



ΕΛΛΗΝΙΚΟ ΑΝΟΙΚΤΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΙΚΗΣ ΚΑΙ ΒΙΟΜΟΡΙΑΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ

Διπλωματική Εργασία

**ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ
ΩΣ ΠΡΟΣΘΕΤΑ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ**

**ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΤΗΣ ΦΟΙΤΗΤΡΙΑΣ**

MARIA ΒΕΡΒΕΡΗ

**ΕΠΙΒΛΕΠΟΝΤΕΣ ΚΑΘΗΓΗΤΕΣ: ΤΣΙΑΦΟΥΛΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ
ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ ΚΑΜΠΟΛΗΣ**

Πάτρα, Μάιος 2024

Η παρούσα εργασία αποτελεί πνευματική ιδιοκτησία της φοιτήτριας Μαρίας Βερβέρη που την εκπόνησε. Στο πλαίσιο της πολιτικής ανοικτής πρόσβασης η συγγραφέας εκχωρεί στο ΕΑΠ, μη αποκλειστική άδεια χρήσης του δικαιώματος αναπαραγωγής, προσαρμογής, δημόσιου δανεισμού, παρουσίασης στο κοινό και ψηφιακής διάχυσής τους διεθνώς, σε ηλεκτρονική μορφή και σε οποιοδήποτε μέσο, για διδακτικούς και ερευνητικούς σκοπούς, άνευ ανταλλάγματος και για όλο το χρόνο διάρκειας των δικαιωμάτων πνευματικής ιδιοκτησίας. Η ανοικτή πρόσβαση στο πλήρες κείμενο για μελέτη και ανάγνωση δεν σημαίνει καθ' οιονδήποτε τρόπο παραχώρηση δικαιωμάτων διανοητικής ιδιοκτησίας του/της συγγραφέα/δημιουργού ούτε επιτρέπει την αναπαραγωγή, αναδημοσίευση, αντιγραφή, αποθήκευση, πώληση, εμπορική χρήση, μετάδοση, διανομή, έκδοση, εκτέλεση, «μεταφόρτωση» (downloading), «ανάρτηση» (uploading), μετάφραση, τροποποίηση με οποιονδήποτε τρόπο, τμηματικά ή περιληπτικά της εργασίας, χωρίς τη ρητή προηγούμενη έγγραφη συναίνεση του/της συγγραφέα/δημιουργού. Η συγγραφέας/δημιουργός διατηρεί το σύνολο των ηθικών και περιουσιακών του δικαιωμάτων.

ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΡΟΣΔΙΟΡΙΣΜΟΥ ΧΡΩΣΤΙΚΩΝ ΩΣ ΠΡΟΣΘΕΤΑ ΣΤΑ ΤΡΟΦΙΜΑ

Μαρία Βερβέρη

Επιτροπή Επίβλεψης Διπλωματικής Εργασίας

Επιβλέπων Καθηγητής:

ΤΣΙΑΦΟΥΛΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

«Μέλος Ε.Δ.Ι.Π., Βαθμός Α του
Πανεπιστημίου Ιωαννίνων, Τμήμα
Χημείας, Εργαστήριο Αναλυτικής
Χημείας, Κέντρο NMR Μέλος ΣΕΠ του
Ελληνικού Ανοικτού Πανεπιστημίου,
ΜΠΣ “Χημική και Βιομοριακή
Ανάλυση”»

Συν-Επιβλέπων Καθηγητής:

ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ ΚΑΜΠΟΛΗΣ

«Πανεπιστήμιο Πατρών, Μέλος ΣΕΠ του
Ελληνικού Ανοικτού Πανεπιστημίου»

Πάτρα, Μάιος 2024

Περίληψη

Οι χρωστικές στα τρόφιμα είναι ουσίες που χρησιμοποιούνται για να βελτιώσουν ή να αλλάξουν το χρώμα των τροφίμων. Αυτές μπορεί να είναι φυσικές ή συνθετικές και χρησιμοποιούνται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων για να κάνουν τα προϊόντα πιο ελκυστικά οπτικά. Οι χρωστικές στα τρόφιμα παίζουν σημαντικό ρόλο στην εμφάνιση και την αποδοχή των προϊόντων από τους καταναλωτές. Είναι σημαντικό να χρησιμοποιούνται υπεύθυνα και εντός των καθορισμένων ορίων για να διασφαλίζεται η ασφάλεια των καταναλωτών. Οι χρωστικές τροφίμων ρυθμίζονται αυστηρά από διάφορους οργανισμούς υγείας και ασφάλειας, όπως η Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων (FDA) στις ΗΠΑ και η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (EFSA). Αυτοί οι οργανισμοί καθορίζουν τα επιτρεπτά όρια χρήσης και πραγματοποιούν ελέγχους για να διασφαλίσουν ότι οι χρωστικές είναι ασφαλείς για κατανάλωση. Στην συγκεκριμένη εργασία γίνεται αναφορά στις ακόλουθες φυσικές χρωστικές: χλωροφύλλη, καροτενοειδή, ανθοκυανίνες, κουρκουμίνη, καρμίνη και σε συνθετικές όπως: Sunset Yellow και χρωστικές Sudan. Παράλληλα αναφέρονται οι δομές, οι φυσικές και χημικές ιδιότητες των συγκεκριμένων χρωστικών καθώς και μέθοδοι προσδιορισμού για την ανίχνευση και τον διαχωρισμό των χρωστικών. Οι κύριες μέθοδοι που αναλύονται είναι υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) και χρωματογραφία λεπτής στοιβάδας (TLC). Η HPLC είναι μια ισχυρή τεχνική που επιτρέπει τον ακριβή προσδιορισμό και τον ποσοτικό έλεγχο χρωστικών σε σύνθετα μίγματα τροφίμων. Η TLC είναι μια απλούστερη και οικονομικότερη μέθοδος για τον αρχικό προσδιορισμό χρωστικών σε δείγματα τροφίμων.

Λέξεις Κλειδιά: χρωστικές, μέθοδοι προσδιορισμού, HPLC, TLC, ασφάλεια τροφίμων

Abstract

Food colorants are substances used to enhance or alter the color of foods. These can be natural or synthetic and are widely employed in the food industry to enhance the visual appeal of products. Food colorants play a significant role in the appearance and consumer acceptance of products. It is crucial to use them responsibly and within established limits to ensure consumer safety. Food colorants are strictly regulated by various health and safety organizations, such as the Food and Drug Administration (FDA) in the US and the European Food Safety Authority (EFSA). These organizations set permissible usage limits and conduct inspections to ensure that colorants are safe for consumption. This work specifically references the following natural colorants: chlorophyll, carotenoids, anthocyanins, curcumin, carmine, and synthetic colorants such as Sunset Yellow and Sudan dyes. Additionally, it discusses the structures, physical and chemical properties of these specific colorants, as well as methods for their identification and separation. The primary methods analyzed include high-performance liquid chromatography (HPLC) and thin-layer chromatography (TLC). HPLC is a powerful technique that allows precise identification and quantitative analysis of food colorants in complex food mixtures. TLC, on the other hand, is a simpler and more economical method for initial identification of colorants in food samples.

Key Words: food colorants, determination methods, HPLC, TLC, food safety

Πίνακας Περιεχομένων

Περίληψη.....	iv
Abstract.....	iv
Περιεχόμενα.....	v
Κατάλογος Εικόνων.....	vi
Κατάλογος Πινάκων.....	vii
Κεφάλαιο 1 ^ο : Εισαγωγή.....	1-2
1.1 Φυσικές Χρωστικές.....	3-10
1.1.1 Χλωροφύλλες.....	4-5
1.1.2 Καροτενοειδή.....	5-6
1.1.3 Ανθοκυανίνες.....	6-7
1.1.4 Βεταλαΐνες.....	7-8
1.1.5 Κουρκουμίνη.....	8-9
1.1.6 Καρμίνη.....	9-10
1.2 Τεχνητές Χρωστικές.....	10-13
1.2.1 Sunset Yellow FCF.....	12
1.2.2 Patent Blue.....	13
Κεφάλαιο 2.1: Χλωροφύλλες.....	14-26
2.1.1. Δομή Χλωροφυλλών.....	14
2.1.2 Φυσικές Ιδιότητες Χλωροφυλλών.....	14-15
2.1.3 Μέθοδοι Προσδιορισμού Χλωροφυλλών.....	15-26
Κεφάλαιο 2.2: Καροτενοειδή.....	27-29
2.2.1 Δομή Καροτενοειδών.....	27
2.2.2 Φυσικές Ιδιότητες Καροτενοειδών.....	27-28
2.2.3 Μέθοδοι Προσδιορισμού Καροτενοειδών.....	28-29
Κεφάλαιο 2.3: Ανθοκυανίνες.....	30-31
2.3.1 Δομή και Ιδιότητες Ανθοκυανινών.....	30-31
2.3.2 Ποσοτικός Προσδιορισμός των Ανθοκυανινών.....	31

Κεφάλαιο 3.1 Τεχνητές Χρωστικές.....	32-39
3.1.1 Δομή και Ιδιότητες των χρωστικών Sudan.....	32-33
3.1.2 Μέθοδοι Προσδιορισμού χρωστικών Sudan.....	33-35
3.2.1 Δομή και Ιδιότητες Χρωστικής Sunset Yellow.....	36
3.2.2 Μέθοδοι Προσδιορισμού Χρωστικής Sunset Yellow.....	36-39
4.1 : Νομικό Πλαίσιο.....	40
4.2 : Χρωστικές Τροφίμων και Ασφάλεια για τον Ανθρώπινο Οργανισμό	40-41
4.3 Επιτρεπόμενες Χρωστικές στην Ευρώπη.....	41-43
4.4 Επιτρεπόμενες Χρωστικές στην Ελλάδα.....	43
4.5 Διατάξεις περί χρωστικών στις Η.Π.Α, Ινδία, Κίνα.....	43-44
Κεφάλαιο 5: Συμπεράσματα.....	44
Βιβλιογραφία.....	45-59

Κατάλογος Εικόνων

Εικόνα 1. Μόρια Χλωροφύλλης α και β.....	5
Εικόνα 2. Μόρια Καροτενοειδών.....	6
Εικόνα 3. Μόρια Ανθοκυανών.....	7
Εικόνα 4. Μόρια Βεταλαϊνών.....	8
Εικόνα 5. Μόριο Κουρκουμίνης.....	9
Εικόνα 6. Μόριο Καρμίνης.....	10
Εικόνα 7. Μόριο Sunset Yellow FCF.....	12
Εικόνα 8. Μόριο Χρωστικής Patent Blue.....	13
Εικόνα 9. Φάσμα Απορρόφησης Χλωροφύλλης α και β.....	15
Εικόνα 10. Χρωματογραφήματα HPLC δειγμάτων τροφίμων (καραμέλας, powder sample bakery sweet, πατατάκια, σκληρές και μαλακές καραμέλες).....	20
Εικόνα 11. Τρισδιάστατο Χρωματογράφημα της Fe^{3+} -χλωροφυλλίνης.....	22
Εικόνα 12. Χρωματογραφία κανονικής φάσης και ανάστροφης φάσης εκχυλίσματος η-εξανίου ρόκας και σπανακιού σε πλάκες TLC με κινητή φάση η-εξάνιο:ακετόνη.....	27
Εικόνα 13. Φάσμα Απορρόφησης β - καροτενίου, λουτεΐνης, φαιοφυτινών α, β.....	28
Εικόνα 14. Χρωστικές Sudan.....	33

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1. Οι σημαντικότερες ομάδες χρωστικών ουσιών που απαντώνται σε ζωικούς και φυτικούς ιστούς και μικροοργανισμούς.....	3
Πίνακας 2. Συγκεντρώσεις (mg/kg) χρωστικών ουσιών σε τρόφιμα από την τοπική αγορά Vellore της Ινδίας.....	19
Πίνακας 3. Ποσοτικός Προσδιορισμός Ξανθοφύλλων, Καροτονειδών και χλωροφυλλών στα ακτινίδια.....	21
Πίνακας 4. Προσδιορισμός χλωροφύλλης -Na-Cu (mg/L) σε τρία δείγματα τροφίμων (n = 3)	21
Πίνακας 5. Κυριότερες μέθοδοι προσδιορισμού χλωροφυλλών στα τρόφιμα.....	25
Πίνακας 6. Διάφορες μέθοδοι για τον προσδιορισμό των καροτενοειδών στα τρόφιμα.....	29
Πίνακας 7. Σημαντικότεροι Τεχνικές για τον προσδιορισμό χρωστικών Sudan σε διάφορες μήτρες.....	34-35
Πίνακας 8. Χρωματογραφικές Τεχνικές Προσδιορισμού Χρωστικής Sunset Yellow.....	39
Πίνακας 9. Λίστα Επιτρεπόμενων Χρωστικών Τροφίμων στην Ελλάδα (Παράρτημα Ι).43-45	

Κεφάλαιο 1^ο : Εισαγωγή

Η πρακτική του χρωματισμού τροφίμων είναι μια μακρά παράδοση μεταξύ των ανθρώπων, που εκτείνεται σε αιώνες. Σε όλη την αρχαιότητα, οι άνθρωποι είχαν διάφορα κίνητρα για να χρωματίσουν τα τρόφιμα που κατανάλωναν. Ένας συνηθισμένος λόγος ήταν η ενίσχυση της οπτικής ελκυστικότητας ενός πιάτου ή η βελτίωση της εμφάνισης λιγότερο ελκυστικών φαγητών. Επιπλέον, ο χρωματισμός των τροφίμων γινόταν συχνά για συμβολικούς σκοπούς, ιδιαίτερα σε θρησκευτικές τελετές. Κατά την περίοδο της Αναγέννησης, που έλαβε χώρα από το 1470 έως το 1530, οι αραβικοί πολιτισμοί πίστευαν ότι το χρώμα των τροφίμων υποδηλώνει την εξαιρετική θρεπτική αξία και τις φαρμακευτικές του ιδιότητες. Πίστευαν ότι τα ζωντανά χρώματα ορισμένων τροφίμων συνδέονταν με πνευματικές ουσίες που παρείχαν οφέλη για την υγεία. Για παράδειγμα, τα κόκκινα σταφύλια πιστεύεται ότι συμβάλλουν στον εμπλουτισμό του αίματος, ενώ τα τρόφιμα βαμμένα σε χρυσό πιστεύεται ότι έχουν θεραπευτικές ιδιότητες.[23]

Ιστορικά, οι χρωστικές τροφίμων προέρχονταν αποκλειστικά από φυσικές πηγές όπως φυτά, ζώα και μέταλλα. Ωστόσο, αυτό άλλαξε στα μέσα του 19ου αιώνα, όταν εισήχθησαν οι συνθετικές βαφές. Για να αποκτήσετε μια βαθύτερη κατανόηση των χρωμάτων τροφίμων, είναι σημαντικό να εξετάσετε πώς το χρώμα των τροφίμων επηρεάζει τους καταναλωτές. Το χρώμα παίζει σημαντικό ρόλο στη διαμόρφωση των προσδοκιών των ατόμων όσον αφορά τα τρόφιμα που σχεδιάζουν να αγοράσουν. Ο ανθρώπινος εγκέφαλος βασίζεται στις γνώσεις και τις προηγούμενες εμπειρίες του για να ερμηνεύσει οπτικές ενδείξεις που σχετίζονται με την εμφάνιση του φαγητού. Κατά συνέπεια, οι άνθρωποι σχηματίζουν ενστικτωδώς κρίσεις για την ποιότητα ενός φαγητού με βάση την οπτική τους αντίληψη.[19] [20] [21]

Η όψη ενός τροφίμου μπορεί να παρέχει πληροφορίες όπως:

- Τι είναι αυτό το τρόφιμο (π.χ. αναγνώριση ενός πορτοκαλιού από το σχήμα και το χρώμα του);
- Είναι ασφαλές για κατανάλωση (π.χ. αναγνώριση του φυσικού χρώματος όταν το τρόφιμο είναι φρέσκο ή χαλασμένο);
- Τι γεύση και υφή θα έχει;
- Εάν έχει επαρκή θρεπτική αξία για να καλύψει τις διατροφικές ανάγκες του καταναλωτή.

Μέσω της παρατήρησης του χρώματος, ο καταναλωτής μπορεί να συλλέξει πολλές πληροφορίες για την ποιότητα των τροφίμων. Για παράδειγμα, στα φρούτα, μπορεί να καταλάβει αν είναι ώριμα ή άγουρα, αν είναι χυμώδη ή όχι, και γενικά αν είναι κατάλληλα για κατανάλωση. Επίσης, από την ομοιομορφία του χρώματος, μπορεί να καταλάβει αν έχουν χρησιμοποιηθεί φυτοφάρμακα ή εντομοκτόνα και αν χρειάζεται πλύσιμο πριν την κατανάλωση. Αν ένα φρούτο είναι αρκετά γυαλιστερό, μπορεί να υποψιαστεί ότι έχει κέρνινη επικάλυψη. [22] [23]

Το χρώμα των τροφίμων βοηθά επίσης στην αναγνώριση της ομάδας στην οποία ανήκουν, προσφέροντας πληροφορίες για παρόμοιες ιδιότητες τροφίμων στην ίδια ομάδα (π.χ. όλα τα εσπεριδοειδή έχουν όξινη γεύση). Για αυτούς τους λόγους, η βιομηχανία τροφίμων προσπαθεί να αλλάξει το χρώμα των τροφίμων για να βελτιώσει την αισθητική τους, να

αυξήσει την ελκυστικότητά τους και να αποκρύψει ελαττώματα. Η βιομηχανία στοχεύει να παράγει τρόφιμα με καλή εμφάνιση και ωραίο χρώμα, είτε φυσικά είτε επεξεργασμένα.

Υπάρχουν τεχνικές και όργανα στη βιομηχανία τροφίμων που χρησιμοποιούνται για την αξιολόγηση του χρώματος ενός τροφίμου σύμφωνα με την αντίληψη του ανθρώπινου οφθαλμού. Ο στόχος αυτών των μεθόδων είναι η βελτίωση της εμφάνισης των τροφίμων με την κατάλληλη επιλογή χρωστικών. Η χρήση αυτών των τεχνικών απαιτεί την κατανόηση της αντίδρασης του ανθρώπινου οφθαλμού στο χρώμα. Μέσω αυτών των μεθόδων, μπορεί να επιτευχθεί η παραγωγή τροφίμων με ιδιαίτερα ελκυστική εμφάνιση για τον καταναλωτή.

Επομένως, τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά ενός τροφίμου καθορίζουν σε μεγάλο βαθμό την επιλογή και την κατανάλωση των τροφίμων. Το χρώμα μπορεί να θεωρηθεί ένα από τα πιο εντυπωσιακά χαρακτηριστικά των τροφίμων, και αν και τα τρόφιμα έχουν δικό τους χρώμα, οι διάφορες διαδικασίες που υποβάλλονται και διάφοροι παράγοντες, όπως η παρουσία ή η απουσία οξυγόνου, μετάλλων, φωτός, pH και νερού, μπορούν να αλλοιώσουν τα οργανοληπτικά χαρακτηριστικά το τροφίμου. Για να αντιμετωπιστεί αυτό το πρόβλημα, οι βιομηχανίες τροφίμων χρησιμοποιούν χημικές ενώσεις που προσθέτουν ή αποκαθιστούν το χρώμα. Οι χρωστικές μπορούν να καταταχθούν ανάλογα με αρκετά κριτήρια:

- προέλευση (φυσική ή συνθετική, οργανική, ανόργανη)
- διαλυτότητα (διαλυτές και αδιάλυτες)
- αδιαφάνεια (διαφανής και αδιαφανής).

Το κριτήριο με βάση την προέλευσή τους είναι είτε φυσική είτε τεχνητή προέλευση. Οι φυσικές χρωστικές μπορούν να προέλθουν από τον ιστό των φυτών (π.χ., κουρκουμίνη, καροτινοειδή, ανθοκυανίνες, βεταλαΐνες ή χλωροφύλλες), ζωικά κύτταρα (καρμινικό οξύ και κερμεσικό οξύ), μεταβολισμό των μικροοργανισμών (καροτινοειδή και χλωροφύλλες) ή μεταλλικές πηγές (διοξειδίο τιτανίου ή ανθρακικό ασβέστιο). Οι τεχνητές χρωστικές παράγονται με χημική σύνθεση και δεν απαντώνται στη φύση. Όλες οι χρωστικές δεν προσθέτουν γεύση όταν προστίθενται σε μια συγκεκριμένη συγκέντρωση στα τρόφιμα, και η χρήση τους στη βιομηχανία τροφίμων είναι κυρίως στη ζαχαροπλαστική, αρτοποιία, στα ποτά, γαλακτοκομικά προϊόντα και στο κρέας. Ο Ελληνικός Κώδικας Τροφίμων και Ποτών επιτρέπει συνολικά 48 χρωστικές, εκ των οποίων 31 είναι φυσικές και 18 συνθετικές. Οι συνθετικές χρωστικές χωρίζονται σε δύο κατηγορίες: η πρώτη περιλαμβάνει εκείνες που αποδίδουν χρώμα όταν διαλυθούν σε υγρό ή διαλυτικό μέσο, ενώ η δεύτερη αφορά τις αδιάλυτες μορφές, οι οποίες δείχνουν τη χρωστική τους ικανότητα σε ξηρή, αφυδατωμένη μορφή. [25]

Η χρήση των κατάλληλων χρωστικών στα τρόφιμα έχει τους εξής στόχους (Αλευρίτου-Γουλιέλμου, 1993, Καραουλάνης, 1995):

- Διόρθωση των χρωματικών αλλαγών που προκύπτουν από την επεξεργασία.
- Ενίσχυση της ελκυστικότητας του τροφίμου για τον καταναλωτή.
- Εξασφάλιση ομοιομορφίας στην εμφάνιση.
- Διατήρηση της ταυτότητας του τροφίμου για την αναγνώριση από τον καταναλωτή.

Οι προδιαγραφές για τις χρωστικές περιλαμβάνουν:

- Απόλυτη ασφάλεια για τους καταναλωτές στις ποσότητες που χρησιμοποιούνται.
- Μη αλλοίωση της γεύσης και του αρώματος των τροφίμων.
- Ισχυρή χρωστική δύναμη.
- Υψηλή διαλυτότητα στο νερό.
- Σταθερότητα σε οξείδωση, αλλαγές pH, φως και μικροοργανισμούς.

1.1. Φυσικές Χρωστικές

Μέχρι τα μέσα του 20ου αιώνα, οι φυσικές χρωστικές που χρησιμοποιούνταν στα τρόφιμα ήταν κυρίως σαφράν (προερχόμενο από το άνθος του *Crocus sativus*), ορσεϊνη (εξαγόμενη από διάφορα είδη λειχήνων), κοχελίνη (εκχύλισμα αποξηραμένων θηλυκών εντόμων του είδους *Dactylopius coccus Casta*), αλαζαρίνη (προερχόμενη από ρίζες ερυθρόδανου).

Σήμερα οι κυριότερες φυσικές χρωστικές είναι οι ανθοκυανίνες, οι βεταλαΐνες, οι χλωροφύλλες και τα καροτενοειδή. Οι παραπάνω χρωστικές είναι ικανές να παρέχουν αποχρώσεις που κυμαίνονται από πράσινο έως κίτρινο, πορτοκαλί, κόκκινο, μπλε και ιώδες, ανάλογα με τις ενώσεις ή τις σταθεροποιημένες μορφές τους. Η κύρια κατάταξη των φυσικών χρωστικών είναι οι χρωστικές με συζυγή συστήματα διπλών δεσμών (καροτενοειδή, βεταλαΐνες) και σύμπλοκα μετάλλων με πορφυρίνες (χλωροφύλλες, μυοσφαιρίνες κ.λπ.)

Οι επτά κύριες κατηγορίες των φυσικών χρωστικών είναι: τα ινδοκοειδή, τις ανθρακινόνες, τις α-ναφθακινόνες τα φλαβονοειδή, τις διϋδροπυρανόνες, τις ανθοκυανίνες και τα καροτενοειδή. [24] [25] [26]

Πίνακας 1. Οι σημαντικότερες ομάδες χρωστικών ουσιών που απαντώνται σε ζωικούς και φυτικούς ιστούς και μικροοργανισμούς.

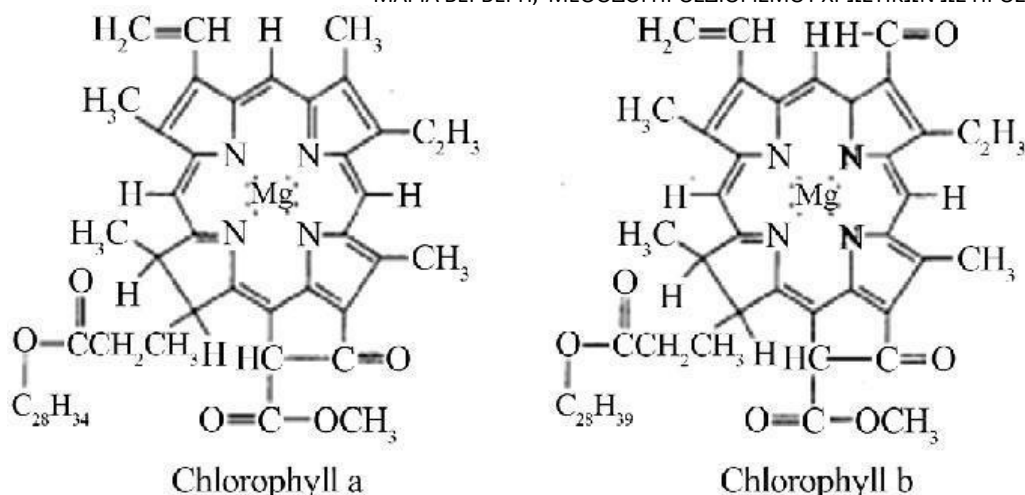
Ομάδα Χρωστικών	Υποομάδες Χρωστικών	Χρώμα	Τρόφιμα που εντοπίζεται
Τετραπυρόλες	Αιμοσφαιρίνες	Κόκκινο	Αίμα
	Μυοσφαιρίνες	Κόκκινο	Κρέας
	Φυκοκυανομπιλίνες	Μπλε ή κόκκινο	Κυανοβακτήρια, κόκκινες άλγες
	Χλωροφύλλες	Πράσινο	Φρούτα, λαχανικά, χυμοί, ελαιόλαδο
Καροτενοειδή	Καροτένια	Κίτρινο - Κόκκινο	Φρούτα, λαχανικά, χυμοί, λάδια, βολβοί, χόρτα
	Ξανθοφύλλες	Κόκκινο - Κίτρινο	Φρούτα, λαχανικά, χυμοί, λάδια, βολβοί, χόρτα
Πολυφαινολικές ενώσεις	Φλαβονοειδή	Υποκίτρινο	Φρούτα, Τσάι
	Ανθοκυανίνες	Κόκκινο - μπλε	Φρούτα,
			λαχανικά, χυμοί, κρασιά, βολβοί, χόρτα
	Τατίνες	Καφέ	Κρασιά
Αλκαλοειδή	Βεταλαΐνες	Κόκκινο-βιολέ προς κίτρινο	Παντζάρια

1.1.1 Χλωροφύλλες

Οι χλωροφύλλες είναι πράσινες χρωστικές που απαντώνται σχεδόν σε όλα τα φυτά και η λειτουργία τους να δεσμεύουν μέρος της ηλιακής ακτινοβολίας για την επιτέλεση της διαδικασίας της φωτοσύνθεσης. Αποτελούν ικανό δείκτη ωριμότητας και φρεσκάδας για τα φρούτα και τα λαχανικά. Ωστόσο, αποτελούν πολύ ασταθείς ενώσεις και λιποδιαλυτές ενώσεις. Χρησιμοποιούνται στην τυροκομία (για την λεύκανση της φέτας και του τελεμέ), στη ζαχαροπλαστική, σε γιαούρτια, παγωτά και καλλυντικά. Η διαδικασία εκχύλισης της χλωροφύλλης για να χρησιμοποιηθεί ως χρωστική πραγματοποιείται μέσω εκχύλισης χημικού διαλύματος με χόρτα και τσουνκίδα. Αποτέλεσμα αυτής της διαδικασίας είναι η δημιουργία χρωστικών όπως οι φαιοφυτίνες και οι χλωροφύλλες μαγνησίου. Οι χλωροφύλλες χρησιμοποιούνται συνήθως σε τρόφιμα όπως γέλες, πηκτώματα φρούτων, γαλακτοκομικά προϊόντα και προϊόντα αρτοποιίας. Επιπλέον του χρωματισμού, η χλωροφύλλη χρησιμοποιείται επίσης για να μειώσει την κιτρινωπή απόχρωση του τυριού, που ενδέχεται να είναι οπτικά ανεπιθύμητη.

Οι τύποι χλωροφύλλης περιλαμβάνουν τους τύπους A & B (βρίσκονται στους χλωροπλάστες των φυτών ξηράς) και τους τύπους C - D - E (βρίσκονται στις θαλάσσιες άλγες του θαλάσσιου πλαγκτον). Τα λαχανικά με υψηλές συγκεντρώσεις χλωροφύλλης είναι τα σπανάκια, οι αγκινάρες, τα σπαράγγια, τα μπρόκολα, τα λαχανά, το σέλινο, ο μαϊντανός, τα ραδίκια, τα αντίδια, τα φασολάκια, οι μπάμιες, ο αρακάς, οι ελιές και οι πιπεριές κ.λπ.

Οι χλωροφύλλες παρουσιάζουν σταθερότητα εντός των φυτών, καθώς οι αντιοξειδωτικοί παράγοντες του φυτού όπως οι λιποπρωτείνες αποτρέπουν την οξείδωση τους. Με την απόμονωση τους όμως καταστρέφονται εύκολα λόγω απουσία αντιοξειδωτικών παραγόντων. Επιπλέον, η σταθερότητα τους μειώνεται κατά τη θέρμανση του φρούτου ή του λαχανικού, λόγω μετουσίωσης των λιποπρωτεϊνών. Τέλος, ανάλογη καταστροφή επέρχεται κατά την κατάψυξη των λαχανικών λόγω ταγγίσματος του λίπους, παρουσία ενζύμου (λιποξειδάσης) και O_2 . Αυτό το πρόβλημα αντιμετωπίζεται με την προσθήκη αντιοξειδωτικών ουσιών. Παράλληλα το χαμηλό pH στο νερό στην περίπτωση βρασμού των λαχανικών οδηγεί σε αποχρωματισμό, ενώ προκύπτουν φαιοφυτίνες A και B από την αντικατάσταση του Mg^{2+} των μορίων χλωροφύλλης από δύο κατιόντα υδρόγονου H^+ . Αυτό το φαινόμενο μπορεί να αποφευχθεί εν μέρει κατά τον βρασμό με ανοιχτό καπάκι για την απομάκρυνση των πτητικών οξέων που εκλύονται από τους ιστούς των φυτών στο νερό. [27] [40]



Εικόνα 1: Μόρια Χλωροφύλλης α και β (Konwar, Mitali & Baruah, G.. (2013). A Possible Realization of Chlorophyll Lase. Optics and Photonics Journal. 03. 385-387. 10.4236/opj.2013.38060.)

1.1.1 Καροτενοειδή

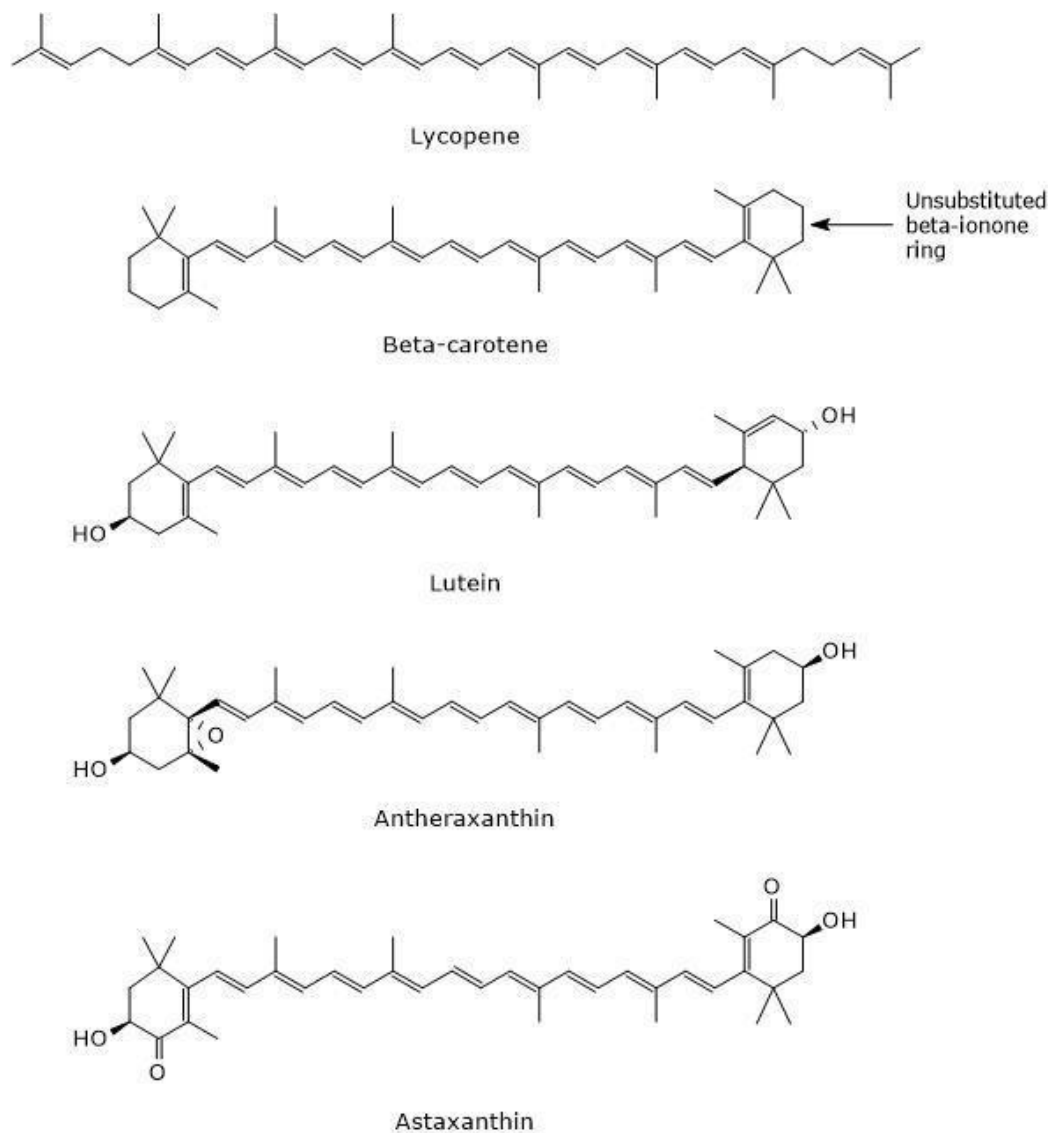
Τα καροτενοειδή αποτελούν ευρέως διαδεδομένες φυσικές, λιποδιαλυτές χρωστικές που συναντώνται τόσο στα φυτά όσο και στα ζώα. Ανάμεσα στα λαχανικά και τα φρούτα πλούσια σε καροτενοειδή συγκαταλέγονται τα καρότα, τα κολοκύθια (ιδιαίτερα τα χειμερινά), οι ντομάτες, οι γλυκοπατάτες, τα ροδάκινα, τα εσπεριδοειδή, οι πάπρικες, και το κόκκινο πιπέρι.

Όσον αφορά τη δομή των καροτενοειδών, αυτή διαφοροποιείται σε δύο κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει τις καροτένες, που είναι υδατάνθρακες, και τις ξανθοφύλλες. Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει τα ακυκλικά (π.χ. λυκοπένιο), μονοκυκλικά (π.χ. γ-καροτένιο), και δικυκλικά (α- και β-καροτένιο) μόρια. Η ένταση του χρώματος (κόκκινο ή κίτρινο) εξαρτάται από τον αριθμό των διπλών δεσμών. Περισσότεροι δεσμοί (πάνω από 7) οδηγούν σε κόκκινο χρώμα. Με την οξειδωτική αποικοδόμησή τους προκύπτουν παράγωγα, όπως η βιταμίνη Α. Επιπλέον, ο προσδιορισμός του β-καροτενίου σε φρούτα και λαχανικά χρησιμοποιείται για τον προσδιορισμό της προβιταμίνης Α. Το β-καροτένιο ανήκει στην οικογένεια των καροτενοειδών και είναι γνωστό για την ικανότητά του να προσδίδει έντονα πορτοκαλί χρώματα σε πολλά τρόφιμα φυσιικής προέλευσης, όπως το κολοκύθι. Επίσης, χρησιμοποιείται ευρέως στη βιομηχανία τροφίμων για το χρωματισμό γαλακτοκομικών προϊόντων όπως το τυρί και η μαργαρίνη. Η καλή λιποδιαλυτότητα του β-καροτενίου το καθιστά ιδιαίτερα κατάλληλο για χρήση σε αυτούς τους τύπους προϊόντων, καθώς επιτρέπει την ομοιόμορφη και αποτελεσματική διανομή του χρώματος. Η χρήση του β-καροτενίου στη βιομηχανία τροφίμων είναι σημαντική για τη δημιουργία ελκυστικών και φυσικών χρωμάτων στα τρόφιμα, προσφέροντας ταυτόχρονα και τη θρεπτική του αξία στα προϊόντα.

Κατά την ωρίμανση των φρούτων και λαχανικών παρατηρείται αύξηση της συγκέντρωσης των καροτενοειδών και μείωση της χλωροφύλλης. Η συγκέντρωση των καροτενοειδών καθορίζει και το χρώμα των φρούτων και λαχανικών, όπως συμβαίνει με τις ντομάτες, τα βερίκοκα και τα ροδάκινα, τα οποία καθώς ωριμάζουν γίνεται πιο κόκκινα.

Όσον αφορά την επεξεργασία των τροφίμων, γενικά οι συνθήκες της επεξεργασίας των τροφίμων έχουν μικρή επίδραση στην σταθερότητα των καροτενοειδών. Όταν οι ενώσεις των καροτενοειδών είναι ενωμένες με πρωτεΐνες, γίνονται πιο ανθεκτικές στις εξωτερικές επιδράσεις σε σχέση με τα ελεύθερα καροτενοειδή. Η υψηλή ακορεστότητα του μορίου τους καθιστά το φως και το οξυγόνο τους κύριους παράγοντες αποικοδόμησης. Το ζεμάτισμα

(blanching) μπορεί να οδηγήσει σε καταστροφή των ενζύμων που αποικοδομούν τα καροτενοειδή. Αν και γενικά είναι πολύ σταθερά σε θερμική επεξεργασία και συνθήκες κατάψυξης, έχουν μικρή αντοχή κατά την αφυδάτωση, εκτός εάν συσκευάζονται υπό συνθήκες αδρανών αερίων (MAP). [40]



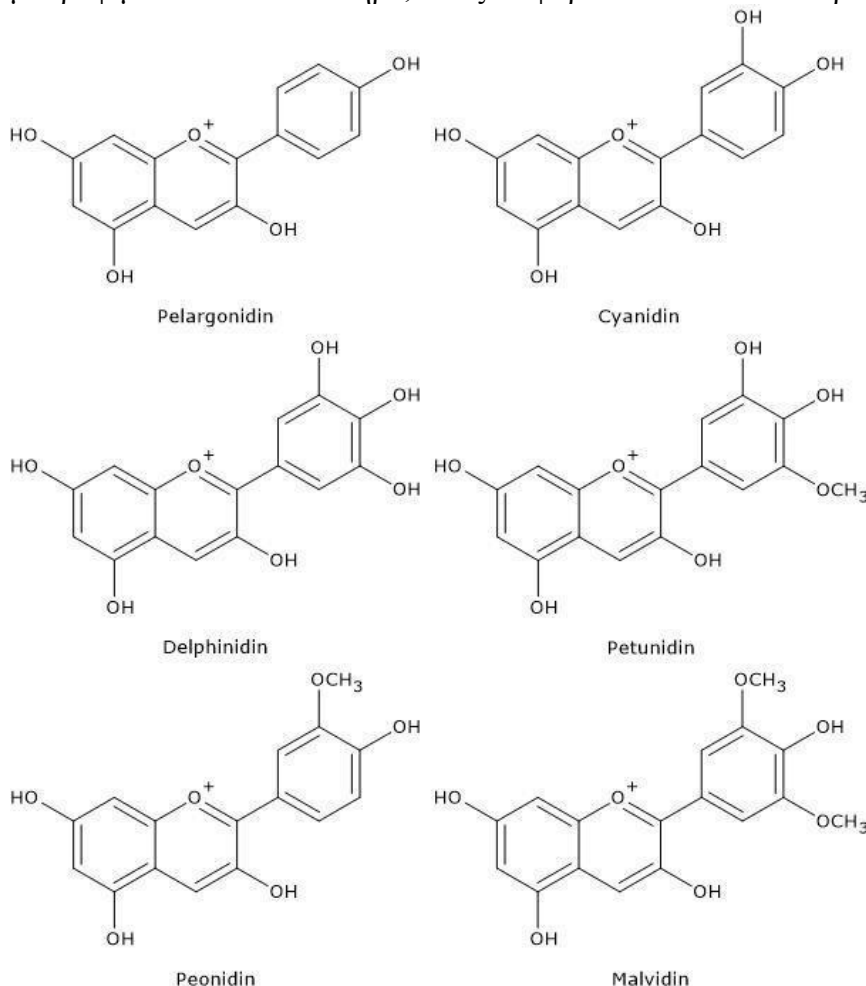
Εικόνα 2: Μόρια Καροτενοειδών : Λυκοπένιο, β - Καροτένιο, Λουτεΐνη, Ανθηραξανθίνη, Ασταξανθίνη (Landrier, Jean-François & Marcotrichino, Julie & Tourniaire, Franck. (2012). Lipophilic Micronutrients and Adipose Tissue Biology. Nutrients. 4. 1622-49. 10.3390/nu4111622.)

1.1.2 Ανθοκυανίνες

Οι ανθοκυανίνες είναι φυσικές χρωστικές που απαντώνται ευρέως στο χυμό των φυτών και είναι υπεύθυνες για το κόκκινο, πορτοκαλί, κίτρινο-πορτοκαλί, βιολέ και μπλε χρώμα των φρούτων και λαχανικών. Μπορούν να βρεθούν σε φυτικά προϊόντα, όπως το κόκκινο λάχανο, τα κόκκινα κρεμμύδια, οι μελιτζάνες, οι φράουλες, τα κόκκινα σταφύλια και στα μούρα.

Από την άλλη, οι ανθοξανθίνες ή φλαβονοειδή βρίσκονται σε φυτά όπως τα κουνουπίδια, οι κράμβες, τα ανοιχτόχρωμα κρεμμύδια, τα άσπρα μούρα και έχουν κίτρινο έως υποκίτρινο χρώμα, το οποίο σε αλκαλικό περιβάλλον γίνεται κίτρινο.

Και οι δύο αυτές κατηγορίες φυσικών χρωστικών επηρεάζονται από ποικίλους παράγοντες κατά την επεξεργασία των τροφίμων, όπως η θερμική επεξεργασία, το pH, η περιεκτικότητα σε ζάχαρη και η παρουσία ασκορβικού οξέος. Επιπλέον, η παρουσία ιόντων σιδήρου μπορεί να οδηγήσει σε γκρι-μπλε ή μαύρο χρώμα, ενώ η παρουσία ιόντων Al^{+3} μπορεί να προκαλέσει κίτρινες ή καφέ αποχρώσεις. Επομένως, κατά το μαγείρεμα, είναι σημαντικό να αποφεύγονται η παρατεταμένη επαφή με σιδερένια ή αλουμινένια σκεύη, καθώς και η επαφή με τρόφιμα πλούσια σε σίδηρο, όπως τα ψάρια και τα κόκκινα κρέατα. [82] [83]



Εικόνα 3: Μόρια Ανθοκυανών: Pelargonidin, Cyanidin, Delphinidin, Petunidin, Peonidin, Malvidin (Custodio-Mendoza JA, Aktaş H, Zalewska M, Wyrwicz J, Kurek MA. A Review of Quantitative and Topical Analysis of Anthocyanins in Food. *Molecules*. 2024; 29(8):1735.)

1.1.3 Βεταλαΐνες

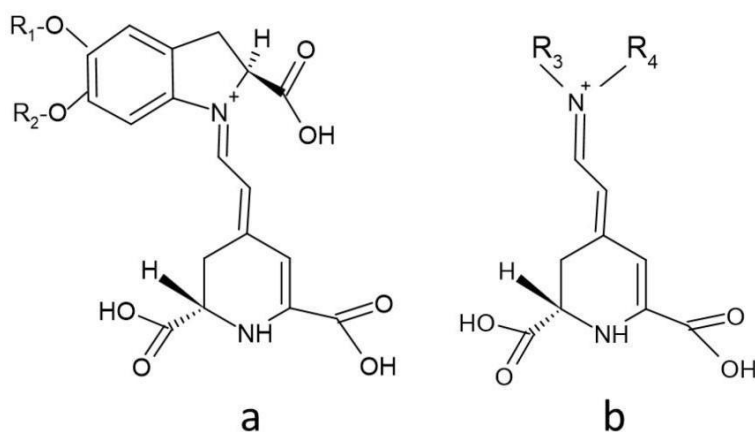
Οι Βεταλαΐνες αποτελούν υδατοδιαλυτές χρωστικές που συχνά εντοπίζονται στα παντζάρια και στα φραγκόσυκα. Κατηγοριοποιούνται σε δύο κύριες ομάδες: τις κόκκινες βετακυανίνες, όπως η βετανίνη, η ισοβετανίνη, η προβετανίνη και η νεοβετανίνη, και τις κίτρινες – πορτοκαλί βεταξανθίνες, όπως η βουλγαξανθίνη και η μιραξανθίνη.

Η κυρία βετακυανίνη του παντζαριού είναι η βετανίνη, η οποία αποτελεί το 75% έως 95% των συνολικών χρωστικών που περιέχονται σε αυτό. Λόγω της αντιοξειδωτικής δράσης που εμφανίζουν, τα παντζάρια κατατάσσονται στα 10 πρώτα λαχανικά που εμφανίζουν αντιοξειδωτική δράση.

Ενώ δεν απαντώνται συχνά στη φύση, οι βεταλαΐνες είναι πιο ανθεκτικές στην υδρόλυση και στις όξινες συνθήκες σε σύγκριση με τις ανθοκυανίνες. Η σταθερότητά τους εμφανίζεται κυρίως σε τιμές pH από 5 έως 7. Σε όξινες τιμές, η χρωστική παίρνει βιολετί χρωματισμό, ενώ σε αλκαλικές τιμές παίρνει έντονο μπλε χρώμα.

Η δράση του φωτός και του οξυγόνου, ειδικά σε αλλαγές pH εκτός του εύρους 5-7, μπορεί να επηρεάσει αρνητικά τη σταθερότητά τους. Επιπλέον, τα κατιόντα του σιδήρου, του κασσίτερου και, ιδιαίτερα, του χαλκού μπορούν να επιταχύνουν την αποικοδόμησή τους σε παρουσία οξυγόνου.

Για να χρησιμοποιηθούν ως χρώσεις σε τρόφιμα, απαιτείται η μεθοδολογία της «παγίδευσής» τους σε συστατικά όπως η μαλτοδεξτρίνη, προκειμένου να προστατευθούν από τις περιβαλλοντικές επιδράσεις. Επιπλέον, λόγω των αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων τους, μπορούν να δράσουν ως αντιφλεγμονώδεις και αντικαρκινικές ουσίες, ενώ εμφανίζουν επίσης αντιπηκτικές και αντιχοληστεριναιμικές ιδιότητες, προστατεύοντας τον οργανισμό από καρκινογόνες τοξίνες.



Εικόνα 4: Μόρια Βεταλαΐνών: a betaxanthin, b betacyanin

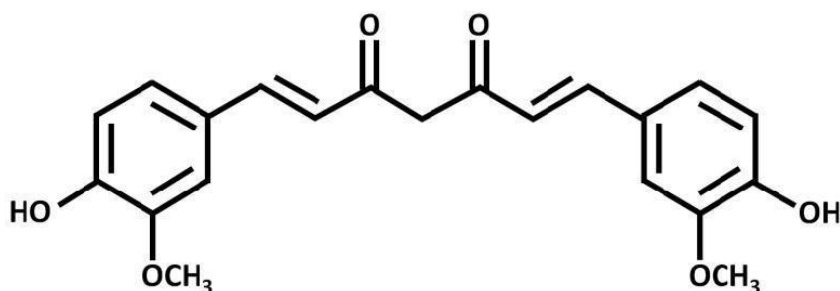
(Damit, Dk & Galappaththi, Kalpana & Lim, Andery & Petra, Mohammad & Ekanayake, Piyasiri. (2017). Formulation of water to ethanol ratio as extraction solvents of *Ixora coccinea* and *Bougainvillea glabra* and their effect on dye aggregation in relation to DSSC performance. Ionics. 23. 10.1007/s11581-016-1859-y.)

1.1.4 Κουρκουμίνη

Η κουρκουμίνη είναι μια φυσική χρυσοκίτρινη χρωστική ουσία — επίσης γνωστή ως CI Natural Yellow 3 ή E 100 ($\lambda_{\max} = 420 \text{ nm}$)— που προέρχεται από το φυτό *Curcuma longa* L., που προέρχεται από την Ανατολική Ινδία. Ο χημικός τύπος για την κουρκουμίνη είναι $\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_6$ και λαμβάνεται από τη ρίζα αυτού του φυτού που χρησιμοποιείται σε μορφή σκόνης παγκοσμίως γνωστή ως κουρκουμάς. Ο κουρκουμάς, ένα συστατικό στο μπαχαρικό κάρυ, χρησιμοποιείται ευρέως στην Ινδία ως χρωστική ή συντηρητικό τροφίμων. Η κουρκουμίνη αποτελεί έως και το 8% της φυτοχημικής της σύνθεσης μαζί με τη διμεθοξυ-κουρκουμίνη, τη διμεθοξυ-κουρκουμίνη, την κουρκουμενόλη, την ευγενόλη και την τετραϋδροκουρκουμίνη. [16] [17]

Σήμερα, η κουρκουμίνη παρασκευάζεται με συνδυασμό 77% διφαιρλουϋλομεθάνιο, 18% διμεθοξυ-κουρκουμίνη και 5% διδιμεθοξυ-κουρκουμίνη. Σε όξινο περιβάλλον, η κουρκουμίνη αποκτά βαθύ κόκκινο χρώμα. Ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας έχει επίσημα εγκρίνει τη χρήση της ως χρωστική τροφίμων. Το μόριο της κουρκουμίνης αποτελείται από δύο. Η κουρκουμίνη βρίσκεται σε ταυτομερισμό κετο-ενόλης που αποτελείται από δύο ομάδες χρωμοφόρου αρυλ-βουτεν-2-μονο-φαιρλουϋλίου ενωμένες με μια μεθυλομάδα, με την ισορροπία να ευνοεί τη μορφή της ενόλης. Η ενολική δομή διευκολύνει το σχηματισμό πρόσθετων ενδομοριακών δεσμών υδρογόνου. Ως εκ τούτου, παρά την έλλειψη υδατοδιαλυτών ομάδων που οδηγεί σε χαμηλή διαλυτότητα στο νερό, η κουρκουμίνη μπορεί

να τροποποιηθεί χημικά για να ενισχύσει τη βιοδιαθεσιμότητά της (π.χ. απορρόφηση από τον οργανισμό).[18]



Εικόνα 5: Μόριο Κουρκουμίνης

(Zhai, Kevin & Brockmüller, Aranka & Kubatka, Peter & Shakibaei, Mehdi & Büsselberg, Dietrich. (2020). Curcumin's Beneficial Effects on Neuroblastoma: Mechanisms, Challenges, and Potential Solutions. *Biomolecules*. 10. 10.3390/biom10111469.)

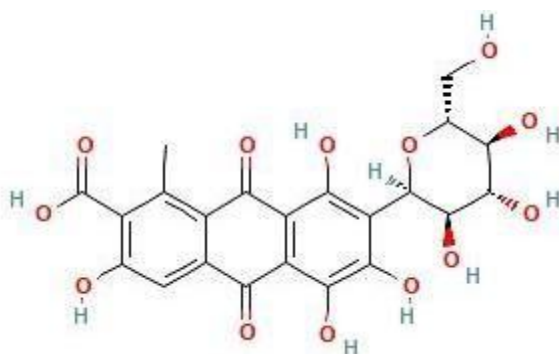
1.1.5 Καρμίνη

Η καρμίνη, επίσης γνωστή ως Natural Red 4 (CI number 75470 στην FDA των ΗΠΑ ή E120 στην Ευρωπαϊκή Ένωση), έχει τουλάχιστον 43 συνώνυμα που χρησιμοποιούνται για να την περιγράψουν, όπως καρμινικό οξύ και κοχενίλη. Αποτελείται κυρίως από καρμινικό οξύ σε ποσοστό 94-98%, με τα υπόλοιπα συστατικά να περιλαμβάνουν κερμεσικό οξύ και φλαβοκερμεσικό οξύ σε ποσοστά 0.1% και 0.4% αντίστοιχα, ενώ άλλα τέσσερα συστατικά δεν έχουν ακόμα ανακαλυφθεί. Η καρμίνη ανήκει στις ανιοντικές χρωστικές, είναι υδατοδιαλυτή και έχει χημική σταθερότητα σε χαμηλά pH και αντίσταση στην οξείδωση και το φως.

Η χρωστική αποσταγμένη από την *Cochineal*, ένα είδος εντόμου της οικογένειας *Dactylopius coccus*, έχει βαθυκόκκινο χρώμα και χρησιμοποιείται σε ποικίλες εφαρμογές. Αρχικά χρησιμοποιήθηκε από τους Αζτέκους για την επισήμανση σώματος και υφασμάτων, ενώ σήμερα καλλιεργείται σε πολλές χώρες όπως η Χιλή και το Μεξικό. Η παραγωγή της περιλαμβάνει εκχύλιση με οργανικούς διαλύτες και διαδικασίες φυγοκέντρησης για να ανακτηθεί το καρμινικό οξύ από τα ξηρά σώματα των θηλυκών εντόμων. Παρά την ασφάλεια της από την άποψη της τοξικότητας και των μεταλλικών ιόν, έχουν αναφερθεί περιστατικά αλλεργικών αντιδράσεων σε άτομα που κατανάλωσαν προϊόντα που περιείχαν καρμίνη. Η καρμίνη είναι ευρέως χρησιμοποιούμενη στις βιομηχανίες τροφίμων ως χρωστική, συνήθως σε συνδυασμό με μεταλλικό ασβέστιο για να δώσει βαθύ κόκκινο χρώμα σε αλκοολούχα ποτά, γαλακτοκομικά προϊόντα, χυμούς, φρούτα, λαχανικά, μαρμελάδες και άλλα τρόφιμα. Επίσης, χρησιμοποιείται σε φαρμακευτικά προϊόντα και καλλυντικά ως αντιοξειδωτικός παράγοντας και σε αναλυτική χημεία για διάφορες εφαρμογές. Το κόκκινο χρώμα της καρμίνης πρωτοχρησιμοποιήθηκε από τους Αζτέκους για διακοσμητικούς και ιατρικούς σκοπούς, μια παράδοση που συνεχίζεται μέχρι σήμερα.

Ωστόσο, παρά τις εφαρμογές της, η καρμίνη δεν είναι απαλλαγμένη από ανησυχίες σχετικά με την υγεία. Αν και θεωρείται μη τοξική και μη μεταλλικογόνα, έχουν αναφερθεί περιστατικά αλλεργικών αντιδράσεων σε μεμονωμένα άτομα. Οι επιπτώσεις της καρμίνης στην υγεία απαιτούν συνεχή παρακολούθηση και αξιολόγηση, ειδικά στο πλαίσιο των νέων μεθόδων παραγωγής που εφαρμόζονται για τη βελτίωση της απόδοσης και τη μείωση των περιβαλλοντικών επιπτώσεων.

Τέλος, η μέση κατανάλωση καρμινικού οξέος ανά άτομο ανά έτος είναι σχετικά μικρή, αλλά η ενδεχόμενη επίδρασή της στην υγεία παραμένει αντικείμενο ερευνών και παρακολούθησης από τις αρμόδιες αρχές ρύθμισης. [4] [14]



Εικόνα 6: Μόριο Καρμίνης

(Aydoğan, Şakir & İncekara, Ümit & Deniz, A. & Turut, Abdulmecit. (2014). Determination of contact parameters of Au/Carmine/n-Si Schottky device. Thin Solid Films-2010.)

1.2. Τεχνητές Χρωστικές

Η χρήση συνθετικών χρωστικών τροφίμων ξεκίνησε κοντά στα τέλη του 19ου αιώνα και αποτέλεσε σημαντικό μέρος της βιομηχανίας τροφίμων του 20ού αιώνα. Αυτές οι χρωστικές παράγονται χημικά και από συγκεκριμένες χημικές ουσίες, κυρίως από αζωχρώματα, τα οποία αποτελούν τη μεγαλύτερη κατηγορία συνθετικών χρωστικών στην αγορά.

Οι κύριες συνθετικές χρωστικές κατατάσσονται σε πέντε ομάδες: τις αζω-ενώσεις, την ομάδα τριαρυλομεθανίου (π.χ. E131, E133), το παράγωγο κιννοφθαλόνης του κίτρινου της κινολίνης (E104), τις ξανθίνες (π.χ. ερυθροϊζίνη) και τα ινδικο-χρώματα όπως η ινδικο-καρμίνη.

Ειδικότερα, οι αζω-χρωστικές αποτελούν την μεγαλύτερη ομάδα συνθετικών χρωστικών. Οι αζω-ενώσεις έχουν ως χρωμοφόρα ομάδα την $R-N=N-R'$, όπου τα R και R' μπορεί να είναι αρύλιο ή αλκύλιο. Παραδείγματα αζωχρωμάτων είναι η Sunset Yellow, η ταρταζίνη, το ερυθρό Allura AC, η αμαράνθη και η καρμοϊσίνη. Οι αζω-ενώσεις ανάγονται σε αρωματικές

αμίνες (ο διπλός δεσμός N διασπάται με τη βοήθεια ενζύμων που βρίσκονται στο ήπαρ ή στο δέρμα), οι οποίες μπορεί να είναι τοξικές, μεταλλαξιογόνες και καρκινογόνες. Για παράδειγμα, η καρμοϊσίνη απαγορεύθηκε στις ΗΠΑ επειδή θεωρήθηκε υπεύθυνη για την τροποποίηση/μετάλλαξη της αλβουμίνης, μιας ανθρώπινης πρωτεΐνης.

Παρόλο που οι συνθετικές χρωστικές είναι εύκολο να παραχθούν και είναι οικονομικές, έχουν αντιμετωπίσει κριτική λόγω των πιθανών αρνητικών επιπτώσεων τους στην υγεία και το περιβάλλον. Αυτό έχει οδηγήσει σε απαγορεύσεις ή περιορισμούς στη χρήση ορισμένων συνθετικών χρωστικών, ενώ άλλες έχουν ανασταλεί εξ ολοκλήρου, όπως το Allura Red (E129) και η ερυθροσίνη σε ορισμένες περιοχές. Οι βιομηχανικά προτιμώμενες συνθετικές βαφές είναι χημικά ή φυσικά τροποποιημένα προϊόντα με επιθυμητές ιδιότητες όπως υψηλή καθαρότητα, δυνατότητα βαφής των τροφίμων, σταθερότητα, μεγάλη ποικιλία αποχρώσεων, ομοιομορφία χρώματος και χαμηλό κόστος παραγωγής σε σύγκριση με τις φυσικές χρωστικές. Με την εξέλιξη της επιστήμης, αναπτύχθηκαν περισσότερα τεχνητά χρώματα, τα οποία εμφανίζουν μεγάλη σταθερότητα και παρέχουν μια ευρεία ποικιλία χρωμάτων, γεγονός που οδήγησε στην αυξανόμενη χρήση τους στη βιομηχανία τροφίμων. Ωστόσο, παρά τη συνεχιζόμενη έρευνα σε συνθετικές ενώσεις, πολλές από τις οποίες προορίζονται για την κατανάλωση των τροφίμων σχετίζονται με διάφορες παρενέργειες για τον ανθρώπινο οργανισμό. Μελέτες έχουν δείξει ότι η κατανάλωση τεχνητών βαφών, κυρίως νιτροπαραγώγων, αζωτύπων (E102, E110, E122, E123, E124 και E129) μπορεί να προκαλέσει ορισμένα προβλήματα υγείας. Το Ευρωπαϊκό Κοινοβούλιο αποφάσισε το 2008 ότι τα τρόφιμα που περιέχουν ένα ή περισσότερα από αυτά τα πρόσθετα χρώματος πρέπει να φέρουν ετικέτα με το όνομα ή τον αριθμό E ακολουθούμενο από την προειδοποίηση "μπορεί να βλάψει την υγεία". [25]

Συγκεκριμένα η ταρτραζίνη (E102), είναι ένα από τα πιο αμφιλεγόμενα χρωματικά πρόσθετα όσον αφορά την ασφάλειά του. Η ιδεοψυχαναγκαστική διαταραχή και η υπερκινητικότητα στα παιδιά έχουν συσχετιστεί τόσο με την κατανάλωσή της όσο και με τις μεταλλαξιογόνες επιδράσεις της επειδή αλληλεπιδρά με τις πρωτεΐνες του ανθρώπινου ορού. Τα ποντίκια εμφάνισαν αυξημένη λιπιδική οξειδωση και αλλαγές στους βιοχημικούς δείκτες σηματοτοξίνης του εγκεφαλικού ιστού, επιδράσεις ανοσοτοξίνης, ανωμαλίες στα νεφρά, και αυξημένες ανωμαλίες του DNA. Παράλληλα η χρωστική αμάρανθος (E123), μια βαφή που δίνει κόκκινο χρώμα σε τρόφιμα όπως καραμέλες, παγωτά και ποτά, επιτρέπεται στην ΕΕ αλλά απαγορεύεται στις Ηνωμένες Πολιτείες λόγω καρκινογένεσης, έχει δείξει υψηλή γονοτοξικότητα στα ανθρώπινα λεμφοκύτταρα. Είναι σημαντικό να σημειωθεί ότι υπάρχουν χρωστικές που επιτρέπονται στην Ευρωπαϊκή Ένωση, αλλά δεν είναι πλέον τα ίδια στις Ηνωμένες Πολιτείες. Δεδομένου αυτών των αντιπαραθέσεων και των επιπτώσεων στην υγεία των τεχνητών χρωστικών, δίνεται αυξανόμενη έμφαση στη διερεύνηση των φυσικών πηγών τόσο για την ασφάλεια όσο και για την προαγωγή της υγείας. Ορισμένες εναλλακτικές λύσεις έχουν αναπτυχθεί στις ΗΠΑ και την ΕΕ με εξαιρετικά αποτελέσματα, συμπεριλαμβανομένων μορίων όπως τα καροτενοειδή, οι ανθοκυανίνες, το annatto που έχουν πιθανές ιδιότητες που θα μπορούσαν να αντικαταστήσουν τα συνθετικά αντίστοιχα. Ωστόσο, αυτές οι ενώσεις έχουν μειονεκτήματα όπως η έλλειψη σταθερότητας στο pH και τη θερμοκρασία, απώλεια χρώματος λόγω οξειδωσης και υψηλότερο κόστος παραγωγής σε σύγκριση με τις συνθετικές χρωστικές. [28] [29]

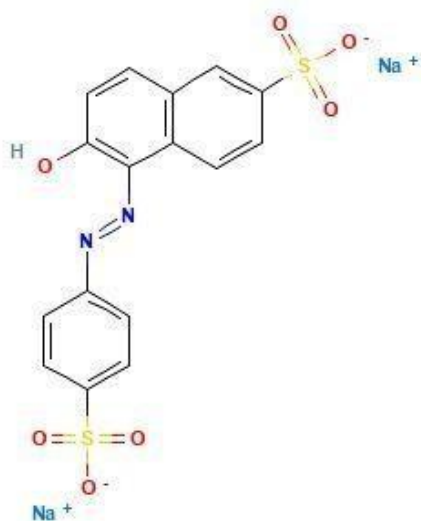
1.2.1 Sunset Yellow FCF

Η FD & C Yellow No. 6 (γνωστή στις ΗΠΑ) ή E110 (γνωστή στην ΕΕ) ή 6-υδροξυ-5-[(4-σουλφοφαινυλ) αζω]-2-ναφθαλενοσουλφονικό οξύ δινάτριο άλας (διαζώχρωμα) είναι μια συνθετική, υδατοδιαλυτή και ανιοντική χρωστική τροφίμων. Το μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης της είναι 481 nm και η μοριακή μάζα της είναι 452 g/mol. Η χρωστική αυτή έχει εγκριθεί από τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας από το 1982. Η Sunset Yellow FCF παράγεται μέσω της διαζώτωσης σουλφονικού οξέος με τη χρήση υδροχλωρικού οξέος και νιτρώδους νατρίου, και στη συνέχεια συνδυάζεται με 6-υδροξυ-2-ναφθαλενοσουλφονικό οξύ. Μετά την απομόνωση, η χρωστική ξηραίνεται.

Η κύρια μέθοδος ανίχνευσης αυτής της χρωστικής στα τρόφιμα είναι η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC). Άλλες μέθοδοι, όπως οι φασματοφωτομετρικές τεχνικές και η φασματοσκοπία φθορισμού, χρησιμοποιούνται επίσης για τον προσδιορισμό της E110 σε διάφορα προϊόντα. Παρόλα αυτά, αυτές οι μέθοδοι έχουν περιορισμούς, όπως το υψηλό κόστος εξοπλισμού και η ανάγκη για εξειδικευμένους χειριστές. Νεότερες μέθοδοι με ηλεκτροχημικούς αισθητήρες, όπως τα ηλεκτρόδια υαλώδους άνθρακα, προσφέρουν μεγαλύτερη ευαισθησία, ευκολία στη χρήση και χαμηλότερο κόστος.

Η χρωστική E110 χρησιμοποιείται σε προϊόντα όπως μαρμελάδες (πορτοκαλί και κίτρινες), ζαχαρώδη, γλυκά, αλκοολούχα ποτά και καπνιστά ψάρια. Η επιτρεπτή ημερήσια δόση για τον άνθρωπο είναι 0-1 mg/kg/ημέρα, ενώ η μέγιστη επιτρεπόμενη ποσότητα ανά kg τροφίμου είναι 500 mg. Η Ινδία χρησιμοποιεί την Sunset Yellow περισσότερο από οποιαδήποτε άλλη χρωστική, ενώ σε χώρες όπως η Νορβηγία και η Φινλανδία έχει απαγορευτεί η χρήση της.

Η χρωστική E110 δεν προκαλεί μεταλλάξεις στο γενετικό υλικό λόγω της αδυναμίας της να απορροφηθεί από τα ανθρώπινα κύτταρα, εξαιτίας των δύο σουλφο-ομάδων στο μόριό της, και δεν συνδέεται με καρκινογενέσεις. Ωστόσο, είναι μία από τις συνθετικές χρωστικές που μπορεί να προκαλέσει άσθμα, ανοσοκαταστολή, έκζεμα και ημικρανίες σε περίπτωση υπερβολικής κατανάλωσης. [12] [43] [54] [57]



Εικόνα 7: Sunset Yellow FCF

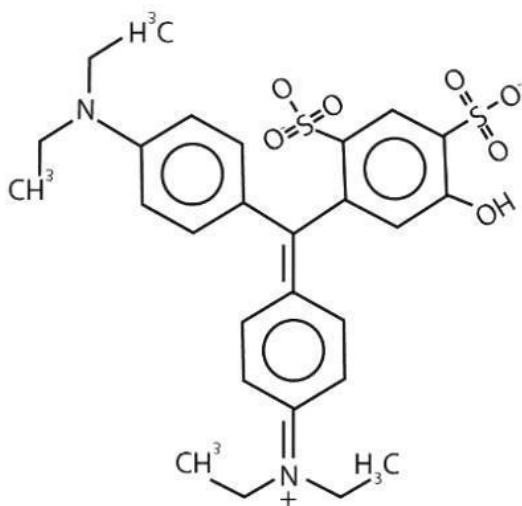
1.2.2 Patent Blue

Η χρωστική Patent Blue (ή E 131) είναι μια υδατοδιαλυτή ανιοντική χρωστική με σκούρο μπλε χρώμα. Υπάρχει σε μορφή σκόνης ή κόκκων και υπό δύο μορφές αλάτων, ασβεστίου ή νατρίου (lakes). Το σημείο τήξης της είναι πάνω από 300°C και ανήκει στην ομάδα τριαρυλομεθανίου, βασισμένη στο σκελετό τριφαινυλομεθανίου. Άλλες χρωστικές στην ίδια ομάδα περιλαμβάνουν την Brilliant Blue (E 133), τη Fast Green (E 143) και τη Brilliant Black (E 151). Από αυτές, οι Patent Blue και Brilliant Blue είναι οι πιο γνωστές.

Η χρωστική Patent Blue απαγορεύεται στις Ηνωμένες Πολιτείες. Στη διαδικασία παραγωγής της πρέπει να τηρούνται αυστηρές προδιαγραφές, όπως οι Γενικές Προδιαγραφές για τις Λάκκες Αλουμινίου χρωστικών ουσιών. Η λάκκα αλουμινίου της δεν πρέπει να περιέχει περισσότερο από 2% υδατοδιαλυτά χλωριούχα και θειικά άλατα ή 0.5% αδιάλυτη σε υδροχλωρικό οξύ.

Η μέγιστη επιτρεπόμενη συγκέντρωση της Patent Blue σε προϊόντα τροφίμων είναι 500 mg/kg. Η χρωστική αυτή μπορεί να απορροφηθεί άμεσα μέσω του στόματος στην κυκλοφορία του αίματος και η επαφή με το δέρμα μπορεί να έχει μακροπρόθεσμες επιπτώσεις στην ανθρώπινη υγεία. Έχουν ανιχνευθεί περιστατικά χαμηλών επιπέδων αιματοκρίτη ή ερυθρών αιμοσφαιρίων μετά από μακροχρόνια έκθεση σε υψηλές δόσεις Patent Blue. Παρ' όλα αυτά, δεν έχει ανιχνευθεί μεταλλαξιογόνο δραστηριότητα, ικανότητα καταστροφής του DNA ή τοξικότητα στην αναπαραγωγή. Επίσης, δεν έχουν καταγραφεί θάνατοι λόγω ανάρμοστης απορρόφησης της χρωστικής αυτής.

Τα βασικά προϊόντα που περιέχουν Patent Blue και καταναλώνονται από διάφορες ομάδες πληθυσμού περιλαμβάνουν αρωματισμένα αναψυκτικά, αρωματισμένα γαλακτοκομικά προϊόντα, εκλεκτά αρτοσκευάσματα και σάλτσες. [6] [8] [10] [58]



Εικόνα 8: Μόριο Χρωστικής Patent Blue

(Barka, Noureddine & Qourzal, S. & Assabbane, Ali & Nounah, Abderrahmane & Ait-Ichou, Y.. (2011). Photocatalytic degradation of patent blue V by supported TiO₂: Kinetics, mineralization, and reaction pathway. Chemical Engineering Communications. 198. 1233-1243. 10.1080/00986445.2010.525206.)

Κεφάλαιο 2.1 - Χλωροφύλλες

2.1.1 Δομή Χλωροφυλλών

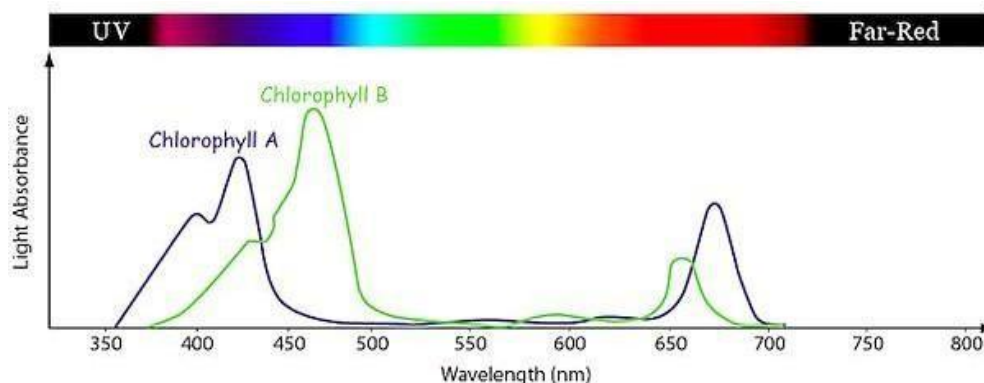
Από χημική άποψη, οι χλωροφύλλες ανήκουν στις πορφυρίνες, με το απλούστερο μόριό τους να είναι η πορφίνη, η οποία αποτελεί τη βασική δομή όλων των χλωροφυλλών. Η πορφίνη αποτελείται από τέσσερις πυρρολικούς δακτυλίους που συνδέονται μεταξύ τους στη θέση α μέσω μεθυλενικών ομάδων, σχηματίζοντας ένα επίπεδο συζυγιακό σύστημα. Αυτό το σύστημα είναι εξαιρετικά σταθερό και ιδανικό για το σχηματισμό χηλικού συμπλόκου με ιόντα μετάλλων, ειδικά με Mg^{2+} . Επιπλέον, φέρει έναν κυκλοπεντενονικό δακτύλιο με καρβοξυλική ομάδα εστεροποιημένη με μεθανόλη και μια ομάδα προπανοϊκού οξέος στον πυρρολικό δακτύλιο D, που είναι εστεροποιημένη με μια αλκοόλη γνωστή ως φυτόλη (3,7,11,15-τετραμεθυλοδεκαεξ-2-ενόλη). Η βασική διαφορά στη δομή μεταξύ των χλωροφυλλών α και β είναι ότι η πρώτη έχει μια μεθυλική ομάδα ($-CH_3$) στη θέση 7, ενώ η δεύτερη έχει μια φορμυλοομάδα ($-CHO$) στο ίδιο σημείο. [87]

2.1.2 Φυσικές Ιδιότητες Χλωροφυλλών

1) Απορρόφηση στο υπεριώδες - ορατό

Το πράσινο χρώμα των χλωροφυλλών οφείλεται στην ικανότητά τους να απορροφούν ακτινοβολία στις περιοχές του ερυθρού και του ιώδους στο ορατό φάσμα. Το μέρος του μορίου που είναι υπεύθυνο για αυτή την απορρόφηση είναι το σύστημα των 11 συζυγιακών διπλών δεσμών, γνωστό και ως χρωμοφόρος ομάδα. Το φάσμα υπεριώδους-ορατού περιλαμβάνει αρκετές έντονες ταινίες απορρόφησης στην περιοχή του κίτρινου και του ερυθρού, καθώς και μία ταινία υψηλής απορρόφησης στην περιοχή του ιώδους ή του εγγύς ιώδους, γνωστή ως ταινία απορρόφησης Soret. Η ύπαρξη αυτής της ταινίας δείχνει ότι η βασική δομή της πορφυρίνης παραμένει ανέπαφη.

Η χλωροφύλλη α έχει μπλε-πράσινη απόχρωση, ενώ η χλωροφύλλη β εμφανίζει κιτρινοπράσινη απόχρωση. Παράγωγα όπως τα επιμερή και τα αλλομερή, που μπορεί να προκύψουν, παρουσιάζουν παρόμοια φάσματα, καθώς η δομή της χρωμοφόρου ομάδας παραμένει ανεπηρέαστη. Αντίθετα, παράγωγα από οξειδωτικές αντιδράσεις που προκαλούν διάνοιξη του ισοκυκλικού δακτυλίου, εμφανίζουν διαφορετικά φάσματα. [86]



Εικόνα 9: Φάσμα Απορρόφησης Χλωροφύλλης α και β
(Panawala, Lakna. (2017). Home » Science » Biology » Cell Biology » Difference Between Chlorophyll A and B Difference Between Chlorophyll A and B Main Difference – Chlorophyll A vs Chlorophyll B.)

2.1.3 Μέθοδοι προσδιορισμού Χλωροφυλλών

● Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Η Υγρή Χρωματογραφία Υψηλής Απόδοσης (High-Performance Liquid Chromatography, HPLC) είναι μια τεχνική που χρησιμοποιείται ευρέως για τον διαχωρισμό, την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό συστατικών σε ένα μείγμα. Ακολουθεί μια λεπτομερής περιγραφή της αρχής λειτουργίας της HPLC:

Οι Βασικές Αρχές της HPLC αναγράφονται παρακάτω:

1. Κινητή Φάση (Mobile Phase)

Η κινητή φάση στην HPLC είναι ένα υγρό διαλύτης ή μείγμα διαλυτών που μεταφέρει το δείγμα μέσω της στήλης. Μπορεί να αποτελείται από νερό, οργανικούς διαλύτες (π.χ. μεθανόλη, ακετονιτρίλιο) ή μείγματα αυτών. Η επιλογή της κινητής φάσης εξαρτάται από τη φύση των συστατικών του δείγματος και τον τύπο της στήλης που χρησιμοποιείται.

2. Στατική Φάση (Stationary Phase)

Η στατική φάση είναι το υλικό που βρίσκεται μέσα στη στήλη και αλληλεπιδρά με τα συστατικά του δείγματος. Συχνά αποτελείται από μικροσφαιρίδια πυριτίας επικαλυμμένα με διάφορες χημικές ομάδες (π.χ. C18, C8, φαινόλη). Η φύση της στατικής φάσης καθορίζει τον τύπο της χρωματογραφίας (π.χ. αντίστροφη φάση, κατιοντική ανταλλαγή).

3. Στήλη (Column)

Η στήλη είναι ένας σωλήνας, συνήθως κατασκευασμένος από ανοξείδωτο χάλυβα, που περιέχει τη στατική φάση. Το μήκος και η διάμετρος της στήλης, καθώς και το μέγεθος των σωματιδίων της στατικής φάσης, επηρεάζουν την αποδοτικότητα του διαχωρισμού.

4. Αντλία (Pump)

Η αντλία είναι υπεύθυνη για την παροχή της κινητής φάσης μέσω της στήλης με υψηλή πίεση. Οι πιέσεις που χρησιμοποιούνται στην HPLC μπορεί να κυμαίνονται από 500 έως 5000 psi (περίπου 35 έως 350 bar).

5. Δείγμα (Sample)

Το δείγμα εισάγεται στο σύστημα HPLC μέσω ενός βρόχου (injector) ή αυτόματου δειγματολήπτη (autosampler). Η ποσότητα του δείγματος είναι συνήθως πολύ μικρή, κυμαινόμενη από μερικά μικρόλιτρα έως μερικά χιλιοστόλιτρα.

6. Ανιχνευτής (Detector)

Ο ανιχνευτής ανιχνεύει τα συστατικά που εκκλύονται από τη στήλη και μετατρέπει την αναλυτική απόκριση σε ηλεκτρικό σήμα. Κοινοί τύποι ανιχνευτών περιλαμβάνουν ανιχνευτές υπεριώδους-ορατού φάσματος (UV-Vis), ανιχνευτές διάθλασης (RI), και φθορισμομετρικούς ανιχνευτές.

7. Διαχωρισμός (Separation)

Ο διαχωρισμός των συστατικών επιτυγχάνεται λόγω των διαφορετικών αλληλεπιδράσεων των συστατικών του δείγματος με τη στατική και την κινητή φάση. Τα συστατικά που έχουν ισχυρότερη αλληλεπίδραση με τη στατική φάση εκκλύονται αργότερα από τη στήλη, ενώ αυτά που αλληλεπιδρούν περισσότερο με την κινητή φάση εκκλύονται γρηγορότερα.

8. Χρωματογράφημα (Chromatogram)

Το αποτέλεσμα του διαχωρισμού απεικονίζεται σε ένα χρωματογράφημα, όπου οι κορυφές αντιστοιχούν στα διάφορα συστατικά του δείγματος. Η θέση των κορυφών (χρόνος κατακράτησης) και η ένταση του σήματος χρησιμοποιούνται για την ταυτοποίηση και τον ποσοτικό προσδιορισμό των συστατικών. [1]

Διαδικασία Λειτουργίας της HPLC

1. Προετοιμασία Δείγματος

- Το δείγμα διαλύεται στην κατάλληλη κινητή φάση και φιλτράρεται για να αφαιρεθούν τα σωματίδια που μπορεί να φράξουν τη στήλη.

2. Εισαγωγή Δείγματος

- Το δείγμα εισάγεται στο σύστημα HPLC μέσω του βρόχου ή αυτόματου δειγματολήπτη.

3. Διαχωρισμός Συστατικών

- Η αντλία ωθεί την κινητή φάση και το δείγμα μέσω της στήλης, όπου πραγματοποιείται ο διαχωρισμός των συστατικών.

4. Ανίχνευση και Καταγραφή

- Τα συστατικά εκκλύονται από τη στήλη και ανιχνεύονται από τον ανιχνευτή, δημιουργώντας το χρωματογράφημα.

● Τύποι HPLC

- Χρωματογραφία Αντίστροφης Φάσης (Reverse Phase HPLC, RP-HPLC):

Χρησιμοποιείται κυρίως για πολικά και μη πολικά μόρια. Η στατική φάση είναι μη πολική (π.χ. C18), ενώ η κινητή φάση είναι πιο πολική (π.χ. μεθανόλη ή ακετονιτρίλιο με νερό).

- Χρωματογραφία Κατιονικής και Ανιοντικής Ανταλλαγής (Ion Exchange HPLC):

Χρησιμοποιείται για ιοντικά μόρια. Η στατική φάση περιέχει φορτισμένες ομάδες που αλληλεπιδρούν με τα ιόντα του δείγματος.

- Χρωματογραφία Κανονικής Φάσης (Normal Phase HPLC): Χρησιμοποιείται για μη πολικά μόρια. Η στατική φάση είναι πολική (π.χ. πυριτία), ενώ η κινητή φάση είναι μη πολική (π.χ. εξάνιο).

➤ Προετοιμασία Δείγματος

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των φωτοσυνθετικών χρωστικών μπορεί να χρησιμοποιηθεί οποιοσδήποτε φωτοσυνθετικός ιστός, όπως φύλλα ανώτερων φυτών, πράσινα φύκη ή βρύα. Ωστόσο, στην πράξη χρησιμοποιούνται συνήθως μαλακά φύλλα ανώτερων φυτών που λειοτριβούνται εύκολα, όπως τα φύλλα σπανακιού. Αν υπάρχει αρκετός χρόνος, η άσκηση μπορεί να επεκταθεί σε ποσοτικές συγκρίσεις μεταξύ σκιοφύτων και ηλιοφύτων, καθώς και μεταξύ φύλλων σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης (νεαρά, ώριμα και γηρασμένα φύλλα).

Η χημική δομή των ουσιών που θέλουμε να εκχυλίσουμε καθορίζει και τον τύπο του διαλύτη που θα χρησιμοποιηθεί. Επειδή οι φωτοσυνθετικές χρωστικές είναι λιποδιαλυτές, πρέπει να χρησιμοποιηθεί οργανικός διαλύτης (π.χ. βενζόλιο, αιθέρας, μεθανόλη, αιθανόλη, ακετόνη). Προτιμάται η ακετόνη (διάλυμα 80% v/v) επειδή αναμιγνύεται καλά με το νερό των κυττάρων χωρίς να σχηματίζει γαλάκτωμα και είναι λιγότερο επιβλαβής σε σχέση με τη μεθανόλη.

Παράδειγμα μίας προετοιμασίας δείγματος αποτελεί η παρακάτω:

Φύλλα βάρους 5g κόβονται σε μικρά κομμάτια και τοποθετούνται σε γουδί πορσελάνης μαζί με 0,5g καθαρής άμμου και 0,1g ανθρακικού ασβεστίου (CaCO_3). Τα φύλλα εκχυλίζονται σταδιακά με 50ml ακετόνης 80%, σε δόσεις των 5ml, για να διευκολυνθεί η ομογενοποίηση και να περιοριστούν οι απώλειες. Το εκχύλισμα μεταφέρεται σε σωλήνα φυγοκέντρησης και φυγοκεντρείται για 10 λεπτά στις 4000 στροφές ανά λεπτό. Το διαυγές πράσινο υπερκείμενο χρησιμοποιείται ως δείγμα για τη φασματοφωτομέτρηση, ενώ το ίζημα απορρίπτεται. Το υπερκείμενο μεταγγίζεται σε ογκομετρικό σωλήνα και ο όγκος του καταγράφεται. Το δείγμα μετράται στα 470, 646, 663 και 720 nm. Η απορρόφηση στα 720 nm οφείλεται σε πιθανό σκεδασμό και όχι στις φωτοσυνθετικές χρωστικές.

Η προσθήκη CaCO_3 αποτρέπει την οξίνιση του διαλύματος από πιθανά οξέα των φύλλων, που θα είχε ως αποτέλεσμα την απομάκρυνση του Mg από τα μόρια της χλωροφύλλης και τη δημιουργία φαιοφυτίνης, η οποία έχει διαφορετικό φάσμα απορρόφησης. Με φασματοφωτόμετρο διπλής δέσμης, λαμβάνεται το συνολικό φάσμα απορρόφησης του δείγματος στην ορατή περιοχή, καθώς το δείγμα αποτελείται από μίγμα χλωροφύλλης a, χλωροφύλλης b και καροτενοειδών, με κάθε χρωστική να συνεισφέρει στην απορρόφηση σε συγκεκριμένα μήκη κύματος. [102]

Οι εξισώσεις παρέχουν το περιεχόμενο της χρωστικής σε $\mu\text{g/ml}$ διαλύματος. Για να εκφραστούν τα ποσά κάθε χρωστικής ανά g νωπού βάρους, γίνονται οι απαραίτητες αναγωγές με βάση το βάρος των φύλλων που χρησιμοποιήθηκε, τον όγκο του εκχυλίσματος και τις αραιώσεις που έχουν γίνει.

Η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) επιτρέπει τον αποτελεσματικό διαχωρισμό και την ποσοτικοποίηση των χρωστικών και των παραγώγων τους, σε συνδυασμό με ανιχνευτές φασματόμετρου μάζας, υπεριώδους-ορατού ή φθορισμού.

Ο διαχωρισμός σε σύστημα αντίστροφης φάσης μπορεί να επιτευχθεί με διάφορα συστήματα έκλουσης. Η Mínguez - Mosquera και οι συνεργάτες της το 1992 πρότειναν βαθμωτή έκλυση με κινητή φάση νερό/αντιδραστήριο ζεύγους ιόντων/μεθανόλη σε αναλογία 1:1:8 (v/v/v) για την πρώτη φάση (Α) και ακετόνη/μεθανόλη σε αναλογία 1:1 (v/v) για τη δεύτερη φάση (Β). Το αντιδραστήριο ζεύγους ιόντων αποτελείται από διάλυμα 0,05 Μ οξικού τετραβουτυλαμμωνίου και 1 Μ οξικού αμμωνίου σε νερό. Χρησιμοποιείται στήλη C18. Σύμφωνα με το πρότυπο ISO (29841:2009), προτείνεται ισοκρατική έκλυση με σύστημα νερού: μεθανόλης:ακετόνης σε αναλογία 4:36:60 (v/v/v), σε στήλη 250 mm με διάμετρο 4 ή 4,6 mm και μέγεθος σωματιδίων 5 μm. [85]

Για την ανίχνευση των χλωροφυλλών και των παραγώγων τους και τον ποσοτικό προσδιορισμό, αξιοποιείται κυρίως η ικανότητά τους να απορροφούν στο ορατό φάσμα. Ενδεικτικά μήκη κύματος σύμφωνα με τους Rahmani και Csallany (1991) είναι τα 430 nm (Chl a), 452 nm (Chl b), 409 nm (Pheo a) και 433 nm (Pheo b). Εναλλακτικά, προτείνεται ο ανιχνευτής φθορισμού (ISO 29841:2009), με μήκος κύματος διέγερσης $\lambda=430$ nm και μήκος κύματος εκπομπής $\lambda=670$ nm. Η φασματοσκοπία μάζας χρησιμοποιείται για την ταυτοποίηση των ενώσεων και των προϊόντων αποικοδόμησης των χλωροφυλλών κατά την οξείδωσή τους. [40]

Εκχύλιση χλωροφυλλών και χλωροφυλλινών από προϊόντα διατροφής

Λαμβάνοντας υπόψη τους κανονισμούς σχετικά με τη χρήση χρωστικών ουσιών και προσθέτων τροφίμων, καθώς και τη σταθερότητα και τους πολυάριθμους αποικοδομητές των φυσικών χλωροφυλλών και χλωροφυλλινών υπό διαφορετικές συνθήκες στις βιομηχανίες επεξεργασίας τροφίμων κατά την παρασκευή τροφίμων και ποτών, η εκχύλιση των φυσικών χρωστικών ουσιών από αυτές τις πολύπλοκες μήτρες τροφίμων και ο διαχωρισμός και η ανάλυσή τους αποτελούν εξαιρετικά δύσκολο έργο για τους αναλυτές. Υπάρχουν διαφορετικές στρατηγικές που υιοθετούνται για την εκχύλιση των χρωστικών ουσιών τροφίμων από τρόφιμα και προϊόντα.

Οι Mathiyalagan et al. (2019) κατέταξαν τα τρόφιμα που συλλέχθηκαν σε δύο κατηγορίες: λιπαρά τρόφιμα (σοκολάτες, γλυκά, τσιπς) και μη λιπαρά τρόφιμα (σκληρά γλυκά).

Εκχύλιση χρωστικών ουσιών από λιπαρά προϊόντα τροφίμων

Οι συγγραφείς συνέλεξαν διάφορους τύπους λιπαρών προϊόντων διατροφής, όπως μαλακές καραμέλες, σκληρές καραμέλες και ζελεδάκια, για την ανάλυση των χρωστικών ουσιών πράσινου χρώματος. Αρχικά, 2,0 g αλεσμένων δειγμάτων σοκολάτας, γλυκών και τσιπς αναμείχθηκαν με 1,0 mL διαλύματος βουτυλιωμένου υδροξυλοτολουολίου (BHT) (0,1%) και 10 mL διαλύματος αιθανόλης, νερού και αμμωνίας σε αναλογία 10:3:0,5 (v/v/v). Τα λίπη απομακρύνθηκαν με 50 mL εξανίου. Στη συνέχεια, το μείγμα μεταφέρθηκε σε διαχωριστικό χωνί των 100 ml και σε υδατόλουτρο θερμοκρασίας 40 °C για 10 λεπτά. Το μίγμα ακολούθως μεταφέρθηκε σε σωλήνα φυγοκέντρωσης, προστέθηκαν 10 ml οξικού οξέος 5% και ανακινήθηκε για 1 λεπτό.

Έπειτα, το διάλυμα φυγοκεντρήθηκε στις 3000g για 5 λεπτά και η φάση του εξανίου απομακρύνθηκε. Η διαδικασία εκχύλισης επαναλήφθηκε για να παραχθεί άχρωμο εκχύλισμα, και στη συνέχεια οι διαλύτες απομακρύνθηκαν με αναρρόφηση υπό κενό. Το χρωματισμένο

δείγμα ήταν έτοιμο για ανάλυση. Στην περίπτωση δειγμάτων λευκού ζελέ ή καραμέλας, τα δείγματα διαλύονταν πλήρως σε θερμαινόμενο νερό πριν ακολουθηθεί η ίδια διαδικασία.

Για τα λιπαρά τρόφιμα πράσινου χρώματος που περιέχουν Na-Cu-χλωροφυλλίνη, η διαδικασία εκχύλισης τροποποιήθηκε λόγω της λιποδιαλυτής φύσης της Na-Cu-χλωροφυλλίνης (E141ii). Το δείγμα διαλύθηκε σε 50 mL εξανίου και σε μεγάλο όγκο οξικού αιθυλεστέρα (περίπου 20-30 mL). Η χρωματισμένη φάση του οξικού αιθυλεστέρα συλλέχθηκε και ξηράνθηκε. Τέλος, διαλύθηκε σε 2 mL μεθανόλης και διηθήθηκε με φίλτρο σύριγγας 0,2 μm και αποθηκεύτηκε για ανάλυση με HPLC. [85]

Εκχύλιση Χρωστικών Ουσιών από Μη Λιπαρά Προϊόντα Τροφίμων

Οι χρωστικές ουσίες από δείγματα μη λιπαρών σκληρών καραμελών (~2,0 g) διαλύθηκαν σε 10 mL νερού, με το pH να ρυθμίζεται σε 2,5 με υδροχλωρικό οξύ. Στη συνέχεια, εκχυλίστηκαν με 3,0 mL οξικού αιθυλεστέρα και η οργανική φάση συλλέχθηκε, φυγοκεντρήθηκε και ξηράνθηκε με αέριο N_2 . Η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε.

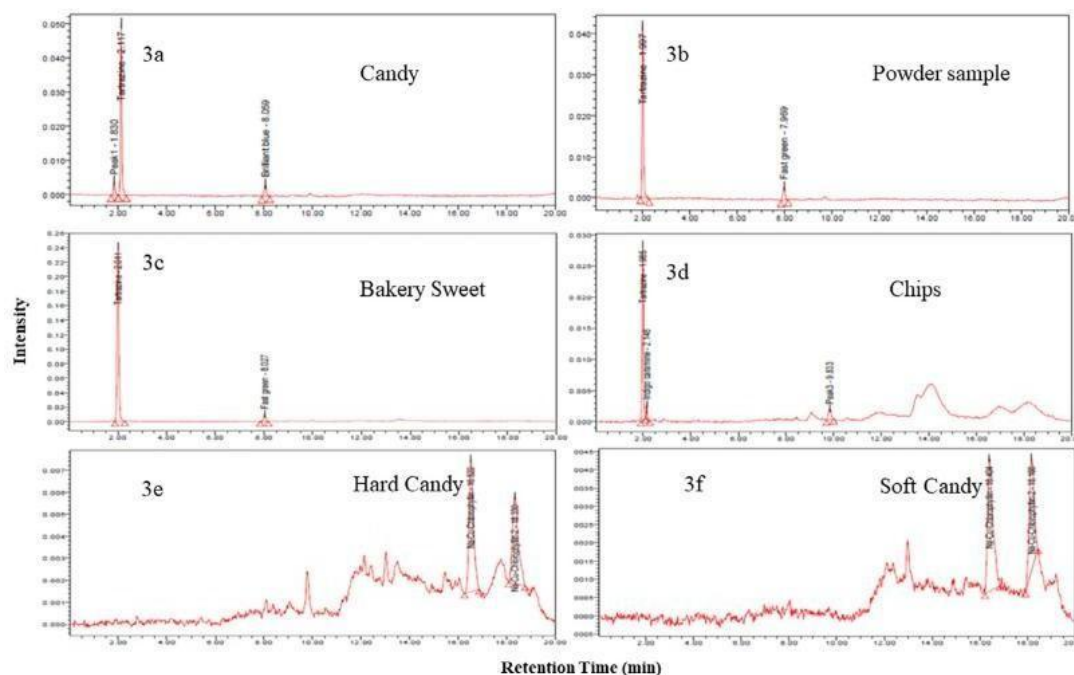
Μετά την εκχύλιση, οι Mathiyalagan et al. (2019) προσδιόρισαν την ταρτραζίνη (E-102) και την Brilliant Blue (E-133) σε καραμέλες, γλυκά, ζελέ, σκόνη και τσιπς, χρησιμοποιώντας RP-HPLC με ανιχνευτή UV-Vis και βαθμωτή έκλουση. Όλα τα δείγματα διαχωρίστηκαν μέσω στήλης Luna C18 (5 μm \times 25 cm μήκος \times 4,6 mm ID) με στήλη προστασίας (5 μm \times 1 cm μήκος \times 4,6 mm ID). Η κινητή φάση Α αποτελούνταν από μεθανόλη και ακετονιτρίλιο (1:1, v/v), ενώ η κινητή φάση Β ήταν υδατικό διάλυμα οξικού αμμωνίου 40 mM. Το pH της κινητής φάσης ρυθμίστηκε σε 7,4 με αραιό οξικό οξύ.

Οι συγγραφείς εντόπισαν την ταρτραζίνη και το Brilliant Blue ως αναμειγμένες χρωστικές ουσίες για την επίτευξη πράσινων αποχρώσεων σε καραμέλες, αποσμητικά στόματος, τσιπς, αντιόξινη σκόνη, γλυκά και μπισκότα κρέμας. Τόσο τα σκληρά όσο και τα μαλακά γλυκά περιείχαν Na-Cu-χλωροφυλλίνη. Ένα δείγμα καραμέλας περιείχε ταρτραζίνη, Brilliant Blue. Οι συγκεντρώσεις που αναφέρθηκαν ήταν 4,745 έως 140,284 mg/kg ταρτραζίνης, 0,952 έως 36,835 mg/kg Brilliant Blue και 3,334 έως 4,489 mg/kg Na-Cu-χλωροφυλλίνης σε τρόφιμα από τοπικές αγορές της Vellore, Ινδία. [92]

Οι συγκεντρώσεις (mg/kg) χρωστικών ουσιών σε τρόφιμα από την τοπική αγορά Vellore της Ινδίας παρατίθενται στον παρακάτω πίνακα 2 [92]:

Πίνακας 2: Συγκεντρώσεις (mg/kg) χρωστικών ουσιών σε τρόφιμα από την τοπική αγορά Vellore της Ινδίας

Τύπος Τροφίμου (No αριθμός Δειγμάτων)	Χρωστικές που ανιχνεύτηκαν	Εύρος Συγκέντρωσης (mg/kg)		
		Cu-Chl	Tartrazine	Brilliant Blue
Candy (n = 26)	Tartrazine, Brilliant blue, Fast green	< 0.2	4.74–190.22	0.90–30.28
Mouth freshener (n = 1)	Tartrazine, Brilliant blue	< 0.2	75.33	36.83
Chips (spice Food) (n = 1)	Tartrazine, Brilliant blue	< 0.2	119.28	30.28
Antacid drink powder (n = 1)	Tartrazine, Brilliant blue	< 0.2	90.53	4.13
Sweet (n = 2)	Tartrazine, Brilliant blue	< 0.2	109–280	19.50–23.17
Cream Biscuit (n = 1)	Tartrazine,	< 0.2	32.53	< 0.06
Hard candy (n = 1)	Na-Cu-Chl	3.334	< 0.24	< 0.06
Soft candy (n = 1)	Na-Cu-Chl	4.489		



Εικόνα 10. Χρωματογραφήματα HPLC (3a) δείγματος καραμέλας (Candy), (3b) powder sample (Eno), (3c) bakery sweet, (3d) πατατάκια, (3e) σκληρές και (3f) μαλακές καραμέλες.[92]

Οι Inoue et al. (1994) χρησιμοποίησαν RP-HPLC με ανιχνευτή UV-Vis σε μήκος κύματος 407 ή 423 nm για το διαχωρισμό της Na-Cu-χλωροφυλλίνης και των παραγώγων της σε πρότυπα και τρόφιμα. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποίησε στήλη Inertsil ODS-2 (5 μm \times 25 cm \times 4,6 mm ID) και κινητή φάση μεθανόλης και νερού (97:3, v/v) με 1% οξικό οξύ, διαχωρίζοντας την Na-Cu-χλωροφυλλίνη και τα παράγωγά της, επιτρέποντας την ανάλυση σε εύρος 0-30 mg/L. [85]

Οι Chernomorsky et al. (1997) εξέτασαν εμπορικά τρόφιμα για Na-Cu-χλωροφυλλίνη, χρησιμοποιώντας RP-HPLC με ανιχνευτή PDA και στήλη C18, έκλουση με μεθανόλη:οξικό αμμώνιο (80:20, v/v) και μεθανόλη:ακετόνη (80:20, v/v) σε χρόνο εκτέλεσης 15 λεπτών. Η μέθοδος εντόπισε παράγωγα χλωροφύλλης όπως πορφυρίνη, Cu-φαιοφορβίδη α, Cu-chlorin e6 και Cu-Isochlorin e4 σε τρόφιμα. [85]

Οι Almela et al. (2000) ανέλυσαν ώριμους καρπούς για χλωροφυλλικά παράγωγα με RP-HPLC, χρησιμοποιώντας PDA και ανιχνευτή φθορισμού στα 660 nm, με στήλη Inertsil ODS-2 (5 μm \times 25 cm \times 4,6 mm ID) και κινητή φάση υψηλής συγκέντρωσης ρυθμιστικού διαλύματος οξικού αμμωνίου (pH 7,0). [85]

Διαχωρισμός και ταυτοποίηση χλωροφυλλών και χλωροφυλλινών σε προϊόντα τροφίμων με τη χρήση μεθόδων HPLC

Ο Cano (1991) ανέπτυξε μια μέθοδο HPLC-PDA για τον προσδιορισμό των χρωστικών ουσιών σε τέσσερις ποικιλίες ακτινιδίου (*Actinidia chinensis*, Planch), δηλαδή Hayward, Abbot, Bruno και Monty, χρησιμοποιώντας στήλη Hypersil ODS (5 μm \times 10 cm \times 4,6 mm ID) από ανοξείδωτο χάλυβα και κινητές φάσεις μεθανόλης/νερού (75:25, v/v) και οξικού

αιθυλεστέρα με βαθμιαία έκλουση. Στον παρακάτω πίνακα αναγράφονται οι συγκεντρώσεις των χρωστικών που ανιχνεύθηκαν στις τέσσερις ποικιλίες ακτινιδίων. [93]

Πίνακας 3: Ποσοτικός Προσδιορισμός Ξανθοφύλλων, Καροτονειδών και χλωροφυλλών στα ακτινίδια[93]

component	kiwi fruit cultivars, mg/100 g of edible food			
	Hayward	Abbot	Bruno	Monty
Xanthophylls				
9'-cis-violaxanthin	0.079	0.079	0.085	0.104
9'-cis-neoxanthin	0.078	0.115	0.075	0.097
violaxanthin	0.093	0.129	0.072	0.117
neochrome (cis + trans)	0.012	0.015	0.016	0.017
auroxanthin	0.024	0.028	0.039	0.043
lutein epoxido	0.021	0.024	0.019	0.029
all-trans-lutein	0.290	0.259	0.281	0.316
neolutein B	0.029	0.017	0.029	0.029
neolutein A	0.021	0.013	0.019	0.022
total	0.647	0.679	0.635	0.770
Chlorophylls				
chlorophyll b	0.437	0.294	0.450	0.458
chlorophyll b'		0.095		
chlorophyll a derivative	0.076	0.049	0.024	0.042
chlorophyll a	1.723	1.127	1.592	1.420
chlorophyll a'		0.225		
pheophytin b				
pheophytin a	0.031	0.027	0.030	0.010
total	2.267	1.817	2.096	1.930
Carotenes				
all-trans-β-carotene	0.036	0.065	0.041	0.005

Οι Yasuda et al. (1995) ανέπτυξαν μια μέθοδο RP-HPLC-PDA για την ανάλυση των χλωροφυλλών και των παραγώγων τους σε τρόφιμα όπως βρασμένη αγκινάρα και τσίχλα, χρησιμοποιώντας στήλη RP-HPLC C18 με κινητή φάση μεθανόλη:νερού (97:3, v/v) που περιέχει 1% οξικό οξύ, με ρυθμό ροής 1 ml/min και ανίχνευση στα 405 nm. Οι πράσινες χρωστικές εκχυλίστηκαν σε διαιθυλαιθέρα σε pH 3 - 4 και ο οργανικός διαλύτης εξατμίστηκε. Το υπόλειμμα διαλύθηκε σε μεθανόλη για ανάλυση με HPLC. Ανιχνεύθηκαν Cu - chlorin e6 και Cu- chlorin e4. [94]

Πίνακας 4: Προσδιορισμός χλωροφύλλης -Na-Cu (mg/L) σε τρία δείγματα τροφίμων (n = 3)

Sample	Certified value	Added	Found	Recovery (%)
Spiked solution		50	49.8 ± 0.6	99.6
		100	99.1 ± 0.4	99.1
Sweet	15.6 ± 0.3	0	16.2 ± 0.6	103.8
		50	67.2 ± 0.8	102.0
		100	115.0 ± 1.1	98.8
Fruit juice	45.2 ± 0.5	0	45.9 ± 0.6	101.5
		50	96.2 ± 0.7	100.6
		100	145.7 ± 1.2	99.8

Οι Nonomura et al. (1996) εξήγαγαν χλωροφύλλη α από σπανάκι και την χρησιμοποίησαν ως πρότυπο υλικό για την παρασκευή χλωροφυλλίνης - Fe υπό αδρανείς συνθήκες. Τα συστατικά της Fe^{3+} -χλωροφυλλίνης διαχωρίστηκαν μέσω στήλης Inertsil ODS με κινητή φάση ρυθμιστικού διαλύματος ακετονιτριλίου-φωσφορικού άλατος (pH 2) (60:40, v/v) που περιείχε 0,01 M χλωριούχο τετραμεθυλοαμμώνιο και αναλύθηκαν με RP-HPLC. Ανιχνεύθηκαν τρία κύρια παράγωγα: Fe^{3+} -φαιοφορβίδιο α, Fe^{3+} -chlorin ε6 και Fe^{3+} - chlorin ε4, επιβεβαιωμένα και με ανάλυση FAB-MS. [85]

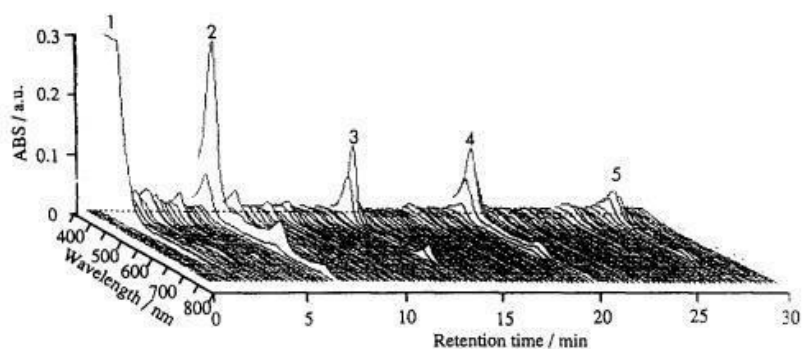


Fig. 2. Three-dimensional chromatogram of iron(III) chlorophyllin. Peaks: 1 = unknown compound; 2 = Fe-Chl ϵ_4 ; 3 = pheophytin derivative; 4 = Fe-Chl ϵ_6 ; 5 = Fe-Phed α . Column, Inertsil ODS (250 mm \times 4.6 mm I.D.); mobile phase, acetonitrile-phosphate buffer (pH 2) (60:40, v/v) containing 0.01 M TMACl; flow-rate 1.4 $\text{cm}^3\text{min}^{-1}$.

Εικόνα 11: Τρισδιάστατο Χρωματογράφημα της Fe^{3+} -χλωροφυλλίνης

Οι Egner et al. (2000) ανέλυσαν παράγωγα χλωροφυλλίνης σε δείγματα ανθρώπινου ορού μετά από κατανάλωση Na-Cu-χλωροφυλλίνης, στο Qidong, (επαρχία Jiangsu, Κίνα), χρησιμοποιώντας HPLC, ESI/MS και MS/MS. Ανίχνευσαν μη αναφερόμενα παράγωγα Cu-chlorin e4 και Cu-chlorin e4, υποδηλώνοντας ότι ήταν βιοδιαθέσιμα και απορροφώνται στην κυκλοφορία του αίματος. [85]

Οι Wang et al. (2004) μελέτησαν το πράσινο χρώμα αφεψημάτων πράσινου τσαγιού διαπιστώνοντας ότι οι χλωροφύλλες είναι το κύριο συστατικό. Εντόπισαν επίσης φλαβονοειδή, κατεχίνες και φλαβονόλες, με την κερκετίνη ως κύρια φαινολική ένωση που συνέβαλε στο πράσινο χρώμα. [85]

Οι Bohn et al. (2004) ανέλυσαν χλωροφύλλες και τα παράγωγά τους χρησιμοποιώντας HPLC με ανιχνευτή φθορισμού και στήλη RP-C18 (4 μm \times 25 cm \times 2 mm ID). Ταυτοποίησαν χλωροφύλλη α και α', χλωροφύλλη β και β' και τις αντίστοιχες φαιοφυτίνες. [85]

Οι Scotter et al. (2005) ανέπτυξαν μέθοδο HPLC-PDA και HPLC-φθορισμού για τον προσδιορισμό των χρωστικών τροφίμων Cu-χλωροφυλλών και Cu-χλωροφυλλινών σε τρόφιμα και ποτά, βρίσκοντας μεγάλες ποσότητες χλωροφυλλών σε σάλτσες μέντας. Η εκχύλιση από τρόφιμα με γαλακτωματοποιητές, ζελατίνη ή λίπη ήταν δύσκολη απαιτώντας περαιτέρω ανάπτυξη εκχυλιστικών μεθόδων. Τα δείγματα με E141 είχαν ολική περιεκτικότητα χλωροφυλλίνης χαλκού κάτω από 15 mg/kg. [85]

Οι Roca et al. (2010) ανέπτυξαν μέθοδο HPLC-PDA για την παρακολούθηση νοθείας ελαιολάδων με E141ii, χρησιμοποιώντας στήλη C18 και κινητές φάσεις νερού/αντιδραστηρίου ζεύγους ιόντων/μεθανόλης και μεθανόλης/ακετόνης. Ανίχνευσαν φαιοφυτίνες α και β στα δείγματα που νοθεύτηκαν με E141ii, αλλά όχι με E141i, αποδεικνύοντας την ικανότητα της μεθόδου να παρακολουθεί τη νοθεία. [85]

Οι Loranty et al. (2010) μελέτησαν χλωροφύλλες και καροτενοειδή σε ξηρά τσάγια βοτάνων και φρούτων χρησιμοποιώντας στήλη Phenomenex Luna C18 και κινητές φάσεις ακετονιτριλίου:νερού (90:10, v/v) και οξικού αιθυλεστέρα. Εντόπισαν χλωροφύλλη και λουτεΐνη ως κύρια συστατικά. [85]

Οι Baskan et al. (2013) ανέλυσαν χρωστικές χλωροφύλλης σε φρέσκο σπανάκι, καρότο και ντομάτα, καθώς και σε απόβλητα τοματοπολτού και χυμού πορτοκαλιού, χρησιμοποιώντας στήλη Waters YMC C30 και κινητές φάσεις MeOH:MeCN (50:50, v/v) με 0,1% TEA και ακετόνη. Ανίχνευσαν μόνο χλωροφύλλη α και β. [85]

Οι Kenner et al. (1973) ανέλυσαν χλωροφύλλη α και β χρησιμοποιώντας HPLC-UV-Vis και ισοκρατική κινητή φάση CHCl₃-MeOH (20:1, v/v). Ταυτοποίησαν διάφορα παράγωγα χλωροφύλλης, όπως φαιοφυτίνη α και διάφορους εστέρες. [85]

Οι Fang et al. (2015) ανέπτυξαν μέθοδο UHPLC-PDA χρησιμοποιώντας στήλη Sustain C18 και κινητές φάσεις 1 M οξικού αμμωνίου/MeOH (2/8, v/v), MeCN, MeOH και νερό. Ανίχνευσαν διάφορες χρωστικές, όπως Cu-πυροφοφυτίνη α, Cu-φαιοφυτίνη α και α', Cu-pyropheophytin b και Cu-152-Methyl-phytol-rhodin g7 ester (Cu-rhodin g7). [85]

Οι Viera et al. (2021) ανέλυσαν λαχανικά, ελαιόλαδο και χυμό φρούτων για χρωστικές χλωροφύλλης με HPLC-UV-Vis, χρησιμοποιώντας στήλη Mediterranean Sea18 και κινητές φάσεις νερού/οξικού αμμωνίου/MeOH και MeOH/ακετόνης. Βρήκαν διάφορα παράγωγα χλωροφύλλης όπως chlorins, rhodins, pheophorbides, chlorophylls, pheophytins, 13²-OH-pheophorbides, 13²-OH-chlorophylls, 13²-OH-pheophytins, 15¹-OH-lactone-pheophorbides, 15¹-OH-lactone-pheophytins, and pyropheophytins.[85]

Διαχωρισμός και ταυτοποίηση χλωροφυλλών και χλωροφυλλινών σε προϊόντα τροφίμων με τη χρήση μεθόδου HPLC-MS

Ο Mendes-Pinto και η ομάδα του (2005) μελέτησαν τα καροτενοειδή και τις ενώσεις που προέρχονται από χλωροφύλλη σε σταφύλια και οίνους Port, χρησιμοποιώντας ανάλυση HPLC-DAD και HPLC-DAD-MS (ESP+). Ανέδειξαν 13 καροτενοειδείς και χλωροφυλλένιες ενώσεις στα σταφύλια. Στους οίνους Port εντόπισαν 19 ενώσεις με δομές παρόμοιες με καροτενοειδή ή χλωροφύλλη. [85]

Οι Gandul-Rojas και οι συνεργάτες τους (2012) ερεύνησαν τη νοθεία του χρώματος σε ελιές, χρησιμοποιώντας την μη εγκεκριμένη ημισυνθετική πράσινη χρωστική Na-Cu-χλωροφυλλίνη (E141ii), με τη χρήση της μεθόδου HPLC-DAD. Εκχύλισαν τις χρωστικές ουσίες με τη μέθοδο των Mínguez-Mosquera και Garrido-Fernández (1989) και τις ανέλυσαν με HPLC-PDA, χρησιμοποιώντας στήλη C-18. Τα δείγματα ήταν *Spanish-style olives* (*O. europaea* (L.), cv. *Manzanilla*) (fermented olives, FO) και *Campo Real-style olives* (*O. europaea* (L.), cv. *Manzanilla Cacereña*) (non-fermented olives, NFO) οι οποίες είχαν αγοραστεί από τοπική αγορά. Ανίχνευαν σύμπλοκα Cu- χλωροφυλλίνης στο εκχύλισμα, με τα αποτελέσματα να δείχνουν την πρακτική των πωλητών για την επίτευξη πράσινου χρώματος στις ελιές. [84]

Οι Yoshioka και Ichihashi (2008) ανέπτυξαν μια χρωματογραφική τεχνική χρησιμοποιώντας RP-HPLC με PDA για την ανάλυση 40 συνθετικών χρωμάτων τροφίμων σε ποτά και καραμέλες από τις ιαπωνικές αγορές. Χρησιμοποίησαν στήλη ZORBAX Eclipse XDB-C18 Rapid Resolution HT με κινητή φάση διαλύτη A και B. Η μέθοδος τους επέτρεψε τον ακριβή προσδιορισμό των διάφορων χρωστικών ουσιών που εντοπίστηκαν στα δείγματα τροφίμων. Συγκεκριμένα, τριάντα εισαγόμενα εμπορικά προϊόντα (αναψυκτικά, σιρόπια, καραμέλες, ζελατίνες και marshmallows) που περιέχουν συνθετικές ή φυσικές χρωστικές τροφίμων αναλύθηκαν με αυτή τη μέθοδο. Αυτά τα προϊόντα αγοράστηκαν από τις τοπικές αγορές στην Hyogo της Ιαπωνίας. Η ποσοτική ανάλυση πραγματοποιήθηκε μέσω καμπυλών βαθμονόμησης και επιβεβαιώθηκε με τη σύγκριση των φασμάτων απορρόφησης των δειγμάτων με πρότυπες χρωστικές τροφίμων. Από τα 30 προϊόντα στα 14 αναφέρονταν στην ετικέτα τους ότι περιείχαν συνθετικές χρωστικές. Συγκεκριμένα περιείχαν τις παρακάτω συνθετικές χρωστικές: Ταρτραζίνη (1.3–21.8 μg/g, 7 δείγματα), Αμάρανθο (27.2 μg/g), Indigotine (18.3 μg/g, 4 δείγματα), Ponceau 4R (6.0 μg/g), Sunset yellow FCF (3.1–17.3 μg/g, 5 δείγματα), Allura red AC (0.2–41.6 μg/g, 5 δείγματα), και Brilliant blue FCF (0.9–5.9 μg/g, 3 δείγματα). Επιπλέον, βρέθηκε Fast red E, που δεν επιτρέπεται στην Ιαπωνία, σε αναψυκτικό με γεύση σταφυλιού σε συγκέντρωση 0.7 μg/g. [85]

Οι Huang και οι συνεργάτες τους (2008) ανέπτυξαν μια μέθοδο HPLC-APCI-MS για την παρακολούθηση των χλωροφυλλών και των παραγώγων τους σε ένα κινέζικο βότανο *Gynostemma pentaphyllum* Makino. Χρησιμοποίησαν στήλη HyPURITY C18 για τον διαχωρισμό των χρωστικών ουσιών. [85]

Πίνακας 5: Κυριότερες μέθοδοι προσδιορισμού χλωροφυλλών στα τρόφιμα

Τεχνική	Στήλη	Έκλουση	Μήκος Κύματος (nm)	Χρόνος (min)	LOD (μg/g)	Μήτρα	Προκατεργασία	Αναφορά
HPLC με ανιχνευτή UV-Vis	C18, 250x4.6 mm, 5 μm	Βαθμιδωτή με κινητή φάση μείγμα ακετονιτριλίου και νερού	660	25	0.1	Πράσινα λαχανικά, σπανάκι, μαρούλι	Εκχύλιση με ακετόνη, φυγοκέντρηση, διήθηση	[86]
HPLC με ανιχνευτή DAD (Diode Array Detector)	C18, 150x4.6 mm, 3.5 μm	Ισοκρατική με κινητή φάση μείγμα ακετονιτριλίου, μεθανόλης και νερού	665	30	0.05	Σπανάκι, μαρούλι, μπρόκολο	Εκχύλιση με μεθανόλη, διήθηση	[87]
HPLC με ανιχνευτή FLD (Fluorescence Detector)	C18, 100x4.6 mm, 2.6 μm	Ισοκρατική με κινητή φάση μείγμα ακετονιτριλίου και νερού	665	20	0.02	Φύλλα σαλάτας, λάχανο	Εκχύλιση με ακετόνη, διήθηση	[88]
LC-MS/MS για τον προσδιορισμό χλωροφυλλών σε τρόφιμα	C18, 75x2.1 mm, 1.8 μm	Βαθμιδωτή με κινητή φάση μείγμα ακετονιτριλίου, μεθανόλης και νερού	Συγκεκριμένο για κάθε χλωροφύλλη	15	0.01	Πράσινα λαχανικά	Εκχύλιση με στερεά φάση (SPE), αραίωση	[89]
Φασματοφωτομετρία UV-Vis για τον προσδιορισμό χλωροφυλλών			665 και 647		0.1	Φύλλα σαλάτας, σπανάκι, μπρόκολο	Εκχύλιση με ακετόνη, φυγοκέντρηση, διήθηση	[90]
HPLC-ECD για τον προσδιορισμό χλωροφυλλών στα τρόφιμα	C18, 150x4.6 mm, 3 μm	Ισοκρατική με κινητή φάση μείγμα μεθανόλης και ακετονιτριλίου	665	18	0.05	Σπανάκι, μαρούλι, λάχανο	Εκχύλιση με μείγμα μεθανόλης και ακετονιτριλίου, διήθηση	[91]

Ο προσδιορισμός χλωροφυλλών στα τρόφιμα μπορεί να πραγματοποιηθεί με διάφορες αναλυτικές τεχνικές, κυρίως με τη χρήση υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) όπως αναφέρεται παραπάνω, αλλά και άλλων μεθόδων όπως η φασματοφωτομετρία και η φασματομετρία μάζας. Στον παραπάνω πίνακα παρουσιάζονται οι κυριότερες μέθοδοι προσδιορισμού χλωροφυλλών στα τρόφιμα.

● Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)

Οι χρωματογραφίες χάρτου και λεπτής στιβάδας λειτουργούν με παρόμοιο τρόπο. Συνήθως χρησιμοποιούν ένα κορεσμένο διάλυμα ενός μη πολικού διαλύτη (π.χ. βουτανόλη) σε έναν πιο πολικό διαλύτη (π.χ. νερό). Καθώς αυτό το μείγμα κινείται πάνω στο χαρτί ή στη λεπτή στιβάδα, το πολικό μέρος του μείγματος (νερό) απορροφάται στο υλικό (π.χ. κυτταρίνη στο χαρτί), σχηματίζοντας πολλές μικρές σταγόνες στατικής φάσης. Αυτές οι σταγόνες ξεπλένονται διαδοχικά από τον μη πολικό διαλύτη (κινητή φάση, βουτανόλη), δημιουργώντας μια κατανομή αντίθετου ρεύματος ή χρωματογραφία κατανομής σε μικροκλίμακα. Στις χρωματογραφίες χάρτου και λεπτής στιβάδας (TLC), η ουσία ή το μείγμα ουσιών τοποθετείται σε διάλυμα κατά μήκος μιας γραμμής βάσης σε ένα φύλλο χαρτιού (χρωματογραφία χάρτου) ή σε μια λεπτή στιβάδα κοκκοποιημένου ξηρού υλικού σε γυάλινη

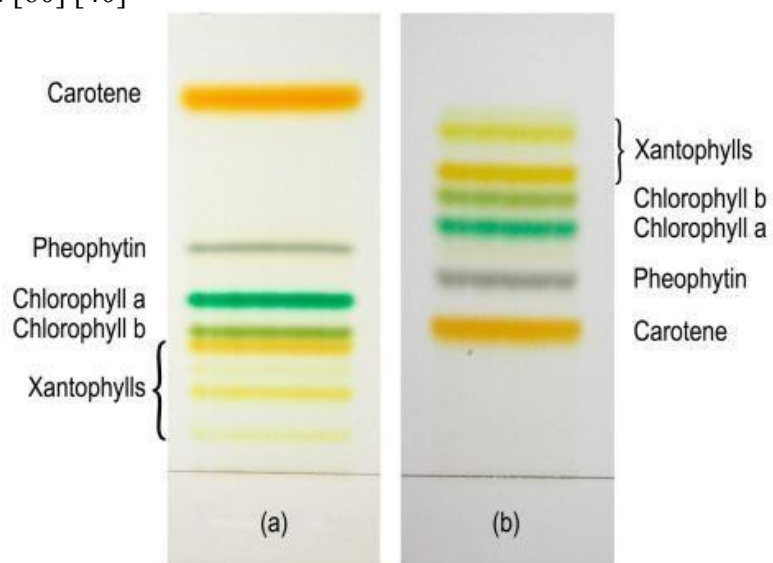
πλάκα ή πλαστικό φιλμ (χρωματογραφία λεπτής στιβάδας, TLC). Το χαρτί ή η πλάκα στεγνώνει στον αέρα και ένα κατάλληλο μείγμα διαλυτών αφήνεται να προχωρήσει και να περάσει από την κηλίδα ή γραμμή των εναποτιθέμενων ουσιών. Αυτό γίνεται είτε καθοδικά για ένα φύλλο χαρτιού λόγω τριχοειδών φαινομένων και βαρύτητας (χρωματογραφία χάρτου), είτε ανοδικά λόγω τριχοειδών φαινομένων (χρωματογραφία χάρτου και λεπτής στιβάδας). Η ανάπτυξη των χρωματογραφημάτων μπορεί να διαρκέσει από 1 έως 24 ώρες, ανάλογα με παράγοντες όπως το πάχος της στατικής φάσης, η επιλογή των διαλυτών, η θερμοκρασία κ.ά. Η απόσταση που διανύει κάθε ουσία από τη γραμμή βάσης σε σχέση με το μέτωπο του διαλύτη ορίζεται ως R_f (αναλογία διαχωρισμού):

$R_f = \text{απόσταση της ουσίας από τη γραμμή βάσης} / \text{απόσταση του διαλύτη από τη γραμμή βάσης}$

Κάθε ουσία έχει μια τιμή R_f που μετριέται κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες (διαλύτες, θερμοκρασία, τύπος ανάπτυξης - ανερχόμενη ή κατερχόμενη, χρωματογραφικό υλικό - TLC ή χαρτί). Επειδή επηρεάζονται από πολλές μεταβλητές, η τιμή R_f μιας ουσίας είναι μόνο μια κατά προσέγγιση ένδειξη της ταυτότητάς της. Γι' αυτό, είναι συνηθισμένο η χρωματογραφική ανάλυση να γίνεται με μείγμα που περιέχει μια γνωστή ουσία μαζί με ένα δείγμα καθαρής ουσίας για αναφορά.

Η μέθοδος χρωματογραφίας λεπτής στιβάδας (TLC) περιλαμβάνει τη χρήση πλάκας με επίστρωση οξειδίου του πυριτίου και δείκτη φθορισμού (F254). Οι χλωροφύλλες α και β, καθώς και τα παράγωγά τους φαιοφυτίνη α και β, αφού απομονωθούν μέσω κατάλληλης εκχύλισης, ανιχνεύονται μετά το διαχωρισμό τους με τη χρήση ενός συστήματος ανάπτυξης αποτελούμενου από πετρελαϊκό αιθέρα, ακετόνη και διαιθυλαμίνη. Ο διαχωρισμός πραγματοποιείται με την έκθεση της πλάκας σε λυχνία εκπομπής UV ακτινοβολίας. Ιδιαίτερη προσοχή χρειάζεται στο pH της επίστρωσης silica gel καθώς οι όξινες συνθήκες της επίστρωσης μπορεί να μετατρέψουν την χλωροφύλλη σε φαιοφυτίνη.

Για τον ποσοτικό προσδιορισμό των ενώσεων, γίνεται απόξεση της αντίστοιχης ζώνης από την πλάκα, και ακολουθεί εκχύλιση για την παραλαβή των ενώσεων και η μέτρησή τους γίνεται σε φασματοφωτόμετρο, χρησιμοποιώντας συγκεκριμένες τιμές ειδικών συντελεστών απορρόφησης. [60] [40]



Εικόνα 12. Χρωματογραφία κανονικής φάσης (Silica gel 60, αριστερά) και ανάστροφης φάσης (πυριτία RP-18, δεξιά) εκχυλίσματος η-εξανίου ρόκας και σπανακιού σε πλάκες TLC με κινητή φάση η-εξάνιο:ακετόνη (7:3 v/v) και η-εξάνιο:ακετονιτρίλιο:αιθανόλη (15:35:50 v/v), αντίστοιχα. [60]

Κεφάλαιο 2.2 - Καροτενοειδή

2.2.1 Δομή Καροτενιδών

Τα καροτενοειδή είναι πολυτερπένια από χημική άποψη και η πλειονότητά τους έχει έναν κεντρικό σκελετό από 40 άτομα άνθρακα, που αποτελείται από οκτώ ισοπρενικές ομάδες. Εκτός από το διαφορετικό μέγεθος της αλυσίδας, μπορούν να φέρουν δακτύλιο στο ένα ή και στα δύο άκρα της αλυσίδας, ο οποίος μπορεί να διαθέτει υδροξυ-, κετο- ή/και εποξυ-ομάδα.

Τα καροτενοειδή του ελαιολάδου ταξινομούνται βάσει της δομής τους σε δύο κύριες κατηγορίες:

1. Τα καροτένια (υδρογονάνθρακες)
2. Τις ξανθοφύλλες (οξυγονούχα παράγωγα των καροτενίων)

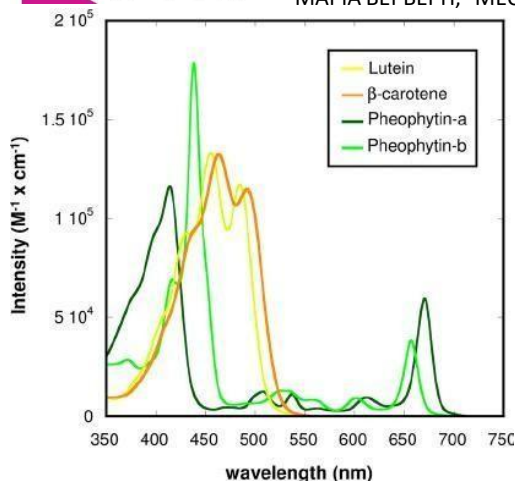
2.2.2 Φυσικές Ιδιότητες Καροτενοειδών

Τα καροτένια διαλύονται σε μη πολικούς διαλύτες όπως ο πετρελαϊκός αιθέρας και το εξάνιο, ενώ οι ξανθοφύλλες διαλύονται πιο αποτελεσματικά σε πολικούς διαλύτες όπως οι αλκοόλες. Εκτός από τα πολύ ακόρεστα καροτένια, όπως το φυτοένιο και το ζ-καροτένιο, τα καροτενοειδή είναι στερεά σε θερμοκρασία δωματίου και μπορούν να κρυσταλλοποιηθούν όταν διαλύονται σε διάφορα μίγματα διαλυτών.

Τα μόρια του β-καροτενίου στοιχίζονται παράλληλα στην επιφάνεια των κυτταρικών μεμβρανών λόγω του υδρόφοβου χαρακτήρα τους, ενώ τα μόρια ορισμένων ξανθοφυλλών, όπως της λουτεΐνης, προσανατολίζονται κάθετα στην επιφάνεια των μεμβρανών με την υδροξυλική ομάδα να προεξέχει λόγω του υδρόφιλου χαρακτήρα της. Τα καροτενοειδή μπορούν επίσης να σχηματίσουν σύμπλοκα με πρωτεΐνες και να αλληλεπιδρούν με τις υδρόφοβες περιοχές των λιποπρωτεϊνών. [40]

Απορρόφηση στο υπεριώδες - ορατό

Τα καροτενοειδή έχουν μια βασική ιδιότητα να απορροφούν το φως και να το μετατρέπουν σε θερμότητα. Αυτή η ικανότητα οφείλεται στο χαρακτηριστικό φάσμα απορρόφησής τους στο ορατό φάσμα, το οποίο προκύπτει από το σύστημα διπλών δεσμών που περιέχεται στην υδρογονανθρακική αλυσίδα τους. Η τιμή του μέγιστου της απορρόφησης εξαρτάται από τον αριθμό των διπλών δεσμών στο μόριο. Επιπλέον, τα καροτενοειδή κυρίως απορροφούν φως στην μπλέ περιοχή του φάσματος, αλλά επίσης απορροφούν και σε περιοχές πράσινου και γαλαζοπράσινου. Είναι χαρακτηριστικό ότι όλες οι ενώσεις παρουσιάζουν ένα τυπικό φάσμα απορρόφησης που αποτελείται από τρεις κορυφές με καθορισμένα μέγιστα και ελάχιστα. Ένα συγκεκριμένο παράδειγμα είναι το β - καροτένιο, το οποίο παρουσιάζει το πρώτο από τα τρία μέγιστα ως όμοιο, με τις τιμές των μεγίστων να είναι 425, 451 και 483 nm. [40]



Εικόνα 13: Φάσμα Απορρόφησης β - καροτενίου, λουτεΐνης, και φαιοφυτινών α, β (Domenici, Valentina & Ancora, Donatella & Cifelli, Mario & Serani, Andrea & Veracini, Carlo Alberto & Zandomenighi, Maurizio. (2014). Extraction of Pigment Information from Near-UV Vis Absorption Spectra of Extra Virgin Olive Oils. Journal of agricultural and food chemistry. 62. 10.1021/jf503818k.)

2.2.3 Μέθοδοι προσδιορισμού Καροτενοειδών

- Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)

Τα περισσότερα καροτενοειδή φέρουν κίτρινο, πορτοκαλί και κόκκινο χρώμα. Έτσι, κατά τον διαχωρισμό τους σε πλάκα, μπορούν εύκολα να παρατηρηθούν κηλίδες χωρίς τη χρήση χρωστικών προσθέτων. Με βάση τις τιμές του παράγοντα έκλουσης (Retention factor – Rf) και το χρώμα των κηλίδων, είναι δυνατόν να ανιχνευθούν πολλά καροτενοειδή. Για αυτόν τον σκοπό, χρησιμοποιούνται πλάκες με επίστρωση πηκτής διοξειδίου του πυριτίου.

- Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Ο διαχωρισμός των καροτενοειδών μέσω χρωματογραφίας εξαρτάται σημαντικά από την επιλογή της χρωματογραφικής στήλης. Στη χρωματογραφία αντίστροφης φάσης, οι στήλες στατικής φάσης C18 και C8 είναι ευρέως χρησιμοποιούμενες και αποτελεσματικές. Παρ' όλα αυτά, αυτές οι στήλες έχουν περιορισμένη ικανότητα διαχωρισμού των cis-trans ισομερών.

- Στήλες C18

- 1) Ευρύ Πεδίο Εφαρμογής: Οι στήλες C18 είναι ιδανικές για την ανάλυση μιας ευρείας γκάμας ενώσεων, ειδικά εκείνων με μικρότερες αλυσίδες και χαμηλότερο μοριακό βάρος.
- 2) Σύντομος Χρόνος Ανάλυσης: Συμβάλλουν σε συντομότερους χρόνους ανάλυσης, συνήθως μεταξύ 10 και 25 λεπτών.
- 3) Περιορισμοί στους Ισομερείς: Παρόλο που είναι αποτελεσματικές για πολλές ενώσεις, δεν προσφέρουν καλή διαχωριστική ικανότητα για τα γεωμετρικά ισομερή cis-trans.

● Στήλες C8

Παρόμοια με τις στήλες C18, οι στήλες C8 είναι επίσης δημοφιλείς και παρουσιάζουν ελαφρώς διαφορετικά χαρακτηριστικά λόγω της μικρότερης ανθρακικής αλυσίδας στη στατική φάση.

Η επιλογή της κατάλληλης χρωματογραφικής στήλης είναι κρίσιμη για τον επιτυχημένο διαχωρισμό των καροτενοειδών. Οι στήλες C18 αποτελούν καλή επιλογή για γρήγορες αναλύσεις με ικανοποιητική διαχωριστική ικανότητα για πολλές ενώσεις, αν και μπορεί να χρειαστεί να εξεταστούν άλλες στήλες ή μέθοδοι για τη βελτιστοποίηση του διαχωρισμού των ισομερών.

Παρακάτω παρουσιάζονται διάφορες μέθοδοι για τον προσδιορισμό των καροτενοειδών στα τρόφιμα με χρήση υγροχρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) και άλλων αναλυτικών τεχνικών:

Πίνακας 6: Διάφορες μέθοδοι για τον προσδιορισμό των καροτενοειδών στα τρόφιμα

Τεχνική	Στήλη	Έκλουση	Μήκος Κύματος (nm)	Χρόνος (min)	LOD (μg/g)	Μήτρα	Προκατεργασία	Αναφορά
HPLC με ανιχνευτή UV-Vis	C30, 250x4.6 mm, 5 μm	Βαθμιδωτή με κινητή φάση μείγμα μεθανόλης, μεθυλενοχλωριδίου και ακετονιτριλίου	450 nm	20	0.1	Καρότα, σπανάκι, τομάτες	Εκχύλιση με μείγμα ακετονιτριλίου και διχλωρομεθανίου, φυγοκέντρηση, διήθηση	[95]
HPLC με ανιχνευτή DAD (Diode Array Detector)	C18, 150x4.6 mm, 3.5 μm	Ισοκρατική με κινητή φάση μείγμα ακετονιτριλίου, νερού και μεθανόλης	450 nm	25	0.05	Πράσινα λαχανικά, κολοκύθες, πιπεριές	Εκχύλιση με ακετόνη και αιθέρα πετρελαίου, διήθηση, συμπίκνωση	[96]
HPLC με ανιχνευτή FLD (Fluorescence Detector)	C18, 100x4.6 mm, 2.6 μm	Ισοκρατική με κινητή φάση μείγμα μεθανόλης και νερού	474 nm	15	0.02	Φρούτα, λαχανικά	Εκχύλιση με αιθανόλη, διήθηση	[97]
HPLC-MS/MS για τον προσδιορισμό καροτενοειδών σε τρόφιμα	C18, 75x2.1 mm, 1.8 μm	Βαθμιδωτή με κινητή φάση μείγμα ακετονιτριλίου, νερού και ισοπροπανόλης	Συγκεκριμένο για κάθε καροτενοειδές	10	0.01	Πολύχρωμα φρούτα και λαχανικά	Εκχύλιση με στερεά φάση (SPE), αραίωση	[98]
HPLC-ECD για τον προσδιορισμό καροτενοειδών στα τρόφιμα	C30, 150x4.6 mm, 3 μm	Ισοκρατική με κινητή φάση μείγμα μεθανόλης και ακετονιτριλίου	445 nm	18	0.05	Σπανάκι, καρότα, πιπεριές	Εκχύλιση με μείγμα μεθανόλης και ακετονιτριλίου, διήθηση	[99]
HPLC-UV/Vis για τον προσδιορισμό καροτενοειδών στα τρόφιμα	C18, 250x4.6 mm, 5 μm	Ισοκρατική με κινητή φάση μείγμα ακετονιτριλίου και νερού	450 nm	20	0.1	Καρότα, σπανάκι, τομάτες	Εκχύλιση με μείγμα ακετονιτριλίου και διχλωρομεθανίου	[100]

							ου, φυγοκέντρωση , διήθηση	
--	--	--	--	--	--	--	----------------------------------	--

Κεφάλαιο 2.3 Ανθοκυανίνες

2.3.1 Δομή και Ιδιότητες Ανθοκυανινών

Οι ανθοκυανίνες είναι η μεγαλύτερη ομάδα υδατοδιαλυτών χρωστικών στο φυτικό βασίλειο. Κατατάσσονται ανάμεσα στις τρεις κύριες κατηγορίες φυσικών χρωστικών, ακολουθώντας τις χλωροφύλλες και τα καροτενοειδή. Παρόλο που ανήκουν στην οικογένεια των φλαβονοειδών, έχουν σημαντικές δομικές διαφορές σε σχέση με τα άλλα μέλη της οικογένειας, όπως τα παράγωγα της φλαβόνης. Αυτές οι χρωστικές είναι υπεύθυνες για τα χρώματα σε πολλά λουλούδια και φρούτα, συνήθως σχετιζόμενες με το κόκκινο χρώμα, αν και καλύπτουν μια ευρεία γκάμα χρωμάτων. Επιπλέον, βρίσκονται σε λαχανικά, ρίζες, όσπρια και δημητριακά. Είναι επίσης οι κύριες χρωστικές στα ερυθρά κρασιά μαζί με τις τανίνες.

Στα φυτά, οι ανθοκυανίνες υπάρχουν ως γλυκοζίτες των αλάτων του φλαβυλίου ή 2-φαινυλο-βενζοπυριλίου, το οποίο σταθεροποιείται μέσω δομών συντονισμού, κυρίως στη θέση C3 (μετα- θέση σε σχέση με το οξυγόνο του ετεροκυκλικού δακτυλίου). Τα άγλυκα μέρη τους ονομάζονται ανθοκυανιδίνες (δηλαδή ανθοκυανιδίνη + σάκχαρο = ανθοκυανίνη). Στη φύση υπάρχουν έξι ανθοκυανιδίνες: πελαργονιδίνη, κυανιδίνη, πεονιδίνη, δελφινιδίνη, πετουνιδίνη και μαλβιδίνη. Όλες έχουν τον ίδιο βασικό σκελετό, αλλά διαφέρουν στους υποκαταστάτες του δακτυλίου B. Οι ανθοκυανίνες στα φρούτα συνήθως γλυκοζυλιώνονται στη θέση C3 (3-O-μονογλυκοζίτες). Στα φρούτα και τα λαχανικά, η κατανομή των ανθοκυανινών είναι ως εξής: κυανιδίνη 50%, δελφινιδίνη 12%, πελαργονιδίνη 12%, πεονιδίνη 12%, πετουνιδίνη 7% και μαλβιδίνη 7%. Τα χρωματικά χαρακτηριστικά τους επηρεάζονται σημαντικά από τον τρόπο υποκατάστασης του δακτυλίου B. Συγκεκριμένα, η αύξηση των υδροξυλίων προκαλεί μετατόπιση του χρώματος από το κόκκινο στο ιώδες (πελαργονιδίνη, κυανιδίνη, δελφινιδίνη). Επίσης, η φύση και η θέση του σακχάρου στον σκελετό επηρεάζουν την απόχρωση αυτών των ενώσεων.

Από φυσική άποψη, τα κόκκινα σταφύλια είναι μια από τις καλύτερες πηγές ανθοκυανινών, ενώ άλλες πλούσιες πηγές περιλαμβάνουν το κόκκινο λάχανο, τα σαγκουίνια και διάφορα μούρα. Στις Η.Π.Α., η μέση ημερήσια πρόσληψη ανθοκυανινών είναι 215 mg το καλοκαίρι και 180 mg το χειμώνα, με υψηλότερες τιμές για τους καταναλωτές κόκκινου κρασιού, το οποίο περιέχει υψηλά ποσοστά ανθοκυανινών, αν και αυτές συχνά συμπλέκονται με άλλα συστατικά του κρασιού.

Η χημεία και η σταθερότητα των ανθοκυανινών σε διάλυμα παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον. Στα φυτά, οι ανθοκυανίνες βρίσκονται στον κενό χώρο ανάμεσα στα κύτταρα, συνυπάρχοντας με φαινόλες, πολυφαινόλες, πρωτεΐνες, πεπτίδια, σάκχαρα, αμινοξέα, οργανικά οξέα και μεταλλικά ιόντα (όπως ασβέστιο, κάλιο, μαγνήσιο). Αυτή η συνύπαρξη συμβάλλει στη σταθερότητα και διατήρηση του χρώματός τους. Σε πειράματα που μιμούνται φυσικές συνθήκες (ελαφρώς όξινες και θερμοκρασία δωματίου), οι ανθοκυανίνες παραμένουν σταθερές και σε άχρωμη μορφή. Οι ανθοκυανίνες είναι υδατοδιαλυτές και έχουν

επαμφοτερίζοντα χαρακτήρα. Σε διαλύματα όξινης φύσης, εμφανίζουν κόκκινο χρώμα, ενώ σε διαλύματα μεταλλικών είναι συνήθως μπλε και σε ουδέτερα διαλύματα είναι ιώδεις.

Στο $pH=1,0$, το κυρίαρχο είδος είναι το κατιόν του φλαβυλίου, το οποίο συμβάλλει στην παραγωγή ιώδους και κόκκινου χρώματος. Αυτό το κατιόν αποπρωτονιώνεται εύκολα λόγω της υψηλής επίδρασης του νερού, και σε $pH\ 4,0$ έως $6,0$ υπάρχει ως άχρωμη ψευδοβάση της καρβινόλης. Κατά την αλλαγή του pH , το χρώμα του μορίου αλλάζει ανάλογα. Όταν η τιμή pH ξεπερνά το $6,5$, η αντίστροφη αντίδραση είναι δυσκολότερη. Η αποπρωτονίωση των υδοξυλομάδων έχει pK_a περίπου $4,85$ και σε $pH\ 6$ έως 8 παρατηρείται περαιτέρω αποπρωτονίωση, ανάλογα με τη διαθεσιμότητα υδροξυλίων. Σε τιμές pH από $6,5$ έως $8,0$, το μόριο είναι υπό τη μορφή άνυδρης κινουειδούς βάσης και το χρώμα εξαρτάται από τους υποκαταστάτες και το σάκχαρο, συνήθως με μια απόχρωση από γκρίζο έως ιώδες.

Σε αλκαλικό περιβάλλον, οι ανθοκυανίνες φορτίζονται αρνητικά και μπορούν να δημιουργήσουν μεταλλικά άλατα, τα οποία είναι μπλε και είναι σε μορφή δις-ιονισμένης κινουειδούς βάσης.

Η παρουσία υδροξυλίων ή μεθοξυλίων στον β δακτύλιο επηρεάζει τη σταθερότητα της άγλυκης ένωσης και μπορεί να οδηγήσει σε μεγαλύτερες μεταβολές στο χρώμα. Συνολικά, η πελαργονιδίνη θεωρείται η πιο σταθερή ανθοκυανίνη. Όλες αυτές οι μεταβολές στις ανθοκυανίνες εξαρτώνται από την τιμή pH .

2.3.2 Ποσοτικός προσδιορισμός των ανθοκυανινών με τη μέθοδο Wrolstad-Durst-Lee.

Η μέτρηση της συγκέντρωσης ανθοκυανινών σε φυσικά δείγματα αποτελεί πρόκληση λόγω της παρουσίας άλλων φυσικών ενώσεων και διαφόρων ειδών ανθοκυανινών μέσα στο δείγμα. Η απουσία προτύπων διαλυμάτων καθιστά αδύνατη τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης για την ακριβή μέτρηση τους. Ως εκ τούτου, χρησιμοποιείται η μέθοδος που περιγράφεται στη μελέτη των Ronald E. Wrolstad, Robert W. Durst και Jungmin Lee ("Tracking color and pigment changes in anthocyanin products," Trends in Food Science & Technology 16, 2005, 423–428).

Σύμφωνα με αυτήν τη μέθοδο, εκμεταλλευόμαστε την αλλαγή της χημικής δομής των ανθοκυανινών σε δύο διαφορετικές τιμές pH , συγκεκριμένα σε $pH=1,0$ και $pH=4,5$. Στο $pH=1,0$, το κυρίαρχο είδος είναι το κατιόν του φλαβυλίου με κόκκινο χρώμα, ενώ στο $pH=4,5$ είναι η άχρωμη ψευδοβάση της καρβινόλης.

Για την ανάλυση της συγκέντρωσης, μετράμε την απορρόφηση των δειγμάτων στο μήκος κύματος με τη μέγιστη απορρόφηση (λ_{max}), που στην περίπτωση μας είναι περίπου $520nm$ για το διάλυμα με $pH=1$. Η απορρόφηση σε αυτό το μήκος κύματος υπολογίζεται για κάθε διάλυμα ($pH=1,0$ και $pH=4,5$), και η διαφορά μεταξύ των δύο τιμών pH χρησιμοποιείται για τον υπολογισμό της συγκέντρωσης των ανθοκυανινών στο δείγμα. Ο παράγοντας αραίωσης DF επιλέγεται έτσι ώστε οι τιμές απορρόφησης να είναι μεταξύ $0,4$ και $0,6$, ενώ η απορρόφηση στα $700nm$ λαμβάνεται υπόψη για τη διόρθωση της μέγιστης απορρόφησης.

Η μέθοδος Wrolstad-Durst-Lee αποτελεί μια απλή και αξιόπιστη λύση για την ποσοτική ανάλυση των ανθοκυανινών, παρέχοντας μια εναλλακτική μέθοδο στην απουσία προτύπων διαλυμάτων και στην πολυπλοκότητα των φυσικών δειγμάτων. [82] [83]

Κεφάλαιο 3.1.1 Δομή και Ιδιότητες των Χρωστικών Sudan

Οι χρωστικές Sudan I, Sudan II, Sudan III και Sudan IV είναι τεχνητές αζωενώσεις (που ονομάζονται επίσης αζωχρωστικές) που χρησιμοποιούνται κυρίως ως χρωστικές ουσίες. Πολλοί γνωστοί δείκτες pH, όπως η ελαντίνη και το κίτρινο μεθύλιο, ανήκουν επίσης στην ίδια κατηγορία. Τα έντονα χρώματα των αζωενώσεων οφείλονται στο ευρύ συζευγμένο σύστημα π-ηλεκτρονίων που απορροφά το φως στο ορατό φάσμα. Όσο μεγαλύτερο είναι αυτό το σύστημα ηλεκτρονίων, τόσο μεγαλύτερο είναι το μήκος κύματος της απορρόφησης (μικρότερη ενέργεια). Συνεπώς, το Sudan IV απορροφά σε μεγαλύτερα μήκη κύματος από το Sudan I, γεγονός που οφείλεται στις φυσικοχημικές ιδιότητες και τη δομή των τεσσάρων χρωστικών ουσιών.

Οι αζωενώσεις παράγονται με αντιδράσεις διαζωνικής σύζευξης με χρήση βενζολίου ως αρχικό υλικό. Συγκεκριμένα, άλατα διαζονίου αρενίου αντιδρούν με ενεργοποιημένους αρωματικούς δακτυλίους για να σχηματίσουν αζωενώσεις. Οι χρωστικές του Σουδάν είναι λιποδιαλυτές, αλλά τα δεδομένα διαλυτότητας στη βιβλιογραφία είναι περιορισμένα. Ωστόσο, η διαλυτότητα των Sudan I-IV αναφέρεται ότι είναι παρόμοια. Το Sudan I είναι αδιάλυτο στο νερό και διαλυτό σε διάφορους οργανικούς διαλύτες: 1,49 mol/dm³ σε τριχλωρομεθάνιο, 0,57 mol/dm³ σε διχλωρομεθάνιο, 0,30 mol/dm³ σε τολουόλιο, 0,17 mol/dm³ σε βενζόλιο, 0,04 mol/dm³ σε ακετονιτρίλιο, 0,02 σε αιθανόλη. mol/dm³ και 0,017 mol/dm³ σε μεθανόλη. Δεν υπάρχουν πληροφορίες για τη διαλυτότητα του Sudan II, αλλά η διαλυτότητα του Sudan III στην αιθανόλη είναι 0,15% και του Sudan IV είναι 0,09%. Οι ενώσεις αυτές είναι λιπόφιλες λόγω του υψηλού μοριακού τους βάρους και της χαμηλής πολικότητας, με τιμές logP στην περιοχή 5-8,5.

Οι χρωστικές Sudan είναι ελαφρά όξινες. Ωστόσο, το άτομο N της αζωομάδας στη θέση 1 σχηματίζει ενδομοριακό δεσμό υδρογόνου με το φαινολικό -OH. Αυτή η μοριακή σταθεροποίηση εξηγεί τις υψηλές τιμές pKa των Sudan I και II (11,65), ενώ τα Sudan III και IV αναμένεται να έχουν παρόμοιες τιμές pKa. Μπορεί επομένως να συναχθεί το συμπέρασμα ότι οι χρωστικές ουσίες Sudan είναι ουδέτερα μόρια σε όλο το εύρος pH που χρησιμοποιείται στην υγρή χρωματογραφία.

Λόγω της δομής τους, οι χρωστικές ουσίες Σουδάν παρουσιάζουν μια σειρά ισομορφισμών. Σε θερμοκρασία δωματίου, υπάρχουν στερεοϊσομερείς διαμορφώσεις (περιστροφές απλών δεσμών). Στο Sudan I έχει μελετηθεί πρωτοτροπικός ταυτομερισμός (1,3-μετακίνηση του H σε ακόρεστα συστήματα) μεταξύ αζωομάδων και υδραζονών. Σε διαλύματα φορμαμιδίου επικρατεί η μορφή υδραζονίου, ενώ σε διαλύματα ισοοκτανίου επικρατεί η μορφή αζονίου. Η πρωτοτροπική ταυτομέρεια εξελίσσεται γρήγορα και τα ισομερή δεν μπορούν να διαχωριστούν με χρωματογραφία. Παρόμοια ισορροπία μπορεί να υπάρχει σε διαλύματα Sudan II-IV. Τέτοια διαστερεοϊσομερίωση υποτίθεται ότι υπάρχει και στο Sudan I-IV, καθώς οι χρωστικές Sudan είναι παρόμοιες με το αζοβενζόλιο και μπορούν να ισομεριστούν στη μορφή E-Z υπό υπεριώδη ακτινοβολία. [61] [62][81]

Ένωση	CAS No	Μορ. Τύπος	M _w (g/mol)	pKa	Σ.Τ. (°C)	Μορφή	λ (nm)	Χημική Δομή
SudanII(SolventYellow 14) (1-phenylazo-2-naphthol)	842-07-9	C ₁₆ H ₁₂ N ₂ O	248,1	11,65		Πορτοκαλί σκόνη	475 (418)	
SudanIII(Solvent Orange 7) (1-[(2,4-dimethylphenyl)azo]-2-naphthalenol)	3118-97-6	C ₁₈ H ₁₆ N ₂ O	276,3	11,65	166	Κόκκινη σκόνη	489 (604)	
SudanIII(SolventRed 23) (1-[4-(phenylazo)phenylazo]-2-naphthalenol)	85-86-9	C ₂₂ H ₁₆ N ₄ O	352,4	7,51	199	Καφεκόκ- κινη σκόνη	503 (507)	
SudanIV(ScarletRed) (1-[[2-methyl-4-[(2-methylphenyl)azo]phenyl]azo]-2-naphthalenol)	85-83-6	C ₂₄ H ₂₀ N ₄ O	380,5	-	186	Καφεκόκ- κινη σκόνη	514 (357)	

Εικόνα 14: Χρωστικές Sudan

3.1.2. Μέθοδοι Προσδιορισμού Χρωστικών Sudan

Οι χρωστικές Sudan δεν είναι εγκεκριμένα πρόσθετα και η χρήση τους σε τρόφιμα απαγορεύεται. Παρ' όλα αυτά, εξακολουθούν να εμφανίζονται πολλά περιστατικά νοθείας σε διάφορα τρόφιμα, κάτι που απαιτεί την ανάπτυξη σύγχρονων, γρήγορων και οικονομικών μεθόδων ανίχνευσης.

Στην επιστημονική βιβλιογραφία υπάρχουν πολλές μέθοδοι για τον προσδιορισμό των αζω-ενώσεων, οι περισσότερες από τις οποίες αναπτύχθηκαν την περίοδο 2004-2007 μετά την εφαρμογή μέτρων από την ΕΕ. Για τον διαχωρισμό των χρωστικών Sudan έχουν προταθεί διάφορες τεχνικές, όπως η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (Thin Layer Chromatography, TLC), η υγροχρωματογραφία υψηλής απόδοσης (High Performance Liquid Chromatography, HPLC), η υγροχρωματογραφία συζευγμένη με φασματοσκοπία μάζας (HPLC – Mass Spectrometry, MS), η χρωματογραφία διαδοχικών εγχύσεων (Sequential Injection Chromatography, SIC) και η φασματοσκοπία πυρηνικού μαγνητικού συντονισμού πρωτονίου (¹H Nuclear Magnetic Resonance, ¹H NMR). Ωστόσο, λίγες από αυτές τις μεθόδους είναι αρκετά οικονομικές και γρήγορες ώστε να είναι κατάλληλες για καθημερινή χρήση σε εργαστήρια.

Η υγροχρωματογραφία είναι η πιο διαδεδομένη τεχνική, καθώς επιτρέπει την ταυτόχρονη ανίχνευση πολλών ενώσεων (πολλά αζω-χρώματα απορροφούν σε παρόμοια μήκη κύματος) και προσφέρει ικανοποιητική εκλεκτικότητα και ευαισθησία. Σε διάφορες μελέτες, η υγροχρωματογραφία συνδυάζεται με ανιχνευτές ορατού-υπεριώδους (UV-Vis), ανιχνευτές συστοιχίας δίοδων (Diode Array Detection, DAD), χημειοφωταύγεια (chemiluminescence, CL), τριχοειδή ηλεκτροφόρηση (Capillary Electrophoresis, CE) και φασματοσκοπία μάζας (MS).

Εξίσου σημαντική με την τεχνική διαχωρισμού είναι και η προεπεξεργασία του δείγματος, η οποία πρέπει να συνδυάζει απλότητα, ταχύτητα, χαμηλό κόστος και ευκολία χρήσης με ικανοποιητική ανάκτηση του αναλύτη. Στη βιβλιογραφία παρουσιάζονται πολλές τεχνικές προεπεξεργασίας και καθαρισμού των δειγμάτων, εξαιτίας της ποικιλίας και της πολυπλοκότητας των διαφορετικών μητρών, καθώς και των διαφορών στις ιδιότητες των αζω-ενώσεων (π.χ. διαφορά στη λιποφιλικότητα). [3]

Σημαντικότεροι Τεχνικές για τον προσδιορισμό χρωστικών Sudan σε διάφορες μήτρες αναγράφονται στον παρακάτω πίνακα :

Πίνακας 7: Σημαντικότεροι Τεχνικές για τον προσδιορισμό χρωστικών Sudan σε διάφορες μήτρες

	Τεχνική	Στήλη	Έκλουση	Κιν. Φάση	λ nm	Χρόνος (min)	LoD	Μήτρα	Προκατεργασία	Έτος	Αναφ.
1	HPLC - UV/Vis	ThermoBetaBasicC-18, 4.6x150 mm, σωματίδια 3μm	Βαθμιδωτή	A: H ₂ O με 0.1% TFA, B: ακετονιτρίλιο με 0.1% TFA	504	12	0.1 έως 0.5 ppm	Σκόνη τσίλι	διάλυση σε ακετόνη, διήθηση, αραίωση, SPE, ξήρανση διάλυση σε ακετονιτρίλιο/ H ₂ O (90/10)	2004	61
2	HPLC - UV/Vis	Shim-pack VP-ODS, 4.6x150 mm,	Ισοκρατική	H ₂ O με 0.1% μυρμηγκ. οξύ/ακετονιτρίλιο 1:9 (v/v)	480	15	-	Σκόνη κάρυ	διπλή εκχύλιση σε αιθανόλη, φυγόκεντρος, διήθηση	2004	62
3	HPLC	i) Zorbax DB-C8, 4.6x150 mm, σωματίδια 5 μm, ii) Zorbax SB-C18	Ισοκρατική	ακετονιτρίλιο με 0,1% μυρμηγκικό οξύ/ H ₂ O με 0,1% μυρμηγκικό οξύ, 80:20 (v/v)	276	i) 10, ii) 40	-	Πρότυπα	-	2005	63
4	UPLC - MS/MS	ACQUITY BEH, 2.1x100 mm, σωματίδια 1.7μm	Βαθμιδωτή	A: H ₂ O με 0.1% μυρμηγκικό οξύ, B: ακετονιτρίλιο με 0.1% μυρμηγκικό οξύ	-	11+6	0.1 to 1.7 μg/Kg	Σάλτσα ντομάτας με τσίλι	διάλυση σε ακετόνη, φυγόκεντρος, εκχύλιση, SPE	2005	64
5	HPLC - UV/Vis	ODS Waters Novapack, 3.9x150 mm, σωματίδια 4 μm	Βαθμιδωτή	A: H ₂ O με NH ₄ OAc, pH=3.6, B: ακετονιτρίλιο	510	25	0.1-0.8 mg/kg	Σκόνη τσίλι	διάλυση σε ακετονιτρίλιο/ακετόνη 90:10, ultrasonic, διήθηση	2006	65
6	HPLC - CL (chemiluminescence)	Nucleosil RP-C18, 4.6x250 mm, σωματίδια 5 μm	Ισοκρατική	μεθανόλη/ H ₂ O με 0.2% μυρμηγκικό οξύ 90:10 (v/v)	-	25	4 - 8 μg/kg	Σκονη και σάλτσα τσίλι	διάλυση σε αιθανόλη, ultrasonic, συμπίκνωση, διήθηση	2006	66
7	HPLC - UV/Vis	Spheri 5 RP-18, 4.6x250, σωματίδια 5 μm	Ισοκρατική	ακετονιτρίλιο/μεθανόλη με 0.05M οξικό αμμώνιο	478	5	-	Σκόνη τσίλι, κουρκουμά, χρώμα τροφίμων	εκχύλιση με ακετονιτρίλιο	2006	67
8	HPLC - MS	Phenomenex Synergi Max RP, 2x150 mm, σωματίδια 4 μm	Ισοκρατική	H ₂ O με 10 mM οξικό αμμώνιο (pH=3.8)/ ακετονιτρίλιο, 30:70 (v/v)	-	-	10 μg/kg	Σκόνη πάπρικα	διάλυση σε ακετονιτρίλιο, ultrasonic, SPE	2006	68

Τεχνική	Στήλη	Έκλουση	Κιν. Φάση	λ nm	Χρόνος (min)	LoD	Μήτρα	Προκατεργασία	Έτος	Αναφ.
						(LoQ)				
HPLC - DAD	Agilent XDB-C18, 4.6x150 mm, σωματίδια 5 μm	Ισοκρατική	ακετονιτρίλιο/ H ₂ O με οξικό οξύ 1%, 85/15 (v/v)	506	25	4,1 - 5,8 μg/kg	Σκόνη ταίλι	διάλυση σε ακετονιτρίλιο ή εξάνιο, ultrasonic, επανάληψη εκχύλισης άλλες 2 φορές, SPE, διήθηση	2011	69
2D HPLC - DAD	i) Acclaim™ PA 2, 4.6 × 150 mm, σωματίδια 3 μm, ii) Acclaim Phenyl-1, 4.6 × 150 mm, σωματίδια 3 μm	Βαθμιδωτή	i) A: H ₂ O, B: ακετονιτρίλιο, C: 2-προπανόλη, ii) A: H ₂ O, B: ακετονιτρίλιο, C: μεθανόλη	478	23	0,12-0,98 μg/L	Πάστα κάρυ	διάλυση σε ακετονιτρίλιο, ultrasonic, διήθηση	2012	70
i) HPLC-DAD, ii) LC-MS/MS	i) Waters Atlantis T3, 2.1x150 mm, σωματίδια 3 μm, ii) Waters Atlantis dC18, 2.1x150 mm, σωματίδια 5 μm	Βαθμιδωτή	A: H ₂ O με 20 mM οξικό αμμώνιο B: ακετονιτρίλιο	i) 484 & 526	i) 10, ii) 10	i) 6.43-74.81 ng/mL, ii) 0.02-21.83 ng/mL	Ζωοτροφές και κρέας	διάλυση σε αιθανόλη/αμμωνία/ H ₂ O 80:1:19 (v/v/v), φυγόκεντρος, ξήρανση, διάλυση σε αιθανόλη/αμμωνία/ H ₂ O 80:1:19 (v/v/v), διήθηση	2013	71
LC-MS/MS	XTerra C18RP, 2.1x150 mm, σωματίδια 5 μm	Βαθμιδωτή	A: buffer με 5 mM οξικό αμμώνιο και μυρμηγκικό οξύ pH=3, B: μεθανόλη	-	-	0.05-0.6 μg/kg	Προϊόντα ταίλι	εκχύλιση με ακετονιτρίλιο/ H ₂ O 9:1 (v/v), ultrasonic, φυγόκεντρος, διήθηση	2013	72
UHPLC - UV/Vis	Ascentis Express RP-Amide, 4.6x100 mm, σωματίδια 2.7 μm	Βαθμιδωτή	A: H ₂ O, B: ακετονιτρίλιο	420 & 500	9	4,4-5,8 μg/L στα πρότυπα	Σάλτσα ταίλι, πάστα ταίλι, σκόνη ταίλι	διπλή εκχύλιση με THF σε ultrasonic, διήθηση, SPE (on-line) με στήλη fused core Ascentis Express F5 (5x 4.6 mm, σωματίδια 5 μm)	2014	73
LC - MS/MS	Hypersil GoldC18, 4.6x100 mm, σωματίδια 3 μm	Βαθμιδωτή	A: ακετονιτρίλιο, B: H ₂ O με 0.5% μυρμηγκικό οξύ	-	15	0,3 μg/kg	Σκόνη ταίλι	διάλυση με ακετονιτρίλιο, φυγόκεντρος, εκχύλιση με ακετονιτρίλιο, ξήρανση, διάλυση σε ακετονιτρίλιο, SPE (on-line) με	2014	74

Τεχνική	Στήλη	Έκλουση	Κιν. Φάση	λ nm	Χρόνος (min)	LoD	Μήτρα	Προκατεργασία	Έτος	Αναφ.
HPLC - DAD	Waters RP C18, 4.6x250 mm, σωματίδια 5 μm	Ισοκρατική	H ₂ O /ακετονιτρίλιο 20:80 (v/v)	400 - 550, (474 ποσοτική κοπή)	12	1,5 μg/kg	Σάλτσα ναμάτσας, προϊόντα ταίλι	εκχύλιση με ακετονιτρίλιο/ H ₂ O 80:20 (v/v), ultrasonic, προσθήκη MgSO ₄ και NaCl, φυγόκεντρος, ξήρανση, διάλυση σε ακετόνη, εκχύλιση με UADLLME-SFO (Ultrasound Assisted Dispersive Liquid Liquid Micro Extraction - Solidification of Floating Organic Drop)	2015	75
HPLC - UV/Vis	Zorbax Eclipse Plus-C18, 4.6 x150 mm, σωματίδια 3.5 μm	Ισοκρατική	Μεθανόλη/ H ₂ O, 99:1 (v/v)	478, 500 & 520	19	3,68 - 5,45 μg/kg	Καραμέλες	διάλυση σε H ₂ O, προσθήκη επιφανειοδραστικών, ultrasonic, φυγόκεντρος, διήθηση	2015	76
HPLC - UV/Vis	ODS II, 4.6x250 mm, σωματίδια 5 μm	Ισοκρατική	μεθανόλη/ακετονιτρίλιο 20:80 (v/v)	480	17	0.3-15.3 μg/kg	Διάφορα μπαχαρικά σκόνη	(on-line) MMSPD (Micro Matrix Solid Phase Dispersion), διάλυση στην κινητή φάση	2015	77
UFLC - MS/MS	Agilent Eclipse PlusC18, 2.1x100 mm, σωματίδια 1.8 μm	Βαθμιδωτή	A: H ₂ O με 0,1% μυρμηγκικό οξύ, B: ακετονιτρίλιο με 0,1% μυρμηγκικό οξύ	-	6,5	0,06 μg/L	Αίμα ποντικού	ανάμιξη με διάλυμα IS, προσθήκη ακετονιτρίλιου, εκχύλιση, φυγόκεντρος, SPE	2015	78
HPLC - DAD	Agilent XDB C-18, 4.6x250 mm, σωματίδια 5 μm	Βαθμιδωτή	A: H ₂ O με 0.1% μυρμηγκικό οξύ, B: μεθανόλη/ακετονιτρίλιο 50:50 (v/v)	450, 490, 520 & 620	40	0.40 - 2.41 mg/kg	Προϊόντα ταίλι	διάλυση σε ακετόνη, ultrasonic, φυγόκεντρος, διήθηση	2016	79
LC - DAD (επέκταση της 5)	ODS Waters Novapak, 3.9x150 mm, σωματίδια 4 μm	Βαθμιδωτή	A: H ₂ O με NH ₄ OAc, pH=3.6, B: ακετονιτρίλιο	380, 430, 470, 510, & 550	7	-	Σκόνη ταίλι, σάλτσα κάρυ, πάπρικα, κουρκουμάς	διάλυση σε ακετονιτρίλιο/ακετόνη 90:10 (v/v), ultrasonic	2016	80
HPLC - DAD	Eclipse XDB-C18, 4.6x150 mm, σωματίδια 3.5 μm	Βαθμιδωτή	A: H ₂ O, B: ακετονιτρίλιο	478 & 520	24	1.08-1.30 μg/L	Χυμός	διήθηση, εκχύλιση με τεχνική SIL (Solidification of Ionic Liquid)	2016	81

3.2.1 Δομή και Ιδιότητες Χρωστικής Sunset Yellow FCF

Η χρωστική Sunset Yellow (E110), γνωστή επίσης ως Sunset Yellow FCF (Food, Cosmetics, and Pharmaceuticals), είναι ένα συνθετικό αζώχρωμα που χρησιμοποιείται ευρέως ως χρωστική ουσία σε τρόφιμα, ποτά, φαρμακευτικά προϊόντα και καλλυντικά.

Η χημική ονομασία της είναι δινάτριο 6-υδροξυ-5-[(4-σουλφοφαινύλ)αζο]-2-ναφθαλινισουλφονικό και έχει χημικό τύπο $C_{16}H_{10}Na_2O_7S_2$ με μοριακό βάρος 452.37 g/mol. Η δομή του μορίου αποτελείται από έναν δακτύλιο ναφθαλινίου που είναι υποκατεστημένος με μία υδροξυλομάδα (OH) και δύο σουλφομάδες (SO_3Na). Ένας δακτύλιος βενζολίου είναι συνδεδεμένος με τον δακτύλιο ναφθαλινίου μέσω μιας αζωτομάδας ($-N=N-$). Η Sunset Yellow εμφανίζεται ως κίτρινη-πορτοκαλί σκόνη ή με την μορφή κόκκων και είναι πολύ διαλυτή στο νερό, ενώ ελαφρώς διαλυτή στην αιθανόλη. Δεν έχει καθοριστεί συγκεκριμένο σημείο τήξης, καθώς διασπάται πριν λιώσει. Είναι σταθερή σε όξινα και ουδέτερα διαλύματα, αλλά μπορεί να αποχρωματιστεί σε ισχυρά αλκαλικά διαλύματα. Η Sunset Yellow απορροφά ακτινοβολία σε μήκος κύματος περίπου 480 nm, κάτι που της δίνει το χαρακτηριστικό της κίτρινο-πορτοκαλί χρώμα.

Χρησιμοποιείται σε αναψυκτικά, γλυκά, μαρμελάδες, τυριά, επιδόρπια και άλλα προϊόντα για την απόκτηση ενός ζωντανού κίτρινο-πορτοκαλί χρώματος. Στα φαρμακευτικά προϊόντα, χρησιμοποιείται σε δισκία, κάψουλες και υγρά φάρμακα για χρωματισμό, ενώ στα καλλυντικά χρησιμοποιείται σε προϊόντα μακιγιάζ, σαπούνια και λοσιόν.

Όσον αφορά την ασφάλεια και τις ρυθμίσεις, η χρωστική έχει εξεταστεί εκτενώς για τοξικότητα. Σε ορισμένα άτομα μπορεί να προκαλέσει αλλεργικές αντιδράσεις. Η χρήση της είναι εγκεκριμένη σε πολλές χώρες με συγκεκριμένα όρια πρόσληψης. Στην Ε.Ε., η ανώτατη αποδεκτή ημερήσια πρόσληψη (ADI) είναι 0-4 mg/kg ανά κιλό σωματικού βάρους. [43]

3.2.2 Εκχύλιση Χρωστικής Sunset Yellow από δείγματα τροφίμων

- Διήθηση με μεμβράνη:

Για τις αζωχρωστικές σε ποτά, η πιο κοινή διαδικασία εξαγωγής πραγματοποιείται με μονοφασική εξαγωγή χρησιμοποιώντας φίλτρο μεμβράνης και νερό ως διαλύτη, λόγω της εύκολης και αποτελεσματικής τεχνικής προετοιμασίας δειγμάτων. Τα δείγματα τροφίμων μπορούν να φιλτραριστούν απευθείας ή να αραιωθούν και στη συνέχεια να φιλτραριστούν πριν από την ανάλυση HPLC. Η επιλογή των φίλτρων πρέπει να δίνει έμφαση στον τύπο της μεμβράνης και το μέγεθος των πόρων, τη διάσταση του φίλτρου, τις ιδιότητες των στοχευμένων αναλυτών και τις ανάγκες της ανάλυσης του οργάνου. Οι Minioti et al. και οι Gosetti et al. χρησιμοποίησαν την τεχνική εξαγωγής με φίλτρο μεμβράνης για τον προσδιορισμό πολλών συνθετικών χρωστικών, συμπεριλαμβανομένου του Sunset Yellow.

- Εκχύλιση Στερεάς Φάσης SPE

Η τεχνική της εκχύλισης στερεάς φάσης (SPE) είναι αποτελεσματική για τον προσδιορισμό και την απομόνωση των αζωχρωμάτων, τα οποία είναι συνθετικές χρωστικές που χρησιμοποιούνται ευρέως σε τρόφιμα και άλλα προϊόντα. Η μέθοδος αυτή είναι δημοφιλής λόγω της απλότητας και της αποτελεσματικότητάς της στην προετοιμασία των δειγμάτων.

Τα προσροφητικά υλικά που χρησιμοποιούνται συχνά στην SPE περιλαμβάνουν τις στήλες C_{18} , πολυμερή με αμινομάδες και χαμηλό βαθμό διασταυρωμένης σύνδεσης (NH_2 -LDC-MP), πολυαμίδιο, και πολυμερές στυρενίου-διβινυλοβενζολίου. Αυτά τα υλικά προσφέρουν καλή κατακράτηση για χρωστικές όπως το Sunset Yellow.

Οι οργανικοί διαλύτες παίζουν κρίσιμο ρόλο στην ανάλυση των αζωχρωμάτων, καθώς η επιλογή του κατάλληλου διαλύτη μπορεί να επηρεάσει σημαντικά την αποδοτικότητα της εκχύλισης. Τα συστατικά της μήτρας είναι παράγοντες που καθορίζουν τον κατάλληλο διαλύτη. Συχνά χρησιμοποιούνται διαλύτες όπως η μεθανόλη, το οξικό οξύ, η αιθανόλη, η ακετόνη, ο οξικός αιθυλεστέρας και το φωσφορικό τετρα-ν-βουτυλαμμώνιο.

Έρευνες έχουν δείξει διάφορες προσεγγίσεις και συνδυασμούς διαλυτών για την αποτελεσματική εξαγωγή αζωχρωμάτων:

- Ο Chen et al. χρησιμοποίησαν $\text{NH}_2\text{-LDC-MP}$ για την εκχύλιση επτά συνθετικών χρωστικών τροφίμων, χρησιμοποιώντας νερό (pH 9.0) ως διαλύτη εκχύλισης. [38] [94]
- Ο Tang et al. μελέτησαν την εξαγωγή δεκαέξι τεχνητών χρωμάτων από σύνθετο καρύκευμα με υψηλή περιεκτικότητα σε λάδι, χρησιμοποιώντας μείγμα μεθανόλης και ακετόνης (1:1, v/v) και διάλυμα 2 mol L^{-1} καρβαμίδιου με 5% αμμωνία σε μεθανόλη.
- Ο Harp et al. χρησιμοποίησαν SPE για την εκχύλιση δεκαεπτά χρωστικών τροφίμων από σαράντα επτά προϊόντα τροφίμων, συμπεριλαμβανομένου του Sunset Yellow.
- Ο González et al. προσδιόρισαν φυσικές και συνθετικές χρωστικές σε λυοφιλωμένα τρόφιμα με αυτόματο σύστημα SPE, χρησιμοποιώντας μείγμα αμμωνίας και μεθανόλης ως διαλύτες και RP-C_{18} ως στατική φάση.

Η εκχύλιση LLE είναι μια τεχνική διαχωρισμού ενώσεων με βάση τη σχετική διαλυτότητα τους στην οργανική φάση και στο νερό. Πολλοί διαλύτες χρησιμοποιούνται ευρέως για την εκχύλιση αζωχρωμάτων από τρόφιμα, όπως νερό, αιθανόλη, μεθανόλη, ισοπροπυλική αλκοόλη, αμμωνιακή αιθανόλη, οξικός αιθυλεστέρας, αμμωνία, κυκλοεξάνιο και τετραν-βουτυλικό φωσφορικό αμμώνιο. Διάφορες μέθοδοι LLE εκχύλισης έχουν χρησιμοποιηθεί για την εκχύλιση του χρώματος Sunset Yellow.

Για παράδειγμα, οι Zou et al. διαπίστωσαν ότι το μείγμα αιθανόλης, αμμωνίας και νερού (80:1:19, v/v/v) παρουσίασε εξαιρετικές ανακτήσεις εκχύλισης για επτά χρώματα σε ζωοτροφές και δείγματα κρέατος. Χρησιμοποίησαν διάλυμα αιθανόλης-αμμωνίας-νερού (80:1:19, V/V/V) ως διάλυμα εκχύλισης, το οποίο μπορεί να εκχυλίσει το Sunset Yellow ενώ μειώνει τις παρεμβολές από τις μήτρες των δειγμάτων.

Επιπλέον, οι Harp et al. αναγνώρισαν επτά πιστοποιημένα χρώματα τροφίμων σε σαράντα τέσσερα τρόφιμα χρησιμοποιώντας υδροξείδιο του αμμωνίου και μεθανόλη ως διαλύτες εκχύλισης.

Μέθοδοι Προσδιορισμού Χρωστικής Sunset Yellow

● Χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC)

Η χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC) είναι μια από τις πιο απλές χρωματογραφικές τεχνικές λόγω του χαμηλού κόστους του εξοπλισμού. Η TLC χρησιμοποιείται συχνά για τον διαχωρισμό και την ανίχνευση χρωστικών σε τρόφιμα και ποτά. Πρόκειται για μια τεχνική φάσης παγίδευσης, όπου η στάσιμη φάση αποτελείται από μια γυάλινη πλάκα καλυμμένη με ένα στρώμα πυριτικής γέλης, και η κινητή φάση λειτουργεί ως οργανικός διαλύτης. Οι οργανικοί διαλύτες είναι οι πιο δημοφιλείς στις χρωματογραφικές τεχνικές. Δυστυχώς, έχουν έντονη δυσάρεστη οσμή και καρκινογόνο δράση. Για αυτόν τον λόγο, προτάθηκε η χρήση διαλύματος νερού-μεθανόλης με β-κυκλοδεξτρίνη ως κινητή φάση και προσροφητικό πολυαμίδιο ως στάσιμη φάση για την αντικατάσταση των οργανικών διαλυτών.

Οι Soronar et al. ανέπτυξαν μια μέθοδο HP-TLC σε συνδυασμό με επεξεργασία εικόνας σαρωμένων χρωματογραμμάτων. Τα όρια ανίχνευσης βρέθηκαν εντός της περιοχής 5.21-9.34 ng/spot, και οι τιμές ανάκτησης κυμαίνονταν μεταξύ 96.39-102.76%. Τα αποτελέσματα αυτά έδειξαν ότι η προσέγγιση της παλινδρόμησης παρέχει αυστηρά και ρεαλιστικά όρια ανίχνευσης και ποσοτικοποίησης και, ως εκ τούτου, μπορεί να εφαρμοστεί ρουτινιά σε άλλα αναλυτικά συστήματα. [52]

Οι Tang et al. καθιέρωσαν μια μέθοδο χρωματογραφίας λεπτής στοιβάδας (TLC) με πολυαμίδιο σε συνδυασμό με εκχύλιση στερεάς φάσης επί της πλάκας και υποβοηθούμενο από πίσω φως για την ανίχνευση πέντε συνθετικών χρωστικών σε τρόφιμα. Τα όρια ανίχνευσης για το Sunset Yellow βρέθηκαν στα 4.12 ng. Η προτεινόμενη τεχνική είναι γρήγορη, χαμηλού κόστους και ευαίσθητη, προσφέροντας μια πράσινη μέθοδο δοκιμής ορίου για πέντε χρωστικές σε ποτά και τρόφιμα. [44]

● Υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC)

Η μέθοδος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (HPLC) χρησιμοποιείται ευρέως για τον προσδιορισμό της παρουσίας συνθετικών χρωστικών τροφίμων, καθώς προσφέρει καλή επαναληψιμότητα και αποδεκτή ευαισθησία με τη χρήση παραδοσιακής ανίχνευσης UV-vis. Ωστόσο, οι περισσότερες μέθοδοι HPLC για την ανάλυση χρωστικών αντιμετωπίζουν περιορισμούς στην ικανότητα διαχωρισμού και είναι χρονοβόρες, ιδιαίτερα όταν απαιτείται ταυτόχρονος προσδιορισμός ευρείας γκάμας χρωστικών τροφίμων. Βασικά, η μέθοδος HPLC χρησιμοποιείται μέσω της περιοχής χρωματογραφικής αιχμής και του γραφήματος βαθμονόμησης όπου η περιοχή αιχμής σχεδιάζεται έναντι της συγκέντρωσης της χρωστικής για τον υπολογισμό της ομοιομορφίας.

Αυτή η μέθοδος συνήθως συνδυάζεται με άλλες, όπως HPLC σε συνδυασμό με ανιχνευτή διάταξης διόδων (HPLC-DAD) και HPLC-DAD με εκχύλιση διαλύτη υποβοηθούμενη από υπερήχους, HPLC με ανιχνευτή υπεριώδους ακτινοβολίας, HPLC-DAD και φασματομετρία μάζας σε σειρά (HPLC-MS/MS), αντίστροφη φάση HPLC και μονολιθική στήλη πολυ(N-ισοπροπυλακρυλαμίδιο-συν-N,N"-μεθυλενοδιβικρυλαμίδιο) με ενσωματωμένα νανοσωματίδια αλουμίνας/μικροεκχύλιση HPLC.

Οι Sha et al. ανέπτυξαν μια γρήγορη και αποτελεσματική μέθοδο για τον ταυτόχρονο προσδιορισμό πέντε συνθετικών χρωστικών τροφίμων σε δείγματα τροφίμων, χρησιμοποιώντας 1-αλκυλ-3-μεθυλιμιδαζολικό βρώμιο ως αντιδραστήριο εκχύλισης με αποδοτικότητα άνω του 95% για τις πέντε χρωστικές. Η μέθοδος εφαρμόστηκε επιτυχώς σε πραγματικά δείγματα τροφίμων με όρια ανίχνευσης (LOD) που κυμαίνονταν από 0.051 έως 0.074 ng/mL. [45]

Οι Wu et al. παρουσίασαν μια ταχεία μέθοδο μικροεκχύλισης υγρής φάσης με διασπορά ιοντικού υγρού μέσω ταχείας ανάδευσης για τον προσδιορισμό έξι συνθετικών χρωστικών τροφίμων, συμπεριλαμβανομένου του Sunset Yellow, σε αναψυκτικά, ζάχαρη και ζελατίνη. Υπό βέλτιστες συνθήκες, η μέθοδος έδειξε υψηλή ευαισθησία με LOD από 0.015 έως 0.32 ng/mL και ποσοστά ανάκτησης από 95.8% έως 104.5%. [79] [81]

Οι Zou et al. πρότειναν αποτελεσματικές τεχνικές για τον προσδιορισμό συνθετικών σουλφονικών χρωστικών σε ζωοτροφές και κρέας χρησιμοποιώντας HPLC-DAD και HPLC-MS/MS. Το LOD βρέθηκε στην περιοχή των 0.02-21.83 ng/mL, με ποσοστά ανάκτησης σε ζωοτροφές και κρέας κοτόπουλου από 71% έως 97%. Άλλες χρωματογραφικές τεχνικές συνοψίζονται στον Πίνακα 8. [38]

Πίνακας 8: Χρωματογραφικές Τεχνικές Προσδιορισμού Χρωστικής Sunset Yellow

Τεχνική	LOD	Αναφορά
Polyamide TLC	4.2 ng/mL	[44]
HPLC με UV ανιχνευτή	0.051–0.074 ng/mL	[45]
HPLC-DAD και HPLC-MS/MS	74.81 και 2.18 ng/mL	[46]
HPLC με ανιχνευτή διόδου	0.1 mg/L	[47]
HPLC με ανιχνευτή διόδου	100 µg/L	[48]
HPLC	0.027 µg/mL	[49]
HPLC	50 ppb	[50]
HPLC	143 ppb	[51]
HPLC - TLC	5.21 ng/spot	[52]
UV-vis φωτομετρία	0.085 ppm	[53]
Φωτομετρία	0.6 µg/mL	[54]
UV-vis φωτομετρία	0.23 mg/L	[55]
Φωτομετρία	5.2 µg/L	[56]
UV-vis φωτομετρία με ανιχνευτή διόδου	0.25 mg/L	[57]
HLA/GO	0.52 µg/mL	[58]

Κεφάλαιο 4.1 Νομικό Πλαίσιο

Η χρήση διαφόρων χρωστικών στα τρόφιμα ελέγχεται ως προς τη νομιμότητά της από διάφορους φορείς. Αυτό συνέβη κατά τη σταδιακή αύξηση της χρήσης αυτών των χρωστικών παγκοσμίως. Οι κύριοι φορείς που εποπτεύουν αυτήν τη χρήση είναι ο Παγκόσμιος Οργανισμός Τροφίμων και Γεωργίας (FAO) και ο Παγκόσμιος Οργανισμός Υγείας (WHO). Αυτοί οι οργανισμοί έχουν προετοιμάσει μελέτες και έγγραφα τα οποία χρησιμοποιούνται ως αναφορά για την ασφαλή παραγωγή τροφίμων σε παγκόσμιο επίπεδο.

Η κύρια αποστολή αυτών των φορέων είναι να αξιολογούν τα επιστημονικά δεδομένα και να παρέχουν καθοδήγηση στις εταιρίες παραγωγής τροφίμων για την ασφαλή χρήση προσθέτων και χρωστικών. Αυτό επιτυγχάνεται μέσω της υπολογιστικής αξιολόγησης των Τιμών Ημερήσιας Πρόσληψης (ADI). Η ADI αντιπροσωπεύει την ποσότητα μιας ουσίας που μπορεί να καταναλωθεί καθημερινά χωρίς σημαντικό κίνδυνο για την υγεία, υπολογιζόμενη ως χιλιοστόγραμμα ουσίας ανά κιλό σωματικού βάρους, διαιρούμενο με το 100.

Οι τιμές ADI είναι ίδιες σε παγκόσμιο επίπεδο και δεν αναγράφονται στις ετικέτες των τροφίμων, καθώς αποτελούν διεθνή πρότυπα. Παρ' όλα αυτά, υπάρχουν πολλοί άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τη χρήση προσθέτων και χρωστικών στα τρόφιμα, οι οποίοι διαφέρουν σημαντικά από χώρα σε χώρα. Αυτοί οι παράγοντες συμπεριλαμβάνουν νομικές διατάξεις που καθορίζουν τις επιτρεπόμενες ουσίες, όπως επίσης και πολιτιστικούς και κοινωνικούς παράγοντες που επηρεάζουν τις προτιμήσεις καταναλωτών και τις απαιτήσεις της αγοράς. [105]

4.2 Χρωστικές Τροφίμων και Ασφάλεια για τον Ανθρώπινο Οργανισμό

Οι χρωστικές τροφίμων είναι ουσίες που χρησιμοποιούνται για να προσδώσουν ή να ενισχύσουν το χρώμα των τροφίμων. Αν και πολλές από αυτές προέρχονται φυσικά από φυτά ή ζώα, οι συνθετικές χρωστικές, οι οποίες παράγονται χημικά, έχουν καταλάβει μεγάλο μέρος της αγοράς λόγω της ευκολίας παραγωγής και σταθερότητας των χρωστικών χαρακτηριστικών τους.

Όσον αφορά την ασφάλεια των χρωστικών τροφίμων για τον ανθρώπινο οργανισμό, υπάρχουν κάποιες κρίσιμες πτυχές που πρέπει να ληφθούν υπόψη:

1. Τοξικότητα και Παρενέργειες: Ορισμένες συνθετικές χρωστικές έχουν συνδεθεί με πιθανούς κινδύνους για την υγεία του ανθρώπου. Παραδείγματα είναι τα αζωχρώματα, τα οποία έχουν αναφερθεί για δυνητικές επιπτώσεις στο νευρικό σύστημα και τον καρκίνο σε μερικές μελέτες.
2. Διαδικασίες Αξιολόγησης και Έγκρισης: Σε πολλές χώρες, οι συνθετικές χρωστικές υπόκεινται σε αυστηρές διαδικασίες αξιολόγησης πριν από την έγκρισή τους για χρήση σε τρόφιμα. Αυτές περιλαμβάνουν την αξιολόγηση της τοξικότητας και την καθορισμένη ημερήσια πρόσληψη (ADI) για κάθε χρωστική.
3. Ρύθμιση και Εποπτεία: Η χρήση των συνθετικών χρωστικών ρυθμίζεται αυστηρά από εθνικές και διεθνείς αρχές, όπως ο Ευρωπαϊκός Οργανισμός Ασφάλειας των Τροφίμων

(EFSA) στην Ευρώπη και η FDA στις Ηνωμένες Πολιτείες, προκειμένου να διασφαλιστεί η ασφάλεια των καταναλωτών.

4. Επιπτώσεις στο Περιβάλλον: Ορισμένες συνθετικές χρωστικές μπορούν να έχουν αρνητικές επιπτώσεις στο περιβάλλον κατά την παραγωγή τους ή μετά τη χρήση τους.

Για την εξασφάλιση της ασφάλειας, είναι σημαντικό οι καταναλωτές να ενημερώνονται για τις χρωστικές που χρησιμοποιούνται στα τρόφιμα που καταναλώνουν και να τηρούνται οι οριοθετημένες κατευθυντήριες γραμμές για την κατανάλωση τους. Η επιστημονική έρευνα και η παρακολούθηση από τις αρμόδιες αρχές είναι ζωτικής σημασίας για τη συνεχή αξιολόγηση των επιπτώσεων των χρωστικών στην υγεία και το περιβάλλον.

Η χρήση των συνθετικών χρωστικών στα τρόφιμα εμφανίστηκε κατά τη βιομηχανική επανάσταση και ενσωματώθηκε γρήγορα στην τροφική παραγωγή. Ωστόσο, στη σύγχρονη εποχή, έχουν προκύψει σημαντικές ανησυχίες για την ασφάλεια αυτών των χρωστικών στον ανθρώπινο οργανισμό. Πολλοί επιστήμονες και ειδικοί έχουν εκφράσει την άποψη ότι η υπερβολική κατανάλωση συνθετικών χρωστικών μπορεί να έχει τοξικές επιπτώσεις στην υγεία του ανθρώπου. Ως αποτέλεσμα, έχει προκύψει έντονη αμφισβήτηση γύρω από τη χρήση αυτών των χρωστικών στα τρόφιμα.

Στο παρελθόν, πριν από τη θέση σε ισχύ των σύγχρονων κανονισμών που διέπουν τη διεθνή αγορά, όπως η Οδηγία του Συμβουλίου της ΕΟΚ του 1962 περί χρωστικών (62/2645/EEC), πολλά από τα συνθετικά χρωστικά περιελάμβαναν βαρέα μέταλλα, όπως το κάδμιο, το οποίο αποδείχθηκε τοξικό για τον ανθρώπινο οργανισμό. Το κάδμιο, για παράδειγμα, συσσωρεύεται στον ανθρώπινο οργανισμό και μπορεί να προκαλέσει σοβαρές επιπτώσεις όπως αναιμία, καρκινογένεση και βλάβες σε οργανικά συστήματα.

Τα αζωχρώματα, που αποτελούν μέρος των συνθετικών χρωστικών, έχουν συνδεθεί με προβλήματα όπως η καρκινογένεση, καθώς μπορούν να μετατραπούν σε αρωματικές αμίνες στον ανθρώπινο οργανισμό, οι οποίες είναι επιβλαβείς για την υγεία. Ορισμένες από αυτές τις χρωστικές, όπως το methyl yellow, έχουν ακόμη αποσυρθεί από τη χρήση λόγω των έντονα καρκινογόνων ιδιοτήτων τους.

Τέλος, παρατηρείται αυξημένη ζήτηση για φυσικά χρωστικά ως εναλλακτική λύση στα συνθετικά. Παρ' όλα αυτά, η αντικατάσταση των συνθετικών χρωστικών δεν είναι πάντα εύκολη λόγω τεχνικών δυσκολιών και ανεπαρκών επιστημονικών δεδομένων για την ασφάλεια και την αποτελεσματικότητα των φυσικών εναλλακτικών. Αυτές οι πληροφορίες αναδεικνύουν τη σημασία της συνεχούς αξιολόγησης και επιτήρησης των χρωστικών τροφίμων για την προστασία της δημόσιας υγείας και την προώθηση της ασφάλειας των καταναλωτών παγκοσμίως. [10] [11] [30] [31] [32] [39]

4.3 Επιτρεπόμενες Χρωστικές στην Ευρώπη

Η Ευρωπαϊκή Ένωση έχει θεσπίσει πληθώρα κανονισμών και οδηγιών που αφορούν την ασφάλεια των τροφίμων για τους καταναλωτές της. Σχετικά με τη χρήση προσθέτων και χρωστικών στην παραγωγή τροφίμων, τον κανονισμό (ΕΚ) αριθ. 1333/2008 του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου και του Συμβουλίου της 16ης Δεκεμβρίου 2008 αναφέρει συγκεκριμένες οδηγίες και περιορισμούς για τη χρήση αυτών των προσθέτων. [34]

Στο άρθρο 8 του εν λόγω κανονισμού ισχύει μια γενική αρχή για τη χρήση χρωστικών τροφίμων. Αναφέρει ότι ένα χρωστικό τροφίμων μπορεί να συμπεριληφθεί στον κοινοτικό κατάλογο του παραρτήματος II για την κατηγορία των χρωστικών, εάν εκτός από την εξυπηρέτηση ενός ή περισσότερων σκοπών του άρθρου 6 παράγραφος 2, εξυπηρετεί επίσης έναν ή περισσότερους από τους ακόλουθους σκοπούς: (α) αποκατάσταση της αρχικής εμφάνισης τροφίμου μετά τη μεταποίηση, αποθήκευση, συσκευασία και διανομή, ώστε να μην είναι πλέον οπτικά αποδεκτό, (β) βελτίωση της οπτικής ελκυστικότητας του τροφίμου, και (γ) πρόσδοση χρώματος σε άχρωμα τρόφιμα.

Επιπλέον, στο παράρτημα IV του Κανονισμού περιγράφονται τα παραδοσιακά τρόφιμα για τα οποία ορισμένα κράτη μέλη μπορούν να εξακολουθήσουν να απαγορεύουν τη χρήση ορισμένων κατηγοριών προσθέτων τροφίμων. Αυτό υποδηλώνει ότι οι χώρες έχουν τη δυνατότητα να θεσπίσουν αυστηρότερους κανόνες από αυτούς που ορίζονται από την ευρωπαϊκή νομοθεσία, εάν συνδέονται με την παράδοση της εκάστοτε χώρας.

Επίσης, στο παράρτημα V του ίδιου Κανονισμού αναφέρονται οι κατηγορίες χρωστικών τροφίμων που απαιτείται η προσθήκη επιπρόσθετων πληροφοριών στη σήμανση των τροφίμων, κατά περίπτωση, μετά από μελέτη της προειδοποίησης που συνοδεύει το παράρτημα.

Παράλληλα, στην Ευρωπαϊκή Ένωση υπάρχει μια γενική ευελιξία στη χρήση των διαφόρων χρωστικών τροφίμων που χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία, με κάποιες εξαιρέσεις. Εάν ένα κράτος μέλος επιθυμεί να περιορίσει ή να απαγορεύσει τη χρήση συγκεκριμένων χρωστικών, αυτό αποτελεί ζήτημα εθνικής πολιτικής και δεν επηρεάζει τους ευρωπαϊκούς κανονισμούς.

Τα κράτη μέλη της Ε.Ε. ίδρυσαν την Ευρωπαϊκή Αρχή Ασφάλειας των Τροφίμων (EFSA) για να καθορίσουν γενικές απαιτήσεις και νομοθεσία για την ποιότητα και ασφάλεια των τροφίμων. Οι διατάξεις της EFSA αντικατοπτρίζονται στους εθνικούς κανονισμούς κάθε κράτους μέλους. Το Ευρωπαϊκό Συμβούλιο (συγκεκριμένα η επιτροπή για τα πρόσθετα τροφίμων και τις πηγές θρεπτικών συστατικών) επανεξετάζει τις συνθήκες χρήσης και την ασφάλεια των χρωστικών (υπαρχόντων και νέων) για κάθε κράτος μέλος, κάθε φορά που ανανεώνονται τα επιστημονικά δεδομένα, λαμβάνοντας υπόψη τις προτεραιότητες, τις διαδικασίες και τις προθεσμίες που προβλέπουν οι υπάρχοντες κανονισμοί για τα πρόσθετα τροφίμων.

Στον κανονισμό του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου (No 1333/2008) όπως αναφέρεται παραπάνω περιλαμβάνονται οι επιτρεπόμενες χρωστικές τροφίμων στην Ε.Ε. (25 φυσικές ή "τύπου φυσικές" και 15 συνθετικές). Στον κανονισμό δεν περιλαμβάνονται ουσίες με ικανότητες χρωματισμού, όπως τα εκχυλίσματα φρούτων και λαχανικών, γεγονός που αποτελεί πρόβλημα, καθώς παρόλο που αυτές οι ουσίες χρησιμοποιούνται ολοένα και περισσότερο, δεν είναι όλες απόλυτα ασφαλείς. Ωστόσο, οι χλωροφύλλες και τα καροτενοειδή που εκχυλίζονται εκλεκτικά περιλαμβάνονται στον κανονισμό και πρέπει να υποβάλλονται σε αξιολόγηση ασφαλείας.

Γενικά, ο κανονισμός καθορίζει τις εγκεκριμένες χρωστικές τροφίμων, τα τρόφιμα στα οποία δεν επιτρέπεται η παρουσία της χρωστικής και τους όρους χρήσης κάθε χρωστικής στα διάφορα τρόφιμα. Συνθετικές χρωστικές (π.χ. E125, E126, E103) που εγείρουν ερωτήματα σχετικά με την ασφάλειά τους, καθώς και χρωστικές (όπως E154, E160f) που δεν προσφέρονται πλέον από τους παραγωγούς, έχουν αφαιρεθεί από τη λίστα με τις εγκεκριμένες χρωστικές.

Τέλος, υπάρχουν χρωστικές ουσίες (π.χ. sudan, ροδαμίνη Β, πράσινο μαλαχίτη) που είναι απαγορευμένες, λόγω αρνητικών επιπτώσεων στην υγεία του καταναλωτή. Παρόλο που η χρήση τους αυξάνεται από τη βιομηχανία τροφίμων και άλλες βιομηχανίες (π.χ. πλαστικών ή υφασμάτων), η ευρεία χρήση τους εξηγείται από την έλλειψη επαρκούς ελέγχου στην παραγωγή τροφίμων (π.χ. σε χώρες εκτός Ε.Ε.), την ευκολία των εξαγωγών και τη μεγέθυνση της αλυσίδας εφοδιασμού.

4.4 Επιτρεπόμενες Χρωστικές στην Ελλάδα

Σύμφωνα με την τρέχουσα έκδοση του άρθρου 35, Μέρος Α, παράγραφος 1 του ελληνικού Κώδικα Τροφίμων και Ποτών (ΚΤΠ):

«Ως "χρωστικές" νοούνται οι ουσίες που προσθέτουν ή αποκαθιστούν το χρώμα ενός τροφίμου και περιλαμβάνουν φυσικά συστατικά τροφίμων και φυσικές ουσίες που συνήθως δεν καταναλώνονται ως τρόφιμα και δεν χρησιμοποιούνται συνήθως ως συστατικά τροφίμου. Τα παρασκευάσματα που λαμβάνονται ως τρόφιμα και άλλες φυσικές ουσίες, οι οποίες παράγονται μέσω φυσικής ή/και χημικής εκχύλισης που οδηγεί σε επιλεκτική εκχύλιση του χρωστικού στοιχείου σε σχέση με τα θρεπτικά ή αρωματικά συστατικά τους, θεωρούνται χρωστικές σύμφωνα με το παρόν άρθρο.»

Η ελληνική νομοθεσία ακολουθεί τον γενικό ευρωπαϊκό κανόνα της αυστηρότερης εφαρμογής των διατάξεων, όπως ισχύει και στις υπόλοιπες ευρωπαϊκές χώρες.

Όπως αναφέρθηκε προηγουμένως, η νομοθεσία που ρυθμίζει τις χρωστικές τροφίμων διαφέρει από χώρα σε χώρα. Παρόλο που στις Ευρωπαϊκές χώρες οι κανόνες για τη χρήση των χρωστικών τροφίμων είναι παρόμοιοι με τον κανονισμό 1333/2008 της Ευρωπαϊκής Ένωσης, σε χώρες εκτός Ευρώπης υπάρχουν διαφορετικοί φορείς που αξιολογούν τη χρήση των προσθέτων, συμπεριλαμβανομένων των χρωστικών τροφίμων. Παρακάτω παρατίθεται Πίνακας με λίστα των επιτρεπόμενων χρωστικών ουσιών τροφίμων στην Ελλάδα.

Πίνακας 9: Λίστα Επιτρεπόμενων Χρωστικών Τροφίμων στην Ελλάδα (Παράρτημα Ι)
(Άρθρο 35, Μέρος Α παρ. 1 του ελληνικού Κώδικα Τροφίμων και Ποτών)

Αριθμός Ε	Κοινή Ονομασία	Αριθμός Color Index ή Περιγραφή
E 100	Κουρκουμίνη	75300
E 101	i. Ριβοφλαβίνη ii. 5-φωσφορική ριβοφλαβίνη	
E 102	Ταρτραζίνη	19140
E 104	Κίτρινο της κινολίνης	47005
E 110	Κίτρινο Sunset FCF Κίτρινοπορτοκαλί S	15985
E 120	Κοχενίλη, Καρμινικό οξύ, Καρμίνες	75470

Αριθμός E	Κοινή Ονομασία	Αριθμός Color Index ή Περιγραφή
E 122	Αζωρουμπίνη, Καρμοϊζίνη	14720
E 123	Αμαράνθη	16185
E 124	Πονσώ 4R, Ερυθρό της κοχενίλης Α	16255
E 127	Ερυθροζίνη	45430
E 128	Ερυθρό 2G (αναστολή χρήσης)	18050
E 129	Ερυθρό Allura AC	16035
E 131	Μπλε πατεντέ V	42051
E 132	Ινδικοτίνη, Ινδικοκαρμίνη	73015
E 133	Λαμπρό κυανό FCF	42090
E 140	Χλωροφύλλες και χλωροφυλλίνες	75810
E 141	Σύμπλοκα των χλωροφυλλών και χλωροφυλλινών με χαλκό	75816
E 142	Πράσινο S	44090
E 150α	Απλό καραμελόχρωμα	
E 150β	Καυστικό θειώδες καραμελόχρωμα	
E 150γ	Εναμμώνιο καραμελόχρωμα	
E 150δ	Εναμμώνιο θειώδες καραμελόχρωμα	
E 151	Λαμπρό Μαύρο BN Μαύρο PN	28440
E 153	Φυτικός άνθρακας	
E 154	Καστανό FK	
E 155	Καστανό HT	20285
E 160α	Καροτένια i. Μείγματα καροτενίων ii. Β-καροτένιο	i. 75130 ii. 40800
E 160β	Ανάττο, μπιζίνη, νορμπιζίνη	75120
E 160γ	Εκχύλισμα πάπρικας καψανθίνη, καψορουμπίνη	

E 160δ	Λυκοπένιο	
E 160ε	β-από-8'-καροτενάλη (C30)	40820
E 160στ	Αιθυλεστέρας του β-από-8'-καροτενικού οξέος (C30)	40825
E 161β	Λουτεΐνη	
E 161ζ	Κανθαξανθίνη	
E 162	Ερυθρά χρωστική ρίζας των τεύτλων, μπεκατίνη	

Αριθμός E	Κοινή Ονομασία	Αριθμός Color Index ή Περιγραφή
E 163	Ανθοκυανίνες	Παρασκευαζόμενες με φυσικά μέσα από φρούτα και λαχανικά
E 170	Ανθρακικό ασβέστιο	77220
E 171	Διοξείδιο του τιτανίου	77891
E 172	Οξείδια και υδροξείδια του σιδήρου	77491 77492 77499
E 173	Αργίλιο	
E 174	Άργυρος	
E 175	Χρυσός	
E 180	Λιθορουμπίνη BK	

4.5 Διατάξεις περί Χρωστικών Τροφίμων σε Η.Π.Α., Κίνα, Ιαπωνία, Ινδία

Στις Ηνωμένες Πολιτείες της Αμερικής, ο έλεγχος και η ρύθμιση των χρωστικών τροφίμων γίνεται από την *U.S. Food and Drug Administration* (FDA). Οι κανονισμοί για τις χρωστικές τροφίμων στις ΗΠΑ περιλαμβάνονται στον *Title 21 of the Code of Federal Regulations (e-CFR, 2009)*. Σύμφωνα με αυτόν τον κώδικα, στις ΗΠΑ επιτρέπονται μόνο εννέα συνθετικές χρωστικές στα τρόφιμα, οι οποίες υπόκεινται σε αυστηρούς ελέγχους. Από αυτές, επτά είναι για γενική χρήση. Χρωστικές από φυτικές, ζωικές ή ορυκτές πηγές δεν υπόκεινται στους ίδιους ελέγχους, και οκτώ από αυτές χρησιμοποιούνται μόνο σε ζωοτροφές. Η πιστοποίηση κάθε χρωστικής περιλαμβάνει πολλούς ελέγχους από τον FDA, με στόχο τον καθορισμό των επιτρεπόμενων ημερήσιων προσλήψεων (ADI). Από τις συνθετικές χρωστικές που επιτρέπονται στις ΗΠΑ, τρεις είναι απαγορευμένες στην Ευρωπαϊκή Ένωση, ενώ εννέα χρωστικές που είναι νόμιμες στην Ευρώπη δεν επιτρέπονται στις ΗΠΑ. [36]

Στην Ινδία, επιτρέπονται οκτώ συνθετικές και έντεκα φυσικές χρωστικές. Οι κανονισμοί της Ινδίας, όπως ορίζονται από τους *The Prevention of Food Adulteration Rules* του 1954 και τροποποιήθηκαν το 1964, 1976 και 1986, δεν επιτρέπουν καμία ανόργανη χρωστική. Στην

Ιαπωνία, επιτρέπονται δώδεκα συνθετικές χρωστικές τροφίμων, ενώ στην Κίνα επιτρέπονται έντεκα, με μία από αυτές να είναι παράνομη στην Ε.Ε., στις ΗΠΑ και στην Ινδία.

Αυτές οι πληροφορίες δείχνουν ότι το νομοθετικό πλαίσιο κάθε χώρας έχει σημαντικές διαφοροποιήσεις όσον αφορά τη χρήση των διαφόρων χρωστικών που κυκλοφορούν στην αγορά. Στον ακόλουθο πίνακα παρουσιάζονται οι διάφορες χρωστικές που έχουν διαφοροποιήσεις στη νομοθεσία που τις διέπει στις προαναφερθείσες χώρες. [6]

Κεφάλαιο 5ο - Συμπεράσματα

Οι βιομηχανίες προτιμούν τις χρωστικές ουσίες. Παρόλο που είναι βλαβερές για τον άνθρωπο, είναι οικονομικά αποδοτικές και σταθερές, διευκολύνοντας τη χρήση τους και προσδίδοντας στα προϊόντα πιο ελκυστική εμφάνιση. Κατά συνέπεια, η χρήση τους είναι σχεδόν αναπόφευκτη. Παρά ταύτα, για την προστασία της ανθρώπινης υγείας, η Ευρωπαϊκή Αρχή για την Ασφάλεια των Τροφίμων (E.F.S.A) έχει καθορίσει συγκεκριμένα όρια για κάθε χρωστική ουσία.

Η συχνότερα χρησιμοποιούμενη μέθοδος ανάλυσης των χρωστικών είναι η υγρή χρωματογραφία, ειδικότερα η υγρή χρωματογραφία υψηλής απόδοσης (HPLC) με ανιχνευτές UV-Vis. Από τα παραπάνω δεδομένα, κατανοούμε τη σημασία της μελέτης των χρωστικών για τη διασφάλιση της ανθρώπινης υγείας και την αποφυγή δυσάρεστων συνεπειών. Συνεπώς, είναι απαραίτητο οι μέθοδοι ανάλυσης να είναι όσο το δυνατόν πιο αποδοτικοί και ακριβείς για την αντικειμενική μελέτη των συντηρητικών και των χρωστικών στα τρόφιμα.

Η υγρή χρωματογραφία προτιμάται λόγω της υψηλής ευαισθησίας της, που επιτρέπει την ανίχνευση και τον ποσοτικό προσδιορισμό χαμηλών συγκεντρώσεων αναλυτών, καθώς και της επιλεκτικότητας της, που επιτρέπει το διαχωρισμό πολύπλοκων μιγμάτων. Επιπλέον, η υγρή χρωματογραφία είναι ιδανική για ποσοτική ανάλυση, καθώς μπορεί να δημιουργεί καλά καθορισμένες κορυφές και να παρέχει ακριβή και αναπαραγώγιμα αποτελέσματα. Επίσης, είναι μια ευέλικτη τεχνική που μπορεί να εφαρμοστεί σε ένα ευρύ φάσμα ενώσεων, από μικρά οργανικά μόρια έως μεγάλα βιομόρια, και μπορεί να συνδυαστεί με διάφορους ανιχνευτές.

Βιβλιογραφία

1. A.Skoog, F. James Holler, Stanley R. Crouch, Αρχές Ενόργανης Ανάλυσης, 6η έκδοση.
2. Novais, C., Molina, A.K., Abreu, R.M.V., Santo-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R., Pereira, C., Barros, L. Natural Food Colorants and Preservatives: A Review, a Demand, and a Challenge(2022) Journal of Agricultural and Food Chemistry, 70 (9), pp. 2789-2805.
3. R. Rebane, I. Leito, S. Yurchenko, K. Herodes.A review of analytical techniques for determination of Sudan I–IV dyes in food matrixes,Journal of Chromatography A,2010, 1217, σσ. 2747-2757.
4. Małgorzata N. et al (2015). “Adsorption of C.I. Natural Red 4 onto Spongin Skeleton of Marine Demosponge”, Materials.
5. K.Azlan et al (2008). “Chitosan and chemically modified chitosan beads for acid dyes sorption”. Journal of Environmental Sciences, 21(3)
6. Michalina O.S, C.T.Elliott (2017). “Food Colors: Existing and Emerging Food Safety Concerns”, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 57(3)
7. Simone P.A. et al (2008). ”Determination of synthetic dyes in selected foodstuffs by high performance liquid chromatography with UV DAD detection “, Food Chemistr, 107(1).
8. M.Carcho et al (2014). ”Adding Molecules to Food, Pros and Cons: A Review on Synthetic and Natural Food Additives”. Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety
9. K.H.Prabhu et al (2012). ”Plant based natural dyes and mordants: A Review”.Journal of Natural Prod. Plant Resources
10. P.Amchova, J.R.Kucerova (2015). ”Health safety issues of synthetic food colorants”, Regul Toxicol Pharmacol
11. S.Kobylewski, M.F.Jacobson (2012). ”Toxicology of Food Dyes”, International Journal of Occupational and Environmental Health
12. K.Rovina et al (2016). ”Methods for the analysis of Sunset Yellow FCF (E110) in food and beverage products – a review“, Trends in Analytical Chemistry
13. R.Silva et al (2011). ”Evaluation of Antibacterial, Antifungal, and Antioxidant Properties of Some Food Dyes”, Food Science Biotechnology
14. European Food Safety Authority (2015). ”Scientific Opinion on the reevaluation of cochineal, carminic acid, carmines (E 120) as a food additive”, EFSA Journal 13
15. A.Roquero (2008). ”Identification of Red Dyes in Textiles from the Andean Region”, Textile Society of America 11th Biennial Symposium
16. B.B. Aggarwal et al (2007). ”Curcumin: the Indian solid gold.”, Adv Exp Med Biol
17. V.P.Menon, A.R.Sudheer (2007). ”Antioxidant and anti -inflammatory properties of curcumin.” Adv. Exp. Med. Biol

18. C. F. Chignell et al (1993). "Spectral and Photochemical Properties of Curcumin", *Photochemistry and Photobiology*
19. Tkaczyk, A., Mitrowska, K., Posyniak, A., "Synthetic Organic Dyes as Contaminants of the Aquatic Environment and their Implications for Ecosystems: A Review", *Science of the Total Environment*
20. Perkin W. H., *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 69, 1896, 596–637.
21. Perkin W. H., *Journal of the Chemical Society, Transactions*, 35, 1879, 717–732
22. *Colour in Food: Improving Quality*. MacDougall D., Ed., Woodhead Publishing, 2002.
23. Coultate, T., Blackburn, R. S., "Food Colorants: Their Past, Present and Future", *Coloration Technology*, 134, 2018, 165–186.
24. *Bioactive Molecules in Food*. Mérillon, J. M., Ramawat, K. G., Eds., Springer Nature Publishing AG, 2019.
25. Ardila-Leal, L. D., Poutou-Piñales, R. A., Pedroza-Rodríguez, A. M., Quevedo Hidalgo, B. E., "A Brief History of Colour, the Environmental Impact of Synthetic Dyes and Removal by Using Laccases", *Molecules*, 26, 2021, 3813–3852.
26. Spears K., "Developments in Food Colourings: The Natural Alternative", *Trends in Biotechnology*, 6, 1988, 283–288.
27. Nielsen S. R., Holst S., *Developments in Natural Colorings*. Στο *Colour in Food Improving Quality*. MacDougall D. B., Ed., Woodhead Publishing, 2002.
28. Chengaiah B., Rao K. M., Kumar K. M., Alagusundaram M., Chetty C. M., "Medicinal Importance of Natural Dyes—A Review", *International Journal of PharmTech Research*, 2, 2010, 144–154.
29. Lakshmi G. C., "Food Coloring: The Natural Way", *Research Journal of Chemical Sciences*, 4, 2014, 87–96.
30. Amchova, P., Kotolova, H., Ruda-Kucerova, J., "Health Safety Issues of Synthetic Food Colorants", *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 73, 2015, 914–922.
31. Shindy, A., "Problems and Solutions in Colors, Dyes and Pigments Chemistry: A Review", *Chemistry International Journal*, 3, 2017, 97–105.
32. Chung, K. T., "Azo Dyes and Human Health: A Review", *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 34, 2016, 233–261.
33. Varjani, S., Rakholiya, P., Ng, H. Y., You, S. Teixeira, J. A., "Microbial Degradation of Dyes: An Overview", *Bioresource Technology*, 314, 2020, 123728.
34. Κανονισμός του Ευρωπαϊκού Κοινοβουλίου 1333/2008
35. Miller J. A., Miller E. C., "The Carcinogenicity of Certain Derivatives of p

Dimethylaminoazobenzene”, *Journal of Experimental Medicine*, 87, 1948, 139–156.

36. Chung K. T., Stevenson S. E., Jr., Cerniglia C. E., “The Reduction of Azo Dyes by Intestinal Microflora”, *Critical Reviews in Microbiology*, 18, 1992, 175–190.

37. Platzek T., Lang G., Grohmann G., Gi U.-S., Baltes W., “Formation of a Carcinogenic Aromaticamine from an Azo Dye by Human Skin Bacteria in vitro”. *Human and Experimental Toxicology*, 19, 1999, 552–559.

38. Stingley R. L., Zou W., Heinze T. M., Chen H., Cerniglia C. E., “Metabolism of Azo Dyes by Human Skin Microbiota”, *Journal of Medical Microbiology*, 59, 2010, 108–114.

39. Oplatowska-Stachowiak M., Elliott C. T., “Food Colors Existing and Emerging Food Safety Concerns”, *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 57, 2017, 524– 548

40. Benoît Schoefs, Chlorophyll and carotenoid analysis in food products. Properties of the pigments and methods of analysis, *Trends in Food Science & Technology*, Volume 13, Issue 11, 2002, Pages 361-371

41. Ronald E. Wrolstad, Robert W. Durst και Jungmin Lee ("Tracking color and pigment changes in anthocyanin products," *Trends in Food Science & Technology* 16, 2005, 423–428

42. Kobun Rovina, Pillai Perumal Prabakaran, Shafiquzzaman Siddiquee, Sharifudin Md Shaarani

43. Methods for the analysis of Sunset Yellow FCF (E110) in food and beverage products- a review, *TrAC Trends in Analytical Chemistry*, Volume 85, Part B, 2016, Pages 47-56

44. B. Tang, C. Xi, Y. Zou, G. Wang, X. Li, L. Zhang, et al., Simultaneous determination of 16 synthetic colorants in hotpot condiment by high performance liquid chromatography, *J. Chromatogr. B* 960 (2014b) 87–91.

45. O. Sha, X.S. Zhu, Y.L. Feng, W.X. Ma, Aqueous two-phase based on ionic liquid liquid–liquid microextraction for simultaneous determination of five synthetic food colourants in different food samples by high-performance liquid chromatography, *Food Chem.* 174 (2015) 380–386.

46. T. Zou, P. He, A. Yassen, Z. Li, Determination of seven synthetic dyes in animal feeds and meat by high performance liquid chromatography with diode array and tandem mass detectors, *Food Chem.* 138 (2013) 1742–1748.

47. E. Diacu, C.P. Ene, Study of analytical parameters of the HPLC method for tartrazine and sunset yellow analysis in soft drinks, *Rev. Chim. (Bucharest)* 61 (2010) 1177–1182.

48. E. Diacu, C.P. Ene, A rapid HPLC method for the analysis of water soluble synthetic pigments in soft drinks, *Ovidius University Annals of Chemistry* 20 (2009) 189–192.

49. N. Yoshioka, K. Ichihashi, Determination of 40 synthetic food colors in drinks and candies by high-performance liquid chromatography using a short column with photodiode array detection, *Talanta* 74 (2008) 1408–1413.

50. S.P. Alves, D.M. Brum, É.C. Branco de Andrade, A.D. Pereira Netto, Determination of synthetic dyes in selected foodstuffs by high performance liquid chromatography with UV-DAD detection, *Food Chem.* 107 (2008) 489–496.

51. E.C. Vidotti, W.F. Costa, C.C. Oliverira, Development of a green chromatographic method for determination of colorants in food samples, *Talanta* 68 (2006) 516–521.
52. F. Soponar, A.C. Mot, C. Sarbu, Quantitative determination of some food dyes using digital processing of images obtained by thin-layer chromatography, *J. Chromatogr. A* 1188 (2008) 295–300.
53. K. Asadpour-Zeynali, F. Mollarasouli, Bismuth and bismuth-chitosan modified electrodes for determination of two synthetic food colorants by net analyte signal standard addition method, *Cent. Eur. J. Chem.* 12 (2014) 711–718.
54. . M.S. El-Shahawi, A. Hamza, A.A. Al-Sibaai, A.S. Bashammakh, H.M. Al-Saidi, A new method for analysis of sunset yellow in food samples based on cloud point extraction prior to spectrophotometric determination, *J. Ind. Eng. Chem.* 19 (2013) 529–535.
55. A.H. El-Sheikh, Y.S. Al-Degs, Spectrophotometric determination of food dyes in soft drinks by second order multivariate calibration of the absorbance spectra-pH data matrices, *Dyes Pigm.* 97 (2013) 330–339.
56. Y.E. Unsal, M. Soylak, M. Tuzen, Column solid-phase extraction of sunset yellow and spectrophotometric determination of its use in powdered beverage and confectionery products, *Int. J. Food Sci. Tech.* 47 (2012) 1253–1258.
57. N.E. Llamas, M. Garrido, M.S.D. Nezio, B.S.F. Band, Second order advantage in the determination of amaranth, sunset yellow FCF and tartrazine by UV-vis and multivariate curve resolution-alternating least squares, *Anal. Chim. Acta* 655 (2009) 38–42.
58. Lucova M. et al (2013). "Adsorption of triphenylmethane dyes Brilliant Blue and Patent Blue through intact skin, shaven skin and lingual mucosa from daily life products", *Food Chem Toxicol*, 52, 19-27
59. Y.S. Al-Degs, Determination of three dyes in commercial soft drinks using HPLC/GO and liquid chromatography, *Food Chem.* 117 (2009) 485–490.
60. Sjursnes, Birte & Kvittingen, Lise & Schmid, Rudolf. (2015). Normal and Reversed-Phase Thin Layer Chromatography of Green Leaf Extracts. *Journal of Chemical Education*. 92. 193-196. 10.1021/ed400519v.
61. J. Stevens, M. Crawford, G. Robinson. Totally Automated Method for the Determination of Sudan Dyes in Food via On-Line Filtration, SPE and HPLC Analysis
62. Shimadzu. Shimadzu Application News No L332. Analysis of Sudan Dyes in Foods
63. Y. Zhang, Y. Zhang, W. Gong, A. I. Gopalan, K. Lee. Rapid separation of Sudan dyes by reverse-phase high performance liquid chromatography through statistically designed experiments, *Journal of Chromatography A*, 2005, 1098, σσ. 183-187
64. C. Keow Ng, N. Tanaka, M. Kim, S. Yap. A Rapid and Sensitive Analysis Method of Sudan Red I, II, III & IV in Tomato Sauce Using Ultra Performance LC- MS/MS, Application Note, Waters. 2005

65. Stuart, B. Analysis of Illegal Dyes in Chilli Powder by LC-UV, Statutory Analysis Government Chemist Programme Ad Hoc Project 1, LGC/GC/2007/006, 2006

66. Y. Zhang, Z. Zhang, Y. Suna. Development and optimization of an analytical method for the determination of Sudan dyes in hot chilli pepper by high-performance liquid chromatography with on-line electrogenerated BrO₂ luminol chemiluminescence detection, Journal of Chromatography A, 2006, 1129, σσ. 34-40

67. A. Nelofar, S.T. Khan, A. Yasmin. A Method for Simultaneous Detection and Determination of Sudan I, II, III & IV in Food Stuff by HPLC, Journal of Chemists Society of Pakistan, 2006, Τόμ. 28, 3

68. Stuart, B. Analysis of Illegal Dyes in Paprika Powder by LC-MS/MS, Statutory Analysis Government Chemist Programme Ad Hoc Project 1, LGC/GC/2007/006, 2006

69. P. Qi, T. Zeng, Z. Wen, X. Liang, X. Zhang. Interference-free simultaneous determination of Sudan dyes in chili foods using solid phase extraction coupled with HPLC–DAD. Food Chemistry. 2011, 125, σσ. 1462-1467.

70. S. Tukkeeree, J. Rohrer, ThermoFisher Scientific. Determination of Sudan Dyes I–IV in Curry Paste. Application Note 1023. 2012

71. T. Zou, P. He, A. Yaseen, Z. Li. Determination of seven synthetic dyes in animal feeds and meat by high performance liquid chromatography with diode array and tandem mass detectors. Food Chemistry. 2013, 138, σσ. 1742- 1748.

72. J. Li, X. Ding, D. Liu, F. Guo, Y. Chen, Y. Zhang, H. Liu. Simultaneous determination of eight illegal dyes in chili products by liquid chromatography– tandem mass spectrometry. Journal of Chromatography B. 2013, 942-943, σσ. 46-52

73. M. Khalikova, D. Šatínský, T. Šmidrkalová, P. Solich. On-line SPE–UHPLC method using fused core columns for extraction and separation of nine illegal dyes in chilli-containing spices, Talanta 2014, 130, σσ. 433-441.

74. Y. Liu, M. Wang, L. Ai, C. Zhang, X. Li, X. Wang. Determination of Sudan dyes in chili pepper powder by online solid-phase extraction with a butyl methacrylate monolithic column coupled to liquid chromatography with tandem mass spectrometry. Journal of Separation Science. 2014, 37, σσ. 1648-1655.

75. X. He, Y. Chen, H. Li, T. Zou, M. Huang, H. Li, E. Xia. Analysis of Sudan I in Food by QuEChERS Combined with Ultrasound assisted Dispersive Liquid-Liquid Microextraction with Solidification of Floating Organic Drop (UADLLME- 87 SFO) Prior to HPLC-PAD. Food Science and Technology Research. 2015, 21, σσ. 659-664.

76. W. Yu, Z. Liu, Q. Li, H. Zhang, Y. Yu. Determination of Sudan I–IV in candy using ionic liquid/anionic surfactant aqueous two-phase extraction coupled with high-performance liquid chromatography. Food Chemistry. 2015, 173, σσ. 815-820.

77. M. Rajabi, S. Sabzalian, B. Barfi, S. Arghavani-Beydokhti, A. Asghari. Inline micro-matrix solid-phase dispersion extraction for simultaneous separation and extraction of Sudan dyes in different spices. Journal of Chromatography A. 2015, 1425, σσ. 42-50.

78. H. Zhu, Y. Chen, C. Huang, Y. Han, Y. Zhang, S. Xie, X. Chen, M. Jin. Simultaneous determination of four Sudan dyes in rat blood by UFLC–MS/MS and its application to a pharmacokinetic study in rats. Journal of Pharmaceutical Analysis. 2015, 5, σσ. 239-248

79. Y. Zhu, Y. Wu, C. Zhou, B. Zhao, W. Yun, S. Huang, P. Tao, D. Tu, S. Chen. A screening method of oil-soluble synthetic dyes in chilli products based on multi-wavelength chromatographic fingerprints comparison. *Food Chemistry*. 2016, 192, σσ. 441-451
80. KM Gray, MJ Walker, MJS Burn, M Mazura, K Niedzwiedzka, K Liszka, DT. Burns. Illegal Dyes in Food and Spices – A 2006 LGC LC-UV/Visible Method Reviewed and Updated for 19 Dyes. *Journal of the Association of Public Analysts (Online)*. 2016, 44, σσ. 018-039.
81. M. Hu, L. Wu, Y. Song, Z. Li, Q. Ma, H. Zhang, Z. Wang. Determination of Sudan Dyes in Juice Samples via Solidification of Ionic Liquid in Microwave Assisted Liquid-Liquid Microextraction Followed by High-Performance Liquid Chromatography. *Food Analytical Methods*. 2016, 9, σσ. 2124-2132.
82. (Ronald E. Wrolstad et al., *Trends in Food Science & Technology* 16, 2005, 423–428
83. Ronald E. Wrolstad et al., Tracking colour and pigment changes in anthocyanin products, *Trends in Food Science & Technology* 16, 2005, 423–428
84. Gandul-Rojas, B.; Roca, M.; Gallardo-Guerrero, L. Detection of the color adulteration of green table olives with copper chlorophyllin complexes (E-141ii colorant). *LWT Food Sci. Technol.* 2012, 1, 311–318.
85. Mandal BK, Ling Y-C. Analysis of Chlorophylls/Chlorophyllins in Food Products Using HPLC and HPLC-MS Methods. *Molecules*. 2023; 28(10):4012.
86. Lichtenthaler, H.K., & Buschmann, C. (2001). Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-Vis Spectroscopy. *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, F4.3.1-F4.3.8.
87. Hynninen, P.H. (1991). Spectral Properties of Chlorophylls and Their Derivatives. *Advances in Photosynthesis Research*, 14, 1-15.
88. Porra, R.J., Thompson, W.A., & Kriedemann, P.E. (1989). Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls a and b extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 975(3), 384-394.
89. Frazier, J., Graham, M.E., & Matulka, R.A. (2011). Determination of chlorophylls in food using high-performance liquid chromatography and tandem mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(6), 3060-3067
90. Arnon, D.I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiology*, 24(1), 1-15.
91. Vernier, F., Coulon, D., & Masson, M. (1997). Determination of chlorophylls and carotenoids in food by HPLC with electrochemical detection. *Journal of Chromatography A*, 770(1-2), 213-222.
92. Sia Mathiyagan, Badal Kumar Mandal, Yong-Chien Ling, Determination of synthetic and natural colorants in selected green colored foodstuffs through reverse phase-high performance liquid chromatography, *Food Chemistry*, Volume 278, 2019, Pages 381-387
93. Cano, M.P. HPLC Separation of Chlorophyll and Carotenoid Pigments of Four Kiwi Fruit Cultivars. *J. Agric. Food. Chem.* **1991**, 39, 1786–1791.

94. Chen SUN, Guangyu LIU, Peixia ZHAO, Extraction of Sodium Copper Chlorophyll in Food Samples Based on Cloud Point Extraction with a Nonionic Surfactant, Grain & Oil Science and Technology, Volume 1, Issue 1, 2018, Pages 59-62.
95. Britton, G. et al. (2004). "Carotenoids Handbook." Birkhäuser Verlag.
96. Khachik, F. et al. (1992). "Separation and quantification of carotenoids in foods." Methods in Enzymology, 213, 347-359.
97. Rodriguez-Amaya, D. B. (2001). "A guide to carotenoid analysis in foods." ILSI Press.
98. Rios, J. J. et al. (2008). "Analysis of carotenoids by high-performance liquid chromatography/mass spectrometry." Journal of Chromatography A, 1185(1), 44-53.
99. Dachtler, M. et al. (2001). "Isolation and structural elucidation of carotenoid glycosides from Crocus sativus L. by LC-NMR and LC-MS." Journal of NaBreithaupt, D. E. (2004). "Simultaneous HPLC determination of carotenoids used as food coloring additives: application to egg yolk." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(22), 6677-6682.
100. Breithaupt, D. E. (2004). "Simultaneous HPLC determination of carotenoids used as food coloring additives: application to egg yolk." Journal of Agricultural and Food Chemistry, 52(22), 6677-6682.
101. Food and Agricultural Organization (FAO). Guidelines for the Simple Evaluation of Dietary Exposure to Food Additives CaC/GL 3-1989. Revision 2014 (formerly Guidelines for the Simple Evaluation of Food Additive Intake). Codex Alimentarius International Food Standards, 2014.
102. Anastasia Stefanaki and Tindevan Andel (2021) 'Aromatic Herbs in Food Bioactive Compounds, Processing, and Applications 2021, pp. 93-121 Chapter 3 - Mediterranean aromatic herbs and their culinary use'

Υπεύθυνη Δήλωση Συγγραφέα:

Δηλώνω ρητά ότι, σύμφωνα με το άρθρο 8 του Ν.1599/1986, η παρούσα εργασία αποτελεί αποκλειστικά προϊόν προσωπικής μου εργασίας, δεν προσβάλλει κάθε μορφής δικαιώματα διανοητικής ιδιοκτησίας, προσωπικότητας και προσωπικών δεδομένων τρίτων, δεν περιέχει έργα/εισφορές τρίτων για τα οποία απαιτείται άδεια των δημιουργών/δικαιούχων και δεν είναι προϊόν μερικής ή ολικής αντιγραφής, οι πηγές δε που χρησιμοποιήθηκαν περιορίζονται στις βιβλιογραφικές αναφορές και μόνον και πληρούν τους κανόνες της επιστημονικής παράθεσης.