

Ispitivanje utjecaja otapala na primjenu plodova vinobojke, *Phytolacca* sp. L., kao kiselo-baznog indikatora

Duković, Iva

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **Josip Juraj Strossmayer University of Osijek, Department of Chemistry / Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku, Odjel za kemiju**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:182:561520>

Rights / Prava: [In copyright](#) / [Zaštićeno autorskim pravom.](#)

Download date / Datum preuzimanja: **2024-11-19**

Repository / Repozitorij:

[Repository of the Department of Chemistry, Osijek](#)



Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku

Odjel za kemiju

Preddiplomski studij

Iva Duković

**Ispitivanje utjecaja otapala na primjenu plodova
vinobojke, *Phytolacca sp. L.*, kao kiselobaznog indikatora**

Završni rad

Mentor: doc.dr.sc. Ana Amić

Osijek, 2022.

SAŽETAK

Indikator je sredstvo koje ukazuje na stanje ili promjene stanja nekog sustava, a u kemiji se koristi kao tvar koja promjenom boje pokazuje prisutnost neke druge tvari te kako bi se odredila pH vrijednost medija. Konvencionalni kiselo-bazni indikatori se pripremaju u kemijskom laboratoriju, primjeri takvih indikatora su metil crveno, lakmus papir i fenolftalein. Jeftinija i manje štetna varijanta indikatora su alternativni odnosno prirodni kiselo-bazni indikatori. Primjeri takvih indikatora su kurkuma, crveni kupus, grožđe, luk i dr. U ovom radu ispitani su plodovi vinobojke (*Phytolacca sp.*) kao kiselo-bazni indikator. Vinobojka ima bobice tamno ljubičaste boje, što sugerira na prisutnost betacijanina, te se pretpostavlja da ima potencijal kao kiselo-bazni indikator. U radu su pripremljeni i ispitani indikatori od suhih i svježih zrelih plodova vinobojke u hladnoj i vrućoj vodi, metanolu, acetonu i etanolu. Prema dobivenim rezultatima, svježa vinobojka daje vizualno dojmljivije rezultate u odnosu na suhu vinobojku, a obje daju najintenzivniju promjenu pri $\text{pH} = 14$. Od otapala se metanol pokazao najpogodnijim za pripremu ovih indikatora, iako su i ostala korištena otapala pokazala određeni potencijal.

Ključne riječi: vinobojka, betacijanini, kiselo-bazni indikatori, metanol, etanol, aceton

ABSTRACT

Indicator shows the state or changes of the state of a system, and in chemistry an indicator shows the presence of another substance by changing colour and is used to determine the pH value of a medium. Conventional acid-base indicators are prepared in a chemical laboratory, examples of such indicators are methyl red, litmus paper and phenolphthalein. A cheaper and less harmful version of indicators are alternative or natural acid-base indicators. Examples of such indicators are turmeric, red cabbage, grape, onions, etc. In this thesis, the fruit of the pokeweed (*Phytolacca sp.*) were tested as an acid-base indicator. Pokeweed has dark purple berries hence it is assumed that they contain betacyanins and could be used as an acid-base indicator. So, in this work, indicators made from dry and fresh ripe pokeweed berries with cold and hot water, methanol, acetone and ethanol were prepared and tested. According to obtained results, fresh pokeweed showed visually more impressive results, and fresh and dried pokeweed had the most intensive colour change at pH = 14. Of all used solvents, methanol seems to be the best for preparation of these indicators, though other solvents showed potential too.

Key words: pokeweed, betacyanins, acid-base indicators, methanol, ethanol, acetone

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. LITERATURNI PREGLED	2
2.1. Vinobojka	2
2.2. Kiselo-bazni indikatori	5
2.2.1. Konvencionalni kiselo-bazni indikatori	5
2.2.2. Alternativni kiselo-bazni indikatori	9
3. EKSPERIMENTALNI DIO	16
3.1. Korištene kemikalije, pribor i biljni materijal	16
3.2. Priprema otopina	16
3.3. Postupak i plan rada	17
4. REZULTATI I RASPRAVA	18
4.1. Indikator pripremljen od zrelih bobica vinobojke i vode	18
4.1.1. Indikator pripremljen od suhih bobica vinobojke i vode	18
4.1.2. Indikator pripremljen od svježih bobica vinobojke i vode	19
4.2. Indikator pripremljen od zrelih bobica vinobojke i etanola	20
4.2.1. Indikator pripremljen od suhih bobica vinobojke i etanola	20
4.2.2. Indikator pripremljen od svježih bobica vinobojke i etanola	21
4.3. Indikator pripremljen od zrelih bobica vinobojke i acetona	22
4.3.1. Indikator pripremljen od suhih bobica vinobojke i acetona	22
4.3.2. Indikator pripremljen od svježih bobica vinobojke i acetona	22
4.4. Indikator pripremljen od zrelih bobica vinobojke i metanola	23
4.4.1. Indikator pripremljen od suhih bobica vinobojke i metanola	23
4.4.2. Indikator pripremljen od svježih bobica vinobojke i metanola	24
5. ZAKLJUČAK	25
6. LITERATURNA VRELA	26

1. UVOD

Vinobojka je narodni naziv za porodicu i rod visokih trajnica s cjelovitim, izmjeničnim listovima i bez palistića. Ženski cvjetovi formiraju grozdove, a imaju 5 listova u ocvijeću, 10 prašnika, 1 nadržaslu plodnicu i kao plod bobu. Rod je poznat i po nazivu kermes, a u Republici Hrvatskoj se do nedavno mogla naći samo jedna vrsta, *Phytolacca americana*, američki kermes, kultivirani i podivljani oblik [1]. Međutim, relativno nedavno utvrđena je prisutnost još jedne vrste ovog roda – azijske vinobojke ili maruljolikog kermesa, *P. acinosa* Roxb.

Alternativni kiselo-bazni indikatori su indikatori koji se mogu naći u prirodi te se pomoću njih može odrediti kiselost, odnosno bazičnost neke otopine. Mnoga istraživanja su pokazala kako se biljke mogu koristiti kao alternativni kiselo-bazni indikatori. Stoga je cilj ovog rada bio ispitati može li se zreli plod vinobojke koristiti u tu svrhu. Naime, ova biljka ima tamno ljubičaste, gotovo crne, plodove što sugerira da plod sadrži spojeve koji bi se mogli ponašati kao kiselo-bazni indikatori.

U prvom dijelu rada opisan je biljni materijal koji se ispituje kao kiselo-bazni indikator. Opisane su njegove karakteristike, svojstva, etimologija, stanište i upotreba. Također u prvom dijelu rada nabrojani su najpoznatiji konvencionalni kiselo-bazni indikatori te su opisana njihova svojstva i područje pH vrijednosti u kojem mijenjaju boju. Osim konvencionalnih indikatora ukratko su obrađeni i alternativni kiselo-bazni indikatori.

U drugom dijelu rada iznesen je eksperimentalni dio istraživanja s prikazom materijala i metoda korištenih u radu. Dobiveni rezultati prikazani su slikama te ispod svake slike prodiskutirani. Rezultati pokazuju da svježe bobice vinobojke imaju veći potencijal primjene od suhih bobica. Od korištenih otapala, najbolje rezultate dao je metanol, koji je dao najintenzivnije i najuočljivije promjene boja. Istraživanje je pokazalo da svježa vinobojka kao alternativni kiselo-bazni indikator mijenja boju pri pH = 12 iz ružičaste u ljubičastu, pri pH = 13 u smeđu, a pri pH = 14 u žutu. Time je potvrđeno kako su ovako pripremljeni indikatori od vinobojke dobri indikatori bazičnih medija.

2. LITERATURNI PREGLED

2.1. Vinobojka

Vinobojka je naziv za porodicu, Phytolaccaceae, i rod, Phytolacca, invazivnih vrsta zeljastih biljaka. Ime roda potječe od grčke riječi *phyton* što znači biljka i riječi *lac* koja se odnosi na štitastu uš *Kerria lacca* Kerr od koje se pripremala grimizno crvena boja. U engleskom (američkom) govornom području, za biljke ovog roda dominira naziv *pokeberry* koji potječe od riječi *puccoon* iz jezika američkih Indijanaca plemena Algonquin, a kojom su nazivali biljke koje koriste za bojanje [2].

Sistematska klasifikacija vinobojke prikazana je u Tablici 1. Porodica Phytolaccaceae, iz reda klinčićolikih, Caryophyllales, je porodica cvatućih dvosupnica koja se sastoji od 5 rodova i približno 33 vrste. Područje distribucije je jug Afrike te tropska i suptropska Amerika. Vrste ove porodice su zeljaste, rjeđe drvenaste. Listovi su jednostavni, naizmjenični, cjelovitog ruba, bez palistića. Cvjetovi su dvospolni ili jednospolni, aktinomorfni, grupirani u grozdove ili metlice. Brakteje su često prisutne, imaju 4 ili 5 tepala, 4-5 prašnika, nadraslu plodnicu. Plod je bobica, ali može biti i koštunica, a sjemenke su okruglaste ili bubrežaste [3].

Tablica 1. Sistematska klasifikacija roda vinobojka [4].

Carstvo	Plantae
Koljeno	Spermatophyta
Razred	Dicotyledonae
Red	Caryophyllales
Porodica	Phytolaccaceae
Rod	Phytolacca

U Hrvatskoj su poznate dvije vrste vinobojke, američka vinobojka ili američki kremes (*P. americana* L.) koja potječe iz Sjeverne Amerike (Slika 1.) i azijska vinobojka ili maruljoliki kermes (*P. acinosa* Roxb.) koja potječe iz Kine i Koreje [5].



Slika 1. Američka vinobojka (*P. americana* L.) [6].

Američka vinobojka (*P. americana* L.) je višegodišnja zeljasta biljka koja može narasti od 1,8 do 3 m visine. Stabljika izrasta iz glavnog korijena, ona je glatka i ružičasto-crvene boje te je djelomično šuplja. Listovi su naizmjenični, tanki i zelene boje. Oštećeni ili zgnječeni listovi i stabljike imaju pomalo oštar miris. Ova vrsta može cvjetati tijekom cijele godine u južnim državama, a od svibnja do listopada u sjevernim državama. Cvjetovi (Slika 2.) su obično bijeli do zelenkasti, ali mogu biti ružičasti ili ljubičasti, imaju 5 latica i oko 10 prašnika. Plodovi američke vinobojke su ljubičaste bobice čiji je promjer od 6 do 10 mm, bobice sadrže od 6 do 12 sjemenki. Nalazi se na rubovima šuma, u nizovima ograda, ispod dalekovoda, pašnjacima, starim poljima i šumskim otvorenim područjima [7].



Slika 2. Cvjetovi američke vinobojke [8].

Krajem 19. stoljeća prvi puta je uočena u hrvatskoj flori te se smatra invazivnom vrstom. Razmnožavaju ju ptice koje se hrane bobicama. Kada nađe povoljne uvjete za klijanje počne jako brzo rasti. Ako je se želi odstraniti potrebno je u potpunosti ukloniti njezin korijen, inače će biljka ponovno narasti [9].

Cijela biljka je otrovna i uzrokuje niz simptoma trovanja, uključujući u rijetkim slučajevima i smrt. Posebno su otrovni korijen i bobice, no mladi izdanci i listovi kada su pravilno kuhani, jestivi su te predstavljaju dobar izvor proteina, masti, ugljikohidrata i vitamina C [7]. Jestivima se smatraju mladi izdanci kada narastu najviše do 30 cm i mladi listovi koji se beru u rano proljeće. Pravilno kuhanje uključuje dvostruko mijenjanje vode ili konzerviranje u octu. Iako otrovne, bobice se koriste za bojanje vina zbog svoje intenzivne boje [10, 11].

Istraživanjima je ustanovljeno da američka vinobojka (*P. americana* L.) ubija slatkovodne puževe (rodovi *Bulinus*, *Biomphalaria* i *Oncomelania*) koji su domaćini metilja roda *Schistosoma*, uzročnika shistosomoze (bilharzioze). Ljudi se zaraze preko kože ili sluznice kada su u kontaktu s onečišćenom vodom. Bolest je kronična, a neki od simptoma su abdominalna bol, proljev, kašalj, problemi s jetrom i slezenom te groznica [12].

Azijska vinobojka (*P. acinosa* Roxb., Slika 3.) je trajnica koja može narasti do 1,5 m. Cvjeta od srpnja do kolovoza, a sjeme dozrijeva od kolovoza do rujna. Biljka je dvodomna (ista biljka ima muški i ženski cvijet) te je naturalizirana u Indiji. U listovima, plodovima i korijenu sadrži saponine, koji su potencijalno otrovni [13, 14].



Slika 3. Azijska vinobojka (*P. acinosa* Roxb.) [15].

Listovi azijske vinobojke (Slika 4.) su otrovni te su jestivi samo kao mladi, budući da se starenjem biljke razvijaju toksini. Staništa su obronci brda, doline, rubovi šuma i cesta na nadmorskoj visini od 500-3400 m i šumsko podzemlje. Odgovaraju joj laka (pješčana), srednja (ilovasta) i teška (glinasta) tla. Prikladan pH za azijsku vinobojku su blago kisela, neutralna i blago alkalna tla, može rasti u polusjeni (svijetla šuma) ili bez sjene te također voli vlažno tlo [13, 16-18].



Slika 4. Listovi azijske vinobojke [19].

Korijen azijske vinobojke ima antibakterijsko djelovanje [20-23]. Ova biljka ima zanimljiv kemijski sastav te se od 1995. godine istražuje kao potencijalni lijek protiv AIDS-a. Sadrži snažna protuupalna sredstva, antivirusne proteine i tvari koje utječu na diobu stanica. Korijen se koristi u liječenju edema, nefritisa, bolesti bubrega i nadutosti trbuha. Također se može koristiti i za liječenje čireva i rana [23].

2.2. Kiselo-bazni indikatori

Kiselo-bazni indikatori se koriste za određivanje pH vrijednosti otopine. Oni mijenjaju boju ovisno o tome dodaju li se u kiselu, neutralnu ili bazičnu otopinu. Danas se većinom kao kiselo-bazni indikatori koriste slabe kiseline, a mogu se koristiti i slabe baze. Raspon pH skale iznosi od 0 do 14, pri čemu pH vrijednost manja od 7 ukazuje na kiselu otopinu. Ako je pH vrijednost jednaka 7 to ukazuje na neutralnu otopinu, a pH vrijednost koja iznosi više od 7 ukazuje da se radi o bazičnoj otopini. Kod bazičnih otopina, kiselo-bazni indikatori prelaze iz neutralne molekule u ionski oblik, a to je posljedica gubitka vodikovih iona, većinom iz hidroksilne skupine. Apsorpciju svjetlosti kiselo-baznog indikatora na različitim valnim duljinama uzrokuje promjena strukture molekule i time mijenja boju otopine u koju je dodan [24].

2.2.1. Konvencionalni kiselo-bazni indikatori

Konvencionalni kiselo-bazni indikatori su kemijske tvari koji se sintetiziraju u kemijskom laboratoriju. Primjer ovakvog indikatora je lakmus papir koji sadrži određene tvari

iz prirode koje ukazuju na pH vrijednost medija. Još neki primjeri su metil crveno, fenolftalein, fenol crveno, metiloranž, metil žuto, bromtimol plavo i bromfenol [24].

Lakmus papir je dostupan u crvenoj i plavoj boji te također i neutralnoj varijanti. Za ispitivanje bazične otopine koristi se crveni lakmus papir koji u kontaktu s bazičnom otopinom promijeni boju u plavu (Slika 5.), dok u kontaktu s kiselim ili neutralnom otopinom neće promijeniti boju [25].

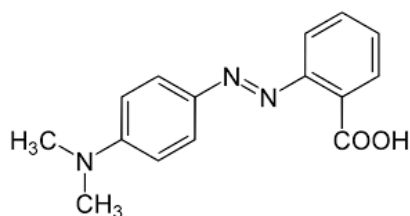


Slika 5. Promjena boje plavog i crvenog lakmus papira [26].

Za ispitivanje kisele otopine koristi se plavi lakmus papir jer on poprima crvenu boju u kontaktu s kiselinom (Slika 5.). Neutralni lakmus papir je ljubičaste boje te on promijeni boju u plavu ili crvenu ovisno je li u kontaktu s kiselinom ili bazom [25].

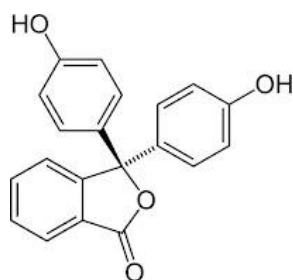
Univerzalni indikator može biti u obliku otopine ili u obliku univerzalnog indikatorskog papira [27]. Univerzalni indikator je zapravo smjesa nekoliko različitih indikatora, a to su metilno crveno, timol plavo, fenolftalein i bromtimol plavo [28]. Ima mogućnost pokazivanja nekoliko različitih promjena boje u širokom pH području, što ga čini preciznijim od lakmus papira [29]. Kod ispitivanja kiselina, univerzalni indikator je crvene boje pri $\text{pH} < 3$, narančasto do žuti u $\text{pH} = 3-6$, a zelene je boje u neutralnoj otopini ($\text{pH} = 7$). U bazičnim otopinama je plave boje ako se ispituje otopina $\text{pH} = 8-11$ te ljubičasti u otopinama koje imaju $\text{pH} > 11$ [28].

Metil crveno odnosno 2-[[4-(dimetilamino)fenil]diazetil]benzojeva kiselina (Slika 6.) je tamnocrveni prah formule $\text{C}_{15}\text{H}_{15}\text{N}_3\text{O}_2$ [30-32]. Koristi se pri titracijama jakih kiselina jakim bazama. U kiselom mediju ($\text{pH} < 4,4$) ovaj indikator je crvene boje, u bazičnoj sredini ($\text{pH} > 6,2$) je žute boje kao i pri neutralnom pH. Između pH vrijednosti 4,4 i 6,2 ovaj indikator je narančaste boje [33].



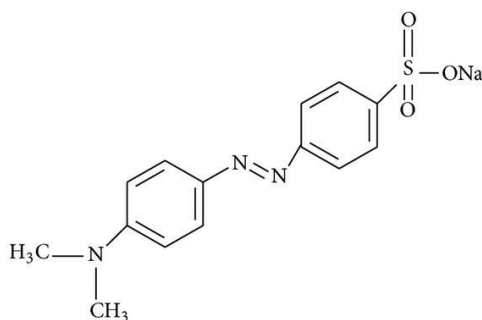
Slika 6. Strukturna formula metil crvenog [34].

Fenolftalein (Slika 7.) ili 3,3-bis (4-hidroksifenil)-2-benzofuran-1-on je spoj formule $C_{20}H_{14}O_4$ [35-36]. U otopinama čija je $pH < 8,5$ fenolftalein je bezbojan, dok u otopinama čija je $pH > 9$ poprima ružičastu do svijetlo ljubičastu boju [37]. Koristi se kao laboratorijski reagens te je dio laksativnih pripravaka. Također može djelovati kancerogeno [38, 39].



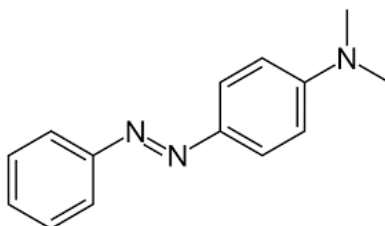
Slika 7. Strukturna formula fenolftaleina [40].

Metiloranž (Slika 8.) ili 4-[[4-(dimetilamino) fenil] diazenil] benzen-1-sulfonat, formule $C_{14}H_{14}N_3NaO_3S$, je crvene boje u kiselom mediju ($pH = 3,1$), pri $pH = 4,4$ je narančaste boje, a u bazičnom mediju je žute boje [41].



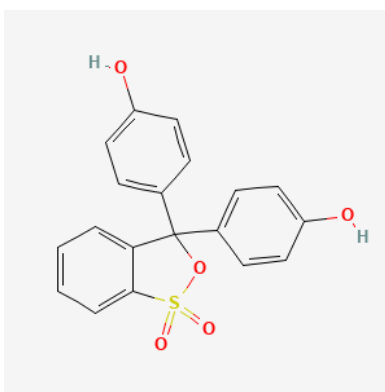
Slika 8. Strukturna formula metiloranža [42].

Metil žuto ili *N,N*-dimetil-4-(fenildiazenil)anilin (Slika 9.), formule $C_{14}H_{15}N_3$, pri pH ispod 2,9 je crvene boje, a iznad pH 4,0 je žute boje. Koristi se pri titracijama slabih baza s jakom kiselinom [43].



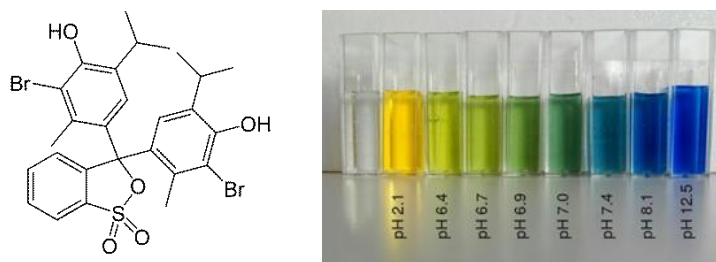
Slika 9. Strukturna formula metil žutog [44].

Fenol crveno (Slika 10.) ili fenolsulfonftalein, formule $C_{19}H_{14}O_5S$, je indikator koji pri pH = 6,8 mijenja boju u žutu, a iznad pH 8,2 mijenja boju u ružičastu. Fenol crveno ima ulogu kiselo-baznog indikatora u kemijskom laboratoriju ali i dijagnostičkog sredstva (npr. kao indikator u staničnim kulturama i za procjenu protoka krvi u bubrezima) [45].



Slika 10. Strukturna formula fenol crvenog [46].

Bromtimol plavo, $C_{27}H_{28}Br_2O_5S$ (Slika 11.), je indikator koji pri pH < 7 medij boja u žutu boju, a kod bazičnih otopina daje plavu boju. Ova promjena nastaje zbog nastanka C=O veze zbog čega se konjugirani sastav molekule promjeni dovoljno da elektroni ne apsorbiraju iste fotone. Stoga dolazi do promijene boje medija iz žute u plavičastu boju (Slika 11.) [47].



Slika 11. Strukturalna formula bromtiol plavog [48] i promjene boje ovog indikatora [49].

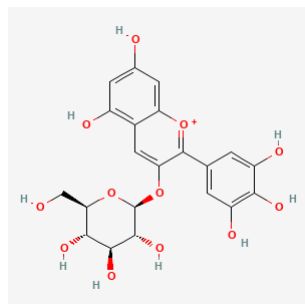
2.2.2. Alternativni kiselo-bazni indikatori

Alternativni kiselo-bazni indikatori, odnosno prirodni indikatori, su vrsta indikatora koji se mogu naći u prirodi te se pomoću njih može odrediti je li neka otopina kisela ili bazična. Neki od primjera alternativnih kiselo-baznih indikatora su kurkuma, crveni kupus, grožđe, luk, rajčica, trešnje i dr. Također, pomoću cvijeta hortenzije može se odrediti kiselost ili bazičnost tla (Slika 12.) [50].



Slika 12. Cvjetovi hortenzije na kiselom tlu [51].

Hortenzija (*Hydrangea sp. L.*) je česta vrtna biljka te je jedan od najljepših primjera promjene boje prirodnih kiselo-baznih indikatora. Za obojenost cvijeta hortenzije zaslužan je delfinidin-3-glukozid (Slika 13.), koji u interakciji s aluminijem iz tla uzrokuje promjenu boje cvjetova. Boja cvijeta hortenzije ovisi i o kiselosti tla, odnosno ako je $\text{pH} < 6,0$ cvjetovi su plave boje, a ako je $\text{pH} > 6,8$ tada su cvjetovi ružičaste boje. Ako je tlo neutralnog pH, cvjetovi su ljubičaste boje [52].



Slika 13. Struktura delphinidin-3-glukozida [53].

Pigmenti biljaka su tvari koje mogu uzrokovati promjenu boje s promjenom pH vrijednosti medija, kao što se vidi na primjeru delphinidin-3-glukozida odnosno cvijeta hortenzije. Chavan i sur. (2017) su ispitali indikatorsku aktivnost pigmenata i pokušali njima zamijeniti sintetske indikatore. U tu su svrhu koristili kiselo-bazne titracije. Biljni materijal (*Hibiscus rosa-sinensis*, *Calotropis gigantea*, *Brassica oleracea-capitata*, *Rosa chinensis*, *Brassica oleracea-italica*, *Ixora chinensis*, *Catharanthus roseus*) su očistili destiliranom vodom, usitnili, macerirali 2 sata u 25 mL 90 % etanola. Ekvimolarne titracije proveli su upotrebom 10 mL titranta s tri kapi indikatora (metiloranž i fenolftalein). U odnosu na standardne sintetske indikatore, dobiveni rezultati bili su obećavajući. Titracije su pokazale oštru promjenu boje u točki ekvivalencije čime su utvrdili da su prirodni kiselo-bazni indikatori u titracijama učinkovita i sigurna alternativa konvencionalnim indikatorima [54].

Kurkuma je jarko žuti prah koji se dobiva iz biljke kurkume (*Curcuma longa* L.). Kada se kurkuma doda u bazičnu otopinu, otopina poprima crvenu boju. Međutim, dodatkom neke kiseline boja će ostati žuta, samo će pri nižim pH biti svjetlija. Kao indikator se koristi u obliku papira (Slika 14.) ili kao otopina. Za pripremu papirnatog indikatora od kurkume potrebno je pomiješati malo praha kurkume s vodom te napraviti pastu. Pasta se nanosi na upijajući papir ili filter papir. Kada se papir osuši, izreže se na trake koje se upotrebljavaju kao indikator [55].



Slika 14. Indikatorski papir od kurkume [56].

Kineska ruža ili tropski hibiskus (*Hibiscus rosa-sinensis* L., Slika 15.) još je jedan alternativni kiselo-bazni indikator. Otopina indikatora je svijetlo ružičaste boje te se dobiva od cvjetova biljke kineske ruže pomiješanih s vodom. Indikator kineske ruže prelazi iz svijetlo ružičaste u tamno ružičastu boju kada se pomiješa s kiselim otopinom, a kada se pomiješa s bazičnom otopinom, mijenja boju iz svijetlo ružičaste u zelenu [55].



Slika 15. Cvijet kineske ruže [57].

Sok od crvenog kupusa (*Brassica oleracea* var. *capitata* f. *rubra* L.) izvorno je ljubičaste boje. Međutim, kada se sok crvenog kupusa pomiješa s kiselim medijem, njegova boja se mijenja u crvenu, a miješanjem s bazičnim medijem mijenja boju u zelenu (Slika 16.). Za pripremu otopine crvenog kupusa potrebno je nasjeckati crveni kupus i dodati vruću vodu. Smjesa se ostavi nekoliko minuta da se ohladi te procijedi. Ovako pripremljen sok (indikator) od crvenog kupusa je tamno ljubičaste boje [55].



Slika 16. Promjena boja soka crvenog kupusa [58].

Sok od grožđa (*Vitis vinifera* L.), plavih ili crnih sorti, mijenja boju ovisno o pH vrijednosti otopine (Slika 17.). Dodatkom soka od grožđa u kiselu otopinu dolazi do promjene

boje u crvenu, a dodatkom soka od grožđa u bazičnu otopinu dolazi do promjene boje u tamno zelenu boju [59].



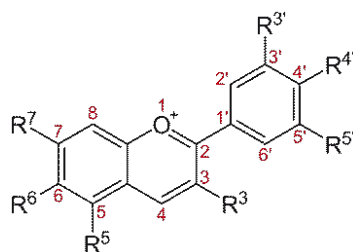
Slika 17. Sok od grožđa [60].

Crveni luk (*Allium cepa* L.) prikazan je na Slici 18. Kao alternativni kiselo-bazni indikator u kiseljoj otopini mijenja boju iz crvene u svijetlo crvenu. Dodatkom bazične otopine crvenom luku, on mijenja boju iz crvene u zelenu boju [61].



Slika 18. Crveni luk [62].

Antocijanini (Slika 19.) su najveća skupina fenolnih pigmentata te ujedno i najvažnija skupina pigmentata u biljkama koji su topljivi u vodi. Oni su odgovorni za crvenu, ljubičastu i plavu boju cvjetova, listova i plodova [63-68]. Uglavnom se nalaze u kožici, osim kod određenih vrsta voća u kojima se nalaze i u mesu ploda (npr. trešnje i jagode) [69]. Imaju karakteristična fizikalno-kemijska svojstva koja im daju jedinstvenu boju i stabilnost [70-74]. Vrlo su reaktivne molekule te su osjetljivi na reakcije razgradnje [75]. U Tablici 2. dan je prikaz osnovnih strukturnih karakteristika glavnih predstavnika antocijanina i promjena boje do koje dovode.



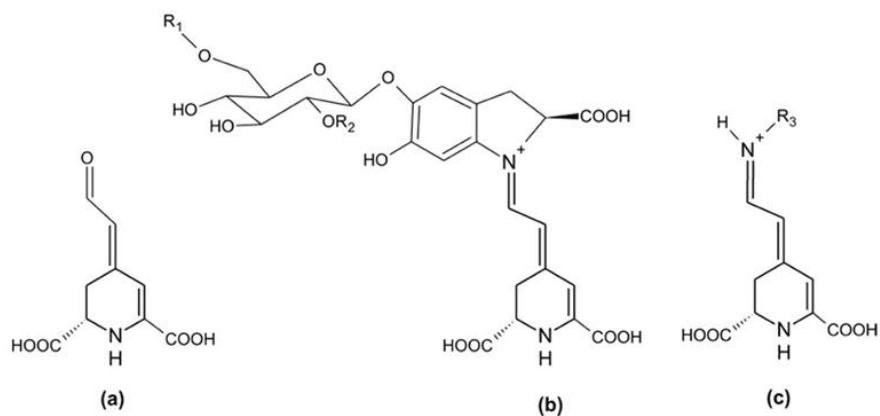
Slika 19. Struktura antocijanina [76].

Tablica 2. Osnovna struktura glavnih antocijanina [77, 78].

Antocijanini	R1	R2	Boja koju proizvodi
pelargonidin	-H	-H	„losos“ narančasta
cijanidin	-OH	-H	purpurno crvena i grimizna
peonidin	-OCH ₃	-H	purpurno crvena
malvidin	-OCH ₃	-OCH ₃	ljubičasta
petunidin	-OCH ₃	-OH	ljubičasta
delfinidin	-OH	-OH	ljubičasta, blijedo plava i plava

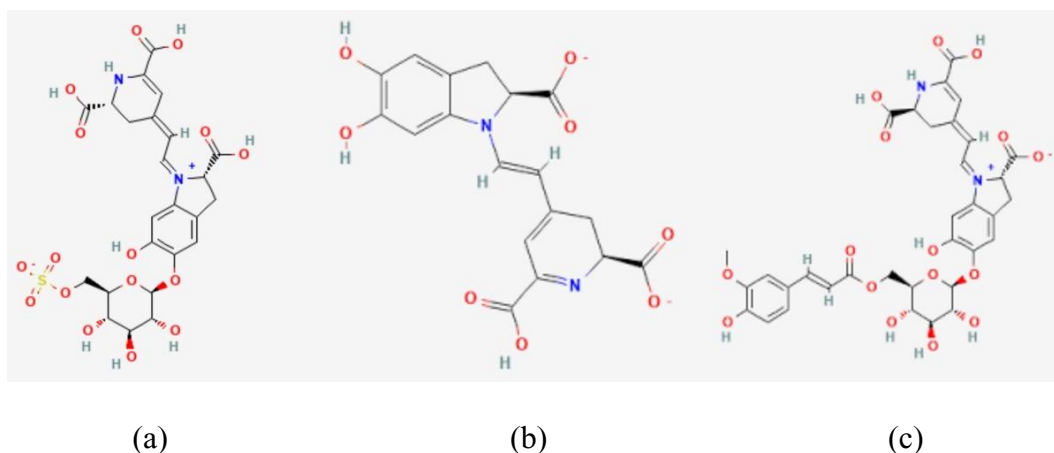
Antocijanini su glikolizirani polihidroksi ili polimetoksi derivati 2-fenilbenzopirilijuma [63, 67, 79]. Obično sadrže dvije, tri ili više šećernih jedinica vezanih na različitim pozicijama ili se pojavljuju kao oligosaharidni bočni lanci [80]. Na intenzitet i boju antocijanina utječe broj hidroksilnih i metoksilnih skupina [63, 81], ako je prisutno više hidroksilnih skupina tada boja ide prema plavičastoj nijansi, a crvenilo se pojačava kada je prisutno više metoksilnih skupina [77, 78].

Betalaini su još jedna skupina važnih biljnih pigmenata, a glavni izvor ovih dušičnih heterocikličkih spojeva je cikla (*Beta vulgaris* L.) iako se mogu naći i u drugim biljkama. Prema strukturi, betalaini sadrže betalamičnu kiselinu, a supstituent (R1, R2) može biti vodik ili neki složeniji supstituent (Slika 20.). Prema kemijskoj strukturi podijeljeni su u dvije podskupine, a to su betaksantini i betacijanini. Betaksantini su odgovorni za narančasto-žutu boju, a betacijanini za crveno-ljubičastu boju. Cikla sadrži obje podskupine betalanina i to 75-95 % betacijanina i 5-25 % betaksantina [82].



Slika 20. Strukturna formula betalamične kiseline (a), betacijanina (b) i betaksantina (c) [82].

Vinobojka također sadrži betalaine, a za njih je dokazano da imaju jaka antioksidativna svojstva. Pigmenti koji se nalaze u plodu američke vinobojke su prebetanin (betanin 6'-*O*-sulfat, Slika 21. (a)) i betanidin (5-*O*-[(5''-*O*-*E*-feruloil)-2'-*O*-β-*D*-apiofuranozil]-β-*D*-glukopiranozid, Slika 21. (b)). Također, potvrđena je prisutnost još jednog pigmenta, lamprantina II (betanidin 5-*O*-(6'-*O*-eferuloil)-β-*D*-glukopiranozid, Slika 21. (c)) [83].



Slika 21. Struktura prebetanina (a) [84], betanidina (b) [85] i lamprantina II (c) [86].

Betalaini zamjenjuju antocijanine u cvijetu i plodu većine biljaka porodice Caryophyllales [87] te dovode do promjena boje uočenih u ovom radu (u slučaju vinobojke se konkretno radi o promjenama boje uzrokovanim prisutnim betacijaninima). Radova o betalainima i betacijaninima kao prirodnim kiselobaznim indikatorima prema našim saznanjima nema. Iako su strukture ovih spojeva poznate, o njihovim bioaktivnostima se jako malo zna. Međutim, u literaturi se mogu naći radovi koji ispituju betacijanine, kao prirodnu

zamjenu za sintetska bojila. Alshamar i sur. (2022) su ispitivali dvije biljke bogate betacijaninima, ciklu, *B. vulgaris*, i američku vinobojku, *P. americana*, kako bi utvrdili mogu li poslužiti za bojanje mikroskopskih preparata. Priredili su alkoholne ekstrakte (metanol), njima obojali mikrobiološke uzorke i usporedili ovako dobivene rezultate s onima dobivenima korištenjem sintetskih bojila. Dobiveni rezultati su pokazali da su oba ekstrakta učinkovita u bojanju epitelnih stanica, mišićnih stanica, kolagenih vlakana i eritrocita, te su dobiveni rezultati usporedivi s onima dobivenima korištenjem boje eozin Y. Osim toga, utvrdili su da prebetanin iz vinobojke daje bolje rezultate u odnosu na betanin iz cikle [88].

3. EKSTEPRIIMENTALNI DIO

3.1. Korištene kemikalije, pribor i biljni materijal

U ovom radu korištene su svježe i suhe zrele bobice vinobojke, *Phytolacca sp. L.* Sve kemikalije koje su korištene u ovom radu su analitičke čistoće, voda koja je korištena za pripremu otopina određene pH vrijednosti i otopina uzoraka je deionizirana i demineralizirana. Popis korištenih kemikalija:

1. Klorovodična kiselina, HCl ($M = 36,46$ g/mol, Kemika)
2. Natrijev hidroksid, NaOH ($M = 39,99$ g/mol, Kemika)
3. Etanol, C₂H₅OH ($M = 46,07$ g/mol, Kemika)
4. Metanol, CH₄O ($M = 32,94$ g/mol, Kemika)
5. Aceton, C₃H₆O ($M = 58,08$ g/mol, Kemika)
6. Ultračista voda

Od pribora u radu su korištene: jažice, keramički tarionik s tučkom, staklene čaše, odmjerne tikvice, kapalice, stakleni štapić, pinceta, pipeta, staklene bočice s čepom, Eppendorf tube.

Od uređaja u radu su korišteni analitička vaga, grijaće tijelo, magnetska miješalica, uređaj za ultračistu vodu (TKA, WASSERAUFBEREITUNGSSYSTEME) i pH metar (808 Titrand, Metrohm).

3.2. Priprema otopina

Za pripremu otopina određene pH vrijednosti korištena je conc. HCl i kruti NaOH. Otopina pH vrijednosti 7 je ultračista voda te je njena pH vrijednost potvrđena pH metrom.

Kod kiselog medija, za pripremu otopina pH = 1 i pH = 2 izračunati volumen conc. HCl se pipetom kvantitativno ulio u odmjernu tikvicu te se zatim (prema pravilima priređivanja otopina u odmjernom posuđu) dodao ostatak volumena ultračiste vode. Otopine pH = 3-6 priređene su razrjeđivanjem otopine pH = 1. Svakoj pripremljenoj otopini određena je pH vrijednost pomoću pH metra. pH je po potrebi korigiran, a tolerirana razlika u pH vrijednosti iznosila je $\pm 0,1$.

Otapanjem NaOH u ultračistoj vodi pripremljen je bazični medij. Za pripremu otopine pH = 11-14 izračunata masa NaOH je dodana kvantitativno u odmjernu tikvicu uz dodatak ultračiste vode, prema pravilima priređivanja otopina u odmjernom posuđu. Otopine pH = 8-10 priređene su razrjeđivanjem iz otopine pH = 12. Svakoj pripremljenoj otopini određena je pH vrijednost pomoću pH metra. pH je po potrebi korigiran, a tolerirana razlika u pH vrijednosti iznosila je $\pm 0,1$.

3.3. Postupak i plan rada

Indikatori su priređeni gnječenjem biljnog materijala (suhe ili svježe bobice vinobojke) u tarioniku uz dodatak odabranog otapala – hladne vode, vruće vode, etanola, metanola ili acetona. U tarionik je dodano 1 g biljnog materijala na koji je potom dodano 5 mL otapala (Slika 22.). Tako pripremljenom indikatoru se odmah nakon pripreme ispitao potencijal primjene kao kiselo-baznog indikatora.

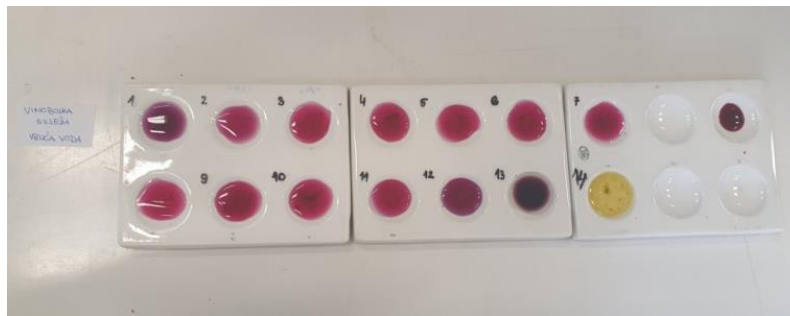


Slika 22. Indikatori pripremljeni od bobica vinobojke i odabranog otapala.

Indikator pripremljen gnječenjem suhih bobica vinobojke i vruće vode pokazuje promjene boje pri vrijednostima pH = 11-14. Promjene boje je gotovo neprimjetna pri pH = 1-10, uočava se posvjetljivanje početne boje otopine indikatora. Najintenzivnija promjena boje je pri pH = 14. Kod pH = 11-12 promjena boje je iz svijetlo ružičaste u svijetlo ljubičastu boju. Promjena boje pri pH = 13 je u svijetlo narančastu, a pri pH = 14 u svijetlo žutu boju (Slika 24.).

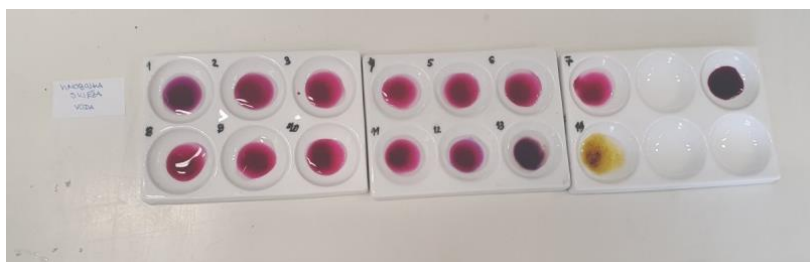
4.1.2. Indikator pripremljen od svježih bobica vinobojke i vode

Rezultati ispitivanja potencijala svježih bobica vinobojke kao kiselo-baznog indikatora u kombinaciji s vrelom ili hladnom vodom prikazani su na Slikama 25. i 26.



Slika 25. Indikator od svježih bobica vinobojke i vruće vode.

Kao što se može vidjeti iz Slike 25., indikator pripremljen od svježih bobica vinobojke i vode je tamno ružičaste boje. Može se primijetiti da je pri pH = 1 promjena boje iz tamno ružičaste u ljubičastu boju. Pri vrijednostima pH = 2-12 promjene su iz tamno ružičaste u svjetliju ružičastu boju, dok je kod pH = 13 u tamno ljubičastu boju. Najintenzivnija promjena boje je pri vrijednosti pH = 14 u žutu.



Slika 26. Indikator od svježih bobica vinobojke i hladne vode.

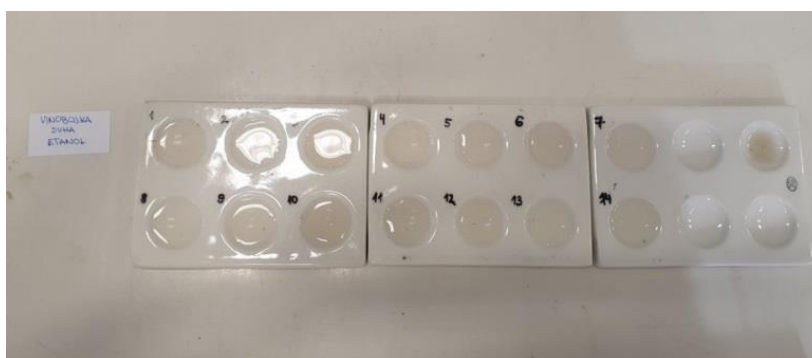
Kao što se može vidjeti iz Slike 26., indikator pripremljen od svježih bobica vinobojke i vode je tamno ružičaste boje. Promjene boje pri $\text{pH} = 1$ je iz tamno ružičaste u ljubičastu, a kod $\text{pH} = 2-12$ u svjetliju ružičastu. Pri vrijednosti $\text{pH} = 13$ dolazi do promjene boje iz tamno ružičaste u tamnoljubičastu, a najintenzivnije promjena boje je pri $\text{pH} = 14$ u žutu.

Usporedbom dobivenih rezultata za indikator pripremljenog od suhih bobica vinobojke i vode te indikator od svježih bobica vinobojke i vode, indikator od svježih bobica se pokazao boljim budući da su uočene promjene boja intenzivnije čime su i dobiveni rezultati uočljiviji. Najintenzivnije promjene boja su u jako bazičnom mediju ($\text{pH} = 13$ i $\text{pH} = 14$), kao i u jako kiselom mediju, odnosno pri $\text{pH} = 1$. Stoga se oba indikatora mogu koristiti kao indikatori jako kiselog i jako bazičnog medija.

4.2. Indikator pripremljen od zrelih bobica vinobojke i etanola

4.2.1. Indikator pripremljen od suhih bobica vinobojke i etanola

Rezultati istraživanja koji se odnose na ispitivanje potencijala suhih bobica vinobojke kao kiselobaznog indikatora u kombinaciji s etanolom prikazani su na Slici 27.



Slika 27. Indikator od suhih bobica vinobojke i etanola.

Otopina indikatora pripremljena od suhih bobica vinobojke i etanola je blijedo smeđe te je promjena boje pri raznim pH gotovo neprimjetna. Pri $\text{pH} = 13$ i $\text{pH} = 14$ mogu se primijetiti promjene boja iz blijedo smeđe u svijetlo žutu boju, dok kod $\text{pH} = 1-12$ promjene boja gotovo nisu primjetne, uočeno je samo blago posvjetljivanje početne boje indikatora (Slika 27.).

4.2.2. Indikator pripremljen od svježih bobica vinobojke i etanola

Rezultati istraživanja koji se odnose na ispitivanje potencijala svježih bobica vinobojke kao kiselo-baznog indikatora u kombinaciji s etanolom prikazani su na Slici 28.



Slika 28. Indikator od svježih bobica vinobojke i etanola.

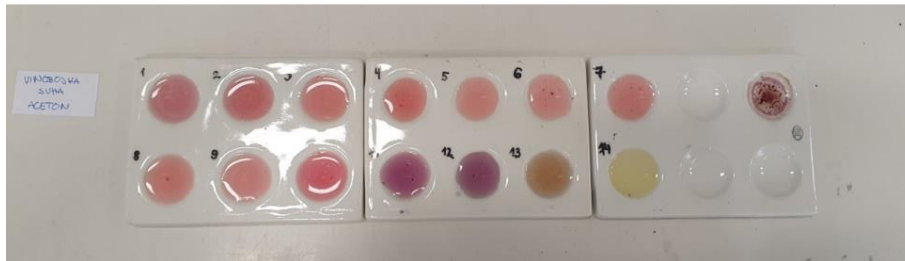
Indikator pripremljen od svježih bobica vinobojke i etanola je ružičaste boje. Pri $\text{pH} = 1-11$ promjene boja su u svijetlo ružičastu. Promjena boje pri $\text{pH} = 12$ je u svijetlo ljubičastu, a već pri $\text{pH} = 13$ u tamno ljubičastu boju. Najintenzivnija promjena je pri vrijednosti $\text{pH} = 14$ u intenzivno žutu boju (Slika 28.).

Usporedbom indikatora pripremljenih od suhih bobica i etanola te indikatora od svježih bobica i etanola, indikator od svježih bobica se pokazao boljim indikatorom. Dobiveni rezultati su zbog intenzivnijih promjena boje izuzetno uočljivi. U bazičnom mediju dolazi do najintenzivnijih promjena boja ($\text{pH} = 12-14$), a u kiselom mediju promjena početne otopine je ista, osim pri $\text{pH} = 1$ gdje dolazi do promjene boje početne otopine u ljubičastu. Budući da su oba indikatora pokazala različite boje u kiselom i u bazičnom mediju, imaju potencijal primjene kao indikatori jako kiselih i bazičnih medija. Samo što je indikator od svježih bobica znatno bolji u odnosu na indikator od suhih bobica.

4.3. Indikator pripremljen od zrelih bobica vinobojke i acetona

4.3.1. Indikator pripremljen od suhих bobica vinobojke i acetona

Rezultati istraživanja koji se odnose na ispitivanje potencijala suhих bobica vinobojke kao kiselo-baznog indikatora u kombinaciji s acetonom prikazani su na Slici 29.

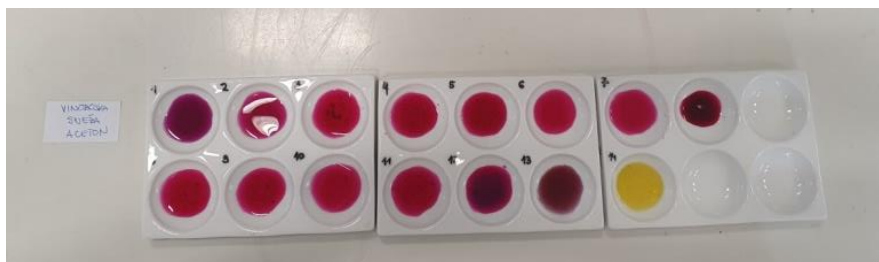


Slika 29. Indikator od suhих bobica vinobojke i acetona.

Otopina indikatora pripremljena od suhих bobica vinobojke i acetona je ružičaste boje. Promjene boja pri pH = 1-9 su iz ružičaste u svijetlo ružičastu, no već kod pH = 10 prelazi u malo tamniju ružičastu. Pri pH = 11 i pH = 12 boja se mijenja u ljubičastu (ali nisu iste), kod pH = 13 u smeđu. Najintenzivnija promjena boje je pri vrijednosti pH = 14 iz ružičaste u žutu (Slika 29.).

4.3.2. Indikator pripremljen od svježih bobica vinobojke i acetona

Rezultati istraživanja koji se odnose na ispitivanje potencijala svježih bobica vinobojke kao kiselo-baznog indikatora u kombinaciji s acetonom prikazani su na Slici 30.



Slika 30. Indikator od svježih bobica vinobojke i acetona.

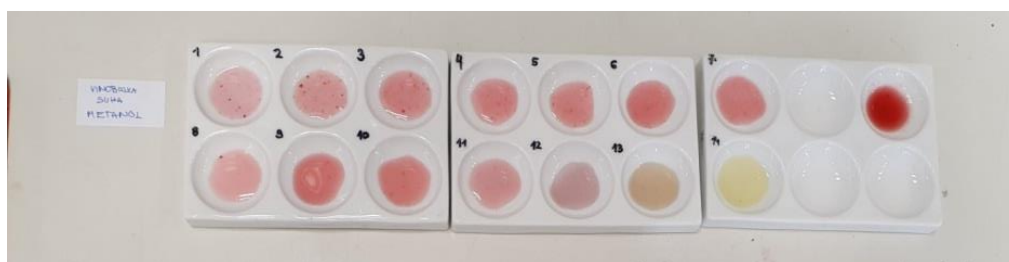
Indikator pripremljen od svježih bobica vinobojke i acetona je tamno ružičaste boje. Pri vrijednosti pH = 1 prikazuje promjenu boje u ljubičastu, a kod pH = 2-11 u svjetliju ružičastu. Pri pH = 12-13 u ljubičastu (ali nisu iste nijanse). Najintenzivnija promjena boje je kod pH = 14 u intenzivno žutu (Slika 30.).

Uspoređujući indikator pripremljen od suhih bobica i acetona te indikator od svježih bobica i acetona, indikator od svježih bobica vinobojke se pokazao boljim indikatorom budući da su dobiveni rezultati zbog intenzivnijih promjena boje uočljiviji. Do najintenzivnijih promjena boja dolazi u bazičnom mediju, pri pH = 12-14, ovisno o indikatoru. U kiselom mediju, promjena boje je jasno izražena pri pH = 1. Oba indikatora pokazuju drugačiju boju u kiselom i u bazičnom mediju pa se mogu koristiti kao kiselo-bazni indikatori. Dobiveni rezultati su slični onima u slučaju indikatora pripremljenih s etanolom.

4.4. Indikator pripremljen od zrelih bobica vinobojke i metanola

4.4.1. Indikator pripremljen od suhih bobica vinobojke i metanola

Rezultati istraživanja koji se odnose na ispitivanje potencijala suhih bobica vinobojke kao kiselo-baznog indikatora u kombinaciji s metanolom prikazani su na Slici 31.



Slika 31. Indikator od suhih bobica vinobojke i metanola.

Otopina indikatora pripremljena od suhih bobica vinobojke i metanola je crvene boje. Vrijednosti pH = 1-8 pokazuju promjene boja iz crvene u svjetlo ružičastu. Promjene boja pri pH = 9-11 su iz crvene u tamniju ružičastu. Pri pH = 12 dolazi do promjene boje u ljubičastu, kod pH = 13 u smeđe-žutu. Najintenzivnija promjena boje je pri pH = 14 u žutu (Slika 31.).

4.4.2. Indikator pripremljen od svježih bobica vinobojke i metanola

Rezultati istraživanja koji se odnose na ispitivanje potencijala svježih bobica vinobojke kao kiselobaznog indikatora u kombinaciji s metanolom prikazani su na Slici 32.



Slika 32. Indikator od svježih bobica vinobojke i metanola.

Otopina indikatora pripremljena od svježih bobica vinobojke i metanola je tamno ružičaste boje. Pri $\text{pH} = 1$ dolazi do promjene boje u svjetliju ružičastu. Zatim, promjene boja pri $\text{pH} = 2-11$ su u crveno-ružičastu, a kod $\text{pH} = 12$ u ljubičastu. Otopina $\text{pH} = 13$ pokazuje promjenu boje u smeđu. Najintenzivnija promjena boje je pri $\text{pH} = 14$ u intenzivno žutu (Slika 32.).

Usporedbom indikatora pripremljenog od suhih bobica i metanola te indikatora od svježih bobica i metanola, ponovo se indikator od svježih bobica vinobojke pokazao boljim budući da su dobiveni rezultati intenzivniji pa su i promjene uočljivije u slučaju svježih bobica. Najintenzivnije promjene boja su i ovaj put u jako bazičnom mediju i jako kiselom mediju, u slučaju oba indikatora. Kako oba indikatora daju drugačiju boju u kiselom i u bazičnom mediju, i ovi se indikatori mogu koristiti kao kiselobazni indikatori.

5. ZAKLJUČAK

U ovom radu ispitan je potencijal primjene vinobojke kao kiselo-baznog indikatora. Ispitane su svježe i suhe zrele bobice, a od otapala ispitana je hladna i vruća voda, metanol, aceton i etanol. Promjene boja se mogu primijetiti i kod primjene indikatora od suhih bobica vinobojke i kod indikatora od svježih bobica vinobojke, odnosno i suhe i svježe bobice su pokazale određeni potencijal primjene kao kiselo-bazni indikatori.

Ispitivanje provedeno na svježim bobicama vinobojke pokazuje da ovaj indikator najintenzivniju promjenu boje pokazuje pri $\text{pH} = 1$ i $\text{pH} = 12-14$, ovisno o korištenom otapalu. Tako na primjer indikator od svježih bobica i metanola pokazuje promjenu boje iz ružičaste u svjetliju ružičastu pri $\text{pH} = 1$, a pri $\text{pH} = 2-11$ u crvenkasto ružičastu, dok je kod drugih otapala promjena veoma slična (iz tamno ružičaste u svjetliju ružičastu). U bazičnom mediju dolazi do promjene boja većinom već pri $\text{pH} = 12$ (ljubičasta), $\text{pH} = 13$ (smeđa) i pri $\text{pH} = 11$ (žuta). Metanol kao otapalo pokazuje najbolje rezultate jer su uočene boje najintenzivnije. Međutim, aceton i etanol također daju vizualno odlične rezultate. Dobre rezultate daje i hladna voda, te su oni bolji od rezultata dobivenih primjenom vruće vode.

Ispitivanje provedeno na suhim bobicama vinobojke pokazuje promjenu boje pri $\text{pH} = 1$ i $\text{pH} = 12-14$. Indikator pripremljen s metanolom pokazuje promjenu boje iz crvene u svijetlo ružičastu pri vrijednostima $\text{pH} = 1-8$, dok je kod drugih otapala promjena boje veoma slična (iz ružičaste u svijetlo ružičastu). U bazičnom mediju dolazi do promjene boja većinom već pri $\text{pH} = 12$ (ljubičasta), $\text{pH} = 13$ (smeđa) i pri $\text{pH} = 11$ (žuta). Metanol opet pokazuje najbolje rezultate što se tiče vizualne interpretacije promjena boja, ali su i ostala korištena otapala (osim etanola) dala dovoljno dobre rezultate.

Indikatori pripremljeni od svježih bobica vinobojke sa svim ovdje korištenim otapalima daju intenzivnije boje nego indikatori pripremljeni od suhih bobica. Stoga se indikator od svježih bobica doima boljim indikatorom budući da su rezultati vizualno uočljiviji. Ipak, indikatori pripremljeni od suhih bobica imaju određeni potencijal primjene kao kiselo-bazni indikatori. U oba slučaja, s bilo kojim korištenim otapalom, pripremljeni indikatori su imali drugu boju u kiselom mediju u odnosu na bazični medij, čime je ispitivanje pokazalo kako se ovako pripremljeni indikatori mogu koristiti kao alternativni kiselo-bazni indikatori. Prednost ovih indikatora je što su bobice široko rasprostranjene i lako dostupne, a priprema indikatora je jednostavna i ne zahtijeva skupu i kompliciranu aparaturu ni skupa otapala.

6. LITERATurna VRELA

- [1] R. Domac, Flora Hrvatske, Školska knjiga, Zagreb, 2002.
- [2] nybg.org/content/uploads/2017/08/EcoQuest_September2017_Pokeweed_Info_Final.pdf (21. 9. 2022.)
- [3] Z. Xu, M. Deng, Phytolaccaceae, u: Identification and Control of Common Weeds: Volume 2. Springer, Dordrecht, 2017.
- [4] <https://www.cabi.org/isc/datasheet/39943> (16. 9. 2022.)
- [5] <https://www.herbal-organic.com/hr/herb/14907> (8. 9. 2022.)
- [6] <https://www.plantea.com.hr/wp-content/uploads/2015/10/vinobojka-0014.jpg> (15. 8. 2022.)
- [7] https://www.fs.usda.gov/wildflowers/plant-of-the-week/phytolacca_americana.shtml (16.09.2022.)
- [8] <https://www.plantea.com.hr/wp-content/uploads/2015/01/vinobojka-1.jpg> (15. 8. 2022.)
- [9] V. Gligić, Etimološki botanički rečnik, Veselin Masleša, Sarajevo, 1953.
- [10] Lj. Grlić, Enciklopedija samoniklog jestivog bilja, August Cesarec, Zagreb, 1990.
- [11] N. Hulina, Korovi, Školska knjiga, Zagreb, 1998.
- [12] T. Nikolić, B. Mitić, I. Boršić, Flora Hrvatske: invazivne biljke, Alfa, Zagreb, 2014.
- [13] <https://hr.garden-landscape.com/pokeweed-plants-against-slugs-and-snails-care-of-berry-6571> (8. 9. 2022.)
- [14] <https://pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Phytolacca+acinosa> (8. 9. 2022.)
- [15] https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/f/ff/Phytolacca_acinosa_fruits01.jpg/800px-Phytolacca_acinosa_fruits01.jpg
- [16] U. P. Hedrick, Sturtevant's Edible Plants of the World, Dover Publications, 1972.
- [17] T. Tanaka, Tanaka's Cyclopaedia of Edible Plants of the World, Keigaku Publishing, 1976.
- [18] S. Facciola, Cornucopia - A Source Book of Edible Plants, Kampong Publications, 1990.
- [19] <https://thumbs.dreamstime.com/b/green-indian-pokeweed-phytolacca-acinosa-plant-garden-green-indian-pokeweed-phytolacca-acinosa-plant-summer-garden-248738619.jpg> (8. 9. 2022.)
- [20] H. C. Yeung, Handbook of Chinese Herbs and Formulas, Institute of Chinese Medicine, Los Angeles, 1985.
- [21] G. A. Stuart, Chinese Materia Medica, Southern Materials Centre, Taipei, 1911.
- [22] J. A. Duke, E. S. Ayensu, Medicinal Plants of China, Reference Publications, 1985.

- [23] D. Bown, Encyclopaedia of Herbs and their Uses, Dorling Kindersley, London, 1995.
- [24] <https://sciencing.com/common-acid-base-indicators-8375206.html> (16. 8. 2022.)
- [25] <https://sciencing.com/function-litmus-paper-5072700.html> (22. 8. 2022.)
- [26] https://edutorij.e-skole.hr/share/proxy/alfresco-noauth/edutorij/api/proxy-guest/4874fe79-8302-4ea2-b516-4657ea249026/content/uploads/kemija-7/m01/j07/C0266772-Litmus_paper-SPL.jpg?v=20180727 (8. 9. 2022.)
- [27] <https://edutorij.e-skole.hr/share/proxy/alfresco-noauth/edutorij/api/proxy-guest/4d903566-3e87-45ae-9299-e35942520b45/kiselo-bazne-reakcije.html> (22. 8. 2022.)
- [28] <https://www.thoughtco.com/definition-of-ph-indicator-60549> (22. 8. 2022.)
- [29] <https://glossary.periodni.com/rjecnik.php?hr=univerzalni+indikator> (22. 8. 2022.)
- [30] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/10303> (22. 8. 2022.)
- [31] <https://www.sigmaaldrich.com/HR/en/substance/methylred26930493527> (22. 8. 2022.)
- [32] https://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB1112962.htm (22. 8. 2022.)
- [33] <https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2Fs40828-016-0026-4.pdf> (23. 8. 2022.)
- [34] https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/b/b4/Methyl_red.svg/800px-Methyl_red.svg.png (22. 8. 2022.)
- [35] <https://db.degruyter.com/view/IUPAC/iupac.compound.4764> (23. 8. 2022.)
- [36] <https://byjus.com/chemistry/phenolphthalein/> (23. 8. 2022.)
- [37] <https://www.britannica.com/science/phenolphthalein> (23. 8. 2022.)
- [38] <https://hr.thpanorama.com/articles/qumica/fenolftalena-c20h14o4-estructura-qumicapropiedades.html> (23. 8. 2022.)
- [39] <https://www.medicinenet.com/script/main/art.asp?articlekey=13444> (23. 8. 2022.)
- [40] <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/50/Phenolphthalein.png> (23. 8. 2022.)
- [41] <https://protonstalk.com/acids-bases-salts/methyl-orange/> (23. 8. 2022.)
- [42] <https://www.researchgate.net/profile/Sharifah-Bee-Abd-Hamid/publication/277977827/figure/fig1/AS:1086773652402200@1636118438440/Structural-formula-of-methyl-orange.jpg> (23. 8. 2022.)
- [43] <https://www.fishersci.com/shop/products/methyl-yellow-indicator/AAB2114514> (23. 8. 2022.)
- [44] https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/6/61/Methyl_yellow.svg/1200px-Methyl_yellow.svg.png (23. 8. 2022.)
- [45] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Phenol-red> (24. 8. 2022.)

- [46] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/imgsrv.fcgi?cid=4766&t=1> (24. 8. 2022.)
- [47] <https://hr.thpanorama.com/articles/quimica/azul-de-bromotimol-estructura-propiedades-preparacin-y-usos.html> (24. 8. 2022.)
- [48] <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/0e/Bromothymol-blue-2D-skeletal.png> (24. 8. 2022.)
- [49] https://3.bp.blogspot.com/-Wkdx1zbPmK0/WQNY3y2GkdI/AAAAAAAAAHsQ/NaYadX7_8bQ2t1LYHycLYeYT_R1Vuw9CACK4B/s1600/Bromothymol_blue_colors_at_different_pH.png (24. 8. 2022.)
- [50] <https://www.toppr.com/guides/science/acids-bases-and-salts/natural-indicators-around-us/> (26. 8. 2022.)
- [51] <https://d19p4plxg0u3gz.cloudfront.net/3320d284-8f23-11ec-9db7-0242ac12001f/v/250b251e-2baa-11ec-b283-3a925a8303a3/1280x854-250c87c4-2baa-11ec-b71b-3a925a8303a3.jpeg> (26. 8. 2022.)
- [52] <https://www.americanscientist.org/article/curious-chemistry-guides-hydrangea-colors> (16. 9. 2022.)
- [53] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/imgsrv.fcgi?cid=443650&t=1> (16. 9. 2022.)
- [54] <https://zenodo.org/record/1048226#.Ywk9hXZBxPZ> (26. 8. 2022.)
- [55] <https://www.embibe.com/exams/natural-indicators/> (9. 9. 2022.)
- [56] <https://uwaterloo.ca/chem13-news-magazine/sites/ca.chem13-news-magazine/files/uploads/images/08-04.png> (9. 9. 2022.)
- [57] https://cdn.useful-plants.net/9959828/rose_de_chine_floraison-_arrosage_et_conseils_damp039entretien.jpg.webp (9. 9. 2022.)
- [58] <https://assets.sutori.com/user-uploads/image/3e342777-775f-48d8-83af-af3e87ecfc90/6220f048da4775079a9809c6bcbba044.jpeg> (9. 9. 2022.)
- [59] <https://www.sciencesource.com/archive/Image/Grape-juice-indicator-SS2771007.html> (9. 9. 2022.)
- [60] <https://brzirecepti.info/wp-content/uploads/2016/09/sok-od-grozdja.jpg> (9. 9. 2022.)
- [61] <https://www.thoughtco.com/home-and-garden-ph-indicators-601971> (9. 9. 2022.)
- [62] <https://alternativa-za-vas.com/images/uploads/crveni-luk.jpg> (9. 9. 2022.)
- [63] J. He, M. Giusti, *Ann. Rev. Food Sci. Technol.* **1** (2010), 163-187.
- [64] O. M. Andersen, M. Jordheim, *The anthocyanins. U: Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications*, CRC Press, Taylor and Francis, Boca Raton (2006).
- [65] J. Fang, *Nutrition* **31** (2015), 1301-1306.

- [66] T. C. Wallace, M. M. Giusti, *Anthocyanins in Health and Disease*, CRC Press, New York, 2014.
- [67] K. Gould, K. Davies, C. Winefields, (Eds.) *Anthocyanins, Biosynthesis, Functions and Applications*, Springer-Verlag, New York, 2009.
- [68] N. Motohashi, H. Sakagami, *Topics Heterocyclic Chem.* **15** (2008), 1-48.
- [69] C. Manach, J. L. Donovan, *Free Radical Res.* **38** (2004), 771-785.
- [70] F. Pina, J. Oliveira, V. de Freitas, Anthocyanins and derivatives are more than flavylum cations, *Tetrahedron* **71** (2015), 3107-3114.
- [71] F. Pina, M. J. Melo, C. A. T. Laia, J. Parola, J. C. Lima, *Chem. Soc. Rev.* **41** (2012), 896-908.
- [72] S. Silva, E. M. Costa, C. Calhau, R. M. Morais, M. E. Pintado, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **57** (2017), 3072-3083.
- [73] V. Petrov, S. Slavcheva, S. Stanimirov, F. Pina, *J. Phys. Chem. A.* **119** (2015), 2908-2918.
- [74] F. Pina, *Dyes Pigments* **102** (2014), 308-314.
- [75] R. L. Prior, X. Wu, *Free Radical Res.* **40** (2006), 1014-1028.
- [76] <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/thumb/c/cd/Anthocyanidine.svg/1200px-Anthocyanidine.svg.png> (16. 9. 2022.)
- [77] M. P. Kahkonen, M. Heinonen, *J. Agric. Food Chem.* **51** (2003), 628-633.
- [78] M. M. Giusti, L. E. Rodríguez-Saona, D. Griffin, R. E. Wrolstad, *J. Food Agric. Chem.* **47** (1999), 4657-4664.
- [79] C. L. Zhao, Y. Q. Yu, Z. J. Chen, G. S. Wen, F. G. Wei, Q. Zheng, C. D. Wang, X. L. Xiao, *Food Chem.* **214** (2017), 119-128.
- [80] O. M. Andersen, K. R. Markham, *Flavonoids, Chemistry, Biochemistry and Applications*, Taylor and Francis, Boca Raton, 2006.
- [81] F. J. Heredia, E. M. Francia-Aricha, J. C. Rivas-Gonzalo, I. M. Vicario, C. Santos-Buelga, *Food Chem.* **63** (1998), 491-498.
- [82] <https://www.intechopen.com/chapters/55599> (16. 9. 2022.)
- [83] Jerz G., T. Skotzki, K. Fiege, P. Winterhalter, S. Wybraniec *J. Chromatogr. A* **1190** (2008), 63-73.
- [84] <http://www.chemspider.com/ImagesHandler.ashx?id=4885085&w=250&h=250> (16. 9. 2022.)
- [85] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/imgsrv.fcgi?cid=135926591&t=1> (16. 9. 2022.)
- [86] <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/imgsrv.fcgi?cid=11953909&t=1> (16. 9. 2022.)

[87] D. Strack, T. Vogt, W. Schliemann, *Phytochemistry* 62 (2003), 247-269.

[88] H. A. Alshamar, N. A. Hatem, R. W. Dapson, *Biotech. Histochem.* 97 (2022), 480-489.