



Araştırma Yazısı

2019; 118-122

***PATENT BLUE V (E131)'İN BULUTLANMA NOKTASI EKSTRAKSİYONU İLE AYRILMASI VE UV-VİS
SPEKTROFOTOMETRESİ İLE MİKTAR TAYİNİ
SEPARATION OF PATENT BLUE V (E131) BY CLOUD POINT EXTRACTION AND DETERMINATION
WITH UV-VIS SPECTROPHOTOMETER**

Dönay YUVALI¹, Esen Gül KOÇAK², İbrahim NARİN¹

¹ Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya A.D., Kayseri

² Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi, Kayseri

ÖZ

Bu çalışmada, Patent Blue V'in ayrılma ve zenginleştirilmesi için yeni bir bulutlanma noktası ekstraksiyon (BNE) yöntemi geliştirilmiştir. Zenginleştirme sonrası tayinler UV-VİS spektrofotometresi ile yapılmıştır. Yüzey aktif madde olarak non iyonik yüzey aktif madde olan Triton X-114 kullanılmıştır. Ekstraksiyon yönteminin optimizasyonu için pH, yüzey aktif madde derişimi, inkübasyon sıcaklığı, inkübasyon süresi ve iyonik şiddet etkisi incelenmiştir. Geliştirilen yöntem farmasötik formülasyondaki Patent Blue V miktar tayini için uygulanmıştır. Doğruluğu belirlemek için yapılan geri kazanma çalışmalarında ortalama geri kazanma değerleri % 89-95 aralığında değişmektedir. Yöntemin % bağıl standart sapma değerleri % 1,3-2,3 aralığındadır. Geliştirilen metodun gözlenebilme ve tayin sınırı sırasıyla 0,56 ve 1,85 ng/mL olarak hesaplanmıştır. Geliştirilen yöntem kullanılarak Patent Blue V'in tayini iyi bir doğruluk ve tekrarlanabilirlik ile yapılabilmektedir. Yöntem oldukça etkili, basit ve çevre dostudur.

ABSTRACT

In this study, the cloud point extraction (BNE) method was developed before quantification by Patent Blue with UV-VIS spectrophotometer. The nonionic surfactant Triton X-114 was used as the surfactant. The effect of pH, surfactant concentration, incubation temperature, incubation time and ionic strength effect was investigated for optimization of the cloud point extraction method. The developed method was applied to the Patent Blue V assay in the pharmaceutical formulation. The mean recovery values range from 89% to 95%, while the relative standard deviation values range from 2.0 to 4.5%. The limit of detection (LOD) and limit of quantification (LOQ) were calculated 0.56 and 1.85 ng/mL, respectively. The purpose of the patent Blue V is very effective, simple and environmentally friendly.

Anahtar kelimeler: Bulutlanma noktası ekstraksiyonu, Triton X-114, Patent Blue V, UV-VİS spektrofotometre

Keywords: Cloud point extraction, Triton X-114, Patent Blue V, UV-VIS spectrophotometry

*Bu çalışma 3. İlaç ve Eczacılık Kongre'sinde poster bildirisi olarak tebliğ edilmiştir. (26-29 Nisan 2017, İSTANBUL)

Makale Geliş Tarihi : 24.01.2019
Makale Kabul Tarihi: 09.08.2019

Corresponding Author: Prof. Dr. İbrahim NARİN, Erciyes Üniversitesi, Eczacılık Fakültesi Analitik Kimya Ana bilim Dalı, Kayseri,38090
Tel: 0352 207 66 66/28050
Fax:0352 437 91 69
e-mail:narin@erciyes.edu.tr
Dönay Yuvalı: Tel: 0352 207 66 66/28050
e-mail:dyuvali@erciyes.edu.tr
Esen Gül Koçak: Tel: 0352 207 66 66
e-mail:esen.g.kocak@gmail.com

GİRİŞ

Gıdalarda, ilaçlarda ve kozmetik ürünlerde renk maddeleri kullanımı (1) ürünü çekici hale getirmek, kalitesini yükseltmek gibi amaçlarla yaygın olarak kullanılmaktadır (2,3). Renk maddelerinin kullanımı uluslararası ve ulusal yasal düzenlemeler çerçevesinde değerlendirilmekte ve denetlenmektedir. Gün geçtikçe ürünlerdeki renk maddelerinin gerek limit değerler içinde olup olmadığı, gerekse yasaklananların da bu ürünler içerisinde bulunup bulunmadığının tayini için yüksek duyarlılıktaki yöntemlere ihtiyaç duyulmaktadır (4).

Patent Blue V, triarilmetan yapıda olan sentetik renk maddesidir. Koyu mavi toz veya granül formdadır (5). Alkolsüz içecekler, dondurma, tatlılar, unlu mamuller, şekerleme gibi gıda ürünlerinde kullanıldığı gibi farmasötik preparatlarda da renklendirici olarak kullanılmaktadır (1-3). Patent Blue V'nin kullanılması astım, deri döküntüleri, hiperaktivite gibi sağlık sorunlarına neden olmaktadır (6,8). Meme kanseri ve malign melanom lenf düğümlerinin belirlenmesinde kullanımı sonucu alerjik reaksiyon geliştiği bildirilmiştir (5,7,8). Solunum problemlerine ve alerjiye sebep olduğundan dolayı bazı ülkelerde kullanımı yasak olan Patent Blue V'nin (7,8) gıdalardaki ve ilaçlardaki tayini önemlidir. Eser miktardaki renk maddelerinin kalitatif ve kantitatif analizlerinin yüksek duyarlılıkta, doğru, hızlı ve ekonomik bir şekilde yapılması önemli bir konudur. Yüksek hassasiyetli cihazlar geliştirilmesine rağmen, analitik cihazlar çoğunlukla yüksek matriks ortamında tayinde başarısız olmaktadır. Bundan dolayı ayırma ve zenginleştirme için ön işlem uygulanması gerekmektedir (4).

Bulutlanma noktası ekstraksiyon (BNE) yönteminin numunede analizi yapılmak istenen analitin ayrılması için örnek çözelti ortamında hidrofobik komplekslerinin oluşturulmasından sonra yüzey aktif maddelerin hidrofilik ve hidrofobik uç özelliklerini kullanarak miseller oluşturması ve bulutlanma noktası sıcaklığı olarak bilinen sıcaklığa kadar ısıtıldığında bulanıklaşması sonucunda analitce zengin sürfaktan fazı ve sulu faz olarak ikiye ayrılmasıdır. Yöntemin en belirgin özellikleri; uygulama basit, hızlı, düşük maliyetli, seçicilik gösteren, çevreci bir yöntem ve çoğu tayin yöntemine uyumlu olması olarak sıralanabilir (10). Bulutlanma noktası ekstraksiyon yönteminde kullanılan sürfaktanların non toksik özellikleri kullanım alanını ve önemini artırmıştır.

Literatürde Patent blue V (E131) için yapılan çalışmalarda miktar tayini yöntemleri ve çeşitli ürünlerdeki tayini rapor edilmiştir. Nevada ve arkadaşları ticari ürünlerdeki Tartrazin, Kinolin Sarısı ve Patent Mavisini V üçlü boya karışımı için hızlı spektrofotometrik metod tasarlamışlardır (11). Başka bir çalışmada ise ultrasonik destekli iyonik sıvı dağılımlı sıvı-sıvı mikroekstraksiyon yöntemiyle Patent Blue V zenginleştirilmiş ve UV-Vis spektrofotometresi ile tayini yapılmıştır. Gıda örneklerinde yapılan çalışmada puding, pasta kreması, şeker, jel, surup ve enerji içeceklerindeki Patent Blue V'nin miktarı basit, etkili ve hızlı bir şekilde belirlenmiştir. İncelenen ürünlerde Patent Blue V derişimlerinin EFSA değerlerinin altında olduğu tespit edilmiştir (12). Karaoğlan ve arkadaşları ise kısmi yetenekli en küçük kareler regresyonu ile gıda boyası analizi yapmışlardır. HPLC metodunu kullanarak toz içeceklerdeki Sunset Yellow, Karmosin, Ponso 4R ve Patent Blue V'nin miktarlarını

belirlemişlerdir (13). Japonya'da yerel marketlerden alınan içecek ve şekerlerde Patent Blue V'in de bulunduğu 40 adet sentetik gıda boyasının HPLC metoduyla analizi yapılmıştır (14). Avrupa birliği düzenlemelerine göre peynirde Patent Blue V gıda boyasının kullanımına izin verilmemektedir. Anklam ve ark. (15) yaptığı çalışmada peynirlerde HPLC metoduyla Patent Blue V'nin kalitatif ve kantitatif analiz yapılmıştır. Yapılan analiz sonucunda peynirlerdeki Patent Blue V konsantrasyonu 0,12 ppm bulunmuştur (15). Patent Blue V'nin gıdalarda sık kullanımı hem ayrılması hem de miktar tayini için yeni yöntemler geliştirilmesini zorunlu kılmıştır. Enstrümental yöntemlerin başında farklı dedektör sistemlerine bağlı sıvı kromatografi yöntemleri (16,17), gaz kromatografisi (18) ve spektrofotometrik yöntemler (19-21) kullanılmaktadır.

Çalışmada; Patent Blue V'nin UV-VİS spektrofotometresi ile tayini öncesi bulutlanma noktası ekstraksiyonu yöntemi ile matriks ortamından ayırmak ve zenginleştirmek amaçlanmıştır. Diğer tekniklere göre daha basit, ucuz maliyetli, diğer sıvı-sıvı ekstraksiyon yöntemlerinde kullanılan organik çözücülere nazaran çevre dostu, pratik ve oldukça etkili bir yöntem olduğu için bulutlanma noktası ekstraksiyon yöntemi kullanılmıştır.

GEREÇ VE YÖNTEM

Deneysel çalışmada kullanılan kimyasal maddeler; Patent blue V (\geq %99,5 Alfa Aesar, Germany), Triton X-114 (Acros Organics, Germany), sodyum klorür, sodyum asetat, glasiyel asetik asit (Carlo Erba, England) ve metanol (Merck, Germany) analitik saflıktadır. Çalışmada Elix Millipore deiyonize su cihazından elde edilen ultra deiyonize su kullanılmıştır.

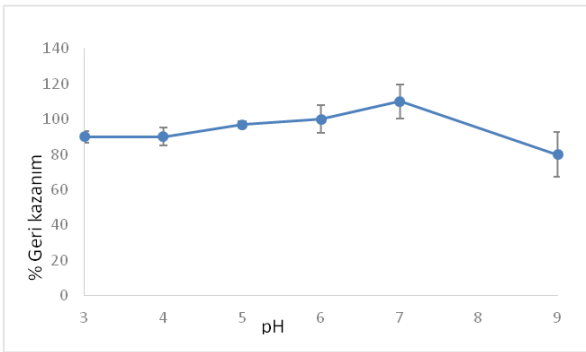
Geliştirilen yöntem için kullanılan analitik ve temel laboratuvar cihazları: ekstraksiyon için en uygun pH ayarlamak için pH metre (WTW-Inolab pH720), misel oluşumunun gerçekleşmesi için su Memmert WNB su banyosu, Faz ayırmasının tamamlanması için Nüve NF 800 santrifüj cihazı, Patent Blue V'nin kalitatif ve kantitatif tayini için Shimadzu UV-1800 spektrofotometre kullanılmıştır.

Çalışma, öncelikle model çözeltiler kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla 1 µg/ml Patent Blue V içeren sulu model çözeltilere, 1 mL 3 M sodyum klorür (NaCl) çözeltisi ve 1,5 mL %10' luk (a/h) Triton X-114 eklendikten sonra karıştırılıp son hacim 15 mL ye kadar uygun tampon çözelti ile tamamlandı. Daha sonra çözelti istenilen sıcaklığa ayarlanmış su banyosunda inkübasyona alındı. Çözeltiler, su banyosunda 30 dakika bekletildikten sonra, 4000 rpm'de 5 dk santrifüjlenerek sürfaktanca zengin faz ve sulu faz birbirinden ayrıldı. Sürfaktanca zengin faz, 3 mL metanolde çözülüp, Patent Blue V derişimi UV-VİS spektrofotometre ile tayin edildi. Geliştirilen bulutlanma noktası ekstraksiyon yönteminin optimizasyonu için pH, yüzey aktif madde miktarı, inkübasyon sıcaklığı, inkübasyon süresi ve tuz çözeltisinin etkisi optimize edildi. Geliştirilen yöntem Kayseri'de eczaneden temin edilen farmasötik preparata (oral sprey) uygulandı. Antibakteriyel etkili boğaz spreyi renk katkı maddesi olarak Patent Blue V ve diğer aktif ilaç bileşenleri içermektedir. Sıvı formdaki ilaç örneğinden farklı hacimlerde numuneler alınarak seyreltilerek geliştirilen yöntem uygulanmıştır.

BULGULAR

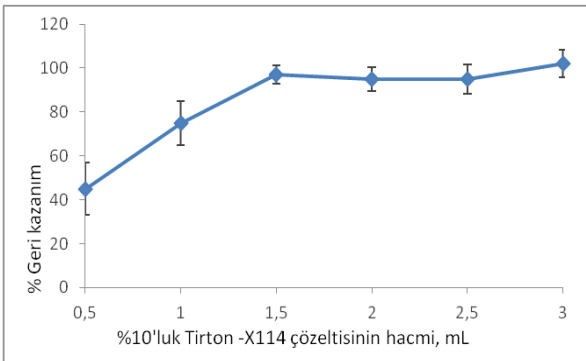
Yöntemin optimum şartlarının belirlenmesinde derişimi tam olarak bilinen standart Patent Blue V içeren sulu model çözeltiler hazırlanmıştır. Bu çözeltiler kullanılarak; çözeltilerin pH'sı, yüzey aktif madde miktarı, çözeltilerin sıcaklığı ve inkübasyon zamanı gibi analitik parametrelerin optimum koşulları belirlenmiştir. Ekstraksiyon için yöntemin optimum koşulları belirlendikten sonra bir farmasötik örneğin Patent Blue V derişimi belirlenmiştir. Yöntemin doğruluğunu ispatlamak için bu örneğe Patent Blue V ilave edilerek geri kazanım değerleri hesaplanmıştır.

Ekstraksiyon işlemlerinde analitin ekstraksiyon fazına geçmesi için ortamın pH'sı en önemli parametrelerden biridir. Geri kazanımlara çözeltilerin pH'sının etkisi pH 3,0-9,0 aralığında araştırılmıştır. Şekil 1'de görüldüğü gibi pH 9,0 hariç çalışılan tüm pH'larda kantitatif geri kazanım elde edilmiştir. Tekrarlanabilirliğin en iyi olduğu ve kritik olmayan pH 5,0 optimum pH olarak kabul edilmiş ve bundan sonraki çalışmalar pH 5,0'de gerçekleştirilmiştir.



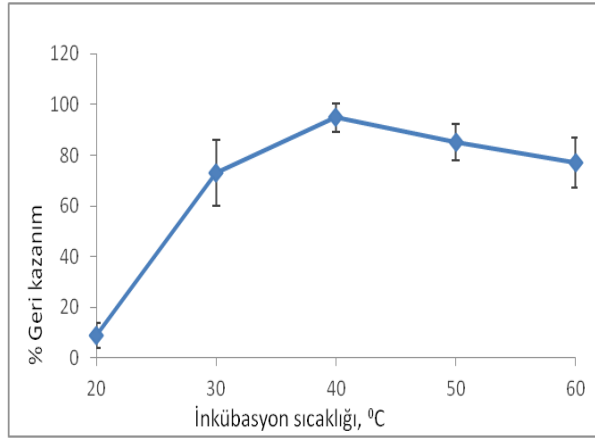
Şekil 1. Patent Blue V'in sulu ortamdan bulutlanma noktası ekstraksiyonu yöntemiyle geri kazanımına çözeltilerin pH'sının etkisi

Bulutlanma noktası ekstraksiyon yönteminde kullanılan yüzey aktif madde miktarı geri kazanımın etkileyen ikinci en önemli parametredir. Misel oluşumuna yüzey aktif madde miktarının etkisini incelemek için % 10'luk Triton X-114 çözeltilerinden 0,5-3,0 mL hacimde kullanılarak Patent Blue V'in geri kazanımına olan etkisi Şekil 2'de verilmiştir. Analitik olarak yeterli geri kazanım değerleri %10'luk Triton X-114 çözeltilerinden 1,5 mL ve daha fazla kullanımıyla sağlandığı görülmüştür.



Şekil 2. Patent Blue V'in sulu ortamdan bulutlanma noktası ekstraksiyonu yöntemiyle geri kazanımına Triton X-114 miktarının etkisi

Çözeltilerin sıcaklığının misel oluşumuna etkisi 20-60 °C arasında incelenmiştir. Elde edilen sonuçlar Şekil 3'te verilmiştir. 20-60 °C aralığında çalışarak elde edilen veriler sonucunda 40 °C en uygun sıcaklık olarak belirlenmiştir.



Şekil 3. Patent Blue V'in sulu ortamdan bulutlanma noktası ekstraksiyonu yöntemiyle geri kazanımına inkübasyon sıcaklığının etkisi

Optimum şartlarda inkübasyon süresinin misel oluşumu ve analitin geri kazanımına etkisi 15-60 dk aralığında incelenmiştir. 30 dk inkübasyon süresinin yeterli olduğu görülmüştür. İyonik şiddetin misel oluşuma katkısının araştırılması için; çözeltilerin ortamına NaCl çözeltilerinin etkisi incelenmiştir. Bu amaçla 0,0-3,0 mL aralığındaki farklı hacimlerde 3,0 mol L⁻¹ NaCl çözeltileri eklenerek iyonik şiddetin etkisinin analitin geri kazanımına etkisi araştırılmıştır. 1,0 mL ve daha fazla NaCl çözeltilerinin eklenmesiyle Patent Blue V'in geri kazanım değeri kantitatif olmuştur. Deneysel çalışmalarda 3,0 mol L⁻¹ NaCl çözeltilerinin 1,0 mL'sinin yeterli olduğu belirlenmiştir. Geliştirilen yöntemin optimum parametreleri Tablo I'de özetlenerek yöntemin optimum şartları verilmiştir.

Tablo I. Geliştirilen yöntemin optimum şartları

Optimum şartlar	
pH	5,0
Yüzey aktif madde miktarı	1,5 mL
İnkübasyon sıcaklığı	40 °C
İnkübasyon süresi	30 dk
NaCl miktarı	1,0 mL

Patent Blue V'in bulutlanma noktası ekstraksiyonu ile yapılan analiz çalışmasında geliştirilen yöntemin analitik parametreleri Tablo II'de verilmiştir.

Geliştirilen ekstraksiyon yönteminin farmasötik numunelere uygulanması ve geri kazanım sonuçları Tablo III'de verilmiştir. Farmasötik örnekte bulunan Patent Blue miktarı $0,022 \pm 0,001 \mu\text{g mL}^{-1}$ olarak bulunmuştur.

Tablo II. Geliştirilen yöntemin analitik parametreleri

Analitik parametreler	Değerler
Lineer dinamik aralık, ng/ml	10,0-200,0
Gün içi tekrarlanabilirlik, % BSS	4,5
Günler arası tekrarlanabilirlik, % BSS	5,6
Gözlenebilme sınırı (LOD) ng/ml	0,56
Tayin sınırı (LOQ) ng/ml	1,85
Kalibrasyon doğrusu	$y=4,048x-0,0009$
r^2	0,9996

% BSS: Bağıl standart sapma $[(ss/ortalama)*100]$

Tablo III. Farmasötik örnek analizi ve geri kazanım sonuçları

Eklenen Patent Blue V $\mu\text{g}/\text{mL}$	Bulunan Patent Blue V $\mu\text{g}/\text{mL}$	% Geri kazanım	%BSS
0,00	0,044 \pm 0,001	0,0	2,27
0,04	0,079 \pm 0,001	90,7 \pm 2,6	1,27
0,05	0,092 \pm 0,002	94,8 \pm 5,1	2,17
0,06	0,099 \pm 0,002	89,4 \pm 4,7	2,02

ss: Standart sapma, % BSS: Bağıl standart sapma $[(ss/ortalama)*100]$

TARTIŞMA

Patent Blue V' in UV-VİS spektrofotometresi ile tayinleri öncesi çevre dostu bir bulutlanma noktası ekstraksiyonu geliştirilmiştir. Yöntemin analitik parametreleri belirlendikten sonra Patent Blue V içeren oral sprey seçilerek gerçek örneğe uygulanmıştır. Yöntemin doğruluğu ve geri kazanım değerleri gerçek örneğe 0,04-0,06 $\mu\text{g}/\text{mL}$ standart Patent Blue V eklenerek kontrol edilmiştir. Elde edilen geri kazanım değerleri yöntemin doğru olarak tayin yaptığını göstermektedir. Patent Blue

V gıda ve farmasötik örneklerde sıklıkla kullanılan bir katkı maddesi olduğu için analizi ve analiz yöntemleri önem kazanmaktadır. Tablo IV 'te Patent blue V'in analizine dair kısa bir literatür özeti verilmiştir.

Literatürde yapılan çalışmaları incelediğimizde; geliştirilen bulutlanma noktası ekstraksiyonu, çevre dostu, uygulaması hızlı, maliyeti düşük ve uygulanabilirliği geniş bir yöntemdir. Yöntemin düşük tayin sınırı farklı konsantrasyonlardaki Patent Blue V' in tayini için kullanılabileceğini göstermektedir. Ayrıca geliştirilen yön-

Tablo IV. Patent Blue V'in analizine yönelik yapılan çalışmaların literatür özeti

Ekstraksiyon Yöntemi	Analiz Yöntemi	Örnek	Gözlenebilme sınırı (ng mL ⁻¹)	%BSS	Ref.
Ultrason destekli iyonik sıvı temelli sıvı-sıvı mikroekstraksiyon	UV-VİS spektrofotometre	Gıda	0,68	4,5	12
-	Poliamit kolon-HPLC-DAD	Gıda	9,0	6,0	14
C18 kartuş ile katı faz ekstraksiyon	Türev spektroskopisi-UV-VİS spektrofotometre	Gıda	-	-	21
-	Apex C18 kolon-HPLC-DAD	Gıda	3,4	1,0	22
Nafyon kaplı karbon elektrot	Voltametrik yöntem	İçecek	43,1	-	23
Triton X-114 ile Bulutlanma noktası ekstraksiyon yöntemi	UV-VİS spektrofotometre	İlaç	0,56	5,6	Bu çalışma

temin yüksek performanslı sıvı kromatografisi öncesi ayırma ve zenginleştirme işlemlerinde de kullanılabilirliği görülmektedir.

KAYNAKLAR

1. Atlı B. Gıda Boyaları. Yüksek Lisans Tezi, Namık Kemal Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Tekirdağ 2010; ss 20,29,75.
2. Şimşek H. Gıda Katkı Maddeleri Rehberi (2. Baskı), Lemi Yayınları, İstanbul, 2011; pp 17-80.
3. Majid A, Mehrnoosh S, Masoomah S, et al. Mediated electrochemical method for the determination of indigo carmine levels in food products. *Talanta* 2017; 173: 60-68.
4. Çakmakçı S, Çelik İ. Gıda Katkı Maddeleri, Atatürk Üniversitesi Ofset Tesisi, Erzurum, 2004; pp 127-136.
5. <https://efsa.onlinelibrary.wiley.com/doi/epdf/10.2903/j.efsa.2013.2818> (erişim tarihi:10.11.2018 15:15).
6. Erden Ç. Z, Çalışkan D. Gıda katkı maddeleri ve insan sağlığı üzerine etkileri. *Ankara Eczacılık Fakültesi Dergisi* 2003; 32:207-206.
7. Alver E, Demirci A, Özçimder M. Microextraction methods. *Sigma Journal of Engineering and Natural Sciences* 2012; 30: 75-90.
8. <http://www.gimdes.org/gidalarda-renklendirici-katki-maddeleri.html> (erişim tarihi: 20.03.2016).
9. Martin-Lazaro J, Nunez-Orjales R, Battikhi-Precedo N. et al. Allergy to Blue Dye. *Journal of Investigational Allergology and Clinical Immunology* 2016; 26: 381-383.
10. Gökkyaya N. Bazı Eser Metallerin Bulutlanma Noktası Ekstraksiyonu ile Tayini. Yüksek Lisans Tezi, Pamukkale Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü, Denizli 2014; ss 11-24.
11. Nevado BJJ, Flores RJ, Lerena VM, et al. Rapid spectrophotometric method to resolve ternary mixtures of Tartrazine, Quinoline Yellow and Patent Blue V in commercial products. *Fresenius J Anal Chem* 1999; 365: 383-388.
12. Unsal YE, Soylak M, Tuzen M. Ultrasound-Assisted ionic liquid-based dispersive liquid-liquid microextraction for preconcentration of patent Blue V and its determination in food samples by UV-Visible Spectrophotometry. *Environ Monit Assess* 2015; 187: 203.
13. Keser GK, Gümrükçü G, Özgür MÜ, ve ark. Abilities of partial least-squares (PLS-2) multivariate calibration in the analysis of quaternary mixture of food colors (E-110, E-122, E-124, E-131). *Analytical Letters* 2007; 40: 1893-1903.
14. Yoshioka N, Ichihashi K. Determination of 40 synthetic food colors in drinks and candies by high-performance liquid chromatography using a short column with photodiode array detection. *Talanta* 2008; 74: 1408-1413.
15. Anklam E, Müller A, Schmalfuß J. High performance liquid chromatographic analysis of Patent Blue V in cheese. *Chromatographia* 1995; 7:431-434.
16. Yang Y, Zhang J, Shao B. Quantitative analysis of fourteen synthetic dyes in jelly and gummy candy by ultra performance liquid chromatography. *Analytical Methods* 2014; 6(15):5872-5878.
17. Bonan S, Fedrizzi G, Menotta S, et al. Simultaneous determination of synthetic dyes in foodstuffs and beverages by high-performance liquid chromatography coupled with diode-array detector. *Dyes and Pigments* 2013; 99: 36-40.
18. Hea L, Sub Y, Fanga B, et al. Determination of Sudan dye residues in eggs by liquid chromatography and gas chromatography-mass spectrometry. *Analytica Chimica Acta* 2007; 594:139-146.
19. Idouhar M, Tazerouti A. Spectrophotometric determination of cationic surfactants using Patent Blue V: Application to the Wastewater Industry in Algiers. *Journal of Surfactants and Detergents* 2008; 11: 263-267.
20. Saydan Kanberoğlu G, Yılmaz E, Soylak M. Developing a new and simple ultrasound-assisted emulsification liquid phase microextraction method built upon deep eutectic solvents for Patent Blue V in syrup and water samples. *Microchemical Journal* 2019; 145:813-818.
21. Özdemir Y, Akkan AA. Determination of Patent Blue V and Carmoisine in gelatine desserts by derivative spectrophotometry. *Turkish Journal of Chemistry* 1999; 23:221-229.
22. Berzas JN, Rodriguez Flores J, Villaseñor Llerena MJ, Rodriguez Fariñas N. Simultaneous spectrophotometric determination of tartrazine, patent blue V, and indigo carmine in commercial products by partial least squares and principal component regression methods. *Talanta* 1999; 48: 895-903.
23. Desimoni E, Brunetti B, Cosio MS. Determination of Patent Blue V (E131) at a Nafion-modified glassy carbon electrode. *Electroanalysis* 2006; 18: 231-235.