinks on monolithic C18 column by high performance liquid chromatography". Journal of Food and Drug Analysis, Vol. **16**, 5: 77–82.
19. Lee, J.H.; Choung, M.G., 2011. "Determination of curcuminoid colouring principles in commercial foods by HPLC". Food Chemistry, Vol. **124**, 3: 1217–1222
20. Alves, P.S.; Brum, D.M.; Branco de Andrade, E.C.; Nieto, P.A., 2008. "Determination of synthetic dyes in selected foodstuffs by high perfor-

mance liquid chromatography with UVDAD detection". *Food Chemistry* **107**, 1: 489–496.

21. Gallego, MR., 2007. "Sustitución de colorantes en alimentos". *Revista Lasallista de Investigación. Corporación Universitaria Lasallista. Colombia*, **4**, 001: 35–36.

22. Olivieri, A.; Goicochea, H.C.; Iñón, F.A., 2004. "MVC1: an integrated MatLab toolbox for first-

order multivariate calibration". *Chem. and Intelligent Lab. Systems*, **73**, 2: 189–197.

23. Thomas, E.V.; Haaland, D.M., 1988. "Partial least-squares methods for spectral analyses. 1. Relation to other quantitative calibration methods and the extraction of qualitative information". *Anal. Chem.* **60**, 11: 1193–1202.