

Atsovärit elintarvikkeissa Suomessa

Helsingin yliopisto

Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

Kemian laitos

Kemian opettajankoulutusyksikkö

Kandidaatintutkielma

Tekijä: Kaarina Vakkala

Pvm: 21.3.2013

Ohjaajat: Maija Aksela

Anu Hopia

Sisällysluettelo

1 Johdanto	4
2 Atsovärien kemiaa	4
2.1 Historiallinen näkökulma.....	4
2.2 Rakenne ja luokittelu kemiallisen rakenteen sekä sitoutumistavan mukaan	5
2.3 Fysikaalis-kemialliset ominaisuudet	9
2.3.1 Väri	9
2.3.2 Vuorovaikutukset värjättävän materiaalin, muiden väriainemolekyylien ja liuottimen kanssa	10
2.4 Valmistustekniikat.....	11
2.5 Erotus- ja analysointimenetelmät	11
2.5.1 Erotusmenetelmät	11
2.5.2 Analysointimenetelmät.....	12
2.5.2.1 Kvantitatiiviset analysointimenetelmät	12
2.5.2.2 Kvalitatiiviset analysointimenetelmät	14
2.6 Käyttökohteet	14
3 Elintarvikevärit	15
3.1 Luokittelu valmistustavan mukaan	15
3.2 Atsovärit elintarvikelisiä aineina ja -väreinä.....	16
4 Elintarvikkeissa sallitut atsovärit Suomessa	16
4.1 Tartratsiini	17
4.2 Paraoranssi	17
4.3 Atsorubiini eli karmosiini.....	18
4.4 Amarantti.....	19
4.5 Uuskokkiini	19
4.6 Alluranpunainen AC	20
4.7 Briljanttimusta BN.....	21

4.8 Ruskea FK.....	22
4.9 Ruskea HT	23
4.10 Litolirubiini BK.....	23
5 Elintarvikkeissa käytettävien atsovärien terveys-ja ympäristövaikutukset ja niiden rajoittaminen	24
5.1 Terveysvaikutukset.....	24
5.1.1 Genotoksiset vaikutukset	24
5.1.2 Yliherkkysoireet.....	25
5.1.3 Neuropsykologiset oireet	26
5.2 Ympäristövaikutukset	26
5.3 Terveys-ja ympäristövaikutusten rajoittaminen.....	27
5.3.1 Lainsäädäntö ja valvonta.....	27
5.3.2 Atsovärien poistaminen jätevesistä.....	28
6 Yhteenveto ja johtopäätökset.....	31
Lähteet.....	34

1 Johdanto

Väri on ruoan tärkeä ominaisuus ja se yhdistetään usein ruoan laatuun ja makuun.^{1,2} Väriaineita lisätään ruokaan parantamaan sen ulkonäköä.^{3,4} Atsovärien käyttö on kuitenkin kiistanalainen aihe niiden terveys- ja ympäristövaikutusten vuoksi.⁵

Englantilainen William Henry Perkin keksi ensimmäisen synteettisen värin, mauveinin,⁶ vuonna 1856. Ch. Mène syntetisoi ensimmäisen atsovärin, aniliinikeltaisen,⁷ vuonna 1861.

Atsovärit ovat nykyään tärkeä osa synteettistä väriteollisuutta ja ne muodostavat 60-70 % maailmanlaajuisesta vuosittaisesta tuotannosta.⁸ Niitä käytetään erityisesti kumi-, muovi-, painotuote- ja tekstiiliteollisuudessa, mutta myös esimerkiksi elintarvikkeissa, kosmetiikassa sekä laboratorioanalyysissä.^{9,10,11}

Elintarvikkeissa sallitut atsovärit vaihtelevat eri maissa.⁵ Tässä tutkielmassa rajoitutaan kuitenkin tarkastelemaan ainoastaan elintarvikkeissa sallittuja atsovärejä ja niitä koskevaa lainsäädäntöä Suomessa ja muualla Euroopan unionin alueella tutkielman laajuuden vuoksi.

2 Atsovärien kemiaa

2.1 Historiallinen näkökulma

Ruokia on värjätty jo muinaisista ajoista lähtien. Historiallisen tiedon mukaan antiikin roomalaiset käyttivät savua ja aaloeta viinien värjäämiseen.¹² Keskiajalla ruoan värjäämiseen käytettiin esimerkiksi saframia ja munankeltuaista ja satunnaisesti myös lehtikulmaa.¹³ Myös raskasmetallien, kuten arseenin, elohopean, kromin, kuparin ja lyijyn, suoloja käytettiin erilaisten ruokien, kuten teen, juuston ja makeisten värjäämiseen.¹⁴

Synteettisiä orgaanisia värejä alettiin valmistaa 1800-luvun loppupuolella. Vuonna 1856 englantilainen kemisti Sir Henry William Perkin keksi ensimmäisen täysin synteettisen värin, mauveiinin eli aniliini-purppuran,⁶ yrittäessään valmistaa malarialääke kiniiniä. Mauveiinista tuli nopeasti suosittu väri eri puolilla Eurooppaa. Sen pääkäyttökohteita olivat silkin ja muiden tekstiilien värjäys, minkä lisäksi sitä käytettiin myös esimerkiksi elintarvikevärinä. Mauveiinin kilpailijaksi tekstiiliteollisuudessa ilmaantui pian magenta eli aniliininpunainen,¹⁵ joka keksittiin myös vuonna 1856.

Saksalainen kemisti, Johann Peter Griess, keksi diatsotointireaktion vuonna 1860, kun taas Ch. Mène syntetisoi ensimmäisen atsovärin, aniliinikeltaisen,⁷ vuonna 1861 ja Carl Alexander Martius puolestaan toisen atsovärin, bismarckinruskean,¹⁶ vuonna 1863. Ne kuuluvat emäksisiin eli kationisiin väreihin. Thomas ja Robert Holliday syntetisoivat ensimmäisen kehitysvärin, joka oli Vacanceine Red,¹⁷ ja Paul Böttiger puolestaan ensimmäisen suoravärin, kongopunaisen,¹⁸ 1880-luvulla. Suoravärejä voitiin käyttää sellaisenaan selluloosakuitujen värjäämiseen.

Synteettiset värit syrjäyttivät nopeasti sekä luontaiset että mineraalipohjaiset värit elintarvike-, painotuote- ja tekstiiliteollisuudessa.⁵ Ne ovat yleensä niitä huomattavasti voimakkaampia, tasalaatuisempia ja pysyvämpiä. Esimerkiksi Yhdysvalloissa käytettiin 1900-luvun alkuun mennessä lähes 80 erilaista synteettistä väriä elintarviketeollisuudessa.

Synteettisten väriaineiden turvallisuuteen ei kuitenkaan kiinnitetty juuri huomiota ennen Yhdysvalloissa 1950-luvulla esiintyneitä myrkytystapauksia (FD&C Orange No. 1 & FD&C Red No. 32).¹⁹

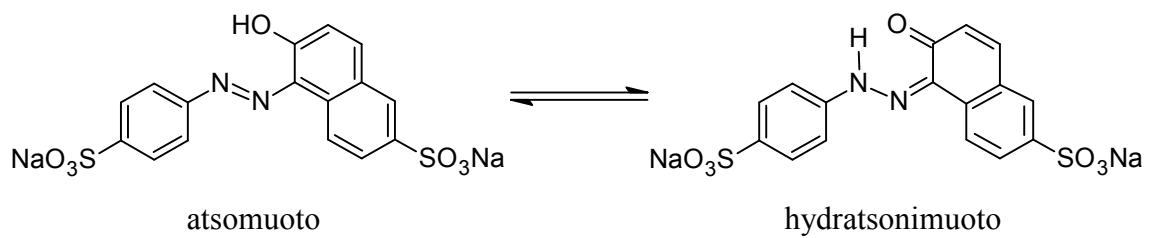
2.2 Rakenne ja luokittelu kemiallisen rakenteen sekä sitoutumistavan mukaan

Atsovärit ovat aromaattisia orgaanisia yhdisteitä, jotka sisältävät yhden tai useamman kromoforisen atsoryhmän (ks. Kuva 1.).²⁰ Kromoforinen atsoryhmä sisältää kaksi sp²-hybridisoitunutta typpiatomia.

– N = N –

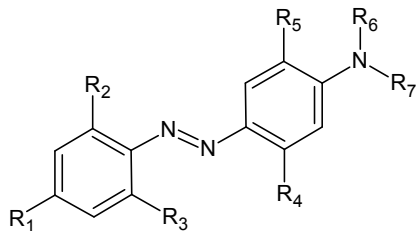
Kuva 1. Atsovärien molekyyli­rakenteessa esiintyvä atsoryhmä.

Monet atsovärit, kuten esimerkiksi paraoranssi, esiintyvät kuitenkin atso-hydratsoni-tautomeereina.^{21,22} Tällöin yhdiste sisältää hydroksyyli­ryhmän, joka on orto- tai para-asemassa atsoryhmään nähden.



Kuva 2. Paraoranssin molekyyli­rakenteessa esiintyvä atso-hydratsoni -tautomerismi.

Suurin osa atsoväreistä on fenyylimiamiinin johdannaisia, joiden yleinen kaava on:



Kuva 3. Yleiskaava atsoväreille, jotka ovat fenyylimiamiinin johdannaisia.

, jossa

R_1 on elektroneja puoleensa vetävä substituentti,

R_2 ja R_3 ovat vetyatomeja tai elektroneja puoleensa vetäviä substituentteja,

R_4 ja R_5 ovat vetyatomeja tai elektroneja hylkiviä substituentteja ja

R_6 ja R_7 ovat vetyatomeja tai alkyylisubstituentteja, joissa on usein liittyneenä muita sivuryhmiä.²³

Atsovärit voidaan jakaa atsoryhmien lukumäärän mukaan mono-, di-, tri- ja polyatsoväreihin.²⁴ Monoatsovärejä ovat esimerkiksi aniliinikeltainen,⁷ Sudan I²⁵ ja tartratsiini.²⁶ Diatsovärejä ovat puolestaan esimerkiksi bismarckinruskea R,¹⁶ kongopunainen¹⁸ ja trypaanipunainen.²⁷ Triatsovärejä ovat taas esimerkiksi Direct Black 41,²⁸ Direct Blue 83²⁹ ja Direct Green 33.³⁰ Polyatsovärejä ovat esimerkiksi Acid Black 4,³¹ Direct Black 19³² sekä Direct Blue 150.³³

Atsovärit voidaan luokitella kemiallisen rakenteen (kuten rengasrakenteessa esiintyvien sivuryhmien) ja sen mukaan, miten ne kiinnittyvät värjättävään materiaaliin.³⁴ Edellä mainitut tekijät vaikuttavat myös käyttökohteen valintaan (ks. luku 2.6). Atsovärit voidaan lukea useisiin väriaineryhmiin, kuten dispersioväreihin, emäksisiin ja kationisiin väreihin, happoväreihin, kehitysväreihin, liuotinväreihin, metallikompleksiväreihin, peittäväreihin, pigmenttiväreihin, reaktio- eli reaktiiviväreihin ja suoraväreihin.^{35,36}

Dispersiovärien molekyylirakenteessa on atsobentseeni- tai antrakininirunko, johon on liittynyt esimerkiksi poolisia amino-, hydroksyyli- tai nitroryhmiä.³⁷ Dispersiovärit sitoutuvat värjättävään materiaaliin dispersiovoimien ja dipoli-dipolisidosten välityksellä.³⁸ Dispersiovärejä ovat esimerkiksi Disperse Black 1,³⁹ Disperse Orange 3⁴⁰ ja Disperse Yellow 16.⁴¹

Emäksiset ja kationiset värit sisältävät yhden tai useamman poolisen amino- tai dialkyyliaminoryhmän, minkä ansiosta ne sitoutuvat värjättävään materiaaliin ionisidoksin.^{38,42} Myös hydrofobisilla vuorovaikutuksilla on merkitystä yhä enenevässä määrin pH:n kohotessa.⁴³ Emäksisiä ja kationisia värejä ovat esimerkiksi aniliinikeltainen,⁷ bismarckinruskea R¹⁶ ja krysoidiini Y.⁴⁴

Happoväreissä väriainemolekyylin runkoon on liittynyt yksi tai useampi poolinen karboksyyli-, nitro-, sulfo- tai aromaattinen hydroksyyli-ryhmä, minkä lisäksi ne ovat usein rikkihapon natriumsuoloja.^{42,45} Ne sitoutuvat värjättävään materiaaliin ionisidoksin,⁴⁶ minkä lisäksi myös hydrofobisilla vuorovaikutuksilla on merkitystä yhä enenevässä määrin pH:n kohotessa.⁴³ Myös kaikki Suomessa elintarvikkeissa sallitut atsovärit ovat luonteeltaan happovärejä lukuun ottamatta litolirubiini BK:ta. Happovärejä ovat esimerkiksi metyylioranssi,⁴⁷ krysoiini S⁴⁸ ja oranssi II.⁴⁹

Pigmenttiväreissä molekyylin runkoon on liittynyt yleensä yksi tai useampi karboksyyli-, sulfo- tai aromaattinen hydroksyyli-ryhmä, joiden avulla ne muodostavat veteen ja protolyytteihin liukenemattomia yhdisteitä yhdessä esimerkiksi alumiinin, bariumin, kalsiumin, mangaanin ja strontiumin suolojen kanssa.⁶² Pigmenttivärit sisältävät usein myös amido-, kloori- ja sulfamoyylisubstituentteja. Pigmenttivärejä ovat esimerkiksi hansakeltainen R,⁶³ Pigment Orange 2⁶⁴ ja Pigment Red 64.⁶⁵

Reaktiovärit sisältävät haloheterosyklisen ryhmän (klooritriatsiinit) tai aktivoitun kaksoissidoksen.⁶⁶ Ne sitoutuvat värjättävään materiaaliin irreversiibelisti kovalenttisella sidoksella, joko nukleofiilisen aromaattisen substituutio- eli korvautumisreaktion kautta tai Michael-addition kautta. Kun kyseessä on nukleofiilinen aromaattinen substituutio, väriaineen lähtevä ryhmä (esimerkiksi kloori) korvautuu värjättävän materiaalin amino-, hydroksyyli- tai tioliryhmällä. Kun sen sijaan kyseessä on Michael-additio, värjättävän materiaalin amino- tai hydroksyyli-ryhmä liittyy kaksoissidokseen. Reaktiovärejä ovat esimerkiksi Reactive Orange 1⁶⁷ sekä Reactive Red 6.⁶⁸

Suoravärit ovat yleensä polyatsovärejä, joiden molekyyli-rakenteessa on bentsidiini- ja mahdollisesti myös 1-naftyyliamiinirunko.⁶⁹ Väriainemolekyylin runkoon on liittynyt happamia karboksyyli-, sulfo- tai aromaattisia hydroksyyli-ryhmiä sekä yleensä yksi tai useampi aminoryhmä. Suoravärit ovat tämän lisäksi usein rikkihapon natriumsuoloja. Suoravärit sitoutuvat värjättävään materiaaliin pääasiallisesti vety- ja ionisidoksin.⁷⁰ Suoravärejä ovat esimerkiksi Direct Blue 83,²⁹ kongopunainen¹⁸ ja trypaanipunainen.²⁷

2.3 Fysikaalis-kemialliset ominaisuudet

2.3.1 Väri

Atsovärien värillisyyden johtuu kromoforisesta atsoryhmästä, joka sisältää kaksi sp^2 -hybridisoitunutta typpi-atomia (ks. luku 2.2).²⁰ Kromofori sisältää delokalisoituneita π -elektroneja, jotka virittyessään π^* -orbitaalille aikaansaavat yleensä voimakkaan absorption.²²

2.3.2 Vuorovaikutukset värjättävän materiaalin, muiden väriainemolekyylien ja liuottimen kanssa

Väriainemolekyylien ja värjättävän materiaalin välillä esiintyy viittä eri vuorovaikutustyyppiä.^{38,71,72,73} Niitä ovat ionisidokset, dipoli-dipolisidokset, joista erityistapauksena ovat vetysidokset, dispersiovoimat sekä hydrofobiset vuorovaikutukset. Ionisidoksia esiintyy varsinkin emäksisten ja kationisten värien, happovärien, metallikompleksivärien sekä suoravärien ja värjättävän materiaalin välillä. Dispersiovoimat ja dipoli-dipolisidokset ovat ratkaisevassa asemassa dispersiovärien ja värjättävän materiaalin välillä, vetysidokset puolestaan suoravärien ja värjättävän materiaalin välillä.⁷⁰ Hydrofobisia vuorovaikutuksia esiintyy puolestaan varsinkin kehitysvärien kohdalla. Väriainemolekyylit saattavat tämän lisäksi sitoutua värjättävään materiaaliin myös kemiallisen reaktion kautta kovalenttisella sidoksella, jolloin kyseessä on reaktioväri. (ks. myös luku 2.2)

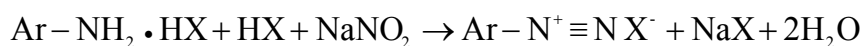
Vastaavia vuorovaikutuksia esiintyy myös väriainemolekyylien, väriainemolekyylin ja liuottimen, monesti poolisten vesimolekyylien, liuottimen ja värjättävän materiaalin sekä värjättävän materiaalin polymeerimolekyylien välillä.^{72,73} Tämä selittää myös emäksisten ja kationisten värien, happovärien sekä suoravärien vesiliukoisuuden. Kyseisten väriainemolekyylien pooliset ryhmät muodostavat vesimolekyyliin ioni-dipolisidoksia, dipoli-dipolisidoksia sekä vetysidoksia. Myös reaktiovärit ovat vesiliukoisia samasta syystä, mutta kiinnittyvät pysyvästi värjättävään materiaaliin kemiallisen reaktion kautta.⁶⁶ Kemialliselta luonteeltaan poolittomien tai heikosti poolisten väriaineiden, kuten esimerkiksi kehitysvärien ja dispersiovärien, molekyylit eivät sen sijaan ole juuri vesiliukoisia, mikä selittää esimerkiksi värien hyvän pesunkeston. Kaikki elintarvikkeissa sallitut synteettiset värit ovat nykyään vesiliukoisia.⁷⁴

Väriainemolekyylien välillä vallitsevat vuorovaikutukset, ionisidoksia lukuun ottamatta, nopeuttavat yleensä niiden adsorboitumista värjättävään materiaaliin.⁷⁵ Liuotinmolekyylien poolisten ryhmien muodostamat vetysidokset väriainemolekyyliin ja värjättävään materiaaliin puolestaan hidastavat väriaineen adsorboitumista värjättävän materiaalin pinnalle.⁷⁶

2.4 Valmistustekniikat

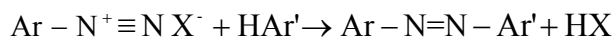
Atsovärejä valmistetaan kahdessa vaiheessa.³⁴ Ensin diatsotoidaan primäärinen aromaattinen amiini käyttäen esimerkiksi typpi- tai rikkihappoa. Tämän jälkeen diatsotoitu amiini eli diatsoniumsuola kytketään fenoliin, enoloituvaan alifaattiseen ketoniin tai aromaattiseen amiiniin, pyrroliin, indoliin tai muuhun vastaavaan rengasrakenteeseen elektrofiilisessa aromaattisessa substituutiossa⁷⁷:

Diatsotointi:



(X = HSO₄, NO₃, Br, Cl jne.)

KytKentä:



(Ar = aryyli-radikaali)

(Ar' = fenoli- tai fenyyliamiiniradikaali)

Di-, tri- ja polyatsovärejä valmistetaan käyttäen lähtöaineena polyfunktionaalista kytKentäkomponenttia, diamiinia.⁷⁸ Diatsotointi ja kytKentä voidaan myös vaihtoehtoisesti toistaa käyttäen aminoatsoyhdistettä.⁷⁹

2.5 Erotus- ja analysointimenetelmät

2.5.1 Erotusmenetelmät

Väriaineet on yleensä eristettävä näytematriisista sekä puhdistettava ja konsentroitava ennen niiden määrittystä.^{80,81,82} Tarkoitukseen sopivia erotusmenetelmiä ovat esimerkiksi erilaiset adsorptio-, haihdutus-, saostus-, suodatus- ja uuttomenetelmät. Tällaisia ovat esimerkiksi kiteytys, kiinteäfaasiuutto, mikro-suodatus, pyöröhaihdutus sekä sentrifugointi.

Analysoitava väriaine on tämän lisäksi usein erotettava muista väriaineista esimerkiksi elektroforeettisia tai kromatografisia menetelmiä käyttäen. Elektroforeettisia menetelmiä ovat muun muassa misellinen sähkökineettinen kapillaarikromatografia (MEKC)⁸³ sekä kapillaarielektroforeesi (CE), joka on menetelmistä yleisin.⁸⁴ Kapillaarielektroforeesilla saatava resoluutio on korkea, mutta menetelmä ei yleensä ole kovin sensitiivinen.^{85,86} MEKC on kapillaarielektroforeesia selektiivisempi menetelmä, minkä lisäksi se mahdollistaa myös sähköisesti varauksettomien yhdisteiden erottamisen.⁸³ Yleisesti käytettyjä kromatografisia menetelmiä ovat esimerkiksi ionipari-käänteisfaasi- (IP-RPLC) ja käänteisfaasinestekromatografia (RPLC), korkean erotuskyvyn ioni- (HPIC)⁸⁷, neste- (HPLC)^{82,86,88} ja ohutkerroskromatografia (TLC)⁸⁹ sekä pylväskromatografia (CC)⁹⁰ sekä näiden yhdistelmät, kuten korkean erotuskyvyn käänteisfaasinestekromatografia (RP-HPLC)^{85,91} ja ionipari-RP-HPLC (IP-RP-HPLC).⁹² Edellä mainituista menetelmistä HPLC, RPLC ja IP-RPLC ja näiden yhdistelmät ovat yleisimmin käytettyjä erotusmenetelmiä niiden antaman korkean resoluution, sensitiivisyyden sekä selektiivisyyden ansiosta.^{87,91}

2.5.2 Analysointimenetelmät

Atsovärien analysointimenetelmät voidaan jakaa kvantitatiivisiin ja kvalitatiivisiin menetelmiin.⁹³ Edellisessä määritetään väriaineiden pitoisuuksia, jälkimmäisessä arvioidaan tuloksena olevaa väriä joko instrumentaalisin analyysitekniikoin tai silmämääräisesti.

Kvantitatiivisten menetelmien tarkoituksena on kuluttajien turvallisuuden varmistamiseksi valvoa väriaineiden pitoisuuksia näytteissä, kvalitatiivisten menetelmien tarkoituksena on puolestaan tunnistaa väriaineita näytteistä.

2.5.2.1 Kvantitatiiviset analysointimenetelmät

Yksittäisten atsovärien pitoisuuksien määrittämiseen voidaan käyttää orgaanisen kemian yleisiä analysointimenetelmiä.⁹⁴ Tällaisia menetelmiä ovat esimerkiksi gravimetria sekä titrimetria.

Atsovärien pitoisuuksien määrittämiseen voidaan vaihtoehtoisesti käyttää myös uudenaikaisempaa instrumenttianalytiikkaa. Tarkoitukseen sopivia ja yleisimmin hyödynnettyjä instrumenttianalytiikan menetelmiä ovat erityisesti spektrometriset menetelmät, kuten spektrofotometria (UV-Vis),^{84,85,86,87,95} sekä elektroanalyttiset menetelmät, kuten differentiaalipulssi- (DPV)⁹⁶ ja neliöaaltovoltammetria (LSV).⁹⁷

Sekä voltammetrian että spektrofotometrian edut suhteessa perinteisiin analysointimenetelmiin ovat nopeus sekä tehokkuus, minkä lisäksi tarvittava näytemäärä on pienempi.⁸⁶ Varsinkin spektrofotometria on kuitenkin puutteellinen tutkittaessa useita eri väriaineita sisältäviä näytteitä johtuen väriaineiden spektrien absorptiohuippujen päällekkäisyyksistä, mistä johtuen analysoitava väriaine on yleensä eristettävä muista väriaineista. Viime vuosina on kuitenkin kehitetty esimerkiksi kiinteäfaasispektrometriaan perustuvia menetelmiä, jotka mahdollistavat väriaineiden määrittämisen seoksesta.^{95,98} Saadun tutkimusaineiston tulkinnassa voidaan tällöin hyödyntää esimerkiksi PLS ja PCR - regressiota. Väriaineille saatavien virta-jännite -käyrien mahdolliset päällekkäisyydet rajoittavat monesti myös voltammetrian käyttöä, kun tutkitaan useampaa kuin kahta eri väriainetta sisältävää näytettä.^{96,99} Saadun tutkimusaineiston tulkinnassa voidaan tosin hyödyntää esimerkiksi PLS- ja PNS -regressiota.

Atsovärien pitoisuuksien määrittämiseen voidaan käyttää myös massaspektrometriaa (MS).^{81,82} Sen etuna suhteessa spektrofotometriaan on menetelmän suurempi tarkkuus, minkä lisäksi esimerkiksi tarvittava näytemäärä on pienempi.⁸⁵ Massaspektrometria on kuitenkin kallis analysointimenetelmä.⁸⁸

Uusinta teknologiaa edustavat digitaaliset menetelmät, kuten digitaaliprosessointi yhdistettynä esimerkiksi korkean erotuskyvyn ohutkerroskromatografiaan.^{80,100} Digitaaliprosessointiin voidaan käyttää tasoskanneria. Menetelmän hyviä puolia ovat esimerkiksi sen edullisuus sekä nopeus. Skannatut kuvat on myös mahdollista tallentaa useassa eri formaatissa niiden myöhempää analysointia varten.¹⁰⁰

2.5.2.2 Kvalitatiiviset analysointimenetelmät

Arvioitaessa analysoitavan näytteen väriä sitä verrataan standardinäytteeseen tai väriatlakseen.⁹³ Kun analysoitavan näytteen väriä arvioidaan silmämääräisesti, on otettava huomioon, että näkemämme ”väri” on subjektiivinen kokemus.⁸⁹ Näytteen väriä voidaan arvioida myös instrumentaalisesti jonkin väriavaruuden, kuten CIELABin tai CIELUVin avulla.^{101,102}

Näytteen sisältämän väriaineen tai väriaineiden tunnistamiseen voidaan puolestaan käyttää esimerkiksi paperi-⁹⁰ tai ohutkerroskromatografiaa (TLC)^{89,103} yhdistettynä mahdollisesti spektrofotometriaan. Ohutkerroskromatografia on paperikromatografiaa huomattavasti nopeampi ja tarkempi menetelmä väriaineita määrittäessä.¹⁰³ Näytteen sisältämät väriaineet voidaan myös vaihtoehtoisesti erottaa nestekromatografian avulla, minkä jälkeen ne määritetään spektrofotometrisesti.¹⁰⁴

2.6 Käyttökohteet

Atsovärejä käytetään muun muassa elintarvikkeiden, lääkkeiden, kosmetiikan, tekstiilien, nahan, paperin, kumin, tiettyjen muovien ja mikrobiologisten näytteiden värjäämiseen sekä tulostinmusteissa.^{9,10,11} Käyttökohteen valintaan vaikuttavat esimerkiksi väriaineen liukoisuus eri liuottimiin, sen sitoutumisaffiniteetti värjättävään materiaaliin sekä väriaineen mahdolliset terveysvaikutukset. Väriaineiden luokittelu eri väriaineryhmiin kemiallisen rakenteen ja sitoutumistavan perusteella on avuksi, kun valitaan värjättävälle materiaalille sopivaa väriainetta (ks. luku 2.2).³⁶

Dispersiovärejä käytetään erityisesti nailonin, polyestereiden ja muiden synteettisten kuitujen sekä muovien värjäämiseen.³⁶ Emäksisiä värejä käytetään varsinkin paperin sekä erilaisten tekstiilien, kuten nailonin ja polyesterien värjäämiseen sekä tulostinmusteissa,³⁶ kun taas kationisia värejä polyakryyliin värjäämiseen.³⁸ Happovärejä käytetään puolestaan elintarvikeväreinä ja pH-indikaattoreina sekä varsinkin paperin, nahan, silkin, villan⁴⁶ ja nailonin värjäämiseen.^{36,45} Kehitysvärejä käytetään erityisesti puuvillan ja viskoosin värjäämiseen.³⁶ Liuotinvärejä käytetään esimerkiksi muovien, orgaanisten liuottimien, polttoaineiden,⁵³ vahan, voiteluöljyjen sekä muiden poolittomien hiilivetypohjaisten materiaalien värjäämiseen sekä tulostinmusteissa.³⁶ Metallikompleksivärejä käytetään

nailonin ja villan värjäämiseen sekä esimerkiksi erilaisissa optisissa instrumenteissa^{54,55} ja peittävärejä erityisesti nahan sekä villan⁵⁹ värjäämiseen.³⁶ Pigmenttivärejä käytetään esimerkiksi maaleissa ja tulostinmusteissa sekä synteettisten kuitujen ja muovien värjäämiseen.^{36,62} Reaktiovärejä ja suoravärejä käytetään puolestaan pääasiassa nailonin ja puuvillan värjäämiseen.^{36,66} Reaktiovärejä käytetään myös silkin ja villan värjäämiseen sekä esimerkiksi tekstiilipainatuksessa.¹⁰⁵ Suoravärejä käytetään myös nahan ja paperin värjäämiseen²² sekä esimerkiksi pH-indikaattoreina¹⁰⁶ ja mikrobiologisten näytteiden värjäykseen.¹⁰⁷

3 Elintarvikevärit

3.1 Luokittelu valmistustavan mukaan

Elintarvikkeissa käytettävät väriaineet jaetaan valmistustapansa mukaan synteettisiin orgaanisiin yhdisteisiin, luontaisiin pigmentteihin ja epäorgaanisiin yhdisteisiin.¹⁰⁸ Synteettisiä orgaanisia yhdisteitä valmistetaan kemiallisin menetelmin. Ne ovat kemialliselta rakenteeltaan erilaisia kuin luonnossa esiintyvät värit. Luontaisia pigmenttejä saadaan tavallisesti uuttamalla kasvi- tai eläinperäisestä raaka-aineesta, joitakin valmistetaan myös kemiallisesti. Tällöin saadaan väri, joka on kemialliselta rakenteeltaan luonnonvärin kaltainen.

Elintarvikeväreistä sokerikulöörit sekä klorofyllikuparikompleksit eivät kuulu mihinkään edellä mainituista luokista, vaan ne ovat osittain synteettisiä värejä.¹⁰⁸

Synteettiset värit voidaan jakaa atso-, indigo-, kinofaloni-, ksanteeni- sekä triaryylimetaaniväreihin.⁸⁵ Niihin kuuluu myös elintarvikevärejä.

3.2 Atsovärit elintarvikelisiä aineina ja -väreinä

Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksen (EY) N:o 1333/2008 3 artiklan 2 kohdan mukaan *”elintarvikelisiä aineella”* tarkoitetaan ainetta, jota ei tavanomaisesti sellaisenaan käytetä elintarvikkeena ja jota ei tavanomaisesti käytetä elintarvikkeelle ominaisena ainesosana riippumatta siitä, onko elintarvikelisiä aineella ravitsevuksellista arvoa, ja jonka lisääminen elintarvikkeeseen... ”¹⁰⁹

Kyseisen asetuksen 8 artiklan mukaan elintarvikelisiä aineita voidaan sisällyttää lisäaineryhmään ”väriaineet”, jos *”sillä on jokin seuraavista tarkoituksista:*

- a) alkuperäisen ulkonäön palauttaminen elintarvikkeeseen, jonka väri on muuttunut prosessoinnissa, varastoinnissa, pakkaamisessa tai jakelussa, minkä yhteydessä sen ulkoinen hyväksyttävyyden on voinut heikentyä;*
- b) houkuttelevamman ulkonäön antaminen elintarvikkeelle;*
- c) värin antaminen muutoin värittömälle elintarvikkeelle.”*¹⁰⁹

4 Elintarvikkeissa sallitut atsovärit Suomessa

Suomessa elintarvikkeiden lisäaineina sallittuja atsovärejä ovat tartratsiini (E102), paraoranssi (E110), atsorubiini eli karmosiini (E 122), amarantti (E 123), uuskokkiini (E 124), alluranpunainen AC (E 129), briljanttimusta BN (E 151), ruskea FK (E 154), ruskea HT (E 155) sekä litolirubiini BK (E 180).¹¹⁰

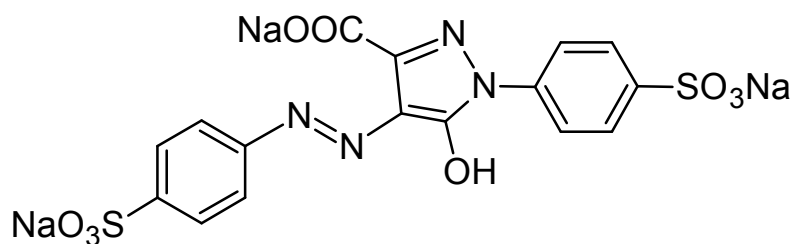
Kullakin atsovärillä on yksilöllinen E-numero eli E-koodi, joka auttaa kuluttajaa kyseisen värin tunnistamisessa.¹¹¹ E-kirjain numeron edessä merkitsee, että Euroopan unioni on arvioinut kyseisen lisäaineen turvalliseksi elintarvikkeiden käyttöön.

4.1 Tartratsiini

Tartratsiini (trinatrium-5-hydroksi-1-(4-sulfonaattifenylyli)-4-(4-sulfonaattifenylylatso)-H-pyratsoli-3-karboksyylaatti) on sitruunankeltainen pyratsoloni- ja monoatsoväri.^{110, 112,113} Se kuuluu happoväreihin.¹¹⁴

Tartratsiinia valmistetaan kytkemällä diatsotoitu 4-aminobentseenisulfonihappo eli sulfaniilihappo 4,5-dihydro-5-okso-1-(4-sulfofenyyli)-1H-pyratsoli-3-karboksylihappoon tai sen metyyliesteriin, etyyliesteriin tai suolaan ja muuntamalla reaktiotuote trinatriumsuolaksi.¹¹² H. Ziegler valmisti tartratsiinia ensimmäistä kertaa vuonna 1884.^{26,114}

Tartratsiinia saa käyttää muun muassa maustettujen sulatejuustojen ja viinien, kala- ja äyriäisvalmisteiden sekä tölkitettyjen herneiden värjäämiseen.¹⁰⁹ Sitä käytetään myös kosmetiikan, lääkkeiden, pesuaineiden sekä villan värjäämiseen.¹¹⁵



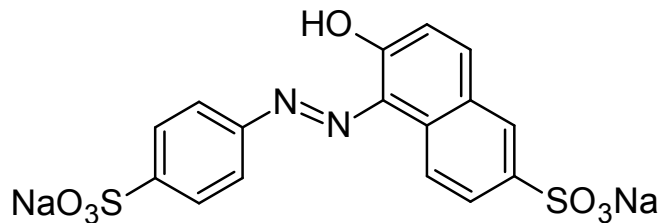
Kuva 4. Tartratsiinin rakennekaava.

4.2 Paraoranssi

Paraoranssi (dinatrium-2-hydroksi-1-(4-sulfonaattifenylylatso)-6-naftaleenisulfonaatti) on oranssinpunainen monoatsoväri.^{110,112} Se kuuluu happoväreihin.¹¹⁶

Paraoranssia valmistetaan kytkemällä diatsotoitu 4-aminobentseenisulfonihappo eli sulfaniilihappo 6-hydroksi-2-naftaleenisulfonihappoon ja muuntamalla reaktiotuote dinatriumsuolaksi.¹¹² J. P. Griess valmisti paraoranssia ensi kertaa vuonna 1878.⁴⁸

Paraoranssia saa käyttää muun muassa hillojen ja marmeladien, kala- ja äyriäisvalmisteiden, maustettujen sulatejuustojen sekä viinien värjäämiseen.¹⁰⁹ Sen muita käyttökohteita ovat esimerkiksi kosmetiikka ja lääkkeet.¹¹⁷



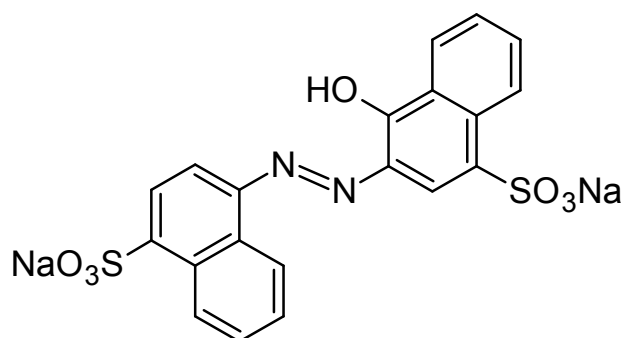
Kuva 5. Paraoranssin rakennekaava.

4.3 Atsorubiini eli karmosiini

Atsorubiini eli karmosiini (dinatrium-4-hydroksi-3-(4-sulfonaatti-1-naftyyliatso)-1-naftaleenisulfonaatti) on punainen monoatsoväri.^{110,112} Se kuuluu happoväreihin.¹¹⁸

Atsorubiinia valmistetaan kytkemällä diatsotoitu 4-amino-1-naftaleenisulfonihappo eli naftionihappo 4-hydroksinaftaleenisulfonihappoon ja muuntamalla reaktiotuote dinatriumsuolaksi.¹¹² O. N. Witt valmisti atsorubiinia ensi kertaa vuonna 1883.¹¹⁸

Atsorubiinia saa käyttää muun muassa hedelmäsäilykkeiden, kala- ja äyriäisvalmisteiden sekä maustettujen sulatejuustojen ja viinien värjäämiseen.¹⁰⁹ Sitä käytetään myös esimerkiksi kosmetiikassa sekä villan, nahan ja puun värjäämiseen.^{119,120}



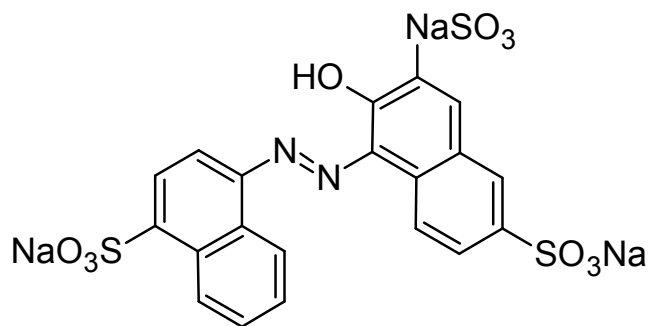
Kuva 6. Atsorubiinin rakennekaava.

4.4 Amarantti

Amarantti (trinitrium-2-hydroksi-1-(4-sulfonaatti-1-naftyyliatso)-3,6-naftaleenidisulfonaatti) on punainen monoatsoväri.^{110,112} Se kuuluu happoväreihin.¹²¹

Amaranttia valmistetaan kytkemällä diatsotoitu 4-amino-1-naftaleenisulfonihappo eli naftionihappo 3-hydroksi-2,7-naftaleenidisulfonihappoon eli R-happoon ja muuntamalla reaktiotuote trinitriumsuolaksi.¹¹² H. Baum valmisti amaranttia ensi kertaa vuonna 1878.¹²¹

Amaranttia saa käyttää kalanmädin, maustettujen viinien sekä muiden alkoholijuomien värjäämiseen.¹⁰⁹ Sen muita käyttökohteita ovat esimerkiksi kosmetiikka sekä tekstiilien, paperin ja nahan värjääminen.^{99,119}



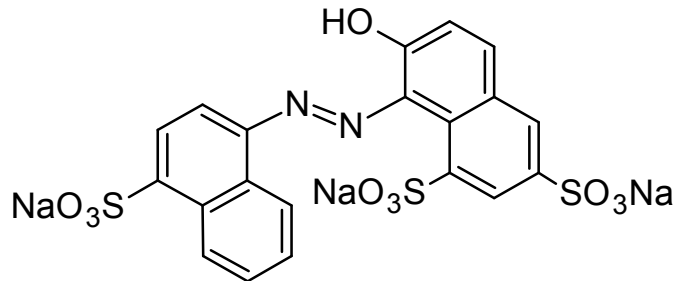
Kuva 7. Amarantin rakennekaava.

4.5 Uuskokkiini

Uuskokkiini (trinitrium-2-hydroksi-1-(4-sulfonaatti-1-naftyyliatso)-6,8-naftaleenidisulfonaatti) on purppuranpunainen monoatsoväri.^{110,112} Se kuuluu happoväreihin.¹²²

Uuskokkiinia valmistetaan kytkemällä diatsotoitu 4-amino-1-naftaleenisulfonihappo eli naftionihappo 2-naftoli-6,8-disulfonihappoon eli G-happoon ja muuntamalla reaktiotuote trinitriumsuolaksi.¹¹² H. Baum valmisti uuskokkiinia ensi kertaa vuonna 1878.¹²²

Uuskokkiinia saa käyttää muun muassa hedelmäsäilykkeiden, hillojen ja marmeladien, kala- ja äyriäisvalmisteiden, makkaroiden, maustettujen sulatejuustojen sekä viinien värjäämiseen.¹⁰⁹ Sen muita käyttökohteita ovat esimerkiksi kosmetiikka ja lääkkeet.¹²³



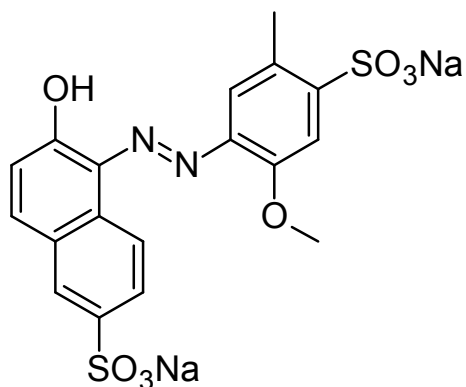
Kuva 8. Uuskokkiinin rakennekaava.

4.6 Alluranpunainen AC

Alluranpunainen AC (dinatrium-2-hydroksi-1-(2-metoksi-5-metyyli-4-sulfonaattifenyylatso)-6-naftaleenisulfonaatti) on tummanpunainen monoatsoväri.^{110,112} Se kuuluu happoväreihin.¹²⁴

Alluranpunaista valmistetaan kytkemällä diatsotoitu 5-amino-4-metoksi-2-tolueenisulfonihappo 6-hydroksi-2-naftaleenisulfonihappoon ja muuntamalla reaktiotuote dinatriumsuolaksi.¹¹² G. E. Rast ja R. I. Steiner valmistivat alluranpunaista ensimmäistä kertaa vuonna 1967.¹²⁵

Alluranpunaista saa käyttää muun muassa hedelmäsäilykkeiden, esikypsennettyjen äyriäisten makkaroiden sekä maustettujen viinien värjäämiseen.¹⁰⁹ Sen muita käyttökohteita ovat esimerkiksi kosmetiikka ja lääkkeet.¹²⁶



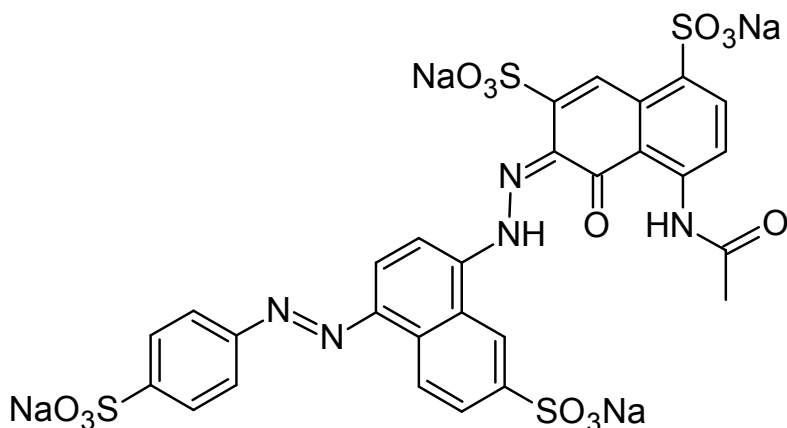
Kuva 9. Alluranpunaisen rakennekaava.

4.7 Briljanttimusta BN

Briljanttimusta BN (tetranatrium-4-asetamido-5-hydroksi-6-[7-sulfonaatti-4-(4-sulfonaattifenyylitso)-1-naftyylitso]-1,7-naftaleenidisulfonaatti) on musta diatsoväri.^{110,112} Se kuuluu happoväreihin.¹²⁷

Briljanttimustaa valmistetaan kytkemällä diatsotoitu 4-aminobentseenisulfonihappo eli sulfaniilihappo 8-amino-2-naftaleenisulfonihappoon ja edelleen 4-asetamido-5-hydroksi-1,7-naftaleenidisulfonihappoon. Tämän jälkeen reaktiotuote muunnetaan tetranatriumsuolaksi.^{112,127}

Briljanttimustaa saa käyttää muun muassa kala- ja äyriäisvalmisteiden värjäämiseen.¹⁰⁹ Sitä käytetään myös esimerkiksi solunäytteiden värjäämiseen.¹²⁸



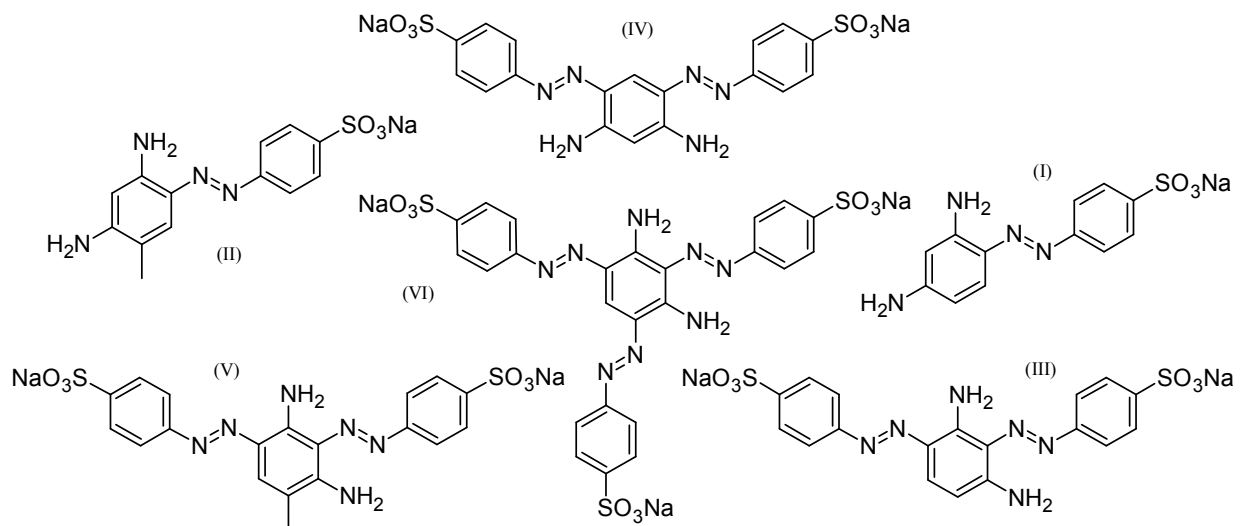
Kuva 10. Briljanttimustan rakennekaava.

4.8 Ruskea FK

Ruskea FK on ruskea kuuden mono-, di- ja triatsovärin seos. Seoksen atsovärit kuuluvat happoväreihin.¹¹⁰

Ruskea FK:ta valmistetaan kytkemällä diatsotoitu 4-aminobentseenisulfonihappo eli sulfaniilihappo 1,3-diaminobentseenin eli 3-fenyleenidiamiinin ja 2,4-diaminotolueenin eli 2,4-tolueenidiamiinin seokseen. Tämän jälkeen reaktiotuotteet muunnetaan eriasteisiksi natriumsuoloiksi.^{110,129}

Ruskea FK:ta saa käyttää savusillien värjämiseen.¹³⁰



(I) natrium-4-(2,4-diaminofenyylatso)bentseenisulfonaatti, (II) natrium-4-(4,6-diamino-m-tolyylatso)bentseenisulfonaatti, (III) dinatrium-4,4'-(4,6-diamino-1,3-fenyleenibisatso)di(bentseenisulfonaatti), (IV) dinatrium-4,4'-(2,4-diamino-1,3-fenyleenibisatso)di(bentseenisulfonaatti), (V) dinatrium-4,4'-(2,4-diamino-5-metyyli-1,3-fenyleenibisatso)di(bentseenisulfonaatti), (VI) trinatrium-4,4',4''-(2,4-diaminobentseeni-1,3,5-trisatso)tri(bentseenisulfonaatti)

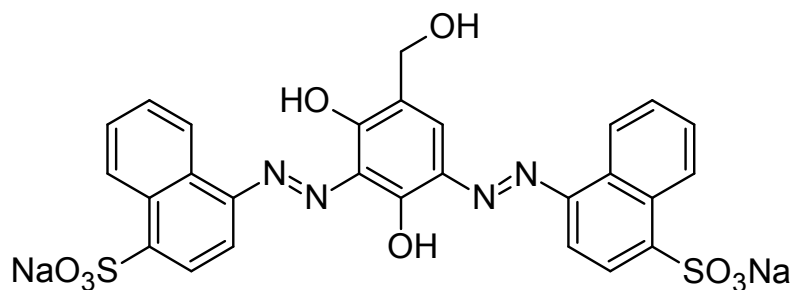
Kuva 11. Ruskea FK:n seoksessa esiintyvien yhdisteiden rakennekaavat ja nimet.

4.9 Ruskea HT

Ruskea HT (dinatrium-4,4'-(2,4-dihydroksi-5-hydroksimetyyli-1,3-fenyleenibisatso)di(1-naftaleenisulfonaatti) on ruskea diatsoväri.^{110,112} Se kuuluu happoväreihin.¹³¹

Ruskea HT:ta valmistetaan kytkemällä diatsotoitu 4-amino-1-naftaleenisulfonihappo eli naftionihappo 4-(hydroksimetyyli)-1,3-bentseenidioliin. Tämän jälkeen reaktiotuote muunnetaan dinatriumsuolaksi.^{112,131}

Ruskea HT:ta saa käyttää muun muassa esikypsennettyjen äyriäisten värjäämiseen.¹⁰⁹



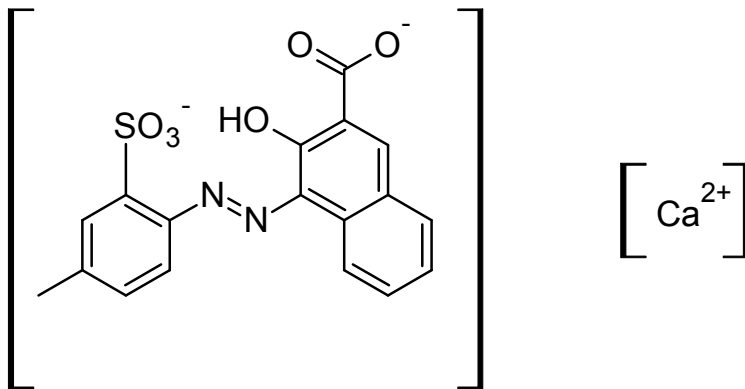
Kuva 12. Ruskea HT:n rakennekaava.

4.10 Litolirubiini BK

Litolirubiini BK (kalsium-3-hydroksi-4-(4-metyyli-2-sulfonaattifenyyliaatso)-2-naftaleenikarboksylaatti) on tummanpunainen monoatsoväri.^{110,112} Se luetaan dispersioväreihin ja pigmenttiväreihin toisin kuin muut Suomessa elintarvikkeissa sallitut atsovärit.¹³²

Litolirubiinia valmistetaan kytkemällä diatsotoitu 2-amino-5-metyylibentseenisulfonihappo 3-hydroksi-2-naftaleenikarboksylihappoon, minkä jälkeen reaktiotuote muunnetaan kalsiumsuolaksi.¹¹² R. Gley ja O. Siebert valmistivat litolirubiinia ensimmäistä kertaa vuonna 1903.¹³²

Litolirubiinia saa käyttää juuston kuorien värjäämiseen.¹⁰⁹ Sitä käytetään myös tulostinmusteissa sekä kosmetiikassa, kuten huulipunissa ja kynsilakoissa.^{88,133}



Kuva 13. Litolarubiinin rakennekaava.

5 Elintarvikkeissa käytettävien atsovärien terveys- ja ympäristövaikutukset ja niiden rajoittaminen

5.1 Terveysvaikutukset

5.1.1 Genotoksiset vaikutukset

Suoliston mikro-organismien tiedetään hajottavan useita vesiliukoisia atsovärejä in vitro ja in vivo.^{9,10,134} Osa näistä atsoväreistä ja niiden hajoamistuotteista, muun muassa aromaattiset amiinit, ovat luonteeltaan genotoksisia, eli niillä on taipumus vahingoittaa DNA:ta.

Genotoksisuus voidaan jakaa mutageenisuuteen, karsinogeenisuuteen ja teratogeenisuuteen.¹³⁵ Mutageeniset aineet aiheuttavat DNA-mutaatioita, minkä lisäksi monet niistä ovat myös karsinogeenisiä, jolloin ne altistavat myös syövälle. Teratogeeniset aineet aiheuttavat sikiölle epämuodostumia.

Elintarvikkeissa sallitut atsovärit, tartratsiini, amarantti, paraoranssi ja alluranpunainen eivät ole mutageenisia *Salmonella typhimurium*- bakteereilla tehtyjen tutkimusten mukaan in vitro.^{10,136,137,138} Myöskään uuskokkiini, atsorubiini sekä litolirubiini sekä ruskea FK eivät ole vastaavien tutkimusten mukaan mutageenisia in vitro.^{139,140}

Elintarvikkeissa sallituista atsoväreistä briljanttimusta BN on sen sijaan osoittautunut mutageeniseksi ihmisen lymfosyyteille in vitro ja härkápavun (*Vicia faba*) juuren kärjen meristeemisoluille in vivo.¹⁴¹ Myös paraoranssin ja amarantin aineenvaihduntatuotteiden, 1-amino-2-naftoli-4-sulfonihapon sekä 1-amino-2-naftolivetykloridin, on todettu olevan genotoksisia in vitro *Escherichia coli* ja *S. typhimurium* -bakteereilla tehdyssä tutkimuksissa.¹³⁴

Amarantti on eläinkokeissa osoittautunut teratogeeniseksi rotille.¹⁴²

5.1.2 Yliherkkyysoireet

Elintarvikkeissa sallituista atsoväreistä haitallisin on tartratsiini. Sen aiheuttamia yleisimpiä yliherkkyysoireita ovat tutkimusten mukaan kutina, nokkosihottuma, turvotus, allerginen nuha sekä astma.^{143,144} Yliherkkyysoireiden yleisyys on tutkimuksissa vaihdellut 0,6 -3,8 % välillä tutkituista koehenkilöistä. Elintarvikkeissa käytettävistä atsoväreistä myös paraoranssilla, amarantilla, uuskokkiinilla ja alluranpunaisella on havaittu olevan samankaltaisia terveysvaikutuksia.^{145,146,147}

Elintarvikkeiden atsovärien aiheuttamat yliherkkyysoireet eivät ilmeisesti ole immunoglobuliini E (IgE) -välitteisiä toisin kuin varsinaisissa allergioissa.¹⁴⁸ Tartratsiinin ei ole todettu aiheuttavan histamiinin vapautumista ihmisen syöttösoluista in vitro.¹⁴⁹

5.1.3 Neuropsykologiset oireet

Elintarvikkeissa sallituista atsoväreistä tartratsiinin ja paraoranssin on todettu aiheuttavan pahentuneita oireita yli 60%:lle 2-14 -vuotiaista aktiivisuuden ja tarkkaavaisuuden häiriötä (ADHD) potevista lapsista.^{150,151} Tyypillisimpiä havaittuja oireita ovat olleet levottomuus, ärtyneisyys sekä unihäiriöt. Amarantilla ei ole todettu olevan vastaavia terveysvaikutuksia.

Elintarvikkeissa sallittujen atsovärien seosten (tartratsiini, uuskokkiini, paraoranssi, atsorubiini sekä alluranpunainen) vaikutusta 3 sekä 8-9 -vuotiaiden lasten käyttäytymiseen on tutkittu Iso-Britanniassa koskien koko ikäluokkaa.^{152,153} Vuosina 2004 (n=277) ja 2007 (n=297) tehdyissä noin kuukauden kestäneissä, laajaotoksisissa tutkimuksissa havaittiin atsoväreillä olevan edellä mainittuja terveysvaikutuksia myös terveisiin lapsiin.

Tartratsiinin on todettu aiheuttavan päänsärkyä 27%:lle ja väsymystä 20%:lle kroonista väsymysoireyhtymää sairastavista 5-85 -vuotiaista henkilöistä.¹⁴⁸ Tutkimukseen osallistui 495 henkilöä, joista yli 50% oli 20-45 -vuotiaita.

Tartratsiinin on eläinkokeissa havaittu heikentävän hiirten muistia ja oppimista.¹⁵⁴ Rotilla havaittuja oireita ovat puolestaan olleet ahdistuneisuus, masennus, ylivilkkaus sekä epäsosiaalinen käytös.¹⁵⁵

Syyksi atsovärien neuropsykologisiin vaikutuksiin on esitetty niiden kykyä muodostaa metallikompleksiyhdisteitä yhdessä elimistön sinkin (Zn^{2+}) kanssa.¹⁵¹ Tartratsiinin ja paraoranssin on havaittu alentavan ADHD:ta sairastavien lasten veren sinkkipitoisuutta.

5.2 Ympäristövaikutukset

Teollisuuden jätevesien mukana ympäristöön päätyvillä väriaineilla, kuten atsoväreillä, on myös ympäristöön liittyviä haittavaikutuksia.¹⁵⁶ Ne aiheuttavat esimerkiksi esteettistä haittaa, minkä lisäksi ne muun muassa häiritsevät vesieliöstön fotosynteesiä. Kemiallisen rakenteensa ansiosta varsinkin synteettiset väriaineet ovat suhteellisen pysyviä.¹⁵⁷ Erityisesti happo- ja reaktiovärien poistaminen jätevesistä on ongelmallista niiden vesiliukoisuuden vuoksi, mistä johtuen perinteiset puhdistusmenetelmät eivät ole tehokkaita.¹⁵⁸

5.3 Terveys- ja ympäristövaikutusten rajoittaminen

5.3.1 Lainsäädäntö ja valvonta

Elintarvikkeissa sallittujen lisäaineiden, mukaan lukien atsovärien, käyttöä säätelevät Suomessa ja muissa Euroopan unionin jäsenvaltioissa kansalliset lait, joita EU-lainsäädäntö yhtenäistää.⁵ Näistä tärkeimpiä ovat Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1333/2008 elintarvikelisiä aineista¹⁰⁹ sekä sitä täydentävät komission asetus (EU) N:o 231/2012 Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksen (EY) N:o 1333/2008 liitteissä II ja III lueteltujen elintarvikelisiä aineiden eritelmien vahvistamisesta¹¹² ja komission direktiivi 2008/128/EY elintarvikkeissa sallittujen väriaineiden erityisistä puhtausvaatimuksista.¹¹⁰

Euroopan parlamentin ja neuvoston asetuksessa (EY) N:o 1333/2008 säädetään yhteisössä hyväksytyjen elintarvikelisiä aineiden luetteloista, ehdoista, jotka koskevat elintarvikelisiä aineiden käyttöä elintarvikkeissa sekä sellaisinaan myytävien elintarvikelisiä aineiden pakkausmerkintöjä (mukaan lukien E-numerot) koskevista säännöistä.¹⁰⁹ Uuden asetuksen 24. artiklassa säädetään myös, että elintarvikkeen pakkaukseen on tehtävä merkintä, ”värin/värien nimi tai E-numero: voi vaikuttaa haitallisesti lasten aktiivisuustasoon ja heikentää tarkkaavaisuutta”, jos elintarvikkeessa on käytetty, jotain seuraavista elintarvikkeistä: tartratsiini (E 102), kinoliinikeltainen (E 104), paraoranssi (E 110), atsorubiini (E 122), uuskokkiini (E 124) tai alluranpunainen (E 129).

Elintarvikkeiden lisäaineiden turvallisuutta arvioi EU:ssa Euroopan Elintarviketurvallisuusviranomaisen, EFSA (European Food Safety Authority)¹⁵⁹ ja kansainvälisellä tasolla Maailman elintarvike- ja maatalousjärjestö FAO:n (Food and Agriculture Organisation of the United Nations) ja Maailman terveysjärjestö WHO:n (World Health Organisation) alainen asiantuntijakomitea, JECFA (Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives).^{160,161} Euroopan Elintarviketurvallisuusviranomaisen määrittää kullekin lisäaineelle, kuten elintarvikkeissa sallituille atsoväreille, hyväksyttävän päiväsaannin eli ADI-arvon tieteellisen tutkimusaineiston pohjalta.¹⁶²

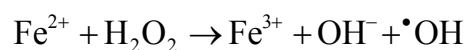
5.3.2 Atsovärien poistaminen jätevesistä

Teollisuuden jätevesissä esiintyvien atsovärien poistaminen voidaan jakaa biologisiin sekä ei-biologisiin eli kemiallisiin, sähkökemiallisiin, fysikaalis-kemiallisiin ja fysikaalisiin menetelmiin, joita käytetään yleensä rinnakkain.¹⁶³ Tämä johtuu siitä, ettei yksikään nykyinen menetelmä pysty sellaisenaan hyödynnettynä poistamaan atsovärejä jätevesistä kustannustehokkaasti.

Atsovärien biologiseen hajottamiseen voidaan käyttää aerobisia¹⁶⁴ tai anaerobisia¹⁶⁵ bakteereja, bakteerientsyymejä,¹⁶⁶ sieniä, kuten valkolahottajia,¹⁶⁷ homeita¹⁶⁸ tai esimerkiksi leviä.¹⁶⁹ Eri mikrobien entsyymit hajottavat tehokkaasti eri atsovärejä, minkä vuoksi atsovärien hajottamiseen käytetään yleensä yksittäisten mikrobiviljelmien sijasta rakeista lietepetiä, joka on usean eri mikrobin seos.¹⁷⁰ Atsovärien biologisen hajottamisen etuna on menetelmän edullisuus, minkä lisäksi prosessissa ei myöskään synny myrkyllistä kemikaalijätettä.¹⁷¹

Atsovärien käsittely anaerobisissa olosuhteissa on tehokkaampaa kuin aerobisissa olosuhteissa.¹¹ Tämä johtuu oletettavasti siitä, että happi on atsovärejä voimakkaampi elektroniakseptori. Anaerobisissa olosuhteissa pelkistymisen kautta tapahtuva hajoaminen ei kuitenkaan yleensä ole täydellistä.¹⁷² Jäljelle jää lähes aina aromaattisia amiineja.

Atsovärien anaerobisessa käsittelyssä jäljellejääneet amiinit voidaan mineralisoida esimerkiksi otsonin tai Fentonin reagenssin avulla.^{173,174} Fentonin reagenssi on voimakas hapetin, jonka vaikutus perustuu vetyperoksidin ja rauta(II) -ionin reaktioon:



Reaktiossa muodostuu hydroksyyli-radikaaleja, jotka hapettavat orgaaniset yhdisteet alifaattisiksi hapoiksi, hiilidioksidiksi ja vedeksi. Fenton-prosessin etuna on sen tehokkuus ja halpuus, mutta siinä muodostuu runsaasti sekä saastunutta lietettä että happamia jätevesiä.¹⁷⁵ Anaerobisessa käsittelyssä jäljellejääneet aromaattiset amiinit voidaan vaihtoehtoisesti mineralisoida hapettamalla ne aerobisissa olosuhteissa.^{156,171}

Atsovärien termofiilistä hajottamista ei ole juuri tutkittu, vaikka suuri osa teollisuuden jätevesistä puretaan korkeissa lämpötiloissa (40–70 °C).¹⁶⁵ Alustavien tutkimustulosten mukaan se on kuitenkin kyseisissä olosuhteissa tehokkaampaa.

Atsovärien kemiallinen hapettaminen voidaan suorittaa esimerkiksi otsonin (O_3),¹⁷⁶ permanganaatin (MnO_4^-)¹⁷⁷ tai vetyperoksidin (H_2O_2)¹⁷⁸ avulla, joista tehokkain on otsoni. Otsoni soveltuu tehokkaasti esimerkiksi emäksisten ja kationisten värien, happo-, peitta-, reaktio- sekä suoravärien poistoon muttei kuitenkaan dispersiovärien poistoon.¹⁶³ Sen etuna on myös se, ettei myrkyllistä kemikaalijätettä tai lietettä synny.¹⁷⁶

Perinteisen otsonoinnin huonon kustannus-hyötysuhteen ja mittavien investointikustannusten vuoksi on kehitetty edistyneempiä hapetusmenetelmiä, eli AOP -menetelmiä (Advanced Oxidation Process).^{174,175,178} Näissä menetelmissä käytetään hapettimena usein otsonia (O_3), vetyperoksidia (H_2O_2) tai happea (O_2) ja reaktiota tehostetaan katalyytillä (esimerkiksi Fe^{2+} , TiO_2 ja ZnO tai näiden yhdistelmillä) sekä mahdollisesti UV-säteilytyksellä.

Atsovärien kemiallinen hapettuminen tapahtuu siten, että hydroksyyli-radikaali liittyy kromoforiseen atsoryhmään, jolloin kaksoissidos purkautuu.²³

Atsovärien poistoon käytettäviä sähkökemiallisia menetelmiä ovat sähkökemiallinen flokkulaatio eli elektrokoagulaatio,¹⁷⁹ sähkökemiallinen pelkistys ja hapetus (metallioksidit, Pt-, ja Ti -elektrodit, booripinnoitteiset timanttielektrodit, hiilikuituelektrodit jne.),¹⁸⁰ epäsuora sähköhapetus vahvojen hapettimien (kloori tai elektro-Fenton) avulla¹⁸¹ sekä valoavusteiset sähkökemialliset menetelmät, kuten fotoelektro-Fenton.¹⁸² Menetelmiä ei kuitenkaan ole juuri sovellettu teollisesti muun muassa niiden puutteellisen hajotustehon vuoksi.³⁵

Fysikaalis-kemiallisissa menetelmissä epäorgaanisten suolojen, kuten esimerkiksi alumiini- tai rauta(III) -suolojen, avulla muodostetaan väriainesaostumia eli flokkeja, jotka erotetaan sedimentoimalla tai suodattamalla.^{183,184} Tätä kutsutaan myös koagulaatio-flokkulaatio -prosessiksi. Koagulaatio-flokkulaation avulla pystytään poistamaan tehokkaasti dispersiovärejä (esimerkiksi litolirubiini BK).¹⁶³ Se ei kuitenkaan sovellu hyvin

esimerkiksi emäksisten ja kationisten värien, happovärien, peittävien, reaktiovärien eikä suoravärien poistoon. Lisäksi prosessissa syntyy runsaasti kemikaalijätettä ja saastunutta lietettä.^{183,184}

Atsovärien poistoon käytettäviä fysikaalisia menetelmiä ovat muun muassa mikro-, nano- ja ultrasuodatus sekä käänteisosmoosi.^{163,185} Näistä mikrosuodatus soveltuu hyvin dispersiovärien ja kehitysvärien poistamiseen, kun taas nanosuodatus kaikkien väriaineryhmien poistamiseen. Ultrasuodatus soveltuu erityisesti dispersiovärien, muttei kuitenkaan emäksisten, happo-, reaktio- ja suoravärien poistamiseen. Edellä mainittujen menetelmien, varsinkin käänteisosmoosin, haittana ovat kuitenkin esimerkiksi muodostuva väriliemijäte, suodatinkalvojen tukkeutuminen sekä korkeat investointikulut.

Muita fysikaalisia menetelmiä ovat esimerkiksi adsorptiomenetelmät. Näissä tavallisesti tehokkain ja siten käytetyin adsorbentti on aktiivihiili.¹⁸⁶ Se soveltuu tehokkaasti esimerkiksi emäksisten ja kationisten värien, happovärien sekä peittävien poistoon ja kohtalaisesti dispersio-, pigmentti-, reaktio- ja suoravärien poistoon.^{163,187} Koska aktiivihiili on kallista, on kuitenkin kehitetty myös edullisempia adsorbenttimateriaaleja.¹⁸⁸ Niitä ovat esimerkiksi ioninvaihtimet,¹⁸⁹ erilaiset savimineraalit,¹⁹⁰ lentotuhka¹⁹¹ sekä turve.¹⁸⁸ Adsorptiomenetelmien etuna on se, ettei niissä juuri synny myrkyllistä kemikaalijätettä eikä lainkaan lietettä.^{157,192} Samaa adsorbenttia voidaan lisäksi käyttää useampaan otteeseen.¹⁹⁰

6 Yhteenveto ja johtopäätökset

Atsovärit ovat aromaattisia orgaanisia väriaineita, joissa on yksi tai useampi kromoforinen atsoryhmä (-N=N-). Kromofori sisältää delokalisoituneita π -elektroneja, jotka virittyessään aikaansaavat yleensä voimakkaan absorption. Atsovärien värillisyyttä johtuu kromoforisesta atsoryhmästä.

Atsovärejä voidaan luokitella niiden kemiallisen rakenteen sekä sitoutumistavan mukaan. Ne voidaan jakaa atsoryhmien lukumäärän mukaan mono-, di-, tri- ja polyatsoväreihin. Atsovärit voidaan lukea myös useisiin väriaineryhmiin, kuten dispersioväreihin, emäksisiin ja kationisiin väreihin, happoväreihin, kehitysväreihin, liuotinväreihin, metallikompleksiväreihin, peittäväreihin, pigmenttiväreihin, reaktio- eli reaktiiviväreihin ja suoraväreihin. Luokittelun perusteena on myös tällöin väriaineen kemiallinen rakenne, esimerkiksi molekyyliin liittyneet sivuryhmät. Ne vaikuttavat edelleen siihen, sitoutuuko väriaine värjättävään materiaaliin hydrofobisten vuorovaikutusten, dispersiovoimien, dipoli-dipoli-, vety-, ioni- vai kovalenttisten sidosten avulla. Esimerkiksi emäksiset ja kationiset värit sekä happovärit sitoutuvat värjättävään materiaaliin ionisidoksiin.

Atsovärejä valmistetaan synteettisesti. Diatsotoitu primäärinen aromaattinen amiini kytketään fenoliin, enoloituvaan alifaattiseen ketoniin tai aromaattiseen amiiniin elektrofiilisessa aromaattisessa substituutiossa.

Atsovärien puhdistamiseen ja konsentroimiseen käytettäviä erotusmenetelmiä ovat puolestaan esimerkiksi erilaiset adsorptio-, haihdutus-, saostus-, suodatus- ja uuttomenetelmät sekä elektroforeettiset ja kromatografiset menetelmät. Elektroforeettisista menetelmistä yleisin on kapillaarielektroforeesi ja kromatografisista menetelmistä erilaiset korkean erotuskyvyn ja käänteisfaasinestekromatografiat.

Atsovärien analysointimenetelmät jaetaan kvantitatiivisiin ja kvalitatiivisiin menetelmiin. Edellisessä määritetään väriaineiden pitoisuuksia, useimmiten spektrometrinen menetelmien, kuten spektrofotometrian, sekä elektroanalyttisten menetelmien, kuten voltametrian avulla. Myös orgaanisen kemian yleisiä analysointimenetelmiä, kuten

titrimetriaa, tai uudenaikaisempia menetelmiä, kuten massaspektrometriaa tai digitaaliprosessointia, voidaan käyttää. Kvalitatiivisissa menetelmissä analysoitavan näytteen väriä arvioidaan joko silmämääräisesti tai instrumentaalisesti. Väriaineiden tunnistamiseen voidaan käyttää esimerkiksi ohutkerros- tai paperikromatografiaa.

Ensimmäinen atsoväri, aniliinikeltainen, keksittiin vuonna 1861. Se kuuluu emäksisiin väreihin sekä liuotinväreihin. Atsovärien varhaisia käyttökohteita olivat tekstiilit ja painotuotteet. Nykyään atsovärejä käytetään myös esimerkiksi elintarvike-, kosmetiikka- ja lääketeollisuudessa.

Atsovärejä on lisätty elintarvikkeisiin jo 1800-luvun loppupuolelta lähtien. Niiden terveysvaikutuksiin alettiin kuitenkin kiinnittää huomiota vasta Yhdysvalloissa 1950-luvulla esiintyneiden myrkytystapausten myötä.

Elintarvikkeissa sallittuja atsovärejä ovat tällä hetkellä Suomessa ja muissa Euroopan unionin jäsenvaltioissa tartratsiini, paraoranssi, atsorubiini, amarantti, uuskokkiini, alluranpunainen AC, briljanttimusta BN, ruskea FK, ruskea HT sekä litolirubiini BK. Ne kuuluvat happoväreihin litolirubiinia lukuun ottamatta, joka luetaan sekä dispersio- että pigmenttiväreihin. Kaikki elintarvikkeiden atsovärit ovat nykyään vesiliukoisia.

Elintarvikkeissa sallittujen atsovärien käyttöä säätelevät kansalliset lait, jotka nojaavat EU-lainsäädäntöön. Elintarvikkeiden atsovärien turvallisuutta arvioi Euroopan unionissa Euroopan Elintarviketurvallisuusviranomainen, EFSA, joka määrittää kullekin väriaineelle turvallisena pidetyn, hyväksyttävän päiväsaannin tieteellisen tutkimusaineiston pohjalta.

Elintarvikkeissa sallituista atsoväreistä haitallisin ihmisen terveydelle on tutkimusten mukaan tartratsiini. Sen yleisimmin havaittuja haittavaikutuksia ovat allergiset oireet, kuten ihottuma ja limakalvojen turvotus, sekä lapsilla neuropsykologiset oireet, kuten ylivilkkaus, unihäiriöt sekä migreeni. Briljanttimusta BN on sen sijaan osoittautunut mutageeniseksi ihmisen lymfosyyteille ja amarantti puolestaan teratogeeniseksi eläinkokeissa.

Atsovärien monikäyttöisyydestä johtuen ei ole selvää, onko niiden pitkäaikaisella nauttimisella haitallisia vaikutuksia koko väestön tasolla. Pelkästään yksi ateria sisältää keskimäärin 12–60 lisäainetta, mistä syystä tähän mennessä tehdyt yksittäistä tai muutamaa väriainetta koskevat tutkimukset eivät selvästikään anna luotettavaa kuvaa lisäaineiden yhteisvaikutuksista.

Atsovärien pitkäaikaisia vaikutuksia aliravittuihin, sairaisiin tai vanhuksiin ei myöskään tunneta kunnolla, sillä kokeelliset tutkimukset on usein tehty terveillä koe-eläimillä, mikrobeilla tai kasveilla. Tutkimukset ovat olleet tämän lisäksi yleensä lyhytkestoisia.

Edellä mainittujen terveysvaikutusten lisäksi atsoväreillä on myös ympäristöön liittyviä haittavaikutuksia. Ne aiheuttavat esteettistä haittaa, minkä lisäksi ne muun muassa häiritsevät vesieliöstön fotosynteesiä joutuessaan vesistöihin teollisuuden jätevesien mukana.

Atsovärien poistaminen jätevesistä voidaan jakaa biologisiin menetelmiin, joissa hyödynnetään aerobisia sekä anaerobisia hajottajamikrobeja, sekä useisiin ei-biologisiin menetelmiin. Ei-biologisia menetelmiä ovat kemialliset menetelmät, kuten otsonointi ja Fenton-prosessi, sähkökemialliset menetelmät, kuten elektrokoagulaatio, sähkökemiallinen pelkistys ja hapetus sekä (foto)elektro-Fenton-prosessi, fysikaalis-kemialliset menetelmät, kuten koagulaatio-flokkulaatio sekä fysikaaliset menetelmät, kuten erilaiset kalvosuodatus- sekä adsorptiomenetelmät. Edellä mainittuja menetelmiä käytetään yleensä rinnakkain, sillä nykyiset menetelmät eivät yksinään pysty poistamaan atsovärejä jätevesistä siten, että se olisi myös taloudellisesti kannattavaa.

Lähteet

1. Skrandies, W. ja Reuther, N. *J. Psychophysiol.* **22** (2008) 175.
2. Spence, C., Levitan, C.A., Shankar, M.U. ja Zampini, M. *Chemosens. Percept.* **3** (2010) 68.
3. Koch, C. ja Koch, E.C. *J. Psychol.* **137** (2003) 233.
4. Ndom, R.J.E., Elegbeleye, A.O. ja Ademoroti, A.O. *IFE Psychologia* **19** (2011) 167.
5. Downham, A. ja Collins, P. *Int. J. Food Sci. Technol.* **35** (2000) 5.
6. Perkin, W.H. *Proc. R. Soc. Lond.* **13** (1863) 170.
7. Mène, C. *C. R. Hebd. Seances Acad. Sci.* **52** (1861) 311.
8. Carliell, C.M., Barclay, S.J., Naidoo, N., Buckley, C.A., Mulholland, D.A. ja Senior, E. *Water SA* **21** (1995) 61.
9. Chung, K.-T., Stevens, S.E. ja Cerniglia, C.E. *Crit. Rev. Microbiol.* **18** (1992) 175.
10. Rafii, F., Hall, J.D. ja Cerniglia, C.E. *Food Chem. Toxicol.* **35** (1997) 897.
11. Stolz, A. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56** (2001) 69.
12. Pliny, the Elder. *Natural History: Libri XII-XVI*, 4. nidos, toim. Rackham, H., Harvard University Press, USA, 1945, s. 232-233.
13. Albala, K. *Cooking in Europe, 1250-1650*, Greenwood Press, USA, 2006, s. 4.
14. McKone, H.T. *Bull. Hist. Chem.* **10** (1991) 25.
15. Hofmann, A.W. *Proc. R. Soc. Lond.* **12** (1862) 2.
16. Griess, P. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **11** (1878) 624.
17. Hintsanen, P. *Coloria*, 2007. <<http://www.coloria.net/historia/aikajana.htm>>, 21.3.2013.
18. Witt, O.N. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **19** (1886) 1719.
19. Fleming v. Florida Citrus Exchange, 358 U.S. 153 (1958). <<http://supreme.justia.com/cases/federal/us/358/153/case.html#167>>, 18.1.2013.
20. Snehalatha, M., Ravikumar, C., Hubert Joe, I., Sekar, N. ja Jayakumar, V.S. *Spectrochim. Acta A Mol. Biomol. Spectrosc.* **72** (2009) 654.

21. Edwards, D.J., Jones, J.W., Lozman, O., Ormerod, A.P., Sintyureva, M. ja Tiddy, G.J.T. *J. Phys. Chem. B* **112** (2008) 14628.
22. Levine, W.G. *Drug Metab. Rev.* **23** (1991) 253.
23. Özen, A.S. ja Aviyente, V. ja Klein, R.A. *J. Phys. Chem. A* **107** (2003) 4898.
24. Habibi, M.H., Hassanzadeh, A. ja Zeini-Isfahani, A. *Dyes Pigm.* **69** (2006) 93.
25. Liebermann, C. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **16** (1883) 2858.
26. Ziegler, J.H. ja Locher, M. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **20** (1887) 834.
27. Griess, P. ja Duisberg, C. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **22** (1889) 2459.
28. The Society of Dyers and Colourists. *Colour Index*, 4. nidos, 3. p., Iso-Britannia, 1971, s. 4286.
29. Viite 28, s. 4320.
30. Viite 28, s. 4321.
31. Viite 28, s. 4332.
32. Viite 28, s. 4329.
33. Viite 28, s. 4327.
34. Thorpe, T.E. *A dictionary of applied chemistry*, 1. tark. ja laaj. p., Longmans, Green, and co., Iso-Britannia, 1921, s. 458.
35. Martínez-Huitle, C.A. ja Brillas, E. *Appl. Catal. B* **87** (2009) 105.
36. O'Neill, C., Hawkes, F.R., Hawkes, D.L., Lourenço, N.D., Pinheiro, H.M. ja Delée, W. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* **74** (1999) 1009.
37. Karst, D., Nama, D. ja Yang, Y. *J. Colloid Interface Sci.* **310** (2007) 106.
38. Kim, Y.H. ja Sun, G. *Text. Res. J.* **72** (2002) 1052.
39. Meldola, R. *J. Chem. Soc., Trans.* **43** (1883) 425.
40. Nölting, E. ja Binder, F. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **20** (1887) 3004.
41. Knorr, L. *Justus Liebigs Ann. Chem.* **238** (1887) 137.
42. van Bommel, M.R., Berghe, I.V., Wallert, A.M., Boitelle, R. ja Wouters, J. *J. Chromatogr. A* **1157** (2007) 260.
43. Robbins, C.R., Reich, C. ja Patel., A. *J. Soc. Cosmet. Chem.* **45** (1994) 85.

44. Hofmann, A.W. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **10** (1877) 213.
45. White, P.C. ja Harbin, A.-M. *Analyst* **114** (1989) 877.
46. Bruce, R.L., Broadwood, N.V. ja King, D.G. *Text. Res. J.* **70** (2000) 525.
47. Griess, P. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **10** (1877) 525.
48. Griess, P. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **11** (1878) 2191.
49. Hofmann, A.W. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **10** (1877) 1378.
50. Winther, A., Laska, A.L., Zitscher, A., Kunert, F. and Acker, E. *U.S. Pat.* 1,099,108 (1914).
51. Witt, O.N. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **12** (1879) 258.
52. Meldola, R. *J. Chem. Soc., Trans.* **47** (1885) 657.
53. Rostad, C.E. *Fuel* **89** (2010) 997.
54. Wang, S., Shen, S. ja Xu, H. *Dyes Pigm.* **44** (2000) 195.
55. Wu, S., Qian, W., Xia, Z., Zou, Y., Wang, S., Shen, S. ja Xu, H. *Chem. Phys. Lett.* **330** (2000) 535.
56. Viite 28, s. 4054.
57. Viite 28, s. 4123.
58. Viite 28, s. 4274.
59. Guzel, B. ja Akgerman, A. *J. Supercrit. Fluids* **18** (2000) 247.
60. Brenner, C. *Helv. Chim. Acta* **3** (1920) 90.
61. Stebbins, J.H. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **13** (1880) 715.
62. Lincke, G. *Dyes Pigm.* **59** (2003) 1.
63. Fierz-David, H.E. ja Ziegler, E. *Helv. Chim. Acta* **11** (1928) 776.
64. Bamberger, E. ja Meimberg, F. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **28** (1895) 1887.
65. Kostanecki, S.V. *Ber. Dtsch. Chem. Ges.* **26** (1893) 2897.
66. Blackburn, R.S. ja Burkinshaw, S.M. *Green Chem.* **4** (2002) 47.
67. Zollinger, H. *Angew. Chem.* **73** (1961) 125.

68. Rys, P. ja Zollinger, H. *Helv. Chim. Acta* **49** (1966) 749.
69. Griffiths, L.H. ja Neale, S.M. *Trans. Faraday Soc.* **30** (1934) 395.
70. Yoshida, Z.-i., Osawa, E. ja Oda, R. *J. Phys. Chem.* **68** (1964) 2895.
71. Weisz, P.B. ja Zollinger, H. *Trans. Faraday Soc.* **64** (1968) 1693.
72. McLachlan, A.D. *Discuss. Faraday Soc.* **40** (1965) 239.
73. Weisz, P.B. ja Zollinger, H. *Trans. Faraday Soc.* **63** (1967) 1815.
74. Gómez, M., Arancibia, V., Rojas, C. ja Nagles, E. *Int. J. Electrochem. Sci.* **7** (2012) 7493.
75. Park, H.S., Oh, K.S., Kim, K.S., Chang, T. ja Spiegel, D.R. *J. Phys. Chem. B* **103** (1999) 2355.
76. Lee, J., Park, K., Chang, T. ja Jung, J.C. *Macromolecules* **25** (1992) 6977.
77. Chen, K.-C., Huang, W.-T., Wu, J.-Y. ja Houg, J.-Y. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **23** (1999) 686.
78. Patel, D.R., Patel, J.A. ja Patel, K.C. *J. Saudi Chem. Soc.* **13** (2009) 279.
79. Peters, A.T. ja Chisowa, E. *Dyes Pigm.* **31** (1996) 131.
80. Cobzac, S.C., Casoni, D., Fasakaş, A.L. ja Sârbu, C. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **35** (2012) 1429.
81. Ma, M., Luo, X., Chen, B., Su, S. ja Yao, S. *J. Chromatogr. A* **1103** (2006) 170.
82. Tateo, F. ja Bononi, M. *J. Agric. Food Chem.* **52** (2004) 655.
83. Desiderio, C., Marra, C. ja Fanali, S. *Electrophoresis* **19** (1998) 1478.
84. Pérez-Urquiza, M. ja Béltran, J.L. *J. Chromatogr. A* **898** (2000) 271.
85. Miniotti, K.S., Sakellariou, C.F. ja Thomaidis, N.S. *Anal. Chim. Acta* **583** (2007) 103.
86. Yoshioka, N. ja Ichihashi, K. *Talanta* **74** (2008) 1408.
87. Chen, Q.-c., Mou, S.-f., Hou, X.-p., Riviello, J.M. ja Ni, Z.-m. *J. Chromatogr. A* **827** (1998) 73.
88. Lai-Hao, W. ja Shu-Juan, H. *J. Autom. Methods Manag. Chem.* 2011 (2011) 1.
89. Măruțoiu, O.F., Gogoasă, I., Măruțoiu, C., Tofană, M., Moigrădean, D. ja Gergen, I. *J. Agroaliment. Processes Technol.* **17** (2011) 46.

90. Stanley, R.L. ja Kirk, P.L. *J. Agric. Food Chem.* **11** (1963) 492.
91. Dossi, N., Toniolo, S., Susmel, A., Pizzariello, G. ja Bontempelli, G. *Chromatographia* **63** (2006) 557.
92. Gianotti, V., Angioi, S., Gosetti, F., Marengo, E. ja Gennaro, M.C. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **28** (2005) 923.
93. Billmeyer, F.W. *Color Res. Appl.* **13** (1988) 140.
94. Evenson, O.L. ja Nagel, R.H. *Ind. Eng. Chem.* **3** (1931) 260.
95. Capitán-Vallvey, L.F., Fernandez, M.D., de Orbe, I., Vilchez, J.L. ja Avidad, R. *Analyst* **122** (1997) 351.
96. López-de-Alba, P.L., López-Martínez, L. ja De-León-Rodríguez, L.M. *Electroanalysis* **14** (2002) 197.
97. Nevado, J.J.B., Flores, J.R. ja Llerena, M.J.V. *Talanta* **44** (1997) 467.
98. Nevado, J.J.B., Flores, J.R., Llerena, M.J.V. ja Fariñas, N.R. *Talanta* **48** (1999) 895.
99. Ni, Y., Bai, J. ja Jin, L. *Anal. Chim. Acta* **329** (1996) 65.
100. Sponar, F., Moř, A.C. ja Sârbu, C. *J. Chromatogr. A* **1188** (2008) 295.
101. Khan, S.A., Ahmad, A., Khan, M.I., Yusuf, M., Shahid, M., Manzoor, N. ja Mohammad, F. *Dyes Pigm.* **95** (2012) 206.
102. Moyano, M.J., Meléndez-Martínez, A.J., Alba, J. ja Heredia, F.J. *Food Res. Int.* **41** (2008) 513.
103. Ramamurthy, M.K. ja Bhalerao, V.R. *Analyst* **89** (1964) 740.
104. Harp, B.P., Miranda-Bermudez, E., Baron, C.I. ja Richard, G.I. *Food Addit. Contam. Part A* **29** (2012) 886.
105. Yang, Y. ja Naarani, V. *Dyes Pigm.* **74** (2007) 154.
106. Rivolo, P., Pirasteh, P., Chaillou, A., Joubert, P., Kloul, M., Bardeau, J.-F. ja Geobaldo, F. *Sens. Actuators B Chem.* **100** (2004) 99.
107. Wu, C., Scott, J. ja Shea, J.-E. *Biophys. J.* **103** (2012) 550.
108. Evira, Tuoteturvallisuusyksikkö. *Lisäaineopas*, Elintarviketurvallisuusvirasto Evira, Multiprint Oy, Helsinki, 2009, s. 15.
<<http://www.evira.fi/portal/fi/evira/julkaisut/?a=view&productId=134>>, 17.1.2013.

109. Euroopan parlamentin ja neuvoston asetus (EY) N:o 1333/2008. <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2008R1333:20111202:FI:PDF>>, 18.1.2013.
110. Komission direktiivi 2008/128/EY. <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=CONSLEG:2008L0128:20110207:FI:PDF>>, 18.1.2013.
111. Elintarviketurvallisuusvirasto Evira. E-koodiavain, 2011, s. 1. <<http://www.evira.fi/portal/fi/tietoa+evirasta/julkaisut/?a=view&productId=52>>, 17.1.2013.
112. Komission asetus (EU) N:o 231/2012. <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2012:083:0001:0295:FI:PDF>>, 18.1.2013.
113. Münzner, R. ja Wever, J. *Arch. Toxicol.* **60** (1987) 328.
114. Viite 28, s. 4132.
115. Mpountoukas, P., Pantazaki, A., Kostareli, E., Christodoulou, P., Kareli, D., Poliliou, S., Mourelatos, C., Lambropoulou, V. ja Lialiaris, T. *Food Chem. Toxicol.* **48** (2010) 2934.
116. Viite 28, s. 4087.
117. Silva, M.L.S., Garcia, M.B.Q., Lima, J.L.F.C. ja Barrado, E. *Talanta* **72** (2007) 282.
118. Viite 28, s. 4068.
119. WHO/International Agency for Research on Cancer. *IARC Monogr. Eval. Carcinog. Risk Chem. Man* **8** (1974) 1.
120. Seesuriyachan, P., Chaiyaso, T., Sasaki, K. ja Techapun, C. *Bioresour. Technol.* **100** (2009) 4097.
121. Viite 28, s. 4093.
122. Viite 28, s. 4094.
123. Tanaka, T. *Food Chem. Toxicol.* **44** (2006) 1651.
124. Kobayashi, F., Ozawa, N., Hanai, J., Isobe, M. ja Watabe, T. *Anal. Chem.* **58** (1986) 3048.
125. Rast, G.E. ja Steiner, R.I. *U.S. Pat.* 3,519,617 (1970).
126. Piccin, J.S., Dotto, G.L., Vieira, M.L.G. ja Pinto, L.A.A. *J. Chem. Eng. Data* **56** (2011) 3759.
127. Viite 28, s. 4262.

128. May, L.T., Briddon, S.J. ja Hill, S.J. *Mol. Pharmacol.* **77** (2010) 678.
129. JECFA. *Toxicological evaluation of certain food additives and contaminants, WHO Food Additives Series, No. 20*, Cambridge University Press, 1987, no. 600 (Brown FK). <<http://www.inchem.org/documents/jecfa/jecmono/v20je10.htm>>, 18.1.2013.
130. *Euroopan parlamentin ja neuvoston direktiivi 94/36/EY*. <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=DD:13:27:31994L0036:FI:PDF>>, 18.1.2013.
131. Viite 28, s. 4146.
132. Viite 28, s. 4085.
133. Bekö, S.L., Hammer, S.M. ja Schmidt, M.U. *Angew. Chem. Int. Ed.* **51** (2012) 4735.
134. Sweeney, E.A., Chipman, J.K. ja Forsythe, S.J. *Environ. Health Perspect. Suppl.* **6** (1994) 119.
135. Sen, D.J., Shishoo, C.J. ja Lahiri, A. *NSHM J. Pharm. Healthcare Manage.* **2** (2011) 13.
136. Das, A. ja Mukherjee, A. *Int. J. Hum. Genet.* **4** (2004) 277.
137. Cameron, T.P., Hughes, T.J., Kirby, P.E., Fung, V.A. ja Dunkel, V.C. *Mutat. Res.* **189** (1987) 223.
138. Ozaki, A., Kitano, M., Itoh, N., Kuroda, K., Furusawa, N., Masuda, T. ja Yamaguchi, H. *Food Chem. Toxicol.* **36** (1998) 811.
139. Green, M.R. ja Pastewka, J.V. *J. Natl. Cancer Inst.* **64** (1980) 665.
140. Edwards, C.N. ja Combes, R.D. *Food Chem. Toxicol.* **22** (1984) 593.
141. Macioszek, V.K. ja Kononowicz, A.K. *Cell. Mol. Biol. Lett.* **9** (2004) 107.
142. Hashem, M.M., Atta, A.H., Arbid, M.S., Nada, S.A., Mouneir, S.M. ja Asaad, G.F. *J. Pak. Med. Stud.* **1** (2011) 43.
143. Corder, E.H. ja Buckley, C.E. *J. Clin. Epidemiol.* **48** (1995) 1269.
144. Bhatia, M.S. *J. Clin. Psychiatry* **61** (2000) 473.
145. Park, H.-W., Park, C.-H., Park, S.-H., Park, J.-Y., Park, H.S., Yang, H.J., Ahn, K.-M., Kim, K.-H., Oh, J.-W., Kim, K.-E., Pyun, B.-Y., Lee, H.-B. ja Min, K.-U. *J. Allergy Clin. Immunol.* **121** (2008) 1059.
146. Mikkelsen, H., Larsen, J.C. ja Tarding, F. *Arch. Toxicol. Suppl.* **1** (1978) 141.
147. Veien, N.K. ja Krogdahl, A. *Acta Derm. Venereol.* **71** (1991) 73.

148. Loblay, R.H. ja Swain, A.R. teoksessa *The Clinical and Scientific Basis of Myalgic Encephalomyelitis / Chronic Fatigue Syndrome*, toim. Hyde, B.M., Goldstein, J.A. ja Levine, P.H., The Nightingale Research Foundation, Kanada, 1992, luku 57, s. 521-533.
149. Bent, S., Wollgarten, I. ja Schmutzler, W. *Agents Actions* **38** (1993) C209.
150. Rowe, K.S. ja Rowe, K.J. *J. Pediatr.* **125** (1994) 691.
151. Ward, N.I. *J. Nutr. Environ. Med.* **7** (1997) 333.
152. Bateman, B., Warner, J.O., Hutchinson, E., Dean, T., Rowlandson, P., Gant, C., Grundy, J., Fitzgerald, C. ja Stevenson, J. *Arch. Dis. Child* **89** (2004) 506.
153. 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. ja Stevenson, J. *Lancet* **370** (2007) 1560.
154. Gao, Y., Li, C., shen, J., Yin, H., An, X. ja Jin, H. *J. Food Sci.* **76** (2011) T125.
155. Kamel, M.M. ja El-Iethy, H.S. *J. Am. Sci.* **7** (2011) 1211.
156. Supaka, N., Juntongjin, K., Damronglerd, S., Delia, M.-L. ja Strehaiano, P. *Chem. Eng. J.* **99** (2004) 169.
157. Unuabonah, E.I., Adebowale, K.O. ja Dawodu, F.A. *J. Hazard. Mater.* **157** (2008) 397.
158. Willmott, N., Guthrie, J. ja Nelson, G. *J. Soc. Dyers Colour.* **114** (1998) 38.
159. European Food Safety Authority (EFSA). <<http://www.efsa.europa.eu/>>, 18.1.2013.
160. Food and Agriculture Organisation of the United Nations (FAO), Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. <<http://www.fao.org/food/food-safety-quality/scientific-advice/jecfa/en/>>, 18.1.2013.
161. World Health Organisation (WHO), Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. <<http://www.who.int/foodsafety/chem/jecfa/en/index.html>>, 18.1.2013.
162. Panel on Dietetic Products, Nutrition and Allergies (NDA). *EFSA J.* **8** (2010) 1778. <<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/1778.pdf>>, 18.1.2013.
163. Marmagne, O. ja Coste, C. *Am. Dyest. Rep.* **85** (1996) 15.
164. Adedayo, O., Javadpour, S., Taylor, C., Anderson, W.A. ja Moo-Young, M. *World J. Microbiol. Biotechnol.* **20** (2004) 545.
165. dos Santos, A.B., de Madrid, M.P., Stams, A.J.M., van Lier, J.B. ja Cervantes, F.J. *Biotechnol. Prog.* **21** (2005) 1140.
166. Nachiyar, C.V. ja Rajakumar, G.S. *Enzyme Microb. Technol.* **36** (2005) 503.

167. Chagas, E.P. ja Durrant, L.R. *Enzyme Microb. Technol.* **29** (2001) 473.
168. Ramalho, P.A., Cardoso, M.H., Cavaco-Paulo, A. ja Ramalho, M.T. *Appl. Environ. Microbiol.* **70** (2004) 2279.
169. Acuner, E. ja Dilek, F.B. *Process Biochem.* **39** (2004) 623.
170. Khehra, M.S., Saini, H.S., Sharma, D.K., Chadha, B.S. ja Chimni, S.S. *Dyes Pigm.* **67** (2005) 55.
171. Shaw, C.B., Carliell, C.M. ja Wheatley, A.D. *Water Res.* **36** (2002) 1993.
172. Razo-Flores, E., Luijten, M., Donlon, B.A., Lettinga, G. ja Field, J.A. *Environ. Sci Technol.* **31** (1997) 2098.
173. Haber, F. ja Weiss, J. *Proc. R. Soc. Lond. A* **147** (1934) 332.
174. Benincá, C., Peralta-Zamora, P., Camargo, R.C., Tavares, C.R.G., Zanoelo, E.F. ja Igarashi-Mafra, L. *React. Kinet. Mech. Catal.* **105** (2012) 293.
175. Grčić, I., Maljković, M., Papić, S. ja Koprivanac, N. *J. Hazard. Mater.* **197** (2011) 272.
176. Khadhraoui, M., Trabelsi, H., Ksibi, M., Bouguerra, S. ja Elleuch, B. *J. Hazard. Mater.* **161** (2009) 974.
177. Aleboye, A., Olya, M.E. ja Aleboye, H. *J. Hazard. Mater.* **162** (2009) 1530.
178. Alaton, I.A., Balcioglu, I.A. ja Bahnemann, D.W. *Water Res.* **36** (2002) 1143.
179. Aleboye, A., Daneshvar, N. ja Kasiri, M.B. *Chem. Eng. Process.* **47** (2008) 827.
180. Fan, L., Zhou, Y., Yang, W., Chen, G. ja Yang, F. *J. Hazard. Mater.* **137** (2006) 1182.
181. Ghoneim, M.M., El-Desoky, H.S. ja Zidan, N.M. *Desalination* **274** (2011) 22.
182. Salazar, R., Garcia-Segura, S., Ureta-Zañartu, M.S. ja Brillas, E. *Electrochim. Acta* **56** (2011) 6371.
183. El-Gohary, F. ja Tawfik, A. *Desalination* **249** (2009) 1159.
184. Rodrigues, A.C., Boroski, M., Shimada, N.S., Garcia, J.C., Nozaki, J. ja Hioka, N. *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* **194** (2008) 1.
185. Aydiner, C., Kaya, Y., Gönder, Z.B. ja Vergili, I. *J. Chem Technol. Biotechnol.* **85** (2010) 1229.
186. Iqbal, M.J. ja Ashiq, M.N. *J. Hazard. Mater.* **139** (2007) 57.

187. Robinson, T., McMullan, G., Marchant, R. ja Nigam, P. *Bioresour. Technol.* **77** (2001) 247.
188. Sun, Q. ja Yang, L. *Water Res.* **37** (2003) 1535.
189. Wawrzekiewicz, M. ja Hubicki, Z. *J. Hazard. Mater.* **164** (2009) 502.
190. Vimonses, V., Lei, S., Jin, B., Chow, C.W.K. ja Saint, C. *Appl. Clay Sci.* **43** (2009) 465.
191. Janoš, P., Buchtová, H. ja Rýznarová, M. *Water Res.* **37** (2003) 4938.
192. Crini, G. *Bioresour. Technol.* **97** (2006) 1061.