

Kasviväriaineet elintarvikkeissa

Helsingin yliopisto
Matemaattis-luonnontieteellinen tiedekunta
Kemian laitos
Kemian opettajankoulutusyksikkö
Kandidaatintutkielma

Tekijä: Milja Helenius
Pvm. 31.8.2013

Ohjaajat:
Anu Hopia
Maija Aksela

Sisällysluettelo

| | |
|--|----|
| 1 Johdanto | 1 |
| 2 Värin kemiallinen synty | 2 |
| 2.1 Silmän aistinsolut | 2 |
| 2.2 Näköaistimuksen synty | 2 |
| 3 Kasvien väriaineista | 4 |
| 3.1 Yleistä kasviväriaineista | 4 |
| 3.2 Klorofyllit | 5 |
| 3.3 Karotenoidit | 8 |
| 3.4 Antosyaanit | 11 |
| 4 Väriaineiden eristäminen ja karakterisointi | 16 |
| 4.1 Yleistä kasviväriaineiden eristämisestä | 16 |
| 4.2 Kasviväriaineiden liukoisuus | 16 |
| 4.3 Kasviväriaineiden karakterisointi | 17 |
| 5 Yhteenveto | 20 |
| Lähteet | 21 |

Lyhenneluettelo

DNA = deoksiribonukleiinihappo

p = para

HPLC = korkean erotuskyvyn nestekromatografia

RP-HPLC = korkean erotuskyvyn nestekromatografia käänteisfaasimenetelmällä

UV = ultravioletti

nm = nanometri

1 Johdanto

Kasvikset ja hedelmät ovat luonnostaan värikkäitä, sillä ne sisältävät molekyylejä, jotka heijastavat tai emittoivat sähkömagneettista säteilyä sellaisilla aallonpituuksilla, jotka ihmissilmä näkee. Myös erilaisiin teollisiin elintarvikkeisiin lisätään väriaineita, jotta ruoka näyttäisi houkuttelevammalta.

Väri onkin ihmisen mielestä yksi ruoan tärkeimmistä ominaisuuksista, sillä jos ruoka ei näytä hyvältä, sitä ei haluta ostaa tai syödä, vaikka se olisi ravitsemuksellisesti erinomaista. Ruoan väri yhdistetään myös laatuun ja ominaisuuksiin: punaista lihaa pidetään tuoreena ja vihreitä omenoita raakoina. Ruoan värejä ei kuitenkaan voida pitää pelkästään kosmeettisina ominaisuuksina, sillä useiden luonnollisten värimolekyylien on todettu toimivan antioksidanteina ja vaikuttavan siten positiivisesti ihmisten terveyteen.¹

Ruoan väriaineet ovat ajankohtaisia juuri nyt, sillä ruoanlaittoon panostaminen, luonnollisuuteen pyrkiminen ja keinotekkoisten lisäaineiden välttäminen näyttäisi olevan nykyään yhä suosittumpaa.

Käsittelen kandidaatin tutkielmassani luonnollisia ja luonnollisen kaltaisia väriaineita: värin kemiallista syntyä, kasvien erilaisia värimolekyylejä sekä väriaineiden eristämistä ja karakterisointia. Värin kemiallista syntyä tarkastellaan kappaleessa kaksi sekä silmän aistinsolujen toiminnan, että fotonien aiheuttamien kemiallisten reaktioiden kautta.

Tarkasteltaviksi yhdisteryhmiksi valitsin klorofyllit, karotenoidit ja antosyaanit, koska ne ovat luonnossa esiintyvistä väriaineista selvästi yleisimpiä. Värimolekyylien kemiallisten rakenteiden lisäksi kappaleessa kolme käsitellään väriaineiden nimeämistä, niiden merkitystä kasveille ja ihmisille, niiden käyttöä elintarvikelisiä aineina sekä värien pysyvyyttä erilaisissa olosuhteissa.

Kappaleessa neljä keskitytään väriaineiden eristämiseen ja karakterisointiin. Käsittelemäni väriaineryhmät eroavat toisistaan erilaisten ominaisuuksiensa, kuten vesi- tai rasvaliukoisuuden ja poolisuuden tai poolittomuuden perusteella. Eri väriainemolekyylit voidaan erotella ja tunnistaa hyvin tarkasti esimerkiksi korkean erotuskyvyn nestekromatografian avulla.

2 Värin kemiallinen synty

2.1 Silmän aistinsolut

Silmän sarveiskalvo ja mykiö kohdistavat ympäristöstä heijastuvan valon silmämunan seinämän sisimpään kerrokseen, verkkokalvoon eli retinaan, joka muodostuu neuron- ja fotoreseptorikerroksista. Fotoreseptorit aistivat valoa ja silmän takaosasta lähtevä näköhermo välittää tiedon aistimuksesta aivoihin, jotka tulkitsevat saamansa tiedon, jolloin tapahtuu näköaistimus. Valoa aistivat solut siis sijaitsevat silmässä, mutta varsinainen näköaistimus tapahtuu aivoissa.²

Fotoreseptoreja eli silmän valoa aistivia soluja on kahdenlaisia, sauvasoluja ja tappisoluja. Sauvat, joita on ihmisen verkkokalvolla keskimäärin 125 miljoonaa, eivät aisti värejä, mutta ne ovat erittäin valoherkkiä ja aistivat siten myös hämärässä. Tapit, joita on keskimäärin 6 miljoonaa, mahdollistavat värien näkemisen, mutta huonomman valoherkkyytensä vuoksi ne eivät aisti hämärässä. Tappeja on kolmea eri tyyppiä, joista kukin on erikoistunut näkyvän valon eri aallonpituuksille eli joko punaiselle, vihreällä tai siniselle aallonpituusalueelle.³

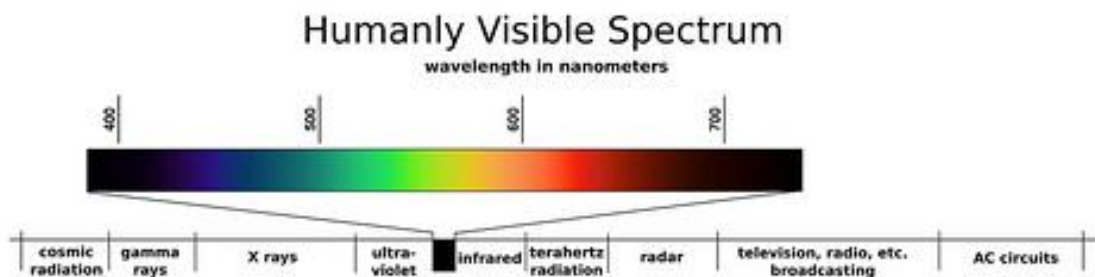
Sekä sauvasolut että tappisolut koostuvat kolmesta osasta: sisäjäsenestä, ulkojäsenestä ja synaptisesta terminaalista. Ulkojäsen muodostuu levymäisistä kalvopusseista, joiden sisällä on reseptorimolekyylejä eli näköpigmenttiä. Näköpigmentit sisältävät valoa absorboivaa retinaalia, joka on A-vitamiinijohdannainen, sekä siihen sitoutunutta, kullekin fotoreseptorityypille ominaista opsiini-proteiinia. Sauvojen näköpigmentti on rodopsiini eli näköpurppura, joka muodostuu, kun yksi opsiinimolekyylillä ja yksi retinaalimolekyylillä sitoutuvat toisiinsa. Kullakin eri väriin erikoistuneella tapilla on oma fotopsiini-näköpigmenttinsä, joka muodostuu, kun yksi retinaalimolekyylillä sitoutuu kolmeen erilaiseen opsiinimolekyylin. Pienet erot opsiinimolekyylin rakenteessa mahdollistavat sen, että kukin tappilaji absorboi valoa omalla aallonpituusalueellaan.³

2.2 Näköaistimuksen synty

Valo on se sähkömagneettisen säteilyn spektrin osa, jonka ihmissilmä näkee. Näkyvän valon aallonpituus on noin 400-700 nanometriä, ja se on lähtöisin jostakin valonlähteestä, kuten

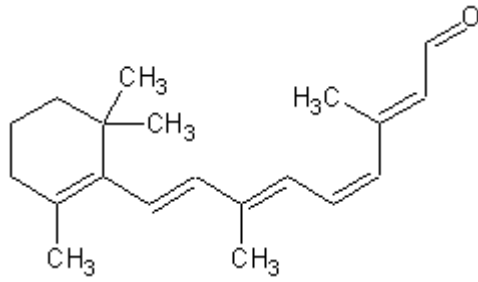
lampusta. Eri aallonpituusalueet vastaavat eri värejä niin, että aallonpituudet 380-450 nm nähdään violetina, 450-490 nm sinisenä, 490-560 nm vihreänä, 560-590 nm keltaisena, 590-630 oranssina ja 630-760 punaisena.⁴

Muut esineet näkyvät, kun ne heijastavat valonlähteestä tulevaa valoa. Se, minkä värisiltä esineet näyttävät, riippuu siitä, mitä aallonpituuksia ne heijastavat ja mitä absorboivat. Sininen esine absorboi eniten pitkiä aallonpituuksia ja heijastaa lyhyitä, sinisenä nähtäviä aallonpituuksia. Jos esine heijastaa kaikkia aallonpituuksia, se on valkoinen, ja se absorboi kaikki aallonpituudet, se on musta.⁵

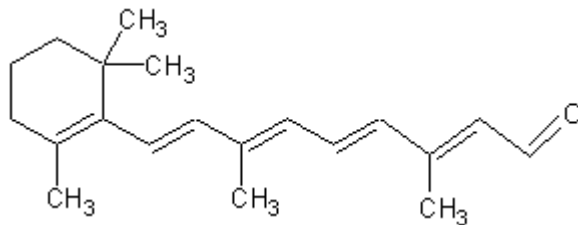


Kuva 1. Näkyvän valon spektri.⁶

Kun valo absorboituu näköpigmenttimolekyyliin, sen sisältämän retinaalin rakenne muuttuu cis-muodosta trans-muotoon ja molekyyli suoristuu. Opsiini ja retinaali irtoavat toisistaan. Konfiguraation muutos saa rodopsiinin aktivoitumaan, jolloin käynnistyy entsyymaattinen ketjureaktio, joka aikaansaa natriumkanavien sulkeutumisen. Kun natrium ei pääse sisälle fotoreseptorisoluihin, solut hyperpolarisoituvat ja tieto siitä kulkee välineuroneiden kautta gangliosoluihin, joiden aksonit muodostavat näköhermon. Pimeässä entsyymit palauttavat retinaalin takaisin cis-muotoon, jolloin opsiini ja rodopsiini yhdistyvät uudestaan ja muodostavat rodopsiinimolekyylin. Entsyymaattisen ketjureaktion seurauksena natriumkanavat avautuvat taas ja solu depolarisoituu.³



Kuva 2. Retinaalin *cis*-isomeeri.^{Esim. 3}



Kuva 3. Retinaalin *trans*-isomeeri.^{Esim. 3}

3 Kasvien väriaineista

3.1 Yleistä kasviväriaineista

Kasvikset ja hedelmät ovat luonnostaan värikkäitä, sillä ne sisältävät molekyylejä, jotka heijastavat tai emittoivat sähkömagneettista säteilyä sellaisilla aallonpituuksilla, jotka ihmissilmä näkee. Väri onkin ihmisen mielestä yksi ruoan tärkeimmistä ominaisuuksista, sillä jos ruoka ei näytä hyvältä, sitä ei haluta ostaa tai syödä, vaikka se olisi ravitsemuksellisesti erinomaista. Ruoan väri yhdistetään myös laatuun ja ominaisuuksiin: punaista lihaa pidetään tuoreena ja vihreitä omenoita raakoina.¹

Monet ruoan väripigmentit ovat kuitenkin niin epästabileja, että ne eivät kestä prosessointia ja säilytystä. Värin muuttumista on usein vaikea estää, mutta siihen voidaan värimolekyylistä riippuen vaikuttaa säätelemällä valon ja hapen määrää, lämpötilaa, veden aktiivisuutta ja

pH:ta, sekä raskasmetallien, hapettimien ja pelkistimien läsnäoloa¹. Värimolekyylien pysymättömyyden vuoksi erilaisiin teollisiin elintarvikkeisiin lisätään usein luonnollisia tai synteettisiä väriaineita, jotta ruoka näyttäisi houkuttelevammalta.

Ruoan väriaineet voidaan jaotella neljään eri luokkaan niiden alkuperän mukaan. Luonnolliset värit saadaan joko suoraan luonnosta löytyvistä elävistä organismeista tai muokkaamalla elävistä organismeista saatuja aineita, esimerkiksi korvaamalla osa klorofyllin sisältämästä magnesiumista kuparilla. Luonnollisen kaltaiset väriaineet ovat ihmisen valmistamia pigmenttejä, jotka ovat rakenteeltaan samanlaisia kuin luonnosta löytyvät molekyylit, kun taas synteettiset väriaineet ovat ihmisen kehittämiä molekyylejä, joita ei esiinny lainkaan luonnossa. Epäorgaaniset värit voivat olla epäorgaanisia molekyylejä tai yksittäisiä atomeja.⁷

Elintarviketurvallisuusvirasto Evira määrittelee väriaineet seuraavalla tavalla: ”Väriaineet ovat aineita, jotka lisäävät tai antavat uudelleen väriä elintarvikkeeseen; kyseessä voivat olla elintarvikkeen omat luontaiset ainesosat tai muista luontaisista lähteistä olevat aineet, joita ei tavanomaisesti sellaisenaan käytetä elintarvikkeina ja joita ei tavanomaisesti käytetä elintarvikkeille ominaisina ainesosina”⁸.

Mikäli väriaine ei ole elintarvikkeen luontainen ainesosa, on kyseessä lisäaine. Kaikkien elintarvikelisiäineiden, sekä luonnollisten että synteettisten, turvallisuus on arvioitu ennen, kuin ne on hyväksytty elintarvikekäyttöön. Elintarvikelisiäineiden käyttöä määrätään lainsäädännössä, ja niiden käytöstä elintarvikkeissa on aina ilmoitettava pakkausmerkinnöissä⁹. Väriaineet merkitään elintarvikkeen ainesosaluetteloon ryhmänimellä väriaineet sekä lisäaineen nimellä tai numerotunnuksella eli E-koodilla¹⁰.

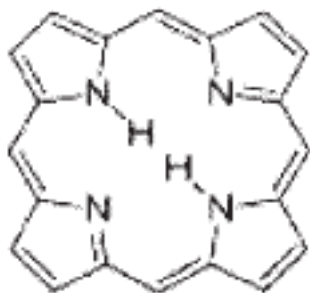
Tärkeimpiä luonnollisia väriaineita ovat tetrapyrrolit, joihin klorofyllit kuuluvat, tetraterpenoidit, joihin karotenoidit kuuluvat sekä flavonoidit, joihin antosyaanit kuuluvat.⁷

3.2 Klorofyllit

Klorofyllit ovat vihreiden kasvien, levien ja fotosynteesiin kykenevien bakteerien kloroplasteissa esiintyviä vesiliukoisia, valoa kerääviä pigmenttejä, joita kasvit tarvitsevat yhteyttämiseen¹¹. Ne imevät valon punaisena, sinisenä ja violetina aistittavia aallonpituuksia,

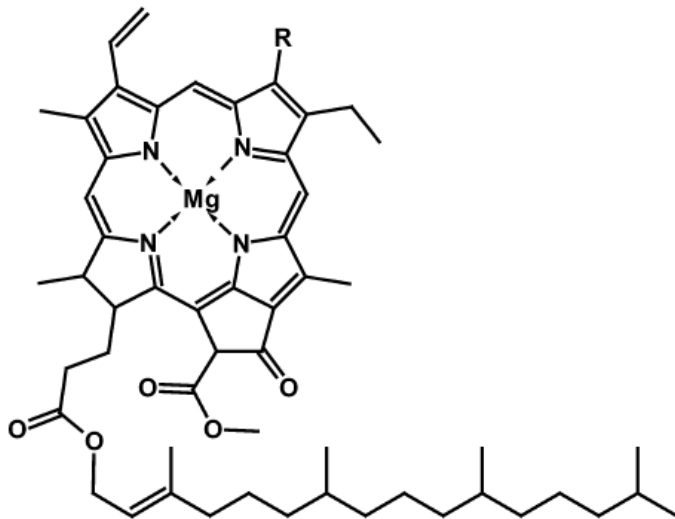
koska nämä aallonpituudet pystyvät virittämään niiden elektroneja korkeammalle energiatasolle ja ovat täten fotosynteesin kannalta tehokkaimpia⁵. Koska vihreän valon aallonpituudet ovat fotosynteesin kannalta tehottomimpia, klorofylli heijastaa ne pois, mikä saa kasvin näyttämään vihreältä⁵. Sana klorofylli tulee kreikankielisistä sanoista khlōros eli vihreä ja phullon eli lehti¹².

Rakenteeltaan klorofyllit ovat porfiinijohdannaisia magnesiumkompekseja. Monitydyttymätön porfiini muodostuu neljästä pyrrolirenkaasta, jotka yhdistyvät toisiinsa hiiliatomien välityksellä. Substituoituja porfiineja kutsutaan porfyriineiksi, joihin myös klorofyllit luokitellaan. Kaikkien klorofyllien perusrakenteena voidaan pitää phorbiinia, joka muodostuu, kun porfiiniin liittyy viides hiilirengas.¹¹



Kuva 4. Porfiinimolekyylä.¹³

Luonnossa esiintyy muutamia erilaisia klorofyllejä, jotka voidaan erottaa toisistaan rakenteensa perusteella. Klorofylli *a* ($C_{55}H_{72}MgN_4O_5$) ja klorofylli *b* ($C_{55}H_{70}MgN_4O_6$) muodostuvat phorbiinirungosta, jonka 2. hiileen on liittynyt vinyyliryhmä ($-CH=CH_2$), 4. hiileen etyyliryhmä ($-CH_2CH_3$), 10. hiileen karbometoksiryhmä ($-CO_2CH_3$) ja 7. hiileen propionaattiin ($-CH_2CH_2CO_2-$) esteröitynyt fytoliryhmä eli 20-hiilinen isoprenoidialkoholi¹¹. Klorofylli *a* ja klorofylli *b* kuitenkin eroavat toisistaan siten, että phorbiinirungon 3. hiileen on sitoutunut erilainen substituentti: klorofylli *a*:lla metyyliiryhmä ($-CH_3$) ja klorofylli *b*:llä formyyliryhmä ($-CHO$)¹¹. Tämän pienen rakenteellisen eron vuoksi ne absorboivat valoa osittain eri aallonpituuksilla, minkä seurauksena klorofylli *a* näyttää sinivihreältä ja klorofylli *b* oliivinvihreältä⁵. Klorofylli *b*:tä pidetäänkin klorofylli *a*:n apupigmenttinä, sillä niiden erilaiset absorptiospektrit mahdollistavat yhdessä laajemman spektrin hyödyntämisen fotosynteesiin⁵.



Kuva 5. Klorofylli α ($R = \text{CH}_3$) ja klorofylli β ($R = \text{CHO}$).⁷

Noin $\frac{3}{4}$ vihreiden kasvien klorofylleistä on klorofylli a :ta ja noin $\frac{1}{4}$ klorofylli b :tä. Niiden lisäksi tunnetaan muitakin klorofyllejä, kuten klorofylli c , jota merilevät, panssarisiimalevät ja piilevät sisältävät klorofylli a :n lisäksi, klorofylli d , jota punalevät sisältävät klorofylli a :n lisäksi sekä bakteerien klorofyllit ja erilaiset klorofyllijohdannaiset.¹¹

Klorofyllit ovat melko herkkiä muuttamaan väriään ja rakennetaan kuumennuksen, entsyymien ja happamuuden vaikutuksesta¹¹. Klorofyllimolekyylin keskellä sijaitseva magnesiumatomi korvautuu herkästi kahdella vetyionilla, jolloin syntyy oliivinviruskea feofytiinimolekyylillä¹¹. Yleensä karotenoidit ja muut lipidit suojaavat klorofyllejä valon vaikutukselta fotosynteesin aikana, mutta mikäli solu on vahingoittunut, myös valo voi hajottaa klorofyllimolekyylejä palautumattomasti¹¹. Tämän vuoksi elintarviketeollisuus onkin keskittynyt kehittämään paremmin värinsä säilyttäviä molekyylejä, joita ovat klorofyllijohdannaiset eli klorofylliinit sekä metallikompleksit.¹¹ Klorofylliinit syntyvät, kun seitsemännessä hiilessä oleva fytyyliesteri hydrolysoituu¹⁴ ja jäljelle jää propionihappo.

Euroopan unionin alueella sallittuja väriaineita ovat klorofyllit ja klorofylliinit (E140) sekä klorofylli- ja klorofylliinikuparikompleksit (E141), jotka valmistetaan korvaamalla osa magnesiumista kuparilla, joka stabiloi värin. Näitä väriaineita saa Elintarviketurvallisuusvirasto Eviran mukaan käyttää muun muassa juomiin, jälkiruokiin, jäätelöön, hilloihin, makeisiin ja kahvileipiin.¹⁵

3.3 Karotenoidit

Karotenoidit ovat kasvien, hedelmien ja levien kloroplasteissa esiintyviä rasvaliukoisia pigmenttejä, joita kasvit tarvitsevat valolta suojautumiseen ja fotosynteesin avuksi. Ne näyttävät keltaisilta tai oransseilta, sillä ne absorboivat valon violettina ja sini-vihreänä nähtävät aallonpituudet ja heijastavat keltaisena ja oranssina nähtävät aallonpituudet. Ne eivät kuitenkaan usein näy vihreissä kasveissa muulloin kuin syksyllä ruska-aikaan, sillä hallitsevammat klorofyllipigmentit peittävät ne alleen.¹⁶

Klorofylliä sisältävissä kasveissa karotenoidien yhtenä tehtävänä on toimia klorofylli *a*:n apupigmenttinä valon keräämisessä, mahdollistaen näin laajemman spektrin hyödyntämisen fotosynteesiin⁵. Toinen karotenoidien tärkeä tehtävä on valolta suojeleminen, sillä valon vaikutuksesta hapestä muodostuu soluille haitallisia, reaktiivisia radikaalimuotoja, joita karotenoidit passivoivat¹⁶. Kaksoissidoksellisen rakenteensa ansiosta karotenoidit suojaavat muita yhdisteitä vapaiden radikaalien aiheuttamalta hapettumiselta¹⁷ eli ne toimivat antioksidanteina. Radikaalimuotojen parittomat elektronit delokalisoituvat karotenoidien konjugoituneisiin kaksoissidoksiin¹⁷, jolloin syntyy pysyvämpi rakenne.

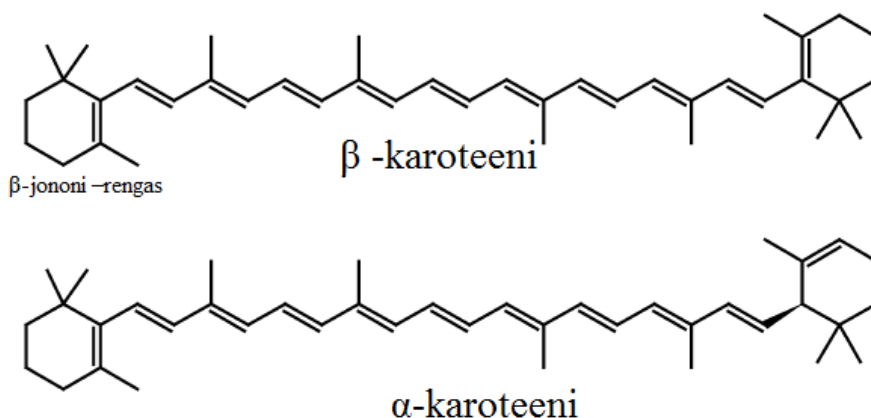
Kasvit voivat syntetisoida kaikki tarvitsemansa karotenoidit itse, mutta ihmisten ja muiden eläinten on saatava niitä ravinnostaan⁵. Ihmisen kannalta onkin tärkeää, että osa karotenoideista kykenee toimimaan A-vitamiinin esiasteina. Beetakaroteeni on tehokkain A-vitamiinin esiaste, koska sillä on kaksi β -jononi –rengasta, mutta myös muut tämän rakenteen omaavat karotenoidit, kuten α -karoteeni ja β -kryptoksantiini, voivat toimia A-vitamiinin esiasteina¹⁶.

Rakenteeltaan karotenoidit ovat symmetrisiä, 40-hiilisiä polyisoprenoideja. Niiden hiiliketjussa on useita kaksoissidoksia ja joillakin karotenoideilla on hiiliketjun päissä

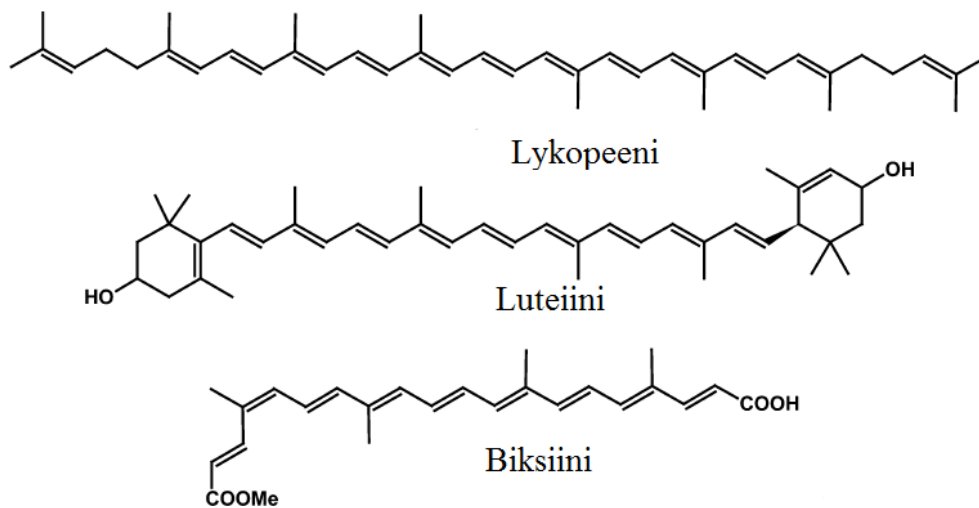
rengsrakenteita. Joillakin karotenoideilla, kuten biksiinillä, on lyhyempi hiiliketju, jolloin niitä kutsutaan apo-karotenaaleiksi. Karotenoidit jaotellaan rakenteensa perusteella kahteen ryhmään, karoteeneihin ja ksantofylleihin. Karoteenit sisältävät vain hiiltä ja vetyä, kun taas ksantofyllien rakenteessa on ainakin yksi happea sisältävä ryhmä, kuten hydroksyyli-, epoksi-, aldehydi- tai ketoryhmä.¹⁶

Karotenoidit ovat saaneet nimensä porkkanan latinankielisestä nimestä *Daucus carota*, kun taas ksantofylli-nimi on johdettu kreikan sanoista *kítrinos* eli keltainen ja *phullon* eli lehti.⁷

Syötävät kasvit, kuten punaiset, keltaiset ja oranssit hedelmät, juurekset sekä vihannekset sisältävät runsaasti erilaisia karotenoideja¹⁶. Kaiken kaikkiaan luonnosta löytyy yli 600 erilaista karotenoidia¹⁸. Yleisin kasveista löytyvä karotenoidi on beetakaroteeni ($C_{40}H_{56}$), jota käytetään laajalti myös elintarvikeväriinä. Muita yleisiä karotenoideja ovat esimerkiksi tomaatin sisältämä lykopeeni ($C_{40}H_{56}$), porkkanan sisältämä alfakaroteeni ($C_{40}H_{56}$), paprikan sisältämä kapsantiini ($C_{40}H_{56}O_3$), maissin, kehäkukan ja vihreiden lehtien sisältämä luteiini ($C_{40}H_{56}O_2$), maissin ja sahramin sisältämä zeaksantiini ($C_{40}H_{56}O_2$), maissin sisältämä beetakryptoksantiini ($C_{40}H_{56}O$), vihreiden lehtien sisältämä neoksantiini ($C_{40}H_{56}O_4$) ja violaksantiini ($C_{40}H_{56}O_4$) sekä annaton siementen sisältämä biksiini ($C_{25}H_{30}O_4$). Eri karotenoidien värit vaihtelevat rakenteen mukaan keltaisesta oranssiin ja punaiseen, mutta biksiini on lyhin mahdollinen värillinen karotenoidi. Kasvin kypsyys vaikuttaa usein huomattavasti sen karoteenipitoisuuteen.¹⁶



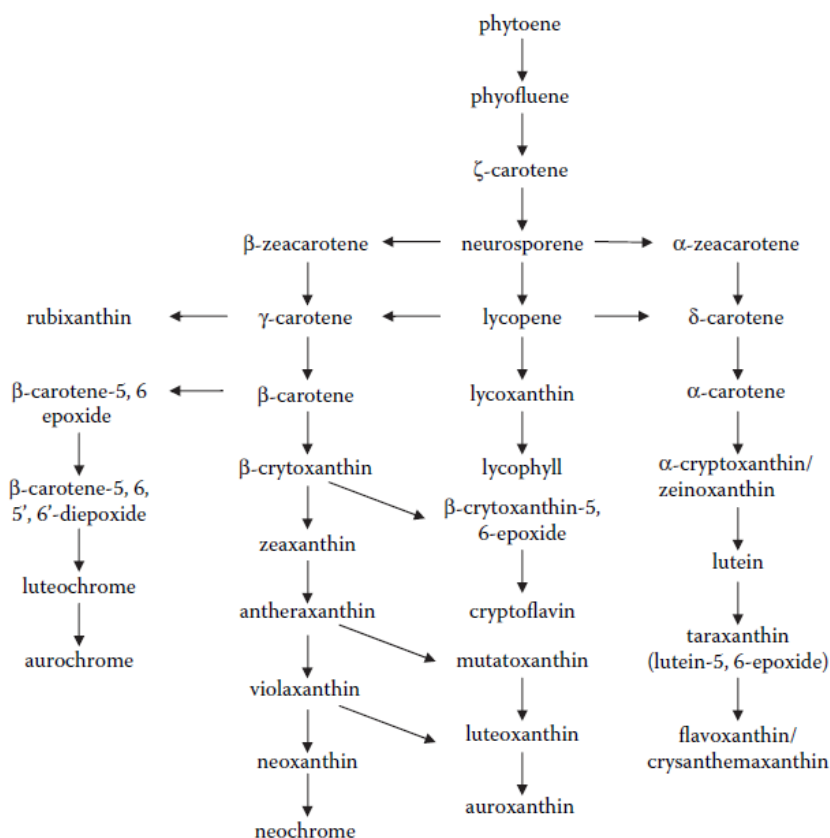
Kuva 6. Beetakaroteeni ja alfakaroteeni.⁷



Kuva 7. Lykopeeni, luteiini ja biksiini.⁷

Karotenoidien konjugoidut kaksoissidokset ovat yleensä trans-muodossa, mutta esimerkiksi lämpökäsittely, orgaanisille liuottimille altistaminen, hapolla käsitteleminen tai valolle altistaminen aiheuttaa helposti isomeroitumisreaktion. Cis-isomeerit eivät juuri poikkea väritään trans-isomeereistä, mutta ne toimivat huomattavasti huonommin A -vitamiinin esiasteina. Karotenoidit sisältävät suuren määrän kaksoissidoksia, joten niistä voi muodostua hyvin paljon erilaisia geometrisiä isomeerejä. Kova kuumennus voi aiheuttaa myös karotenoidimolekyylien hajoamista, jolloin muodostuu herkästi haihtuvia yhdisteitä. Sen sijaan säilyttämistä karotenoidit kestävät hyvin.¹⁶

Karotenoidien biosynteesissä syntyy erilaisten kemiallisten reaktioiden, kuten hapettumisen, dehydrogenaation sekä renkaanmuodostuksen ansiosta suuri määrä erilaisia karotenoideja.¹⁹



Kuva 8. Karotenoidien biosynteesireitti.¹⁹

Euroopan unionin alueella sallittuja väriaineita ovat karotenoidit (E160a), Annatto, biksiini ja norbiksiini (E160b), paprikauute, kapsantiini ja kapsorubiini (E160c), lykopeeni (E160d), beta-apo-8'-karotenaali C30 (E160e), luteoliini ja luteiini (E161b) sekä kantaksantiini (E161g). Kantaksantiini on väriltään oranssinpunainen ja sen käyttö on sallittua vain yhteen ranskalaiseen makkaralajiin, kun taas muut ovat kelta-oransseja ja niitä saa käyttää muun muassa jälkiruokiin, kahvileipiin ja jäätelöön.¹⁵

3.4 Antosyaanit

Antosyaanit ovat flavonoideihin luokiteltavia, kasvikudoksissa esiintyviä vesiliukoisia pigmenttejä, joita on tunnistettu jo yli 600 erilaista²⁰. Erityisen runsaasti niitä on punakaalissa, punasipulissa ja munakoisossa sekä marjoissa, kuten mustikassa, villissä pensasmustikassa, mustaherukassa, puolukassa, aroniassa ja karpalossa²¹. Ne näyttävät sinisiltä, punaisilta ja

violeteilta²², sillä ne absorboivat valon keltaisena ja vihreänä nähtävät aallonpituudet ja heijastavat pois muut aallonpituudet.

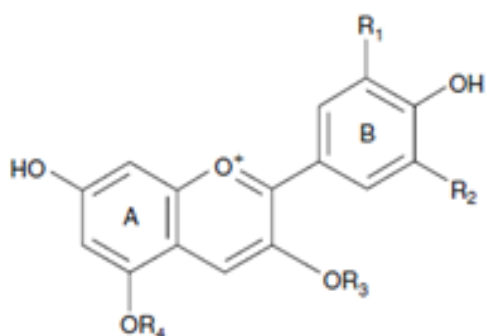
Nimensä antosyaanit ovat saaneet kreikan kielen sanoista anthos eli kukka ja kyanos eli sininen²³. Sen lisäksi, että antosyaanit toimivat kasvien väripigmenteinä, ne myös suojaavat kasveja auringon ultraviolettiäilyltä²⁴.

Vihanneksia, hedelmiä ja punaviiniä nauttivat ihmiset saavat ravinnostaan jopa 200 milligrammaa antosyaaneja päivässä²². Antosyaanien mahdolliset terveysvaikutukset ovat jatkuvasti tutkijoiden kiinnostuksen kohteena, sillä antosyaaneilla saattaa olla antioksidanttivaikutuksia, ja niillä on tutkitusti positiivinen vaikutus verisuonten seinämiin²¹. Niiden on tutkittu myös muun muassa estävän DNA:n vaurioitumista koeputkiolosuhteissa sekä vähentävän tulehdusvasteita²².

Antosyaanien perusrunko muodostuu flavylium-kationista, jossa on sivuryhminä joko vetyjä (-H), hydroksidiryhmiä (-OH) tai metoksyyliryhmiä (-OCH₃)²⁰. Antosyaanit esiintyvät luonnossa glycosideina²⁵. Sokeriosa eli glykoni on liittynyt toiseen osaan eli aglykoniin glykosididoksella²⁰. Kun antosyaaneja hydrolysoidaan, glykosyyliryhmä korvautuu vetyatomilla, ja muodostuu aglykoneja, joita kutsutaan antosyanidiineiksi²⁰. Ne ovat vähemmän vesiliukoisia kuin vastaavat antosyaanit, joten niitä ei esiinny luonnossa vapaana²⁰.

Antosyaanit eroavat toisistaan hydroksyyli- ja metoksyyliryhmien määrän, molekyyliin liittyneiden sokereiden lajin, määrän ja liittymiskohtien, sekä sokereihin liittyneiden alifaattisten tai aromaattisten happojen lajin ja määrän mukaan. Yleisimpiä antosyaaneissa olevia sokereita ovat glukoosi, galaktoosi, arabinoosi ja ksyloosi sekä edellä mainittujen muodostamat di- ja trisakkaridit. Hapoista yleisimpiä ovat kahvi-, *p*-kumariini-, sinappi-, *p*-hydroksibentsoe-, ferula-, maloni-, omena-, meripihka- ja etikkahapot.²⁰

Yleisimpiä ruoissa esiintyviä antosyanidiinejä ovat syanidiini, delfinidiini, peonidiini, petunidiini, malvinidiini sekä pelargonidiini²⁰. Esimerkiksi mustikasta, *Vaccinium myrtillus*, on löydetty viisitoista erilaista antosyaania, joiden aglykoniosana on joko syanidiini, delfinidiini, petunidiini, peonidiini tai malvinidiini ja glykoniosana glukoosi, galaktoosi tai arabinoosi²¹.



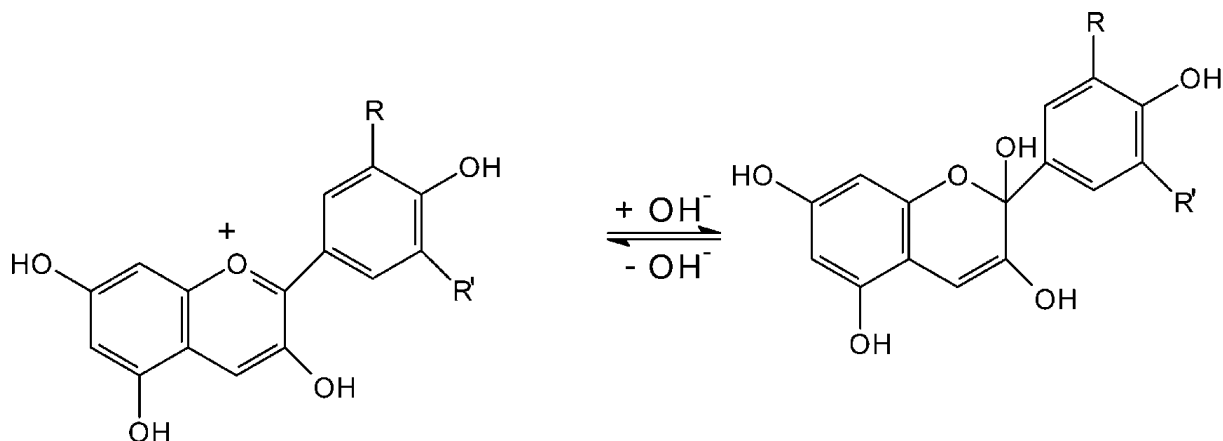
Kuva 9. Flavylum-kationi. Syanidiinillä R1 = OH; R2, R3, R4 = H. Delfinidiinillä R1, R2 = OH, R3, R4 = H. Peonidiinilla R1 = OCH₃; R2, R3, R4 = H. Petunidiinilla R1 = OCH₃; R2 = OH; R3, R4 = H. Malvinidiinilla R1, R2 = OCH₃; R3, R4 = H. Pelargonidiinilla R1, R2, R3, R4 = H.²¹

Antosyaanien ja antosyanidiinien väri johtuu näkyvän valon aiheuttamasta molekyylien virittymisestä. Antosyaanit ja antosyanidiinit sisältävät runsaasti konjugoituneita kaksoissidoksia, joten ne virittyvät helposti, sillä molekyylien virittymisen helppous riippuu elektronien liikkuvuudesta molekyylissä²⁰. Mitä substituoidumpi molekyyli on, sitä syvempi värisävy on²⁰. Tämä johtuu batokromisesta siirtymästä eli siitä, että antosyaanien elektroneja luovuttavat metoksyyl- ja hydroksyyli-ryhmät aiheuttavat näkyvän valon spektrin absorptioalueen siirtymisen lyhyemmästä aallonpituudesta pidempään aallonpituuteen, jolloin väri muuttuu oranssista tai punaisesta violetiksi tai siniseksi²⁰. Erilaiset substituentit aiheuttavat antosyaanimolekyyleihin erilaiset värit: hydroksyyli-ryhmät aiheuttavat sinertävän värin, kun taas metoksyyliryhmät aiheuttavat punaisemman värin⁷.

Antosyaanit toimivat luonnollisina pH-indikaattoreina eli niiden väri riippuu ympäristön pH:sta. Happamassa ympäristössä on läsnä oksoniumioneita, jotka aiheuttavat kaksoissidosten laajempaa konjugaatiota aglykoniosan kolmessa renkaassa. Tämä auttaa näkyvän valon aallonpituuksien fotoneita absorboitumaan. Happamassa ympäristössä antosyaanit ovat väriltään punaisia.²⁵

Emäksisessä ympäristössä kaksoissidosten konjugoituminen häiriintyy toisen ja kolmannen renkaan välissä, minkä seurauksena molekyyli absorboikin fotoneita näkyvän valon sijaan ultravioletisäteilyn alueella. Kun konjugoitujen kaksoissidosten määrä molekyylissä

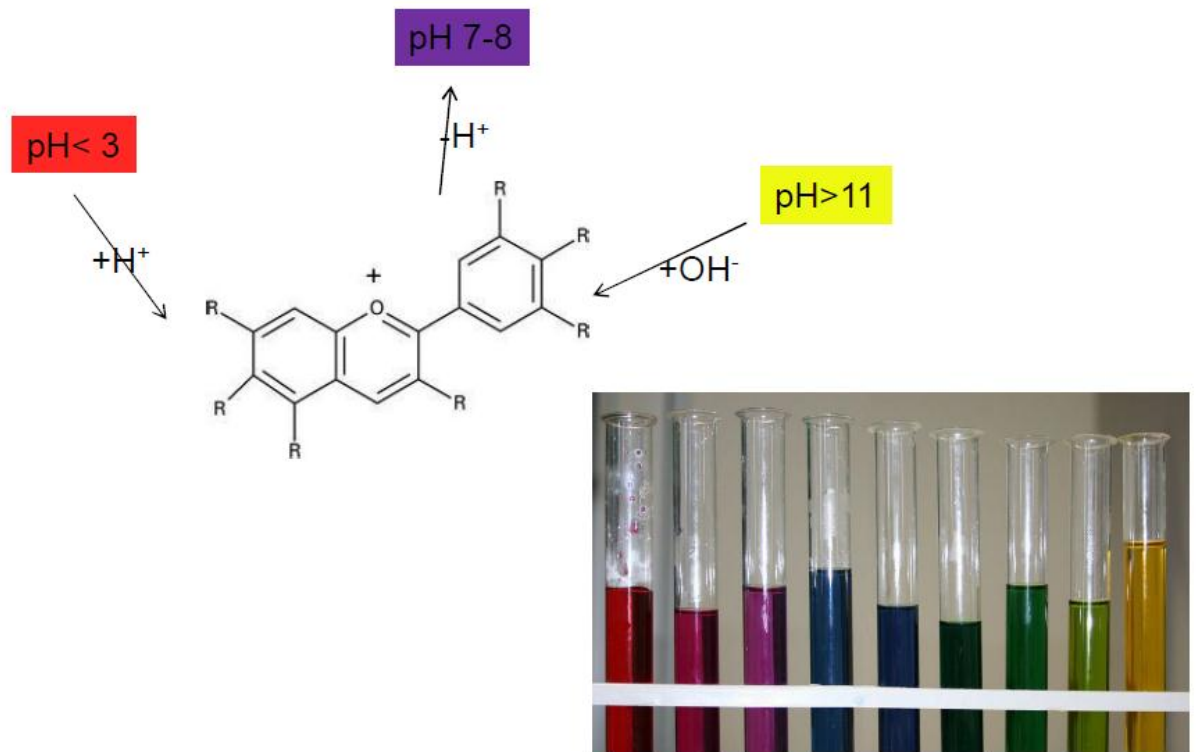
lisääntyä, elektronien virittymiseen tarvittava energia laskee ja fotonit, joilla on suurempi aallonpituus, absorboituvat. Emäksisessä ympäristössä antosyaanien väri muuttuu tumman siniseksi. Värimuutos on palautuva, sillä mikäli ympäristö tehdään taas happamaksi, antosyaanit muuttuvat jälleen punaisiksi.²⁵



Kuva 10. Punakaalin antosyaanin aglykoniosan rakenne muuttuu pH:n muuttuessa, jolloin myös antosyaanin väri vaihtuu.²⁵

Antosyaanimolekyylit ovat epästabiileja ja erittäin herkkiä hajoamiselle²⁶. Niiden värin voimakkuuteen ja pysyvyyteen vaikuttavat pH, lämpötila, valo, entsyymien ja komplekseja muodostavien yhdisteiden läsnäolo sekä itse molekyylien rakenne ja konsentraatio²⁶. Antosyaanien väri on pysyvin matalassa lämpötilassa ja pH:ssa²⁵.

Matala pH vaikuttaa myös värin voimakkuuteen: noin pH:ssa 3 antosyaanien väri on voimakkaan puna-violetti, ja pH:n noustessa viiteen antosyaanit muuttuvat lähes värittömiksi⁷. Neutraalissa ja emäksisessä pH:ssa väri muuttuu siniseksi ja lopulta jopa vihreäksi⁷.



Kuva 10. pH:n vaikutus antosyaaniliuoksen väriin.²⁷

Antosyaanien väriin vaikuttaa suuresti myös kopigmentaatio, joka tekee väristä kirkkaamman, vahvemman ja pysyvämmän. Sillä on suuri vaikutus esimerkiksi viinin värin pysyvyyteen. Kopigmentaatioreaktiossa antosyaanimolekyylisiin sitoutuu molekyylin sisäisten vuorovaikutusten vuoksi kovalenttisesti orgaaninen happo, aromaattinen asyyliryhmä tai toinen antosyaanimolekyylisi. Kopigmentaatio voi tapahtua myös molekyylisen välisten vuorovaikutusten johdosta, kun väritön antosyaani tai muu fenolinen yhdiste on hydrofobisessa vuorovaikutuksessa toisen antosyaanin kanssa.²⁶

Antosyaanit ovat Euroopan unionin alueella sallittuja elintarvikeväriaineita eikä eri antosyaaneja tarvitse erottaa toisistaan elintarvikkeiden ainesosaluetteloissa, joihin ne merkitään tunnuksella E163 tai tekstillä Antosyaanit. Näitä väriaineita saa Elintarviketurvallisuusvirasto Eviran mukaan käyttää muun muassa juomiin, jälkiruokiin, jäätelöön, makeisiin ja kahvileipiin ilman enimmäismäärärajoituksia.¹⁵

4 Väriaineiden eristäminen ja karakterisointi

4.1 Yleistä kasviväriaineiden eristämisestä

Kotioiloissa ruoan väriin vaikutetaan yleensä lisäämällä siihen jotakin voimakkaan väristä ruoka-ainetta, esimerkiksi paprikajauhetta tai punajuurta. Miellyttävän värin aikaansaaminen onkin ruoanvalmistuksessa tärkeää, sillä ruoan ulkonäkö vaikuttaa maun ja hajun ohella suuresti siihen, millaiseksi ruoka koetaan¹, ja halutaanko sitä syödä.

Teollisessa ruoanvalmistuksessa ei kuitenkaan voida käyttää samoja värjäysmenetelmiä, sillä vähäisen pigmenttikonsentraation vuoksi värjäävää ruoka-ainetta joudutaan lisäämään suuria määriä, jolloin se saattaa vaikuttaa ruoan makuun tuomalla siihen oman arominsa. Lisäksi tuotteeseen lisättävässä värjäävässä ruoka-aineessa saattaa olla liukenematonta materiaalia, kuten siemeniä tai kuorta, jotka vaikuttavat negatiivisesti tuotteen rakenteeseen. Nämä ongelmat poistuvat, kun väripigmentit eristetään, jolloin värit ovat käyttökelpoisempia elintarviketeollisuudessa.⁷

4.2 Kasviväriaineiden liukoisuus

Klorofyllit ja karotenoidit ovat pitkien hiiliketjujensa ansiosta rasvaliukoisia, joten ne liukenevat helposti orgaanisiin liuottimiin⁷. Klorofylleille tehokkaimpia ovat pooliset liuottimet, esimerkiksi asetoni, metanoli, etanoli ja etyyliasetatti¹¹, ja vähemmän tehokkaita poolittomat liuottimet, esimerkiksi heksaani ja petrolieetteri¹¹, kun taas karotenoidien uuttamiseen käytetään yleensä heksaanin ja asetonin sekoitusta¹⁶. Erilaisten liuottimien ja niiden sekoitusten käyttö johtuu siitä, että klorofyllien ja niiden johdannaisten sekä karotenoidien ja niiden johdannaisten poolisuus vaihtelee niissä olevien erilaisten sivuketjujen vuoksi. Antosyaanit ovat hyvin vesiliukoisia glykosyloidun rakenteensa ja positiivisen nettovarauksensa vuoksi, joten ne uutetaan yleensä veteen tai laimeisiin alkoholeihin⁷.

Kasvien kloroplasteissa klorofyllit sitoutuvat karotenoideihin, lipideihin ja lipoproteiineihin ei-kovalenttisesti, joten niiden väliset sidokset on helppoa rikkoa¹¹. Klorofyllit ja karotenoidit saadaankin helposti uutettua kasvikudoksista liottamalla mekaanisesti hajotettuja kudoksia orgaanisissa liuottimissa, mutta ongelmana on se, että samalla mukaan tulee myös muita orgaanisiin liuottimiin liukenevia aineita, kuten triglyseridejä, steroleja ja vahoja⁷.

Tarvittaessa klorofylleistä voidaan tehdä saippuoinnin avulla vesiliukoisia, jolloin niitä kutsutaan klorofylliineiksi⁷. Uttamisen jälkeen kiinteä aines erotetaan uutoksesta joko sentrifugoimalla tai suodattamalla.

4.3 Kasviväriaineiden karakterisointi

Kasviväriaineiden puhdistamiseen, eristämiseen ja analysointiin käytetään yleensä kromatografisia menetelmiä, sillä ne ovat eräitä analyttisen kemian tehokkaimpia menetelmiä. Nykyään kasviväriaineiden tutkimiseen käytetään laboratorio-olosuhteissa yleensä korkean erotuskyvyn nestekromatografiaa (HPLC) sen monipuolisuuden ja tarkkuuden vuoksi, mutta esimerkiksi kouluissa kasviväriaineita voidaan tutkia yksinkertaisemminkin menetelmillä, kuten ohutkerroskromatografialla. Teolliseen käyttöön tarkoitettut kromatografialaitteistot ovat hyvin tehokkaita, ne voivat puhdistaa jopa yhden kilogramman painoisia näytteitä²⁸.

Kaikki kromatografiset erotusmenetelmät perustuvat yhdisteiden erilaisiin etenemisnopeuksiin kolonnissa, joka pidättää toisia aineita pidempään kuin toisia. Kromatografiassa on kaksi faasia: liikkuva faasi, joka liikkuu kolumnin läpi, sekä stationäärifaasi eli kiinteä faasi, joka pysyy paikallaan kolonnin sisällä. Liikkuva faasi voi olla joko nestettä tai kaasua, ja kromatografiamenetelmät jaotellaan sen mukaan joko neste- tai kaasukromatografioihin. Kromatografiamenetelmät voidaan jaotella myös sen mukaan, millaiseen stationäärifaasiin ja erotettavien aineiden väliseen vuorovaikutukseen erottuminen perustuu.²⁸

Menetelmästä riippumatta kromatografian toimintaperiaate on kuitenkin aina sama: erotettavat yhdisteet kulkevat liikkuvan faasin mukana stationäärifaasin läpi erilaisella nopeudella sen mukaan, kuinka voimakas vuorovaikutus yhdisteillä on stationäärifaasin kanssa. Mitä voimakkaampi vuorovaikutus on, sitä hitaammin yhdiste etenee kolonnissa. Yhdisteet saadaan siis erotettua toisistaan retentioajan eli kromatografisen kolonnin läpikulkemiseen kuluneen ajan perusteella.²⁸

Korkean erotuskyvyn nestekromatografiassa eluentti eli ajoliuos pumpataan kovalla paineella ohuen kolonnin läpi. Näyte injektoidaan kolonniin, jossa erottuminen tapahtuu. Sen jälkeen

yhdisteet kulkeutuvat detektorille, joka havaitsee ne fysikaalisten tai kemiallisten ominaisuuksien perusteella, esimerkiksi UV-detektori ultraviolettisäteilyn absorbanssin, perusteella. Tietokone piirtää tuloksista kromatogrammin, jonka y-akselilla on esimerkiksi absorbanssi nanometreinä ja x-akselilla kulunut aika.²⁸

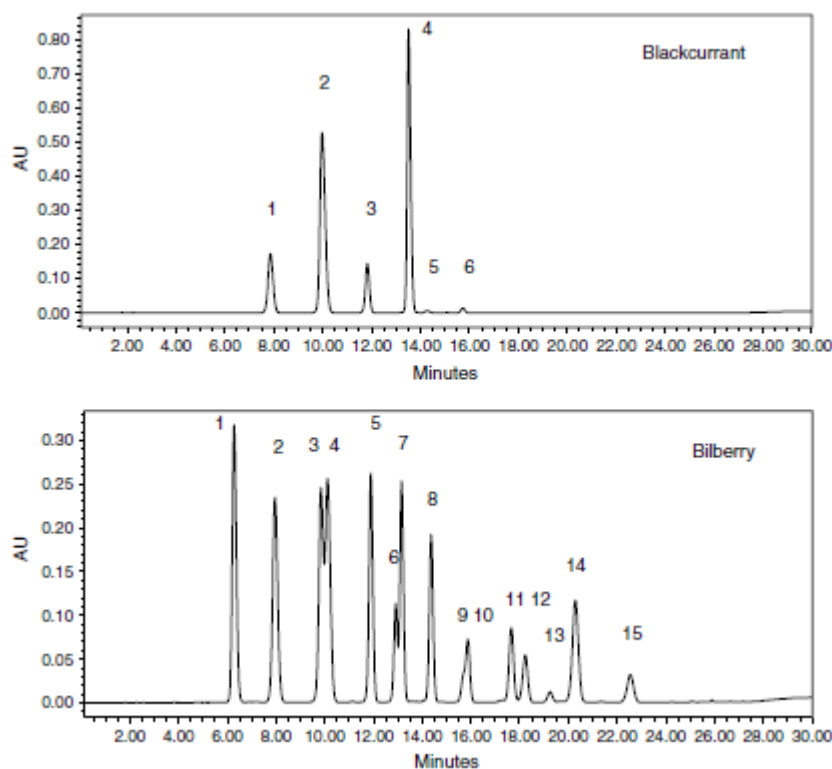
Korkean erotuskyvyn nestekromatografia on tehokas menetelmä elintarvikkeiden karotenoidien erottamiseen ja tunnistamiseen²⁹. Sekä käänteisfaasi- että normaalifaasinestekromatografiaa on käytetty paljon, sillä niillä on molemmilla omat hyvät puolensa³⁰. Käänteisfaasinestekromatografiassa stationäärifaasi on vain heikosti poolinen ja liikkuva faasi on poolinen, kun taas normaalifaasinestekromatografiassa stationäärifaasi on poolinen ja liikkuva faasi on poolittomampi²⁸.

Karotenoidiyhdisteiden erottuminen perustuu niiden poolisuuseroihin: normaalifaasinestekromatografiassa vain hiiltä ja vetyä sisältävillä, poolittomilla karotenoideilla on lyhyempi retentioaika kuin ksantofylleillä³⁰, jotka ovat hydroksyyliyhdisteitä vuoksi poolisia ja siksi voimakkaammassa vuorovaikutuksessa poolisen stationäärifaasin kanssa.

Myös klorofyllien erottamiseen ja tunnistamiseen käytetään usein korkean erotuskyvyn nestekromatografiaa käänteisfaasimenetelmällä¹⁴. Klorofyllien ja niiden johdannaisten polaarisuus vaihtelee, sillä klorofyllit ja feofytiinit ovat vahvasti poolittomia 20-hiilisen fytolisivuketjun vuoksi, kun taas klorofylliinit ja niiden johdannaiset ovat poolisempia sisältämänsä propionihapon vuoksi¹⁴. Mikäli halutaan erottaa kaikki klorofyllit ja niiden johdannaiset kerralla, valitaan sellainen liikkuva faasi, joka sisältää pyridiini- tai ammoniumasetaattia, jonka kanssa myös happamat klorofylliinit ja niiden johdannaiset ovat vuorovaikutuksessa¹⁴. Muuten ne tulevat suoraan ulos kolonnista ilman retentioaikaa¹⁴. Klorofylli *a*:lla ja feofytiini *a*:lla on kolmannessa hiilessä vain metyyliyhdisteitä, joten ne ovat erittäin poolittomia ja pidättyvät pisimpään kolonnissa, sillä ne ovat vuorovaikutuksessa poolittoman stationäärifaasin kanssa¹¹. Klorofylli *b*:llä ja feofytiini *b*:llä sen sijaan on kolmannessa hiilessään formyyliyhdisteitä, joka tekee niistä hieman poolisempia ja siksi hieman nopeammin eluoituvia¹¹.

Korkean erotuskyvyn nestekromatografia on hyvä menetelmä myös eri antosyaanien erottamiseen. Usein mittaukset tehdään aallonpituuksilla 280 nm ja 520 nm. Antosyaanien

erottumiseen kolonnissa vaikuttavat tutkittavien yhdisteiden poolisuus ja niiden jakautumiskertoimet liikkuvan ja stationäärifaasin välillä³¹. Antosyaanien eluutiojärjestys riippuu hydroksyyli- ja metoksyyliryhmien määrästä sekä glukosidien määrästä ja asyylaatiosta³¹. Käytettäessä korkean erotuskyvyn nestekromatografiaa käänteisfaasimenetelmällä (RP-HPLC) antosyanidiinien eluutiojärjestys on seuraava: delfinidiini, syanidiini, petunidiini, peonidiini ja malvidiini³¹. Tämä johtuu siitä, että käänteisfaasinessekromatografiassa stationäärifaasi on pooliton tai heikosti poolinen ja liikkuva faasi on poolisempi²⁸, jolloin ensimmäisinä eluotuvat poolisimmat yhdisteet. Hydroksyyli-ryhmä on vahvasti poolinen, joten antosyanidiineista poolisimpia ovat juuri ne, jotka sisältävät eniten hydroksyyli-ryhmiä.



Kuva 11. Kromatogrammi mustaherukan ja mustikan antosyaaneista aallonpituudella 520nm. Menetelmänä korkean erotuskyvyn nestekromatografia yhdistettynä diodirividetktooriin (HPLC-DAD). Mustaherukasta on löydetty 6 erilaista antosyaania ja mustikasta 15.²¹

5 Yhteenveto

Kasviväriaineita on käytetty elintarvikkeiden värjäämiseen jo satoja vuosia sekä houkuttelevan ulkonäön saavuttamiseksi, että esimerkiksi pilaantumisen peittämiseksi. Miellyttävän värin aikaansaaminen onkin ruoanvalmistuksessa tärkeää, sillä ruoan ulkonäkö vaikuttaa maun ja hajun ohella suuresti siihen, millaiseksi ruoka koetaan, ja halutaanko sitä syödä.

Teollisessa ruoanvalmistuksessa ei kuitenkaan voida käyttää samoja värjäysmenetelmiä kuin kotikeittiöissä, sillä kasvien verrattain vähäisen pigmenttikonsentraation vuoksi värjäävää ruoka-ainetta joudutaan lisäämään suuria määriä, jolloin se saattaa vaikuttaa ruoan makuun tai rakenteeseen ei-toivotulla tavalla. Useimmat kasviväriaineet ovat myös melko herkkiä hajoamaan ja muuttamaan väriään prosessoinnin ja säilytyksen aikana, minkä vuoksi niiden käyttö elintarviketeollisuudessa on ollut haasteellista. Erotusmenetelmien parannuttua kasviväriaineiden kemiaa ja värien säilymistä on voitu tutkia yhä tarkemmin, mikä on mahdollistanut kasviväriaineiden oikeanlaisen käsittelyn ja niiden käytön elintarviketeollisuudessa. Eristetyt ja oikealla tavalla käsitellyt kasviväriainepigmentit ovatkin käyttökelpoisia elintarvikeväriaineita.

Kasviväriaineissa riittää silti vielä paljon tutkittavaa, sillä esimerkiksi antosyaanien värinmuutoksia on tutkittu enimmäkseen happamissa liuoksissa, jolloin emäksisissä liuoksissa tapahtuvat reaktiot ovat jääneet vähemmälle huomiolle. Ruoan värejä ei kuitenkaan voida pitää pelkästään kosmeettisina ominaisuuksina, sillä useiden luonnollisten värimolekyylien on todettu vaikuttavan positiivisesti ihmisten terveyteen. Tämänhetkinen luonnollisten väriaineiden tutkimus keskittyykin erityisesti elintarvikkeiden terveysvaikutusten selvittämiseen. Esimerkiksi karotenoidit suojelevat konjugoituneiden kaksoissidostensa ansiosta ihmiskehon muita yhdisteitä vapaiden radikaalien aiheuttamalta hapettumiselta eli toimivat antioksidantteina. Osa karotenoideista kykenee lisäksi toimimaan elimistölle tärkeän A-vitamiinin esiasteena.

Myös antosyaanien terveysvaikutukset ovat jatkuvasti tutkijoiden kiinnostuksen kohteena. Antosyaaneilla näyttäisi olevat monenlaisia positiivisia vaikutuksia ihmiskehon terveyteen, esimerkiksi verisuonten seinämiin ja tulehdusvasteiden voimakkuuteen. Antosyaanien antioksidanttivaikutukset ovatkin yksi tämän hetken kiinnostavimmista tutkimuskohteista

sekä kemiassa, elintarvikekemiassa että lääketieteessä. Kun kasviväriaineiden terveysvaikutusten ja molekyylien säilyvyyden tutkimus etenee, ihmisille pystytään tarjoamaan yhä terveellisempää ruokaa, joka myös näyttää houkuttelevalta.

Lähteet

1. Schwartz, S.J., von Elbe, J.H. ja Giusti, M.M. teoksessa *Fennema's Food Chemistry*, 4. p., toim. Damodaran, S., Parkin, K.L. ja Fennema, O.R., CRC Press, USA, 2007, luku 9, s. 572-573
2. Bjålie, J., Haug, E., Sand, O., Sjaastad, O., Toverud, K. *Ihminen: fysiologia ja anatomi*, WSOY, 2007, s. 119-121 ja 127
3. Campbell, N.A., Reese, J.B., Urry, L.A., Cain, M.L., Wasserman, S.A., Minorsky, P.V. ja Jackson, R.B. *Biology*, 8. p., Pearson Benjamin Cummings, USA, 2008, s. 1101-1103
4. Ilmatieteenlaitos, *Valo ja spektri*.
<<http://www.geo.fmi.fi/oppimateriaali/envisat/valonsade/spektri.html>>, viitattu 16.11.2012
5. Viite 3, s. 190-192
6. Johannes Ahlmann. Entirelysubjective Photostream, 2007.
<<http://www.flickr.com/photos/entirelysubjective/6146868258/>> Viitattu 6.1.2013
7. Mortensen, A. Carotenoids and other pigments as natural colorants. *Pure Appl. Chem.* **78** (2006) 1477-1491
8. Elintarviketurvallisuusvirasto Evira, *Elintarvikelisiäaineryhmät*, 2011.
<http://www.evira.fi/portal/fi/elintarvikkeet/tietoa_elintarvikkeista/koostumus/elintarvikeparanteet/lisaaineet/lisaaineryhmat/> Viitattu 21.10.2012
9. Elintarviketurvallisuusvirasto Evira, *Elintarvikelisiäaineiden ja vierasaineiden ero*, 2011.
<http://www.evira.fi/portal/fi/elintarvikkeet/tietoa_elintarvikkeista/koostumus/elintarvikeparanteet/lisaaineet/lisaaineiden_ja_vierasaineiden_ero/> Viitattu 21.10.2012
10. Elintarviketurvallisuusvirasto Evira, *E-koodiavain*, 2011.
<http://www.evira.fi/portal/fi/elintarvikkeet/tietoa_elintarvikkeista/koostumus/elintarvikeparanteet/lisaaineet/e-koodiavain/> Viitattu 21.10.2012

11. Viite 1, s. 579-592
12. The Oxford Dictionary, *Chlorophyll*, 2012.
<<http://oxforddictionaries.com/definition/english/chlorophyll?region=us>> Viitattu 27.11.2012
13. Eda, J., Burda, J.V., Leszczynski, J. Study of electronic spectra of free-base porphyrin and Mg-porphyrin: Comprehensive comparison of variety of ab initio, DFT, and semiempirical methods. *J. Comput. chem.* **26** (2005) nr:3 s. 294
14. Garrido, J. L., Rodríguez, F., Campaña, E. ja Zapata, M. Rapid separation of chlorophylls *a* and *b* and their demetallated and dephytylated derivatives using a monolithic silica C₁₈ column and a pyridine-containing mobile phase. *J. Chromatogr. A.* **994** (2003) nr: ½ s. 85
15. Elintarviketurvallisuusvirasto Evira, *E-mobiili E-koodiavaimen mobiilisovellus*, 2011.
<http://m.evira.fi/portal/fi/> luettu 27.11.2012
16. Viite 1, s. 592-599
17. Mortensen, A., Skibsted, L.H., ja Truscott, T.G. The interaction of dietary carotenoids with radical species. *Arch. Biochem. Biophys* **385** (2001) nr: 1 s. 13-19
18. Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M. ja Mazur, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chem-Biol. Interact.* **160** (2006) nr:1 s. 1-40
19. Ötles, S. ja Cagindi, Ö. teoksessa *Food Colorants: Chemical and Functional Properties*, toim. Socaciu, C., CRC Press, USA, 2007, luku 2, s. 25-49.
20. Viite 1, s. 599-610
21. Kähkönen, M. P., Heinämäki, J., Ollilainen, V. ja Heinonen, M. Berry anthocyanins: Isolation, identification and antioxidant activities. *J. Sci. Food Agr.* **83** (2003) 1403
22. McDougall, G. J., Fyffe, S., Dobson, P. ja Stewart, D. Anthocyanins from red cabbage – stability to simulated gastrointestinal digestion. *Phytochemistry* **68** (2007) 1285-1294
23. The Oxford Dictionary, *Anthocyanin*, 2012.
<http://oxforddictionaries.com/us/definition/american_english/anthocyanin>, viitattu 27.11.2012
24. Bong G., K., Jeong, H., K., Shin, Y., M., Kwang-Hee, S., Ji, H. K., Hong, Y., K., Su, N., R., ja Joong-Hoon, A. Anthocyanin Content in Rice Is Related to Expression

- Levels of Anthocyanin Biosynthetic Genes. *Journal of Plant Biology* **50** (2007) nr: 2 s. 156-160
25. Chigurupati, N., Saiki, L., Gayser, C. ja Dash, A. K. Evaluation of red cabbage dye as a potential natural color for pharmaceutical use. *Int. J. Pharm.* **241** (2002) nr:2 s:293
26. Eiro, M., J. ja Heinonen, M. Anthocyanin Color Behavior and Stability during Storage: Effect of Intermolecular Copigmentation. *J. Agric. Food Chem.* **50** (2002) 7461-7466
27. Hopia, A. Ruoan happamuudesta –luento Molekyyligastronomia opetuksessa - täydennyskoulutuskurssilla 12.3.2012
28. Harris, D., C. *Exploring chemical analysis*, 2. p., W. H. Freeman and Company, USA, 2001, s. 429-466
29. Li, L., Qin, J., Yin, S. ja Tang, G. *Chromatographia* **65** (2006) nr: 1-2 s. 91-94
30. Cacciola, F., Donato, P., Giuffrida, D., Torre, G., Dugo, P. ja Mondello, L. Ultra high pressure in the second dimension of a comprehensive two-dimensional liquid chromatographic system for carotenoid separation in red chili peppers. *J. Chromatogr. A* **1218** (2011) s. 2012-2018
31. McCallum, J. L., Yang, R., Young, J. C., Strommer, J., N. ja Tsao, R. Improved high performance liquid chromatographic separation of anthocyanin compounds from grapes using a novel mixed-mode ion-exchange reversed-phase column. *J. Chromatogr. A* **1148** (2007) nr: 1 s. 38-45