

Antosyaanit pH-indikaattoreina

Kandidaatintutkielma

Tekijä: Taina Sirkiä

Helsingin yliopisto

Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta

Kemian laitos

Kemian opettajankoulutus

Helmikuu 2013

Ohjaajat: Mikko Oivanen

Maija Aksela

Sisällysluettelo

1 Johdanto	1
2 Orgaaniset väriaineet	2
2.1 Yhdisteen väri ja kemiallinen rakenne	2
2.1.1 Kromofori ja auksokromi	5
3 pH-indikaattorit	6
3.1 pH ja indikaattorin värinmuutos.....	6
3.2 Luonnon pH-indikaattorit: antosyaanit	8
3.2.1 Antosyaanien rakenne	8
3.2.2 pH:n vaikutus antosyaanien rakenteeseen	10
3.2.3 Kopigmentaatio	12
3.3 Punakaali – esimerkki luonnon pH-indikaattoreista	16
3.3.1 Punakaalin antosyaanit	16
3.3.2 Punakaali pH-indikaattorina	18
4 Pohdinta	22
5 Lähteet	23

1 Johdanto

Antosyaanit ovat kasvipigmenttejä, ja ne saavat aikaan muun muassa kasvien ja vihannesten punaiset, violetit ja siniset värisävyt. Antosyaanit ovat orgaanisia yhdisteitä, jotka luokitellaan flavonoideihin. Niiden rakenne määräytyy ympäröivän liuoksen pH:n mukaan, ja tämän ominaisuuden vuoksi antosyaaneja voidaan hyödyntää pH-indikaattoreina, sillä eri rakenteet ilmentävät eri värejä. Luvun kaksi ”Orgaaniset väriaineet” päämääränä on muodostaa yleiskuva, mistä orgaanisen yhdisteen mahdollinen väri johtuu sekä mitkä rakenteelliset tekijät vaikuttavat yhdisteen väriin.

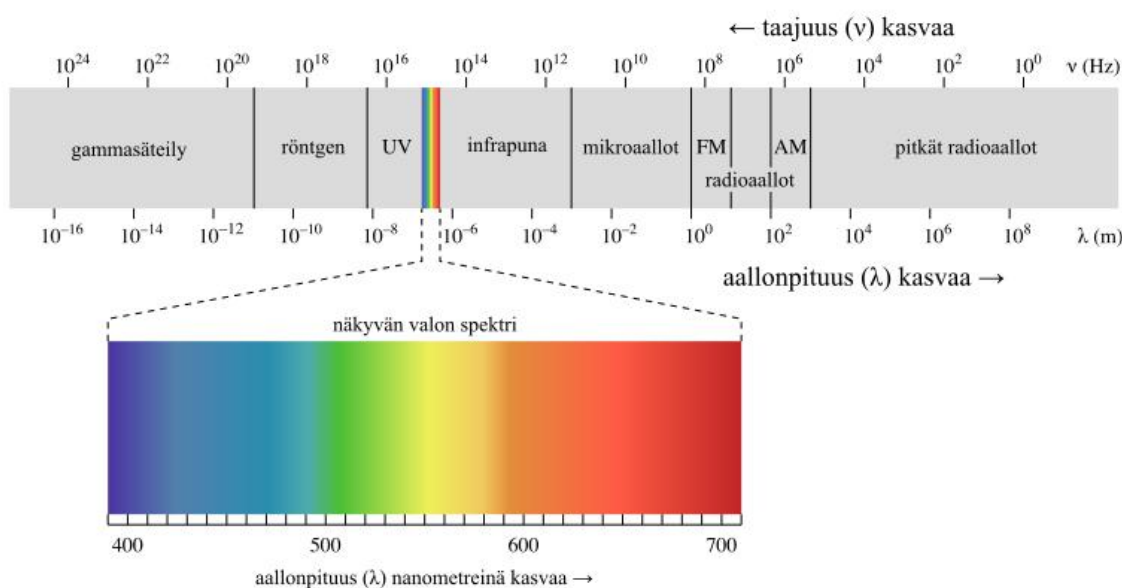
Luku kolme ”pH-indikaattorit” jakautuu sisällöltään kolmeen osaan. Ensiksi käsitellään pH-indikaattoreita yleisesti sekä niiden toiminnan taustalla olevaa teoriaa. Tämän jälkeen siirrytään antosyaaneihin, joita voidaan kutsua luonnon pH-indikaattoreiksi. Tässä osiossa syvennytään antosyaanien rakenteeseen sekä siihen, minkälainen vaikutus ympäröivän liuoksen pH:lla on tähän. Esille nousee myös käsite kopigmentaatio, joka tarkoittaa antosyaaneja stabiloivaa mekanismia ja jonka myötä antosyaanit säilyttävät värinsä paremmin.

Viimeisessä osiossa käsitellään punakaalia, joka on runsas antosyaanien lähde. Olen valinnut punakaalin esimerkiksi luonnon antosyaanilähteistä, koska punakaalia hyödynnetään usein pH-indikaattorina kouluopetuksessa. Punakaalin antosyaanit ovat ainutlaatuisia, koska ne ovat värillisiä läpi koko pH-skaalan, toisin kuin muut antosyaanit. Tavallisesti antosyaanit ovat punaisia happamissa oloissa, ja nostettaessa liuoksen pH:ta lähemmäs neutraalia väri muuttuu violetin kautta siniseksi. Emäksisissä oloissa antosyaanit ovat usein värittömiä. Punakaalin antosyaanit poikkeavat monista muista antosyaaneista, sillä ne ovat emäksissä liuoksissa vihertäviä ja hyvin emäksissä keltaisia. Tutkielmani lopussa pohdin, mitä asioita antosyaaneista ja erityisesti punakaalin antosyaaneista voisi vielä tutkia.

2 Orgaaniset väriaineet

2.1 Yhdisteen väri ja kemiallinen rakenne

Monet orgaaniset yhdisteet ovat värittömiä, koska ne absorboivat sähkömagneettisen säteilyn ultraviolettialueelle kuuluvia valon aallonpituuksia (Kuva 1.). Sen sijaan lukuisat orgaaniset yhdisteet, joiden elektronit ovat delokalisoituneet tiettyjen rakenteiden myötä, absorboivat valoa näkyvän valon alueella (400-700 nm) ja ovat näin ollen värillisiä.^{1,2}



Kuva 1. Sähkömagneettinen spektri³

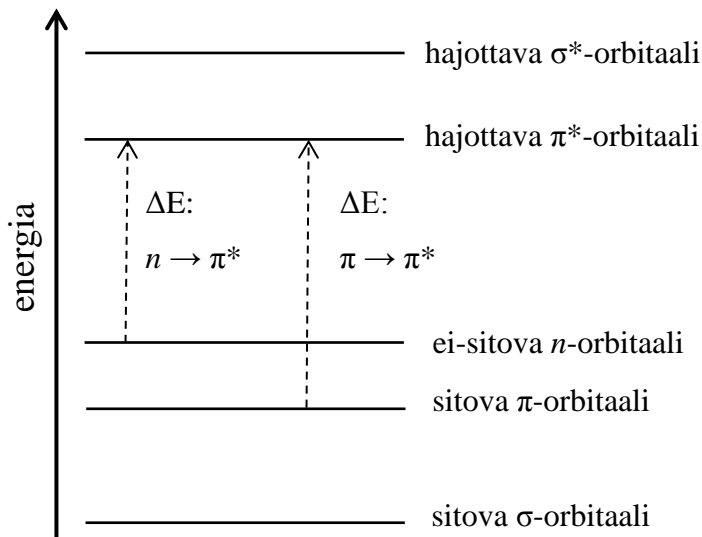
Molekyylin kyky absorboida valon eri aallonpituuksia riippuu siitä, minkälaisia mahdollisuuksia elektroneilla on virittyä. Elektronin virittyminen perustilalta E_1 energiatilalle E_2 vaatii tietyn suuruisen energian

$$\Delta E = E_2 - E_1 = h\nu, \quad (1)$$

missä h on Planckin vakio ja ν on taajuus. Valon sisältämä energia pystytään absorboimaan vain, jos energia vastaa energiatilojen välistä energiaeroa. Toisin sanoen valon taajuuden täytyy olla yhtälön 1 mukainen, jotta molekyyli pystyy absorboimaan energian.¹

Orgaanisen yhdisteen värin syntyminen vaatii delokalisoituneita π -elektroneja. Elektronit ovat delokalisoituneet konjugoituneiden kaksoissidosten vuoksi. Konjugaatioon osallistuvat atomit ovat sp^2 -hybridisoituneita. Atomien hybridisoitumattomat p-orbitaalit

ovat kohtisuorassa hybridiorbitaalien muodostamia σ -sidoksia vasten. Yhdensuuntaisten p-orbitaalien osittainen päällekkäisyys johtaa molekyyliorbitaalien syntyyn, ja alkuperäisten p-orbitaalien elektronit delokalisoituvat muodostaen π -elektronisysteemin. Delokalisoituneen rakenteen ansiosta molekyylin kokonaisenergia on matalampi kuin vastaavan molekyylin, jossa elektronit olisivat lokalisoituneita. Molekyyliorbitaaleja muodostuu yhtä monta kappaletta kuin konjugaatioon osallistuu p-orbitaaleja. Puolet näistä molekyyliorbitaaleista on sitovia π -orbitaaleja (bonding) ja puolet hajottavia π^* -orbitaaleja (antibonding). Sitovat orbitaalit ovat energialtaan alhaisempia kuin hajottavat orbitaalit (Kuva 2.). Lisäksi sitovat π -orbitaalit eroavat energioiltaan hieman toisistaan. Samanlainen energiajakauma on myös muilla orbitaaleilla. Kuvassa 2 tilannetta on yksinkertaistettu, eikä kuvaan ole merkitty samanlaisten orbitaalien keskinäisiä energiaeroja.⁴



Kuva 2. Tyydyttymättömän molekyylin sitovien, hajottavien ja ei-sitovien orbitaalien suhteelliset energiat.^{esim.4}

Tavallisesti molekyyleillä on miehitettyinä sitovat σ -orbitaalit sekä sitovat π -orbitaalit. Jos molekyylin π -elektronisysteemiin osallistuu atomeja, joilla on vapaita elektronipareja, on miehitettyinä myös ei-sitovia (*non-bonding*) n -orbitaaleja. Energoiltaan alhaisimpia ovat sitovat σ -orbitaalit. Sitovilla π -orbitaaleilla on näihin verrattuna enemmän energiaa ja korkein energia on n -orbitaaleilla. Elektronien virittyminen tapahtuu korkeimmalta miehitetyltä molekyyliorbitaalilta (HOMO *highest occupied molecular orbital*) alimmalle miehittämättömälle molekyyliorbitaalille (LUMO *lowest unoccupied molecular orbital*). Tällainen pienienergisin siirtymä vastaa siirtymää n -orbitaalilta π^* -orbitaalille, $n \rightarrow \pi^*$. Jos

π -elektronisysteemiin ei kuulu atomeja, joilla on vapaita elektronipareja, on tällöin pienienenergisin siirtymä π -orbitaalilta π^* -orbitaalille eli $\pi \rightarrow \pi^*$. Näihin siirtymiin riittää näkyvän valon energia. Konjugaatioon osallistuvien atomien lukumäärän kasvaessa π - ja π^* -orbitaalit jakautuvat energioiltaan yhä laajemmalle energia-alueelle ja näin ollen energiaero π - ja π^* -orbitaalien välillä pienenee. Tämän seurauksena elektronin virittäminen ylimmältä miehitytyltä orbitaalilta alimmalle miehittämättömälle orbitaalille vaatii vähemmän energiaa, ja molekyyli absorboi yhä pidempiä näkyvän valon aallonpituuksia.^{4,5}

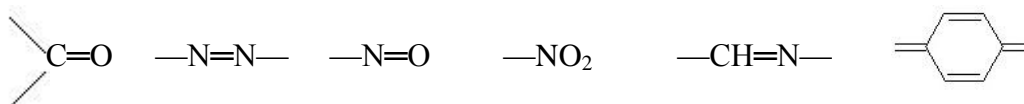
Molekyyli absorboi vain osaa näkyvän valon aallonpituuksista. Se, minkä värisenä aine nähdään, riippuu siitä, mitä aallonpituuksia molekyyli absorboivat (Taulukko 1.). Väri, jonka näemme, koostuu niistä näkyvän valon aallonpituuksista, joita molekyyli eivät absorboi, vaan jotka heijastuvat takaisin. Jos esimerkiksi molekyyli absorboivat aallonpituuksia, jotka vastaavat sinistä väriä (435-480 nm), näemme aineen keltaisena, joka on sinisen vastaväri. Jos molekyylissä on useampia delokalisoituneita π -elektronisysteemejä, jotka ovat molekyylin rakenteen vuoksi erillään toisistaan, voi molekyyli absorboida useita eri näkyvän valon aallonpituuksia.^{1,6}

Taulukko 1. Absorboidun valon aallonpituuden ja havaitun värin välinen suhde.^{esim.2}

Absorboitu aallonpituus (nm)	Absorboitu väri	Havaittu väri
400–435	violetti	keltavihreä
435–480	sininen	keltainen
480–490	vihertäväsininen	oranssi
490–500	sinivihreä	punainen
500–560	vihreä	purppura
560–580	keltavihreä	violetti
580–595	keltainen	sininen
595–605	oranssi	vihertäväsininen
605–700	punainen	sinivihreä

2.1.1 Kromofori ja auksokromi

O. N. Witt loi vuonna 1876 perustan nykyiselle tietämykselle molekyylin värin ja kemiallisen rakenteen välisestä suhteesta. Hän huomasi, että orgaaniset väriaineet sisälsivät aina jonkin tietyn atomiryhmän, ja oletti näiden ryhmien antavan molekyyille värin. Witt nimesi nämä ryhmät kromoforeiksi (Kuva 3.), joka juontuu kreikan kielen sanoista *chroma*, väri sekä *phoros*, kantaja. Orgaanisissa väriaineissa on siis vähintään yksi kromofori, sillä ilman kromoforia yhdiste on väritön. Lisäksi kromoforin tulee olla osa molekyylin delokalisoitunutta π -elektronisysteemiä.^{1,2,7}



Kuva 3. Esimerkkejä kromoforeista: karbonyyli-, atso-, nitroso-, nitro- ja atsometiiniiryhmä sekä kinoidirengas.

Witt huomasi myös joidenkin molekyylin substituenttien saavan aikaan muutoksen yhdisteen värisävyssä tai värin intensiteetissä. Näitä ryhmiä hän kutsui auksokromeiksi, joita ovat esimerkiksi hydroksyyliiryhmä -OH, aminoryhmä -NH₂, karboksyyliiryhmä -COOH, eetteriryhmä -OR sekä halogeenit. Auksokromit ovat sitoutuneet hiiliatomeihin, jotka ovat osa delokalisoitunutta π -elektronisysteemiä. Ne pystyvät luovuttamaan vapaita elektroniparejaan π -elektronipilveen ja samalla niistä tulee osa π -elektronisysteemiä. Tämän seurauksena molekyyli pystyy absorboimaan yhä pidempiä aallonpituuksia ja yhdisteen väri muuttuu. Eri substituentteilla on erilainen kyky luovuttaa elektroneja π -elektronisysteemiin, ja tästä johtuen yhdisteen värin muutos riippuu substituentista.¹

3 pH-indikaattorit

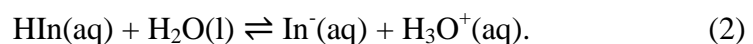
Robert Boyle havaitsi jo 1660-luvulla, että joistakin kasveista eristetyt yhdisteet vaihtavat väriä, kun niitä käsitellään hapon tai emäksen kanssa. Luonnossa esiintyvien värien tutkimus johti useiden uusien, ominaisuuksiltaan samanlaisten väriaineiden löytöön. Yksi löydetty pH-indikaattoreina toimivien väriaineiden luokka oli antosyaanit. Yhdisteet, jotka antavat värin muun muassa ruusujen ja ruiskaunokkien terälehdille, kuuluvat antosyaaneihin.^{8,9}

Yksi ensimmäisistä käyttöön otetuista pH-indikaattoreista oli lakmus, joka eristettiin jäkälästä *Roccella tinctoria*. Lakmus on happamissa liuoksissa punainen ja emäksissä liuoksissa sininen. Myös useiden eri kukkien ja kasvien väriaineita hyödynnettiin indikaattoreina. Titrauksen yleistyessä analyttisenä menetelmänä kasvoi indikaattoreiden tarve. Tämän ansiosta indikaattoreiden tutkimus kiihtyi ja indikaattoreita ryhdyttiin myös syntetisoimaan. 1880-luvun puoliväliin mennessä käytössä oli jo useita synteettisesti valmistettuja indikaattoreita, kuten fenoliftaleiini ja metyylioranssi. Samoihin aikoihin indikaattori ilmaantui myös käsitteenä kirjallisuuteen. Nykyään käytössä olevat pH-indikaattorit ovatkin suurimmaksi osaksi synteettisesti valmistettuja.^{8,9}

3.1 pH ja indikaattorin värinmuutos

Tavallisesti pH-indikaattorit ovat orgaanisia heikkoja happoja tai emäksiä. Protoninsiirtoreaktioissa indikaattorien elektronirakenne muuttuu, mikä saa aikaan indikaattorien värinmuutoksen. pH-indikaattoreita hyödynnetään tämän ominaisuuden vuoksi happo-emästitrauksissa ilmaisemaan titrauksen ekvivalenttikohda.¹⁰

pH-indikaattorin, joka on yhdenarvoinen heikko happo (HIn), protolyysireaktio voidaan ilmaista seuraavan reaktioyhtälön avulla:



Indikaattorin happomuoto HIn ja konjugaattiemäs In^- ovat keskenään erivärisiä. Koska indikaattori on heikko protolyytti, on liuoksessa jatkuvasti läsnä sekä indikaattorin happomuotoa että emäsmuotoa. Liuoksen värin ratkaisee emäs- ja happomuodon välinen

konsentraatiosuhde $\frac{[\text{In}^-]}{[\text{HIn}]}$. Reaktioyhtälön 2 tasapainovakio on

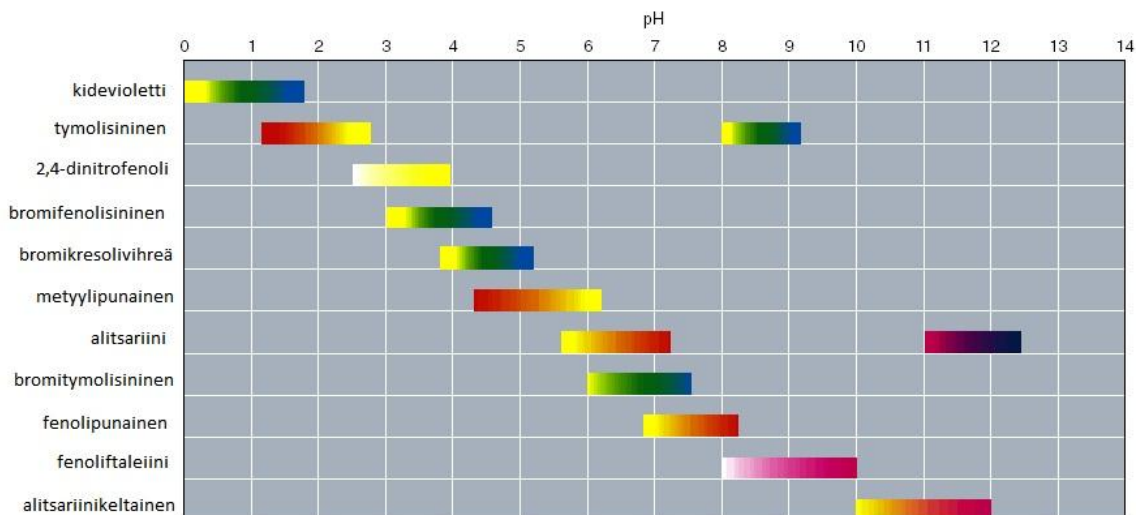
$$K_{\text{HIn}} = \frac{[\text{In}^-][\text{H}_3\text{O}^+]}{[\text{HIn}]}, \quad (3)$$

joka saadaan muotoon
$$\text{pH} = \text{p}K_{\text{HIn}} + \lg \frac{[\text{In}^-]}{[\text{HIn}]}. \quad (4)$$

Tässä yhtälössä viimeinen termi on indikaattorin emäs- ja happomuodon konsentraatioiden suhde, joka siis ilmaisee liuoksen värin. Ihminen ei kykene erottamaan väriseoksien eri värejä toisistaan. Jos indikaattorin emäs- ja happomuotoa on liuoksessa yhtä paljon, on liuos väriltään näitä muotoja vastaavien värien seos. Kun liuokseen lisätään happoa, liuoksen värisävy muuttuu, mutta sen väri vastaa indikaattorin happomuodon väriä vasta, kun emäs- ja happomuotojen suhde on 1/10. Tämän jälkeen happolisäys ei enää muuta liuoksen väriä. Vastaavasti, jos olisi lisätty emästä, olisi liuoksen värisävy aluksi vain hieman muuttunut, ja vasta indikaattorin emäs- ja happomuotojen suhteen ollessa 10/1 olisi liuoksen väri vastannut emäsmuodon väriä. Sijoittamalla nämä raja-arvot, 1/10 sekä 10/1, yhtälöön 4 saadaan yhtälöstä:

$$\text{pH} = \text{p}K_{\text{HIn}} \pm 1. \quad (5)$$

Yhtälö 5 kertoo indikaattorin värinmuutosalueen. Indikaattorin värinmuutos tapahtuu siis pH-alueella, joka määräytyy indikaattorin happovakion mukaan. Kullakin pH-indikaattorilla on oma tyypillinen värinmuutosalueensa (Kuva 4.). Hyödynnettäessä pH-indikaattoria happo-emästitrauksessa tulee indikaattori valita siten, että titrauksen ekvivalenttikohdan pH ja indikaattorin $\text{p}K_{\text{HIn}}$ -arvo ovat mahdollisimman lähellä toisiaan. Tällöin indikaattorin avulla pystytään ilmaisemaan titrattavan liuoksen todellinen pH yhden pH-yksikön tarkkuudella suuntaansa, sillä yhtälöstä 5 nähdään, että indikaattorin täydellinen värinmuutos tapahtuu kahden pH-yksikön sisällä.¹²



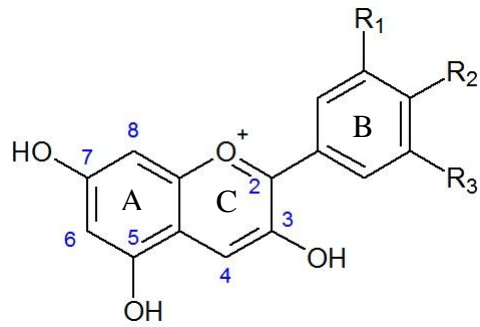
Kuva 4. pH-indikaattoreiden värinmuutoksia pH-asteikolla. Kuva muokattu lähteestä.¹³

3.2 Luonnon pH-indikaattorit: antosyaanit

Antosyaanit (nimi juontaa kreikan kielen sanoista *anthos*, kukka sekä *kyanos*, sininen) on yksi kasvipigmenttien ryhmä, joka kuuluu flavonoideihin. Nämä kasvipigmentit saavat aikaan muun muassa kukkien, hedelmien ja vihannesten punaiset, violetit ja siniset värisävyt.^{14,15}

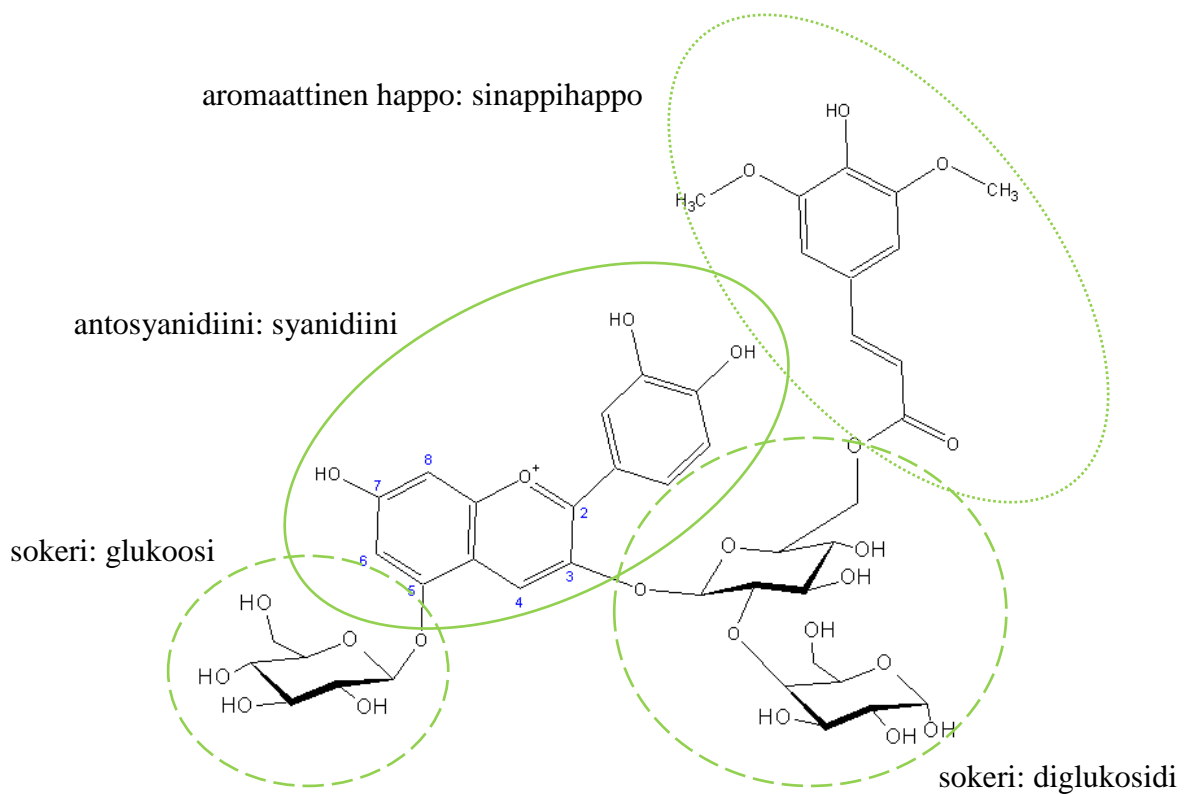
3.2.1 Antosyaanien rakenne

Antosyaanit koostuvat kromoforisesta antosyanidiinista (Kuva 5.) sekä yhdestä tai useammasta sokerista, jotka ovat liittyneet antosyanidiiniin glykosididoksella. Jos antosyanidiiniin on liittynyt vain yksi sokeri, se on sitoutunut molekyylin 3-hiileen. Jos sokereita on sitoutuneena molekyyliin kahdessa eri kohdassa, niin tällöin ne ovat useimmiten sitoutuneet molekyylin 3- ja 5-hiiliin. Sokerit ovat tavallisesti pentooseja, heksooseja tai disakkarideja. Lisäksi näihin sokereihin on voinut sitoutua joko alifaattinen tai aromaattinen happo esteridoksella (Kuva 6.).¹⁶



Antosyanidiini	R ₁	R ₂	R ₃
Delfinidiini	OH	OH	OH
Malvidiini	OMe	OH	OMe
Pelargonidiini	H	OH	H
Peonidiini	OMe	OH	H
Petunidiini	OMe	OH	OH
Syanidiini	OH	OH	H

Kuva 5. Tavallisimmat kasveissa esiintyvät antosyanidiinit ja niiden rakenteet. ^{esim.17}

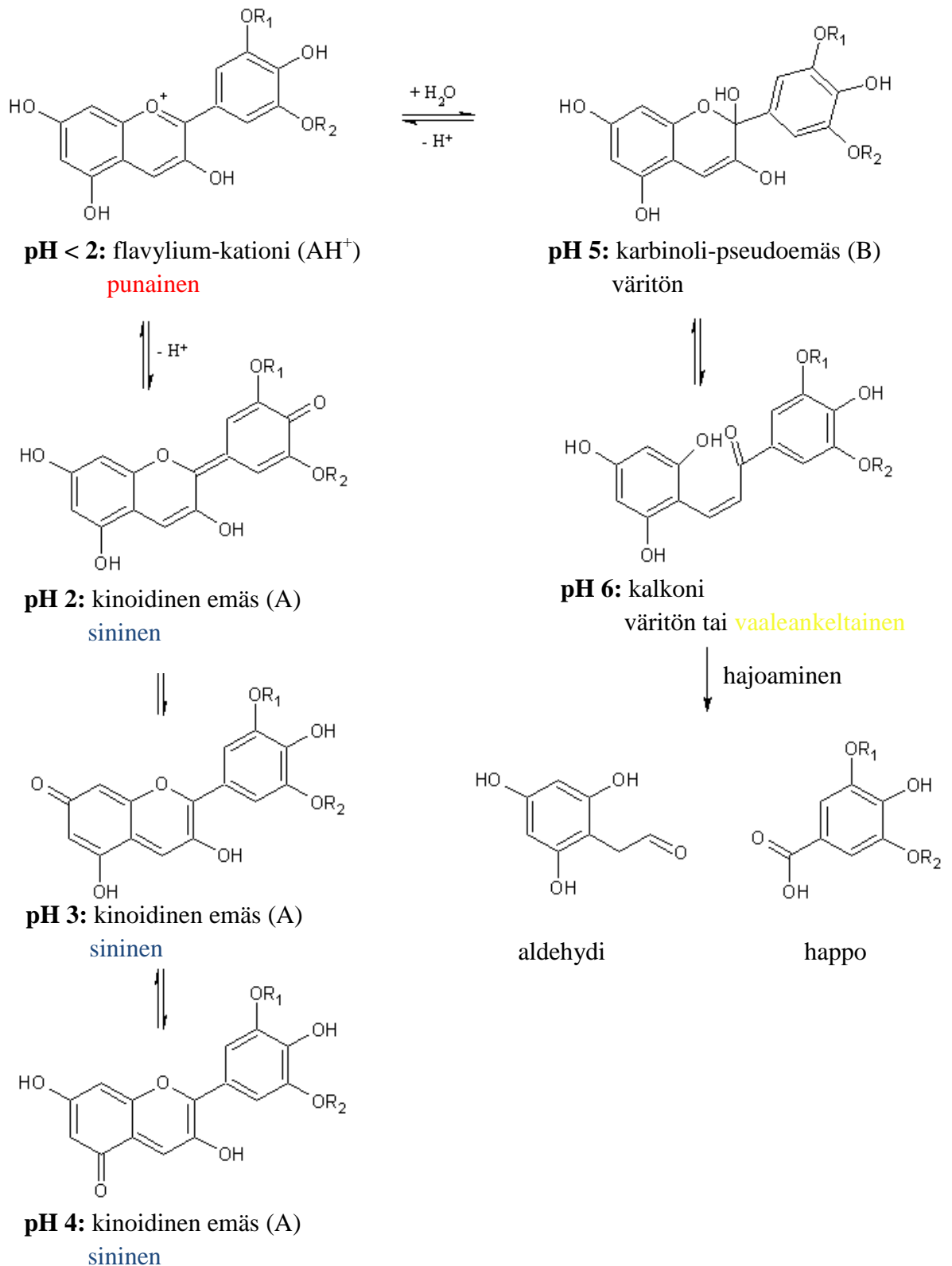


Kuva 6. Antosyaanin rakenne. Esimerkkinä syanidiini-3-(sinapoyyli)diglukosidi-5-glukosidi. ^{esim.15}

Antosyaanin väriin vaikuttaa paljon se, minkälaisia ryhmiä ja kuinka paljon, antosyanidiiniin on sitoutunut. Fenolisten hydroksyyli ryhmien määrän kasvaessa B-renkaassa yhdisteen väri muuttuu vaaleanpunaisesta siniseen. Sen sijaan korvattaessa hydroksyyli ryhmiä metoksiryhmillä ($-\text{OCH}_3$) on värinmuutos päinvastainen. Antosyaanit, jotka ovat antosyanidiinien 3-glykosideja, ovat värikkäämpiä kuin 3,5- tai 5-glykosidit. On havaittu, että 3-glykosidien absorbanssi on kaksinkertainen edellä mainittuihin verrattuna yhdisteille tyypillisellä aallonpituusalueella.¹⁷

3.2.2 pH:n vaikutus antosyaanien rakenteeseen

Antosyaanien rakenteeseen, ja näin ollen myös niiden väriin, vaikuttaa ympäröivän liuoksen pH. Tämän ominaisuuden vuoksi antosyaaneja voidaan hyödyntää pH-indikaattoreina. Tavallisesti antosyaanit ovat happamissa oloissa punaisia, hieman happamissa sinertäviä ja lähellä neutraalia sekä emäksisissä liuksissa värittömiä. Antosyaanimolekyylin väri on ensisijaisesti antosyanidiinin aikaansaama, sillä antosyanidiini toimii kromoforina kahdeksan konjugoituneen kaksoissidoksen ansiosta. Antosyanidiinilla esiintyy neljä kemiallista rakennetta, jotka ovat tasapainossa keskenään, ja vallitseva muoto määräytyy pH:n mukaan. Nämä neljä rakennetta ovat kinoidinen emäs (A), flavylum-kationi (AH^+), karbinoli-pseudoemäs (B) sekä kalkoni (C) (Kuva 7.). Kinoidinen emäs esiintyy lisäksi vielä kolmessa eri muodossa riippuen liuoksen pH:sta.^{17,18}

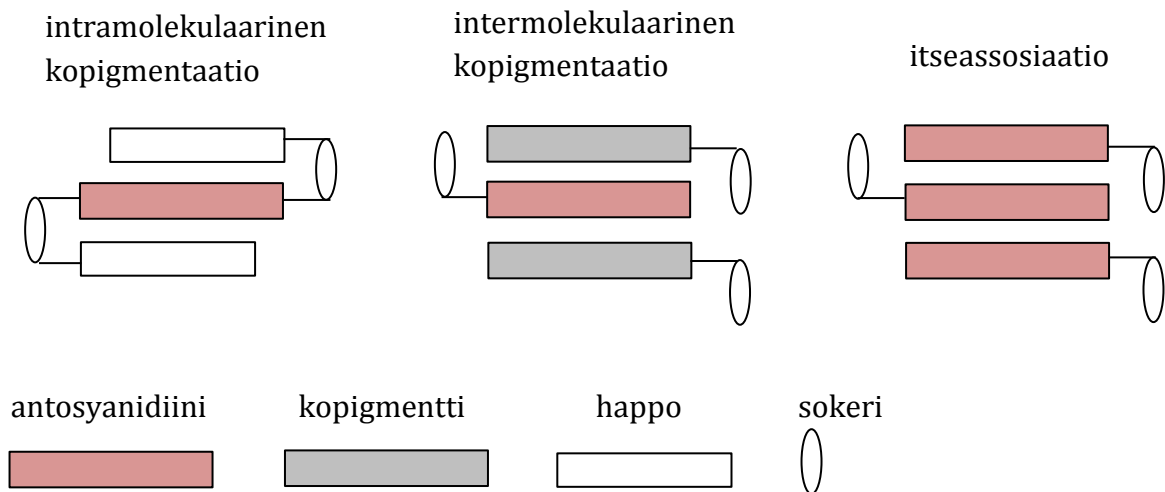


Kuva 7. pH:n vaikutus antosyadiinien rakenteeseen ja antosyanidiinin hajoaminen. R_1 ja R_2 ovat vety (-H) tai metyyli ($-CH_3$).^{esim.18}

Antosyaanit esiintyvät liuoksessa suurimmaksi osaksi punaisina flavylium-kationeina (AH^+) pH:n ollessa alle 2. Flavylium-kationissa renkaiden kaikki kahdeksan kaksoissidosta ovat konjugoituneet keskenään. pH:n noustessa välille 2-4 tapahtuu protoninsiirtoreaktio, jossa flavylium-kationin hydroksyyli-ryhmä deprotonoituu. Vallitseviksi muodoiksi tulevat sinertävät kinoidiset emäkset (A), joissa renkaat ovat yhä konjugoituneina. pH:n ollessa välillä 5-6 voimistuu veden nukleofiilinen hyökkäys flavylium-kationin asemaan 2. Hydraation seurauksena muodostuu vallitseviksi muodoiksi väritön karbinoli-pseudoemäs sekä haalean keltainen tai väritön kalkoni. Karbinoli-pseudoemäs on väritön, koska B- ja C-renkaiden välillä kaksoissidosten konjugaatio estyy, ja molekyyli absorboi lyhyempiä aallonpituuksia näkyvän valon alueen ulkopuolella. pH:n noustessa välille 6-7 voivat kinoidiset emäkset (A) deprotonoitua lisää, ja muodostuu yhä sinisempiä kinoidisia anioneja (A^-). Emäksisemmissä liuoksissa antosyaanit hajoavat fenoliseksi hapoksi ja aldehydiksi (Kuva 7.), mutta hajoamiseen vaikuttavat paljon antosyanidiineihin sitoutuneet ryhmät.^{18,19,20}

3.2.3 Kopigmentaatio

Yksi luontainen antosyaaneja stabiloiva mekanismi on kopigmentaatio: antosyaani vuorovaikuttaa toisen antosyaanin kanssa (itseassosiaatio), jonkin muun orgaanisen yhdisteen kanssa (intermolekulaarinen kopigmentaatio) tai molekyylin osien välillä muodostuu vetovoimia (intramolekulaarinen kopigmentaatio) (Kuva 8.). Nämä vuorovaikutukset muuttavat antosyaanin rakennetta siten, että veden nukleofiilinen hyökkäys flavylium-kationin asemaan 2 estyy, ja tasapaino antosyaanin rakenteiden välillä muuttuu. Näin ollen värittömiä karbinoli-pseudoemäksiä ei pääse muodostumaan yhtä paljon. Ilman kopigmentaatiota heikosti happamissa tai neutraaleissa liuoksissa antosyaanit reagoivat veden kanssa voimakkaasti, ja liuokset ovat lähes värittömiä.^{18,21,22}



Kuva 8. Antosyaaneja stabiloivia mekanismeja.^{esim.23}

Kopigmentaation määrään vaikuttavat antosyaanin ja kopigmentin keskinäinen konsentraatiosuhde, lämpötila, liuoksen pH sekä itse antosyaani että kopigmentti. pH-indikaattorin näkökulmasta kopigmentaation ja pH:n välinen riippuvuus on oleellisin. Kopigmentaatiota esiintyy pH-asteikon koko happamalla osuudella sekä osittain vielä emäksisellä puolella. Kopigmentaatiota esiintyy kaikilla antosyanidiinin värillisillä muodoilla: flavylium-kationilla (AH^+), kinoidisilla emäksillä (A) sekä kinoidisilla anioneilla (A^-). Kopigmentaation vaikutuksesta antosyaanit absorboivat valoa korkeammilla aallonpituuksilla, eli värit siirtyvät sinisen suuntaan. Tämä johtuu siitä, että tasapaino antosyaanin eri muotojen välillä siirtyy sinisten kinoidisten emästen suuntaan. Lisäksi antosyaanien absorbanssi kasvaa huomattavasti kaikilla näkyvän valon aallonpituuksilla. Tähän absorbanssin kasvuun vaikuttavat kopigmentti ja sen konsentraatio, mutta myös liuoksen pH. Heikosti happamissa liuksissa absorbanssi kasvaa huomattavasti enemmän kuin happamammissa liuksissa. Hyvin happamissa liuksissa kopigmentaation vaikutuksesta absorbanssi jopa pienenee. Lisäksi kopigmentin konsentraatiolla on suurempi merkitys heikosti happamissa liuksissa: kopigmentin konsentraation kasvaessa absorbanssi kasvaa.^{17,24,25}

Kopigmentaatio on eksoterminen molekyylien välinen vuorovaikutus. Entropian muutos ΔS on kopigmentaation yhteydessä negatiivinen, eli muutos on epäsuotuisa. Osittain syynä tähän on, että kopigmentaation syntyessä vuorovaikuttavien molekyylien tai molekyylin osien vapausaste pienenee. Intramolekulaarinen kopigmentaatio on suotuisampi intermolekulaariseen verrattuna, sillä edellisessä vuorovaikuttavat molekyylin osat, jotka

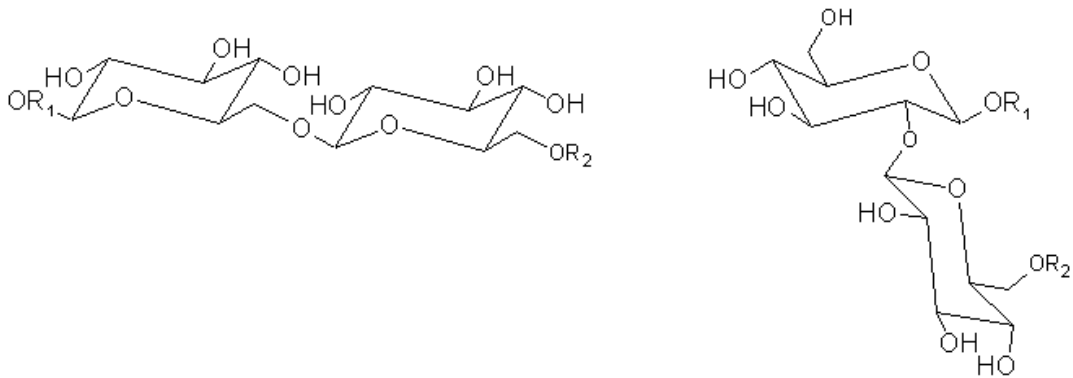
ovat jo kovalenttisesti sitoutuneet toisiinsa. Sidoksesta johtuen niiden vapausaste on alun perinkin matalampi ja ΔS on vastaavasti suurempi. Intramolekulaarinen kopigmentaatio on lisäksi intermolekulaariseen verrattuna tehokkaampi ja stabiloi molekyyliä voimakkaammin, eikä diasyloiduilla antosyaaneilla esiinny juuri lainkaan intermolekulaarista kopigmentaatiota. Jotta asyloimattomat antosyaanit olisivat yhtä stabiileja kuin asyloidut, tulisi kopigmenttien konsentraation olla hyvin suuri.²²

Intramolekulaarinen kopigmentaatio

Intramolekulaarista kopigmentaatiota esiintyy asyloiduilla antosyaaneilla. Tasomaisen fenolisen happoryhmän ja positiivisesti varautuneen tasomaisen flavylium-kationin elektronit ovat delokalisoituneet. Näiden ryhmien π -elektronisysteemien välille muodostuu vuorovaikutuksia, ja tätä vuorovaikutusta kutsutaan π -pinoutumiseksi. Se stabiloi asyloitujen antosyaanien rakennetta ja estää veden nukleofiilisen hyökkäyksen antosyanidiinin asemaan 2. Intramolekulaarista kopigmentaatiota esiintyy flavylium-kationin ja happoryhmien välillä, koska flavylim-kationissa, kuten myös kinoidisissa emäksissä ja anioneissa, kaikkien kolmen renkaan π -elektronit ovat delokalisoituneet keskenään. Tämä mahdollistaa voimakkaan π -pinoutumisen happoryhmän kanssa. Karbinoli-pseudoemäksessä π -elektronit eivät ole yhtä laajasti delokalisoituneina, eikä rakenne ole enää täysin tasomainen, ja tämän vuoksi π -pinoutumista ei tapahdu. Monoasyloiduilla antosyaaneilla happoryhmä pystyy vuorovaikuttamaan vain tasomaisen flavylium-kationin tason toisella puolella. Näin ollen tason toinen puoli on vielä vapaana veden hyökkäykselle. Diasyloiduilla antosyaaneilla kaksi happoryhmää mahdollistaa flavylium-kationin tason molempien puolien suojaamisen veden hyökkäykseltä. Tasomainen antosyanidiini jää siis happoryhmien väliin, ja tällaista intramolekulaarista kopigmentaation muotoa kutsutaan usein voileipätyyppiseksi pinoutumiseksi (*sandwich-type stacking*) (Kuva 8.).²²

Yhdisteen stabiiliuteen ja kopigmentaatioon vaikuttaa antosyanidiiniin sitoutuneen sokerin laatu sekä happoryhmän sitoutumiskohta. Esimerkiksi glukoosin 6-aseman primääriseen hydroksyyliiryhmään sitoutunut happoryhmä pääsee vapaasti kiertymään sidoksensa ympäri, taivuttamaan flavylium-kationin päälle ja pystyy suojaamaan kromoforia tehokkaasti. Sokerin, johon happo on sitoutunut, tulee olla tarpeeksi pitkä, jotta kopigmentaatio olisi tehokasta. Esimerkiksi diglukosidin, jossa glukoosit ovat sitoutuneet β -1,6-

glukosididoksella, on havaittu stabiloivan antosyaaneja huomattavasti enemmän kuin β -1,2-glukosididoksella sitoutuneen diglukosidin (Kuva 9.). Intramolekulaariseen kopigmentaatioon osallistuu vain antosyanidiinin 3-aseman sokeriin sitoutuneet happoryhmät. 5-aseman sokerin on todettu destabiloivan antosyaanin rakennetta, ja se vaikeuttaa mahdollisesti myös diasyloidun antosyaanin 3-aseman sokereihin sitoutuneiden happoryhmien vapaata kiertymistä, eikä kopigmentaatio ole yhtä tehokasta.^{22,26}



Kuva 9. β -1,6-glukosididoksella sekä β -1,2-glukosididoksella sitoutuneet diglukosidit. R_1 on antosyanidiini ja R_2 on happoryhmä.

Intermolekulaarinen kopigmentaatio ja itseassosiaatio

Intermolekulaarista kopigmentaatiota sekä itseassosiaatiota esiintyy monoasyloiduilla antosyaaneilla tai antosyaaneilla, joihin ei ole sitoutunut happoryhmiä lainkaan. Intermolekulaarisessa kopigmentaatioissa antosyaanien ja värittömien polyfenoleiden, kopigmenttien, välille muodostuu intramolekulaarisen kopigmentaation tavoin hydrofobisia π - π -vuorovaikutuksia (Kuva 8.). Vetyhidokset vaikuttavat myös pienessä määrin antosyaanin ja kopigmentin välillä. Antosyaanin ja kopigmentin muodostaman kompleksin ansiosta veden nukleofiilinen hyökkäys antosyanidiinin 2-asemaan estyy. Monoasyloiduilla antosyaaneilla intramolekulaarinen kopigmentaatio suojaa antosyanidiinin toista puolta, mutta toinen puoli on edelleen vapaana veden hyökkäykselle. Kopigmentin ansiosta myös toinen puoli pystytään suojaamaan ja antosyaanin väri säilyttämään. Asyloimattomilla antosyaaneilla intermolekulaarinen kopigmentaatio vastaa antosyanidiinin molempien puolien suojaamisesta.²⁷

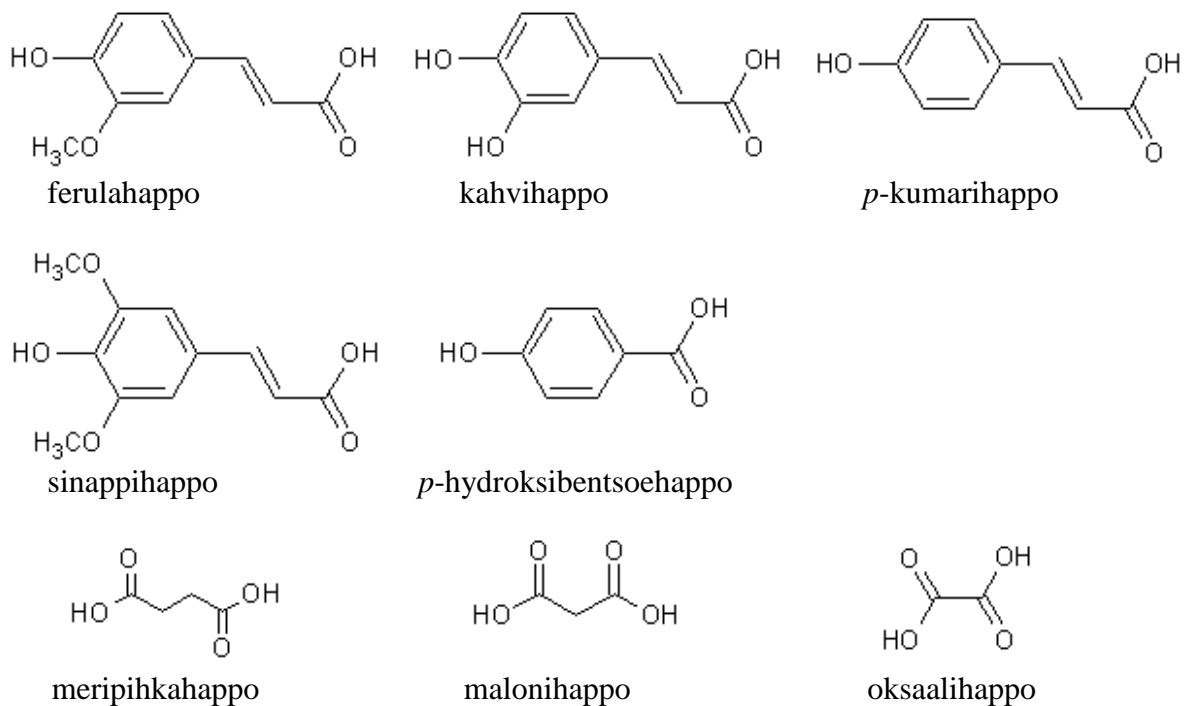
Itseassosiaatiota (Kuva 8.) voidaan verrata intermolekulaariseen kopigmentaatioon. Siinä molekyylien välille muodostuu niin ikään hydrofobisia vuorovaikutuksia, mutta vuorovaikuttavina osapuolina ovat itse antosyaanit. Kasvattamalla antosyaanin konsentraatiota itseassosiaatio lisääntyy, ja tämä havaitaan liuoksen absorbanssin kasvuna. Antosyaanin rakenteella on myös merkitystä itseassosiaation määrään. Esimerkiksi suurempi metoksiryhmien (-OCH₃) lukumäärä antosyanidiinin B-renkaassa edesauttaa itseassosiaatiota.²⁸

3.3 Punakaali – esimerkki luonnon pH-indikaattoreista

Punakaali *Brassica oleracea* on runsas antosyaanien lähde. Verrattuna muihin luonnossa esiintyviin antosyaaneihin punakaalin antosyaanit ovat ainutlaatuisia, sillä ne säilyttävät värinsä hyvin laajalla pH-alueella. Esimerkiksi mustaviinimarjojen ja seljanmarjojen antosyaanit ovat värillisiä vain pH:n ollessa alle 4. Punakaalin antosyaanit sen sijaan ovat punertavia pH:ssa 1-3, violetteja ja yhä sinisempiä pH:n kasvaessa välillä 3-8, vihertäviä pH:ssa 8-12 ja keltaisia vieläkin emäksisemmissä liuoksissa.^{29,30}

3.3.1 Punakaalin antosyaanit

Punakaali sisältää runsaasti erilaisia antosyaaneja, ja kaikkien näiden molekyylien antosyanidiini on syanidiini. Antosyanidiineihin on sitoutunut sekä 3- että 5-asemaan sokereita, jotka ovat pääasiassa glukooseja, diglukooseja tai triglukooseja. Lähes kaikissa punakaalin antosyaaneissa on molekyylin 3-aseman sokeriin sitoutunut yksi tai kaksi aromaattista happoa. Muutamissa antosyaaneissa on 3-aseman sokeriin sitoutunut aromaattisen hapon lisäksi myös alifaattinen happo. Pääsääntöisesti punakaalin antosyaanien hapot ovat kuitenkin aromaattisia, fenolisia happoja. Muutamassa antosyaanissa myös 5-aseman sokeriin on sitoutunut joko yksi aromaattinen tai alifaattinen happo. Happoryhmät ovat sitoutuneet esterisidoksella useimmiten glukoosin primääriseen hydroksyyliiryhmään. Punakaalin antosyaaneissa esiintyvät aromaattiset hapot ovat ferulahappo, kahvihappo, *p*-kumarihappo, sinappihappo sekä *p*-hydroksibentsoehappo. Alifaattiset hapot ovat meripihkahappo (butaanidihappo), malonihappo (propanidihappo) sekä oksaalihappo (etaanidihappo) (Kuva 8.).^{14,16,31}



Kuva 8. Punakaalin antosyaaneissa esiintyvät hapot.

Tähän mennessä punakaalista on löydetty keskimäärin 30 antosyaania. Antosyaanien sisältämät sokeri- ja happoryhmät sekä niiden lukumäärät vaihtelevat eri tutkimustulosten välillä hieman, mutta kaikissa tutkimuksissa on löydetty pääpiirteissään samankaltaisia yhdisteitä. Tutkimukset on suoritettu lähes samoin menetelmin hyödyntäen nestekromatografiaa ja massaspektrometriaa. Tulosten eroavaisuus johtuu siitä, että punakaalin antosyaanien analysointi on hankalaa niiden suuren lukumäärän sekä suurien keskinäisten konsentraatioerojen vuoksi. Analysointia hankaloittaa myös se, ettei saatavilla ole puhtaita, rakenteeltaan tunnettuja standardiantosyaaneja, joihin näytteessä olevia yhdisteitä voisi verrata. Käytetyillä tutkimusmenetelmillä ei myöskään saada selville yhdisteiden täysin tarkkoja molekyyliarakenteita. Osa löydettyistä antosyaaneista on keskenään toistensa isomeerejä. Näiden rakenteiden tiedetään eroavan toisistaan siltä osin, että happoryhmät ovat sitoutuneet sokereissa eri kohtiin, mutta tarkkoja sitoutumiskohtia ja molekyyliarakenteita ei ole pystytty näillä tiedoilla selvittämään.^{14,15,16,32}

Punakaalin sisältämät antosyaanit ovat suurimmaksi osaksi syanidiini-3-diglukosidi-5-glukosidin johdannaisia, joissa 3 aseman diglukosidiin on sitoutunut yksi tai kaksi happoryhmää (Kuva 6.). Asyloituja eli happoryhmän sisältäviä antosyaaneja on punakaalin antosyaaneista konsentraation perusteella noin 80 %, ja loput antosyaanit ovat syanidiinien

glykosideja. Pitoisuuksiltaan huomattavasti suurimmat antosyaanit muihin antosyaaneihin verrattuna ovat: syanidiini-3-diglukosidi-5-glukosidi,

syanidiini-3-(*p*-kumaroyyli)diglukosidi-5-glukosidi,

syanidiini-3-(sinapoyyli)diglukosidi-5-glukosidi,

syanidiini-3-(sinapoyyli)(sinapoyyli)diglukosidi-5-glukosidi.^{16,32}

3.3.2 Punakaali pH-indikaattorina

Indikaattorin käytön kannalta on oleellista tietää pK_{HIn} eli indikaattorin happo- ja emäsmuotojen välisen tasapainon tasapainovakio, sillä sen perusteella tiedetään indikaattorin värinmuutosalue. Punakaalille ei pystytä määrittelemään pelkästään yhtä pK_{HIn} -arvoa, koska punakaalin antosyaanit esiintyvät pH:n muuttuessa useammassa kuin kahdessa muodossa. Värinmuutoksen kannalta oleelliset tasapainoreaktiot ovat:



Reaktioyhtälössä 6 punainen flavylium-kationi (AH^+) luovuttaa protonin ja muodostuu sininen kinoidinen emäs (A). Reaktioyhtälössä 7 tapahtuu flavylium-kationin hydraatio ja tuotteena saadaan väritön karbinoli-pseudoemäs (B). Ensimmäisen reaktioyhtälön tasapainovakio on K_a ja jälkimmäisen K_H . Tasapainovakioista saadaan logaritmin vastaluvun avulla pK_a sekä pK_H , jotka kertovat suoraan indikaattorin värinmuutosalueen pH-arvon (Kaava 5).¹⁷

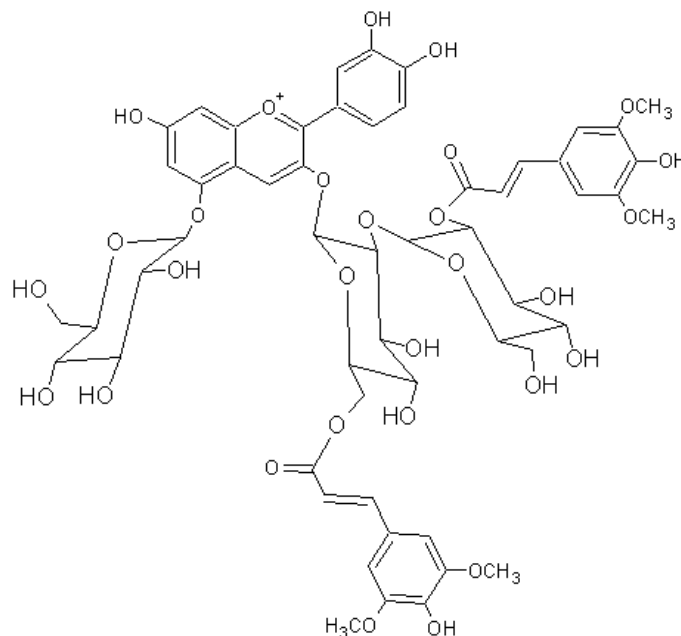
Punakaalille määritetty pK_H -arvo on 2,69. Se on saatu titraamalla punakaalista eristettyjen antosyaanien vesiliuosta ja mittaamalla liuoksen absorbanssia. pK_H -arvo vastaa liuoksen pH:ta, jossa liuoksen absorbanssi on pienentynyt alkuperäisestä arvostaan puoleen. Kyseisen pH-arvon määrittämiseksi titraus aloitettiin pH-arvosta 0,45, koska näin happamissa oloissa tiedetään kaikkien antosyaanimolekyylien olevan flavylium-kationi -muodossa. Titrausta jatkettiin, kunnes absorbanssi pienentyi alkuperäisestä arvostaan puoleen. Tällöin puolet flavylium-kationeista oli hydraation myötä muuttunut karbinoli-pseudoemäksiksi. Titrauksen aikana absorbanssia mitattiin aallonpituudella 500 nm, jotta liuokseen muodostuvat siniset kinoidiset emäkset eivät häirinneet mittausta.²⁶

Punakaalin jokaiselle antosyaanille voidaan määrittää myös oma pK_H -arvo. Nämä arvot poikkeavat punakaalille määritetystä pK_H -arvosta jonkin verran antosyaanin rakenteesta riippuen. Esimerkiksi syanidiini-3-diglukosidi-5-glukosidin pK_H -arvo on 2,32, kun taas tämän antosyaanin diasyloidun johdannaisen syanidiini-3-(kumaroyyli)(sinapoyyli)diglukosidi-5-glukosidin pK_H on 3,12. Sokeriin sitoutuneet happoryhmät vähentävät siis flavylium-kationin hydraatiota ja nostavat pK_H -arvoa. Tämä on seurausta siitä, että asyloidulla antosyaanilla esiintyy intramolekulaarista kopigmentaatiota, joka suojaa antosyaania hydraatiolta tehokkaammin kuin asyloimattoman antosyaanin intermolekulaarinen kopigmentaatio. Näin ollen asyloitujen antosyaanien värit ovat happamissa liuksissa intensiteetiltään korkeampia kuin asyloimattomien. Punakaalin pK_H -arvo on suurin piirtein näiden esimerkkinä mainittujen antosyaanien pK_H -arvojen puolivälissä. Tämä johtuu siitä, että punakaali sisältää sekä asyloituja että asyloimattomia antosyaaneja, ja kaikki antosyaanit yhdessä vaikuttavat punakaalista eristetyn liuoksen väriin ja pK_H -arvoon.²⁶

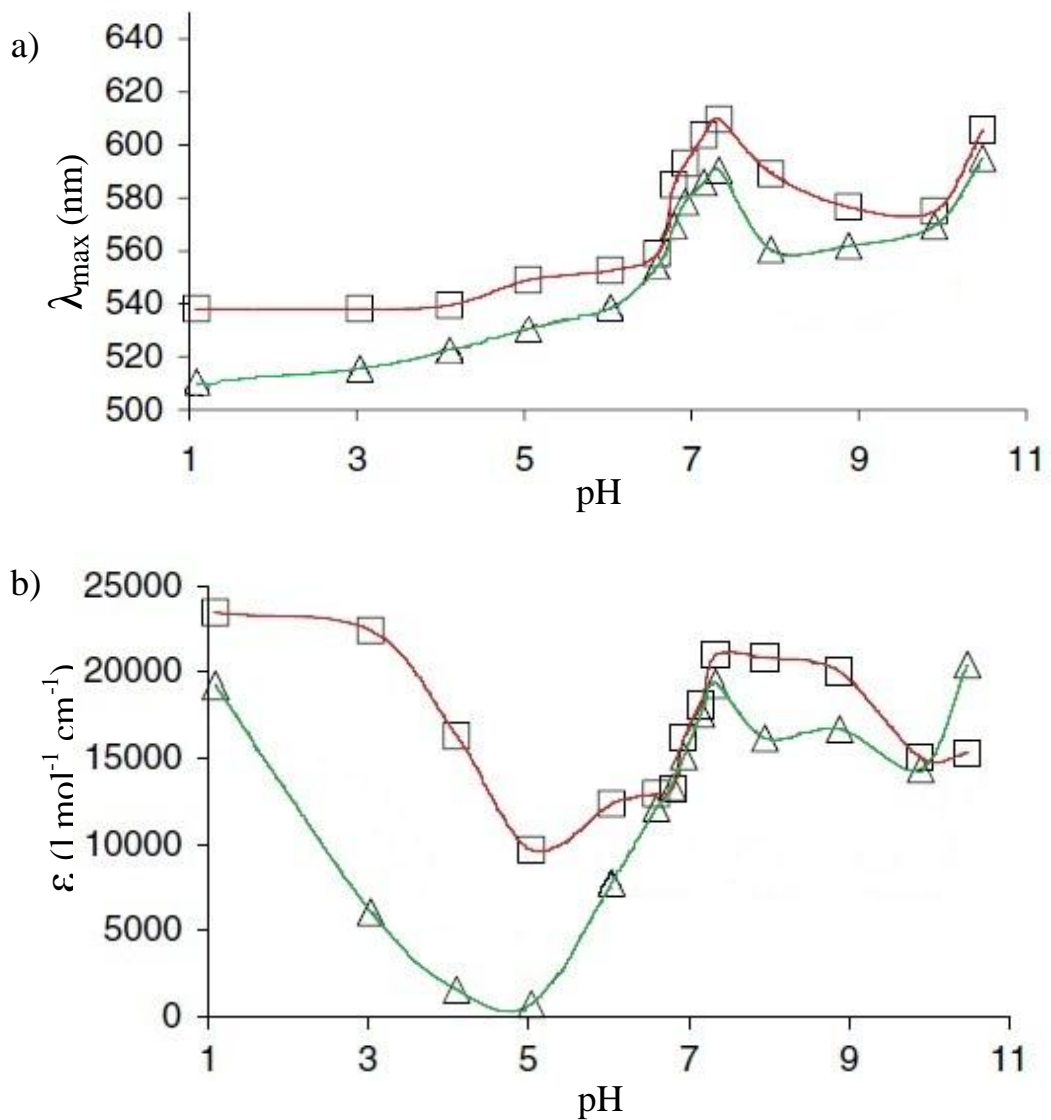
Punakaalille määritetty pK_a -arvo on $6,99 \pm 0,16$. Arvo on määritetty spektrofotometrisesti mittaamalla ensin absorbansseja eri aallonpituuksilla liuoksen pH:n ollessa 5,0 ja 8,0. Kun liuoksen pH on 5, on liuos väriltään punainen, joten antosyaanien muodoista flavylium-kationit ovat enemmistönä. pH:n ollessa 8 liuos on sininen, ja vallitsevina muotoina ovat kinoidiset emäkset tai anionit. Vertaamalla happaman ja emäksisen liuoksen absorbansseja toisiinsa on pystytty selvittämään analyttinen aallonpituus, joka on aallonpituus, jossa absorbanssien ero on suurimmillaan. Analyttiseksi aallonpituudeksi saatiin 612 nm. Tällä aallonpituudella mitattiin 14 happamuudeltaan erilaisen liuoksen (pH 5,2-7,8) absorbanssit, ja näistä pystyttiin laskemaan pK_a -arvot, jotka olivat välillä 6,8-7,2. Yllä mainittu pK_a -arvo on näiden saatujen arvojen keskiarvo.³³

Verrattaessa punakaalin antosyaaneille määritettyjä pK_H - ja pK_a -arvoja huomataan, että pK_H on pienempi kuin pK_a . Jos liuoksen pH on alussa alle 2, kaikki antosyaanit ovat flavylium-kationi -muodossa, ja liuos on väriltään punainen. Nostettaessa pH:ta vähitellen liuoksen väri pysyy edelleen punaisena, mutta se alkaa haalistua, koska liuokseen muodostuu värittömiä karbinoli-pseudoemäksiä. pK_H on 2,69 eli pH:n ollessa noin 3 liuoksen väri on intensiteetiltään puolet alkuperäisestä. Nostettaessa liuoksen pH:ta edelleen väri haalistuu, ja vähitellen lähestyttäessä pH:ta 7 (pK_a 6,99) liuoksen väri alkaa muuttua sinertäväksi kinoidisten emästen ja anionien alkaessa muodostua.

Tilanne on havainnollistettu kuvassa 10, jossa syanidiini-3-(sinapoyyli)(sinapoyyli)diglukosidi-5-glukosidin ($\text{---}\square\text{---}$) ja syanidiini-3-diglukosidi-5-glukosidin ($\text{---}\triangle\text{---}$) absorboiman valon aallonpituus ja absorbanssi on kuvattu pH:n funktiona. Esimerkkinä olevat yhdisteet (Kuva 9.) ovat punakaalissa runsaimmin esiintyviä yhdisteitä. Verrattaessa diasyloidun ja asyloimattoman antosyaanin absorboimia aallonpituuksia toisiinsa huomataan, että diasyloitu antosyaani absorboi koko tutkitulla välillä pH 1,1-10,5 pidempiä aallonpituuksia.³⁴ Lähellä pH-arvoa 7 molemmilla yhdisteillä tapahtuu aallonpituuksissa voimakas kasvu, ja ne saavuttavat korkeimmat λ_{max} -arvonsa pH:ssa 7,3. Tämän jälkeen aallonpituuksissa tapahtuu pientä laskua, ja jälleen pH 9:n jälkeen aallonpituudet alkavat kasvaa. Kuvassa 10 b) absorbanssi on ilmaistu molaarisena absorptiona ϵ , jonka yksikkö on $\text{l}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$. Verrattaessa diasyloidun ja asyloimattoman antosyaanin absorptioita nähdään, että diasyloidun antosyaanin absorbanssi on lähes koko pH-välin korkeampi kuin asyloimattoman. Varsinkin happamissa liuoksissa diasyloidun antosyaanin väriä stabiloivat happoryhmät intramolekulaarisen kopigmentaation kautta. pH-arvon 5 jälkeen yhdisteiden absorbanssit alkavat kasvaa, ja maksimi saavutetaan hieman pH 7:n jälkeen, jolloin antosyaanit esiintyvät pääasiassa kinoidisina emäksinä ja anioneina³⁵.



Kuva 9. Syanidiini-3-(sinapoyyli)(sinapoyyli)diglukosidi-5-glukosidin rakenne. Poistamalla sinappihapporyhmät saadaan syanidiini-3-diglukosidi-5-glukosidin rakenne. esim.³⁴



Kuva 10. Syanidiini-3-(sinapoyyli)(sinapoyyli)diglukosidi-5-glukosidin (\square) ja syanidiini-3-diglukosidi-5-glukosidin (\triangle) a) absorboiman valon aallonpituus pH:n funktiona ja b) molaarinen absorptio pH:n funktiona. Kuva muokattu lähteestä.³⁴

4 Pohdinta

Antosyaaneja hyödynnetään tällä hetkellä lähinnä elintarvikkeiden väriaineina. Ruoat ovat pääasiassa happamia, ja näin ollen tutkimus on keskittynyt hyvin vahvasti antosyaanien happamiin liuoksiin. pH-asteikon happaman ja neutraalin osuuden osalta löytyy hyvin laajasti tietoa värinmuutoksen taustalla olevista tekijöistä sekä väriä stabiloivista mekanismeista. Antosyaanien värinmuutoksia on tutkittu jonkin verran myös emäksisellä puolella, mutta ilmiöiden kemiallista taustaa ei ole tutkittu ja selvitetty samalla tavalla kuin happamissa liuoksissa.

Punakaalia hyödynnetään niin ikään elintarviketeollisuudessa väriaineena eikä niinkään pH-indikaattorina. Tästä syystä punakaalia koskeva tutkimuskirjallisuus ei juurikaan käsittele punakaalia pH-indikaattorin näkökulmasta. Punakaalia hyödynnetään kuitenkin usein pH-indikaattorina kouluopetuksessa, koska se on halpa, turvallinen ja ympäristöystävällinen vaihtoehto. Artikkeleita, jotka käsittelevät puhtaasti punakaalin ominaisuuksia pH-indikaattorina, löytyy vain opetuspuolen julkaisuista.

Punakaalin antosyaaneja on muiden antosyaanien tapaan tutkittu huomattavasti enemmän happamissa liuoksissa. Punakaalin antosyaaneille on määritetty värinmuutoksiin liittyvät pK-arvot happamassa ja neutraalissa liuoksessa tapahtuville muutoksille. Sen sijaan emäksisessä liuoksessa tapahtuvalle värinmuutokselle, eli värin muuttumiselle sinisestä vihreän kautta keltaiseksi, ei ole saatavilla pK-arvoa. Tutkimuskirjallisuudesta ei myöskään ilmene syytä, mistä punakaalin keltainen väri emäksisissä liuoksissa johtuu. Todennäköisesti kalkoni (yksi antosyanidiinin muodoista) ei voi olla värin aiheuttaja, koska usein mainitaan, että kalkoni on väritön tai ainoastaan haaleankeltainen. Esimerkiksi viineistä on eristetty kovalenttisesti sitoutuneiden antosyaanien ja flavanolien muodostamia molekyylejä, jotka ovat väriltään keltaisia.³⁶ Näiden molekyylien muodostuminen kestää kuitenkin useamman päivän, joten tämänkaltainenkaan tapahtuma tuskin on punakaalin keltaisen värin taustalla.

Punakaalin laaja värien kirjo sekä värin säilyminen läpi koko pH-skaalan on ainutlaatuinen ilmiö. Kirjallisuudesta ei kuitenkaan löydy selitystä, mikä tekee juuri punakaalin antosyaaneista poikkeuksellisen stabiileja muihin antosyaaneihin nähden. Samoja antosyaaneja esiintyy luonnossa myös muualla, mutta tällöin ne eivät ilmennä samanlaista stabiiliutta kuin punakaalissa. Syy punakaalin antosyaanien stabiiliuteen täytynee siis olla jokin muu kuin itse antosyaanit. Tutkittavaa antosyaaneihin liittyen on siis vielä paljon, eteenkin antosyaanien emäksisiin liuoksiin ja siellä esiintyviin kemiallisiin ilmiöihin liittyen.

5 Lähteet

1. Juster, N. J. (1962). Color and chemical constitution. *Journal of Chemical Education*, 39(11), 596
2. General introduction to the chemistry of dyes. *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 2010, 99, 55
3. Sähkömagneettinen spektri. Wikipedia:
<http://commons.wikimedia.org/wiki/File:EM_spectrum_fi.svg> 28.8.2012
4. Rest, A. (1982). Polyenes and linearly conjugated dyes teoksessa *Light, chemical change and life: A source book in photochemistry* toim. Coyle, J. D., Hill, R. R., Roberts, D. R., Walton Hall: Open University, s. 33-34
5. Adachi, M., Murata, Y. (1998). Relationship between pi-conjugation size and electronic absorption spectrum: novel pi-conjugation size dependence of indoaniline dyes. *The Journal of Physical Chemistry A*, 102(5), 841-845
6. Griffiths, J. (1982). Man-made colour teoksessa *Light, chemical change and life: A source book in photochemistry* toim. Coyle, J. D., Hill, R. R., Roberts, D. R., Walton Hall: Open University, s. 73
7. Pratt, L. S. (1947). *The chemistry and physics of organic pigments*, 2. painos, New York: John Wiley, s.10-12
8. Ross, E. (2003). Indicator Dyes teoksessa *Industrial Dyes Chemistry, Properties, Applications* toim. Hunger, K. Weinheim: WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, s.526

9. Baker, A. A. (1964). A history of indicators. *Chymia; Annual Studies in the History of Chemistry*, 9, 147.
10. Cooper, D., Doran, C., Chapman, N. B. (1987). *Classical methods vol. 1*, Chichester: Wiley, s. 228-229
11. Kolthoff, I. M., Laitinen, H. A. (1944). *pH and electro titrations*, 2. painos, New York: Wiley, s. 23-24
12. Budevsky, O. (1979). *Foundations of chemical analysis*, Chichester: Ellis Horwood, s. 82-83
13. Chegg <<http://www.chegg.com/homework-help/questions-and-answers/x--i5re-195-choose-indicator-following-titrations-select-apply-note-choose-indicator-chang-q612615>> 3.12.2012
14. Arapitsas, P. (2008). Characterisation of anthocyanins in red cabbage using high resolution liquid chromatography coupled with photodiode array detection and electrospray ionization-linear ion trap mass spectrometry. *Food Chemistry*, 109(1), 219
15. McDougall, G. J., Fyffe, S., Dobson, P., Stewart, D. (2007). Anthocyanins from red cabbage - stability to simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry*, 68(9), 1285
16. Wu, X. (2005). Identification and characterization of anthocyanins by high-performance liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry in common foods in the united states: Vegetables, nuts, and grains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(8), 3101
17. Mazza, G., Brouillard, R. (1987). Recent developments in the stabilization of anthocyanins in food products. *Food Chemistry*, 25(3), 207
18. Castaneda-Ovando, A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113(4), 859
19. Umami, K. I. (2011). The effect of pH on color behavior of brassica oleracea anthocyanin. *Journal of Applied Sciences*, 11(13), 2406
20. Yoshida, K. K. (2009). Blue flower color development by anthocyanins: From chemical structure to cell physiology. *Natural Product Reports*, 26(7), 884
21. Gordillo, B. (2012). Comprehensive colorimetric study of anthocyanic copigmentation in model solutions: effects of pH and molar ratio. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(11), 2896
22. Dangles, O. (1993). Kinetic and thermodynamic control of flavylum hydration in the pelargonidin-cinnamic acid. *Journal of the American Chemical Society*, 115(8), 3125

23. Goto, T. (1987). Structure, stability and color variation of natural anthocyanins. *Fortschritte Der Chemie Organischer Naturstoffe / Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*, 52, 113
24. Brouillard, R., Wigand, M. C., Dangles, O., Cheminat, A. (1991). pH and solvent effects on the copigmentation reaction of malvin with polyphenols, purine and pyrimidine derivatives. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*, (8), 1235
25. Bridle, P., Timberlake, C. F. (1997). Anthocyanins as natural food colours - selected aspects. *Food Chemistry*, 58(1-2), 103
26. Stintzing, F. C. (2002). Color and antioxidant properties of cyanidin-based anthocyanin pigments. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*., 50(21), 6172
27. Di Meo, F. (2012). Highlights on anthocyanin pigmentation and copigmentation: A matter of flavonoid π -stacking complexation to be described by DFT-D. *Journal of Chemical Theory and Computation* 8(6), 2034
28. Gonzalez-Manzano, S. (2008). Colour implications of self-association processes of wine anthocyanins. *European Food Research & Technology*, 226(3), 483
29. Dyrby, M., Westergaard, N., Stapelfeldt, H. (2001). Light and heat sensitivity of red cabbage extract in soft drink model systems. *Food Chemistry*, 72(4), 431
30. Forster, M. (1978). High school forum: Plant pigments as acid-base indicators - an exercise for the junior high school. *Journal of Chemical Education*, 55(2), 107
31. Malien-Aubert, C., Dangles, O., Amiot, M. J. (2001). Color stability of commercial anthocyanin-based extracts in relation to the phenolic composition. Protective effects by intra- and intermolecular copigmentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(1), 170
32. Charron, C. S. (2007). Effect of dose size on bioavailability of acylated and nonacylated anthocyanins from red cabbage (*brassica oleracea* L. var. *capitata*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*., 55(13), 5354
33. Chigurupati, N. (2002). Evaluation of red cabbage dye as a potential natural color for pharmaceutical use. *International Journal of Pharmaceutics*, 241(2), 293
34. Torskangerpoll, K. (2005). Colour stability of anthocyanins in aqueous solutions at various pH values. *Food Chemistry*, 89(3), 427
35. Cabrita, L., Fossen, T., Andersen, O. M. (2000). Colour and stability of the six common anthocyanidin 3-glucosides in aqueous solutions. *Food Chemistry*, 68(1), 101

36. Remy, S., Fulcrand, H., Labarbe, B., Cheynier, V., Moutounet, M. (2000). First confirmation in red wine of products resulting from direct anthocyanin-tannin reactions. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 80(6), 745