



تهیه رنگدانه سدیم-مس-کلروفیلین از برگ گیاه ازگیل جنگلی (*Mespilus germanica* L.

سینا کریم دوست

دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

فایزه بیات

دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان

سهیلا زرین قلمی

دانشیار و استاد گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه زنجان، زنجان، ایران

چکیده

در تحقیق حاضر به منظور تهیه کمپلکس سدیم-مس-کلروفیلین به عنوان یک رنگدانه سبز رنگ رایج در صنعت غذا، از برگ های گیاه ازگیل جنگلی استفاده شد. پس از استخراج کلروفیل و تهیه کمپلکس جهت ارزیابی کارایی روش مورد استفاده، راندمان، رنگ، بافت، حلالیت، pH و جذب نمونه در مقایسه با نمونه تجاری مورد بررسی قرار گرفت. در آخر میزان کلروفیل و ترکیبات فنولی به عنوان ترکیبات زیست فعال مورد ارزیابی قرار گرفت. مطابق نتایج بیشترین بازده استخراج در نسبت های جامد به حلال ۱:۶۰ و ۱:۳۰ به دست آمد. نمونه های تهیه شده حلالیت کامل در آب، حلالیت جزئی در اتانول و نامحلول بودن در کلروفرم را نشان دادند و رنگی بین سبز تا سیاه و بافت پودری با pH ۹.۸ داشتند. مقدار کلروفیل کل در برگ درخت ازگیل جنگلی و نمونه کمپلکس تهیه شده به ترتیب ۳/۴۳ و ۴۸/۶ میکروگرم بر میلی گرم و محتوای فنول کل آن ۰/۷۴ میلی گرم بر گرم گالیک اسید بر گرم عصاره به دست آمد. مقایسه اسپکترومتری نمونه تهیه شده با نمونه تجاری، پیک هایی را به ترتیب در طول موج 405 ± 5 نانومتر و 630 ± 5 نانومتر نشان داد. برابری در قله های جذب هر دو نمونه تجاری و تهیه شده، معتبر بودن رنگدانه تهیه شده را تایید می کند. باتوجه به نتایج به دست آمده این کمپلکس می تواند پس از آزمون های تکمیلی به عنوان ترکیب رنگی حاوی ترکیبات زیست فعال برای تولید محصولات غذایی جدید پیشنهاد شود.

واژگان کلیدی: رنگدانه، سدیم-مس-کلروفیلین، ازگیل جنگلی، ترکیبات زیست فعال

مقدمه

امروزه نگرانی مصرف کنندگان درباره ایمنی رنگدانه های سنتزی و مزایای سلامت بخش رنگدانه های طبیعی باعث شده که صنعت غذا مصرف رنگدانه های سنتزی را محدود کند. درواقع رنگدانه های سنتزی در اتحادیه اروپا و آمریکای شمالی به ترتیب فقط ۱۶ و ۲۹ درصد از رنگدانه های غذایی را تشکیل می دهند (Simon et al., 2017).

رنگ های طبیعی خوراکی را می توان براساس منشأ (گیاهی، حیوانی، باکتریایی، قارچی و غیره)، رنگ (قرمز، سبز، بنفش، آبی، سبز و غیره) یا ساختار شیمیایی آن ها تقسیم بندی کرد؛ که شامل مشتقات فلاوونوئیدی^۱ (آنتوسیانین ها^۲)، ایزوپرنوئیدی^۳ (کاروتنوئیدها^۴)، نیتروژن هتروسیکلیک (بتالین ها^۵) و پیرول^۶ یا کلروفیل ها^۷ هستند. کلروفیل یک کمپلکس رنگدانه سبز است که به طور طبیعی در گیاهان، جلبک ها و باکتری های خاص یافت می شود و با جذب انرژی نور و تبدیل آن به انرژی شیمیایی، نقش مهمی در فرآیند فتوسنتز دارد (Björn et al., 2009). رنگدانه کلروفیل (E140i) که پس از استخراج مستقیم با حلال از مواد گیاهی سبز نظیر یونجه، گزنه، اسفناج به بازار عرضه می شود، عمدتاً از کلروفیل a و b به همراه مشتقات فتوفیتین مربوط به آن ها تشکیل شده است. نسبت کلروفیل به فتوفیتین موجود در رنگدانه ها به شرایط و روش تولید بستگی دارد و بین تامین کنندگان مختلف بسیار متغیر است (Viera et al., 2019). علاوه بر این، کلروفیل موجود در رنگدانه بسیار حساس بوده و طی فرآوری ماده غذایی تخریب می شود و به رنگ قهوه ای تغییر رنگ پیدا می کند که یک فرآیند نامطلوب در صنایع غذایی محسوب می شود.

رنگدانه سبز طبیعی (E140ii) که معمولاً کلروفیلین^۸ نامیده می شود؛ در اصل به مشتقات کلروفیل تولید شده پس از صابونی شدن کلروفیل بدون تغییر رنگ آن اشاره دارد. البته توجه به این نکته هم لازم و ضروری است که اصطلاح فعلی کلروفیلین ها کامل نیست زیرا تعریف دقیق شیمیایی کلروفیلین ها مشتقات کلروفیل را با یک یون منیزیم مرکزی دست نخورده بیان می کند. کمپلکس کلروفیلین ترکیبی از کمپلکس سدیم-مس سنتز شده از کلروفیل است که اتم منیزیم موجود در مرکز کلروفیل با مس جایگزین می شود و انتهای فیتول^۹ خود را از دست می دهد (Banu & Pavithra, 2015). این کمپلکس یک رنگدانه خوراکی مجاز مورد تایید کدکس^{۱۰}، سازمان غذا و دارو سازمان ملل متحد (FAO^{۱۱})، سازمان بهداشت جهانی (WHO^{۱۲}) و کمیته تخصصی افزودنی های غذایی (JECFA^{۱۳}) و در بیشتر کشورها از جمله چین، ایالات متحده، اتحادیه اروپا (EU)، کره و ژاپن است. این رنگدانه در محصولات غذایی مختلف نظیر جلبک های دریایی، کنسروهای میوه، سبزیجات، آدامس، آب نبات و ... مورد استفاده قرار گرفته است. اتحادیه اروپا و کدکس مصرف روزانه مجاز تا ۱۵ میلی گرم بر وزن بدن در روز (mg/kgbw/day) را

¹ flavonoid

² anthocyanins

³ isoprenoid

⁴ carotenoids

⁵ betalains

⁶ pyrrole

⁷ chlorophylls

⁸ chlorophyllin

⁹ phytol

¹⁰ CODEX

¹¹ Food and Agriculture Organization

¹² World Health Organization

¹³ The Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives

برای این رنگدانه تعیین کرده‌اند؛ درحالی که اداره غذا و داروی ایالات متحده (FDA^{۱۴}) ۷.۵ میلی گرم بر وزن بدن در روز مصرف کمپلکس سدیم-مس-کلروفیلین را مجاز دانسته است (Dusemund et al., 2012). چند گزارش در مورد سنتز رنگدانه سدیم-مس-کلروفیلین از برگ‌های گیاهان مختلف نظیر اسفناج، بامبو، شیرین برگ^{۱۵}، سگ‌واش^{۱۶}، تمر هندی^{۱۷}، تاماریلو^{۱۸}، پاپایا^{۱۹}، کاتوک^{۲۰}، آلوئه‌ورا و غیره وجود دارد (Banu & Pavithra, 2015; Jubert et al., 2009; Majbaududdin et al., 2015; Suparmi et al., 2016). ازگیل جنگلی با نام علمی مسپیلوس جرمینیکا^{۲۱} عضوی از خانواده رزسه^{۲۲} است که در شمال ایران با نام محلی کنوس^{۲۳} یا کندوس^{۲۴} شناخته می‌شود. میوه قهوه‌ای رنگ آن قطر ۱/۵ تا ۳ سانتی‌متر دارد و برگ‌ها بزرگ، سبز تیره، بیضوی با طول ۸ تا ۱۵ سانتی‌متر و عرض ۳ تا ۴ سانتی‌متر هستند (Safari & Ahmady-Asbchin, 2019; Yolmeh & Sadeghi, 2018). نوع بومی آن در ایران به‌طور گسترده در جنگل‌های گیلان، مازندران و گلستان یافت می‌شود. میوه‌ها و برگ‌های آن در طب ایرانی دارای خواص دارویی و فواید پزشکی متعدد مانند دفع سنگ کلیه و مثانه، درمان یبوست، ادرارآور و همچنین درمان فشارخون بالا، تپش قلب، عفونت‌های دهان و گلو و درمان اسهال کاربرد دارد (Bibalani & Sayadmahaleh, 2012; Lim, 2012). از آنجایی که تاکنون هیچ گزارش مبنی بر سنتز کمپلکس سدیم-مس-کلروفیلین با منشاء کلروفیل حاصل از برگ درخت ازگیل جنگلی وجود ندارد، این تحقیق با هدف سنتز کمپلکس سدیم-مس-کلروفیلین محلول در آب از برگ این گیاه انجام شده است.

روش تحقیق

تجزیه و تحلیل داده‌های حاصل از حداقل ۳ بار تکرار در قالب طرح کامل تصادفی و به روش تجزیه و تحلیل واریانس مورد بررسی قرار گرفت و مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون توکی در سطح اطمینان ۹۵ درصد با استفاده از نرم افزار Minitab نسخه ۱۶ انجام شد.

مواد و روش‌ها

سنتز کمپلکس سدیم-مس-کلروفیلین

برگ‌های تازه گیاه ازگیل جنگلی از روستای اوشیان، چابکسر، استان گیلان، شمال ایران جمع‌آوری و در دمای اتاق در سایه پهن شد تا خشک شوند، سپس به آن انتقال داده شد و به مدت ۱۸ ساعت در دمای ۴۰ درجه سلسیوس نگهداری شد تا رطوبت برگ‌ها به زیر ۱۰٪ رسید (Safari & Ahmady-Asbchin, 2019). سنتز کمپلکس سدیم-مس-کلروفیلین با استفاده از روش سورس^{۲۵} و همکاران (۲۰۲۲) با کمی تغییر انجام شد. به منظور تعیین نسبت مناسب حلال به ماده جامد در استخراج، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ گرم از برگ خشک شده ازگیل جنگلی توزین و در هاون کاملاً خرد شد و سپس به آن ۳۰۰ میلی‌لیتر اتانول

¹⁴ Food and Drug Administration

¹⁵ *Scoparia dulcis* L

¹⁶ *Cynodon dactylon* L

¹⁷ *Tamarindus indica* L

¹⁸ *Solanum trilobatum* L

¹⁹ *Carica papaya* L

²⁰ *Sauropus androgynus* L

²¹ *Mespilus germanica* L

²² *Rosaceae*

²³ *Conos*

²⁴ *Condos*

²⁵ *Suresh*

۶۵٪ اضافه شد. سپس به یک ظرف انتقال و به مدت ۱۰ دقیقه در حمام آب گرم در دمای ۶۵ درجه سلسیوس قرار داده شد. پس از ۱۰ دقیقه ۲۰ میلی لیتر سود ۵٪ به منظور انجام فرآیند صابونی شدن و حذف بقایای سلولی اضافه شد و با سرعت ثابت به مدت ۲۰ دقیقه هم زده شد. سپس نمونه ها با دور ۴۵۰۰ rpm و مدت زمان ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ شد. مواد رویی جمع آوری و ۱۵ میلی لیتر CuSO_4 ۲۰٪ به آن افزوده شد. ظرف حاوی نمونه به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب گرم قرار داده شد تا مس-کلروفیلین به دست آمد. سپس محلول سود ۲٪ اضافه شد تا زمانی که pH به ۹.۶ برسد و کمپلکس سدیم-مس-کلروفیلین به دست آید. سپس نمونه با دور ۴۵۰۰ rpm و مدت زمان ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. مواد رویی دور ریخته شد و ماده باقی مانده جمع آوری و تا رطوبت کمتر از ۵٪ خشک شد. در نهایت نمونه های خشک شده در شیشه های درب دار ریخته شد و برای ادامه تحقیقات در یخچال با دمای ۴ درجه سلسیوس نگهداری شد.

بازده

راندمان استخراج براساس فرمول (۱) محاسبه شد (Suresh et al., 2022).

رنگ و بافت

نمونه های کمپلکس مس-سدیم-کلروفیلین تهیه شده روی کاغذ سفید قرار گرفتند و رنگ و بافت زیر نور طبیعی به دقت بررسی شد (Singh et al., 2020).

حلالیت

حلالیت جزئی و کامل کمپلکس سدیم-مس-کلروفیلین تهیه شده با حل کردن آن در آب، اتانول و کلروفرم به طور جداگانه مورد آزمایش قرار گرفت.

pH

برای تخمین pH محلول ۱٪ از نمونه تهیه شد و pH آن اندازه گیری شد و با محدوده ذکر شده در استاندارد مقایسه شد.

بررسی پیک جذب کمپلکس سدیم-مس-کلروفیلین

برای تایید اینکه کمپلکس درست تهیه شده است، جذب نمونه ها با نمونه استاندارد تهیه شده از Sigma Chemical Co. (شماره محصول C6003-100 G؛ خلوص ۹۹٪) و با پیروی از استاندارد ذکر شده در گزارش GAIN ۲۰۱۱ مقایسه شد (Singh et al., 2020). مقدار مشخصی از نمونه های کمپلکس مس-سدیم-کلروفیلین تهیه شده در آب مقطر حل شد و سپس با استفاده از کاغذ صافی واتمن برای حذف ناخالصی ها فیلتر شد. میزان جذب نمونه کمپلکس سدیم-مس-کلروفیلین تهیه شده و نمونه تجاری در محدوده ۳۴۰ تا ۷۰۰ نانومتر با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتری UV-VIS (spectro 250, analytjena,) (Analytik Jena AG, Germany) خوانده شد. کمپلکس سدیم-مس-کلروفیلین استاندارد نشان دهنده پیک های 405 ± 5 نانومتر و 630 ± 5 نانومتر بود که با نمونه کمپلکس مس-سدیم-کلروفیلین تهیه شده مقایسه شد.

تخمین میزان کلروفیل برگ و کمپلکس سدیم-مس-کلروفیلین

۱۰۰ میلی گرم از برگ از گیل جنگلی وزن شد و در هاون به همراه ۱۰ میلی لیتر استون ۸۰٪ خرد و سپس با دور ۴۵۰۰ rpm و مدت زمان ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ شد. برای کمپلکس سدیم-مس-کلروفیلین سنتز شده از عصاره برگ از گیل جنگلی ۱۰ میلی گرم از آن با ۱۰ میلی لیتر استون ۸۰٪ ترکیب شد. سپس به لوله فالکن منتقل شد و در دور ۵۰۰۰ rpm برای مدت زمان ۱۵ دقیقه

سانتریفیوژ شد. جذب مایع رویی در ۶۴۵ نانومتر و ۶۶۳ نانومتر به ترتیب برای کمپلکس سدیم-مس-کلروفیلین در برابر حلال (۸۰ درصد استون) به عنوان نمونه فاقد جزء آزمایشی، خوانده شد. در نهایت کلروفیل کل در کمپلکس سدیم-مس-کلروفیلین و برگ درخت ازگیل جنگلی با استفاده از فرمول (۲) محاسبه گردید که در این فرمول A جذب در طول موج خاص، V حجم نهایی محلول کلروفیل در استون ۸۰٪ و W وزن برگ می باشد (Arnon, 1949; Suresh et al., 2022).

تعیین محتوای فنل کل^{۲۶} کمپلکس سدیم-مس-کلروفیلین

میزان کل ترکیبات فنولی با روش فولین-سیوکالتو اندازه گیری و نتایج بر حسب میلی گرم معادل گالیک اسید در گرم عصاره بیان شد. اساس این روش که از متداول ترین روش های اندازه گیری ترکیبات فنولی می باشد، احیای معرف فولین توسط ترکیبات فنولی در محیط قلیایی و ایجاد کمپلکس آبی رنگ است که حداکثر جذب را در ۷۶۰ نانومتر نشان می دهد. در این روش ابتدا ۰/۱ گرم از نمونه با ۱۰ میلی لیتر آب مقطر و سپس با ۲/۵ میلی لیتر فولین رقیق شده به نسبت ۱:۱۰ (درصد وزنی وزنی) مخلوط و پس از نگهداری به مدت پنج دقیقه در تاریکی با ۲ میلی لیتر سدیم کربنات ۷/۵ درصد مخلوط و بعد از ۲ ساعت نگهداری در تاریکی عدد جذب در طول موج ۷۶۰ نانومتر خوانده شد. مقدار ترکیبات فنولی کل موجود عصاره بر اساس منحنی استاندارد گالیک اسید محاسبه شد (Sharma et al., 2015; Yu et al., 2003).

یافته ها

اندازه گیری راندمان استخراج

تغییر در گرم وزن برگ خشک شده ازگیل جنگلی از ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵ و ۳۰ گرم در ۳۰۰ میلی لیتر اتانول ۶۵٪ با نسبت ماده جامد به حلال ۱:۶۰، ۱:۳۰، ۱:۲۰، ۱:۱۵، ۱:۱۲ و ۱:۱۰ در مدت زمان ۲۴ ساعت مورد بررسی قرار گرفت، نتایج نشان داد که با کاهش مقدار ماده جامد به حلال (افزایش میزان حلال) راندمان استخراج نیز افزایش پیدا خواهد کرد، یعنی بیشترین راندمان استخراج در نسبت های ۱:۶۰ (۵ گرم برگ خشک شده) و ۱:۳۰ (۱۰ گرم برگ خشک شده) به دست آمد (شکل ۱). نتایج به دست آمده با قانون انتقال جرم مطابقت داشت. براساس این قانون افزایش حجم حلال بر افزایش گرادیان غلظت بین ماده گیاهی و فاز مایع (حلال) تاثیر می گذارد در نتیجه انتشار مواد محلول از گیاه را افزایش می دهد (Osmić et al., 2019).

حلالیت، رنگ و بافت

طبق استاندارد ذکر شده در گزارش GAIN ۲۰۱۱ (Singh et al., 2020) این رنگدانه یا کمپلکس از نظر رنگی باید بین سبز تا سیاه و از نظر بافت باید بصورت پودر باشد. نمونه های تهیه شده به رنگ سبز بوده و دارای بافت پودری بودند (شکل ۲). طبق استاندارد ذکر شده در گزارش GAIN ۲۰۱۱ (Singh et al., 2020) رنگدانه باید کاملاً محلول در آب، نیمه محلول در اتانول و نامحلول در کلروفرم باشد. نمونه های تهیه شده در تحقیق حاضر نیز حلالیت کامل در آب، حلالیت جزئی در اتانول و نامحلول بودن در کلروفرم را نشان دادند (شکل ۳). این امر نشان دهنده ماهیت قطبی رنگدانه تهیه شده در مقایسه با کلروفیلین است که به دلیل از دست دادن اتم منیزیم مرکزی و جایگزین شدن با مس که باعث از دست رفتن انتهای فیتول کلروفیلین می شود باعث این انحلال پذیری در آب است (Banu & Pavithra, 2015).

pH

طبق استاندارد GAIN ۲۰۱۱ pH محلول کمپلکس سدیم-مس-کلروفیلین ۱٪ باید بین ۹.۵ تا ۱۱ باشد pH محلول تهیه شده از

²⁶ Total Phenolic Compounds (TPC)

نمونه به دست آمده نیز ۹.۸ بود (Singh et al., 2020).

اندازه‌گیری میزان کلروفیل کل در برگ و کمپلکس سدیم-مس-کلروفیلین

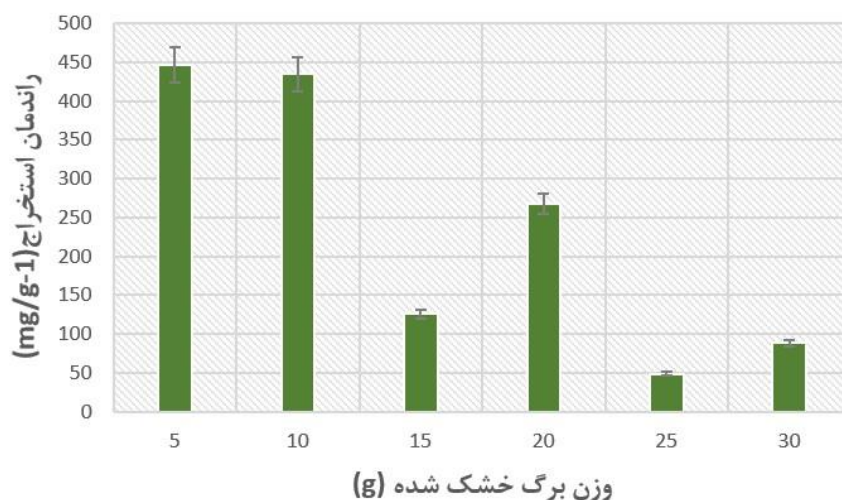
کلروفیل یک مولکول فعال زیستی مهم در گیاهان برای انجام فرآیندهای فتوسنتز و تامین انرژی برای گیاهان در حال رشد است. این ترکیب زیست‌فعال کاربردهای برجسته‌ای در زمینه غذایی و دارویی دارد (Speer, 1997). کلروفیل در شکل طبیعی خود بسیار به نور حساس است و به سرعت تجزیه می‌شود (Koca et al., 2007). مقدار کلروفیل کل در برگ درخت ازگیل جنگلی ۳/۴۳ میکروگرم بر میلی‌گرم به دست آمد که نسبت به گزارش مقدار کلروفیل برگ آلوئه‌ورا توسط سورش و همکاران (۲۰۲۲) (۰/۷۴۱ میکروگرم بر میلی‌گرم) چندبرابر بالاتر بود که نشان‌دهنده پتانسیل بالای این گیاه جهت سنتز رنگدانه سدیم-مس-کلروفیلین است. محتوای کلروفیل در کمپلکس سدیم-مس-کلروفیلین هم ۴۸/۶ میکروگرم بر میلی‌گرم اندازه‌گیری شد که نشان‌دهنده مقادیر بالای کلروفیل در نمونه حاصل از سنتز برگ درخت ازگیل جنگلی است. که این مقدار در نمونه برگ آلوئه‌ورا تنها ۴/۹ میکروگرم بر میلی‌گرم گزارش شده است.

نتایج آزمون تاییدی برای خلوص کمپلکس سدیم-مس-کلروفیلین

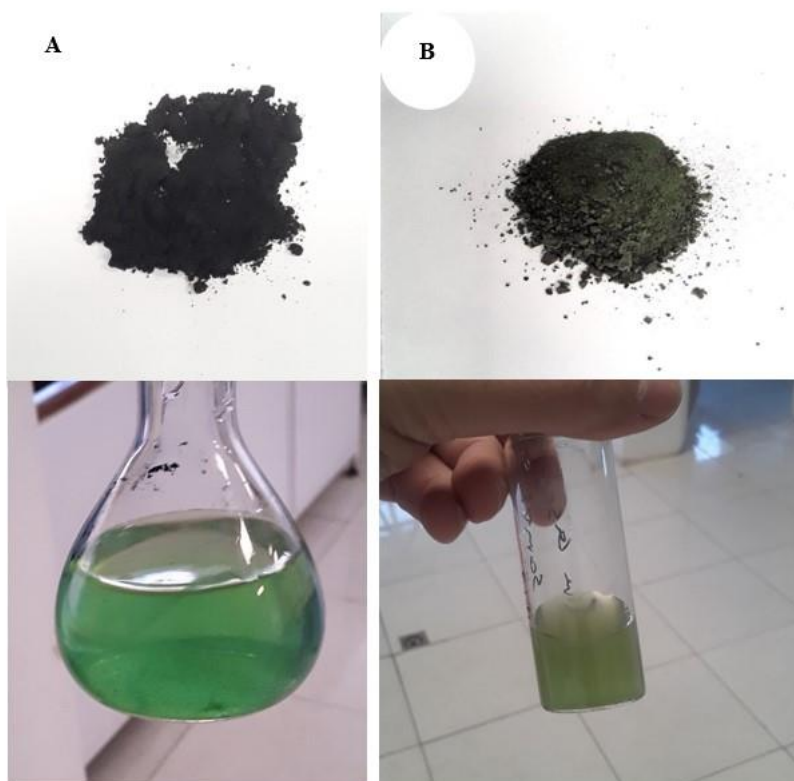
باتوجه به استاندارد کمپلکس سدیم-مس-کلروفیلین باید پیک‌های جذب را در محدوده طول موج ۳۴۰ تا ۷۰۰ نانومتر نشان دهد و باید دو قله یکی در طول موج 405 ± 5 نانومتر و دیگری 630 ± 5 نانومتر وجود داشته باشد (Singh et al., 2020). بررسی پیک جذب نمونه‌های تهیه‌شده با تعیین حداکثر جذب آن‌ها و مقایسه آن با حداکثر جذب نمونه تجاری تهیه‌شده از بازار به روش اسپکتوفتومتری نشان داد که هر دو نمونه پیک‌هایی را به ترتیب در طول موج 405 ± 5 نانومتر و 630 ± 5 نانومتر نشان دادند (شکل ۴). برابری در قله‌های جذب هر دو نمونه تجاری و تهیه‌شده، معتبر بودن رنگدانه تهیه شده را تایید می‌کند.

اندازه‌گیری محتوای فنل کل کمپلکس سدیم-مس-کلروفیلین

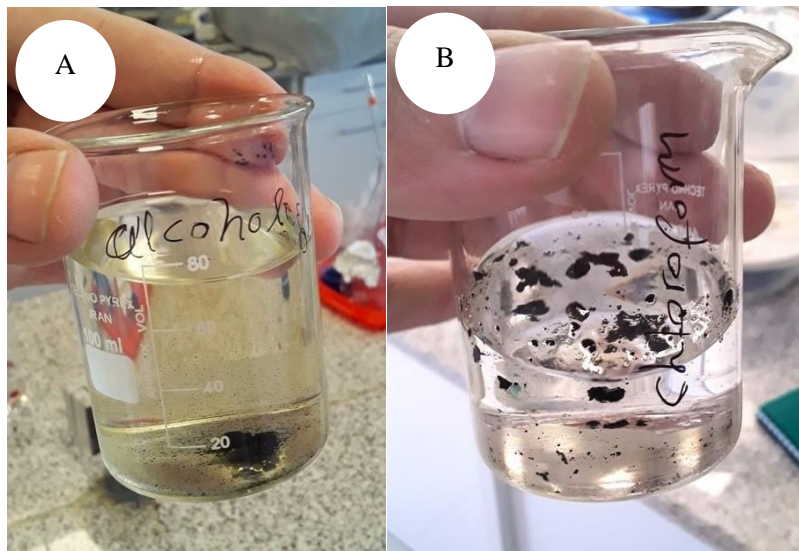
ترکیبات فنلی از آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی موجود در گیاهان هستند و معمولاً با استفاده از روش فولین-سیوکالتو اندازه‌گیری می‌شوند. در این تحقیق محتوای فنل کل در کمپلکس سدیم-مس-کلروفیلین سنتز شده از برگ درخت ازگیل جنگلی ۰/۷۴ میلی‌گرم بر گرم گالیک‌اسید بر گرم عصاره بود. اطلاعات کمی در مورد محتوای فنل کل کمپلکس‌های سنتز شده توسط سایر گونه‌های گیاهی در دسترس است اما در مطالعه‌ای که توسط صفری و همکاران (۲۰۱۹) انجام شد میزان فنل کل عصاره متانولی برگ درخت ازگیل جنگلی ۳۸۰ میلی‌گرم گالیک‌اسید بر گرم عصاره خشک گزارش شد. این نتیجه نشان می‌دهد که عصاره متانولی برگ درخت ازگیل جنگلی در مقایسه با سایر گیاهانی که در سال‌های اخیر گزارش شده میزان ترکیبات فنولی بیشتری دارند.



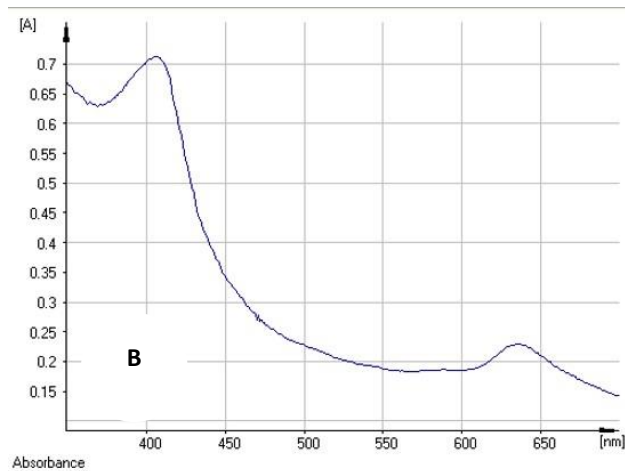
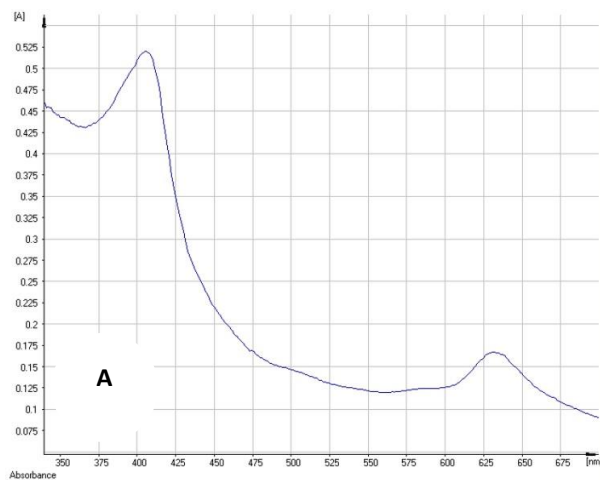
شکل ۱- راندمان استخراج کمپلکس مس-سدیم-کلروفیلین تهیه شده از برگ درخت ازگیل جنگلی



شکل ۲- پودر سبز رنگ کمپلکس سدیم-مس-کلروفیلین تهیه شده از برگ درخت ازگیل جنگلی، A نمونه تجاری به شکل پودر و محلول در آب و B نمونه تهیه شده به شکل پودر و محلول در آب.



شکل ۳ - حلالیت نمونه‌های SCC تهیه شده از برگ درخت ازگیل جنگلی، A حلالیت جزئی در اتانول B عدم حلالیت در کلروفرم.



شکل ۴ - طیف جذبی نمونه تجاری (A) و نمونه تهیه شده از برگ درخت ازگیل جنگلی (B) در طول موج ۳۴۰ تا ۷۰۰ نانومتر



$$\text{وزن برگ خشک شده} = \frac{scc}{\text{بازده استخراج}}$$

(2)

$$\left(\frac{mg}{mg}\right) \text{ کلروفیل کل} = [20.21(A645) + 8.02(A663)] \times V/1000 \times W$$

بحث و نتیجه گیری

این مطالعه اولین پژوهش در خصوص سنتز رنگدانه سدیم-مس-کلروفیلین با استفاده از عصاره برگ درخت ازگیل جنگلی بود که باتوجه به نتایج به دست آمده کمپلکس مس-سدیم-کلروفیلین تهیه شده با خواص فیزیکی و شیمیایی مشابه نمونه تجاری، دارای حلالیت کامل در آب بود. به علاوه میزان کلروفیل و محتوای فنلی بالایی نیز داشت. این کمپلکس رنگی می تواند منبع مهمی از ترکیبات طبیعی با خاصیت زیست فعال برای تولید محصولات غذایی جدید باشد. اما مطالعات تکمیلی برای جداسازی ترکیبات زیست فعال از رنگدانه و مکانیسم دقیق اثر مهار رادیکال آزاد مورد نیاز است. همچنین سمیت سلولی برای سلول های انسانی و ارتباط فیزیولوژیکی در غلظت های مختلف رنگدانه تهیه شده باید مورد بررسی قرار گیرد.

منابع

- Arnon, D. I. (1949). Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant physiology*, 24(1), 1. <https://doi.org/10.1104%2Fpp.24.1.1>
- Banu, N., & Pavithra, S. (2015). A Study of chlorophyllin of medicinal plants, its chemical characterization and anti-proliferative activity with special reference to *Solanum trilobatum* L. on liver cell line. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7(12), 69-79.
- Bibalani, G. H., & Sayadmahaleh, F. (2012). Medicinal benefits and usage of medlar (*Mespilus germanica*) in Gilan Province (Roudsar District), Iran. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(7), 1155-1159.
- Björn, L. O., Papageorgiou, G. C., Blankenship, R. E., & Govindjee. (2009). A viewpoint: why chlorophyll a? *Photosynthesis research*, 99, 85-98.
- Dusemund, B., Gilbert, J., Gott, D., Kenigswald, H., König, J., Lambré, C., Leblanc, J. C., Mortensen, A., & Tobback, P. (2012). Food additives and nutrient sources added to food: developments since the creation of EFSA. *EFSA Journal*, 10(10), s1006.
- Jubert, C., Mata, J., Bench, G., Dashwood, R., Pereira, C., Tracewell, W., Turteltaub, K., Williams, D., & Bailey, G. (2009). Effects of chlorophyll and chlorophyllin on low-dose aflatoxin B1 pharmacokinetics in human volunteers. *Cancer prevention research*, 2(12), 1015-1022.
- Koca, N., Karadeniz, F., & Burdurlu, H. S. (2007). Effect of pH on chlorophyll degradation and colour loss in blanched green peas. *Food Chemistry*, 100(2), 609-615.
- Lefahal, M., Zaabat, N., Ayad, R., Makhoulouf, E. H., Djarri, L., Benahmed, M., Laouer, H., Nieto, G., & Akkal, S. (2018). In vitro assessment of total phenolic and flavonoid contents, antioxidant and photoprotective activities of crude methanolic extract of aerial parts of *Capnophyllum peregrinum* (L.) Lange (Apiaceae) growing in Algeria. *Medicines*, 5(2), 26.
- Lim, T. K. (2012). *Edible medicinal and non-medicinal plants* (Vol. 1). Springer.
- Majbaudhin, A., Kodani, I., & Ryokey, K. (2015). The effect of bamboo leaf extract solution and sodium copper chlorophyllin solution on growth and volatile sulfur compounds production of oral malodor associated some anaerobic periodontal bacteria. *Yonago acta medica*, 58(3), 129.
- Nabavi, S. F., Nabavi, S. M., Ebrahimzadeh, M. A., & Asgarirad, H. (2011). The antioxidant activity of wild medlar (*Mespilus germanica* L.) fruit, stem bark and leaf. *African Journal of Biotechnology*, 10(2), 283-289.
- Osmić, S., Begić, S., Mičić, V., Petrović, Z., & Avdić, G. (2019). Effect of solvent and extraction conditions on antioxidative activity of sage (*salvia officinalis* L.) extracts obtained by maceration. *Technologica Acta: Scientific/professional journal of chemistry and technology*, 11(2), 1-8.
- Safari, M., & Ahmady-Asbchin, S. (2019). Evaluation of antioxidant and antibacterial activities of methanolic extract of medlar (*Mespilus germanica* L.) leaves. *Biotechnology & biotechnological equipment*, 33(1), 372-378.
- Sharma, S., Kori, S., & Parmar, A. (2015). Surfactant mediated extraction of total phenolic contents (TPC) and antioxidants from fruits juices. *Food Chemistry*, 185, 284-288.
- Simon, J. E., Decker, E. A., Ferruzzi, M. G., Giusti, M. M., Mejia, C. D., Goldschmidt, M., & Talcott, S. T. (2017). Establishing standards on colors from natural sources. *Journal of food science*, 82(11), 2539-2553.
- Singh, V. L., Chakravarty, S., Chandra, N., & Mallick, N. (2020). Production of sodium copper chlorophyllin from a green microalga *Chlorella minutissima*: a value-added co-product for sustainable microalgal refinery. *Food and Bioprocesses Processing*, 123, 322-334.
- Speer, B. R. (1997). Photosynthetic pigments. *UCMP Glossary (online)*. University of California, Berkeley Museum of Paleontology. Access verified April, 27, 2007.
- Suparmi, S., Fasitasari, M., Martosupono, M., & Mangimbulude, J. C. (2016). Comparisons of curative effects of chlorophyll from *Sauropus androgynus* (L) Merr leaf extract and Cu-chlorophyllin on sodium nitrate-induced oxidative stress in rats. *Journal of Toxicology*, 2016.
- Suresh, H., Nagananda, G., Minchitha, K., Swetha, S., & Suryan, S. (2022). Synthesis and bio-evaluation of soluble sodium copper chlorophyllin complexes from the leaves of *Aloe vera*. *South African Journal of Botany*, 147, 1086-1095.
- Tabaraki, R., Nateghi, A., & Ahmady-Asbchin, S. (2013). In vitro assessment of antioxidant and antibacterial activities of six edible plants from Iran. *Journal of acupuncture and meridian studies*, 6(3), 159-162.



- Viera, I., Pérez-Gálvez, A., & Roca, M. (2019). Green natural colorants. *Molecules*, 24(1), 154.
- Yolmeh, M., & Sadeghi Mahoonak, A. (2018). Characterization of polyphenol oxidase and peroxidase from Iranian medlar (*Mespilus germanica* L.) Fruit.
- Yu, L., Perret, J., Harris, M., Wilson, J., & Haley, S. (2003). Antioxidant properties of bran extracts from “Akron” wheat grown at different locations. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(6), 1566-1570.



Preparation of sodium-copper-chlorophyllin pigment from the medlar (*Mespilus germanica* L.) leaves

Sina Karimdoust

faezeh Bayat

MSc Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran

MSc Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran

Soheila Zarringhalami

Associate Professor and Assistant Professor, respectively, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Zanjan, Zanjan, Iran

1-1- Abstract

In this study, in order to prepare sodium-copper-chlorophyllin complex as a common green pigment in the food industry, the medlar (*Mespilus germanica* L.) leaves used. After extracting chlorophyll and preparing the complex, SCC yield, color, texture, solubility, pH and absorption of the sample were compared to the commercial sample in order to evaluate the efficiency of the method used. According to the results, the highest extraction efficiency was obtained in solid to solvent ratios of 1:60 and 1:30. The prepared samples showed complete solubility in water, partial solubility in ethanol and insolubility in chloroform and had a color between green and black and a powder texture with a pH of 9.8. The amount of total chlorophyll in the leaves of the medlar leaves tree and the prepared complex sample was 43.3 and 48.6 $\mu\text{g}/\text{mg}$, respectively, and its total phenolic content was 0.74 mg/g of the Gallic acid equivalent in the extract. The spectrophotometric comparison of the prepared sample with the commercial sample showed peaks at wavelengths of 405 ± 5 nm and 630 ± 5 nm, respectively. According to the obtained results, this complex can be proposed after additional tests as a color composition containing bioactive compounds for the production of new food products.

1-2- Keywords: pigment, semisynthesis, sodium-copper-chlorophyllin, medlar, bioactive compounds.