وزارت علوم تحقیقات و فناوری
پژوهشگاه علوم و فناوری رنگ

available online @ www.jcst.icrc.ac.ir
نشریه علمی ـ پژوهشی علوم و فناوری رنگ/ ۵ (۱۳۹۰)، ۱۵۱ـ ۱۴۵

نشریه علمی پژوهشی علوم و فناوری رنگ
Journal of Color Science and Technology
www.jcst.icrc.ac.ir

استخراج و خالص‌سازی ماده رنگزای غذایی بتاسیانین از گیاه آمارانتوس

نادر علیزاده مطلق[1*]، شهره روحانی[2]، هاشم زرآبادی[3]، هدایت حدادی[4]

۱ـ استاد، دانشکده علوم، بخش شیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۷۵- ۱۴۱۱۵
۲- دانشیار، گروه پژوهشی مواد رنگزای آلی، پژوهشگاه علوم و فناوری رنگ، تهران، ایران، صندوق پستی: ۶۵۴-۱۶۷۶۵.
۳ـ دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشکده علوم، بخش شیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۷۵-۱۴۱۱۵
۴ـ دانشجوی دکتری، دانشکده علوم، بخش شیمی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران، صندوق پستی: ۱۷۵-۱۴۱۱۵

تاریخ دریافت: ۸۹/۴/۲۹ تاریخ پذیرش: ۸۹/۱۱/۲۰ در دسترس به صورت الکترونیکی از: ۱۳۹۰/۶/۲۰

چکیده

در این تحقیق استخراج ماده رنگزای غذایی بتاسیانین از گیاه آمارانتوس پس از آماده سازی با دو روش مختلف بررسی شد و خلوص و بازده استخراج با استفاده از اسپکتروفوتومتر مرئی ـ فرا بنفش مورد مطالعه قرار گرفت. برای دستیابی به خلوص بالاتر، از فازهای جامد سلولز میکروکریستالین و سفادکس (LH-20) استفاده شد. نتایج نشان داد که استخراج در محیط متانولی بازده بیشتری نسبت به استخراج در محیط اسیدی دارد، اما خلوص ماده رنگزای حاصل از استخراج اسیدی ۰,۱۸ درصد بیشتر می‌باشد. به کارگیری ستون سفادکس خلوص ماده رنگزا را در استخراج اسیدی تا ۳,۶ درصد و در استخراج متانولی تا ۸ درصد افزایش داد. شناسایی وآنالیز رنگزای تخلیص شده نهایی با روش‌های مختلف اسپکتروسکوپی وکروماتوگرافی با کارایی بالا تأیید شد.

واژه‌های کلیدی: آمارانتوس، بتاسیانین، ماده رنگزای غذایی، استخراج.

Extraction and Purification of Betacyanin Food Colorant from Amaranthus Plant

N. Alizadeh[*1], Sh. Rouhani[2], H. Zarabadi[1], H. Haddadi[1]

[1] Departments of Chemistry, Tarbiat Modares University, P.O. Box 14115-175, Tehran, Iran
[2] Department of Organic Colorants, Institute for Color Science and Thecnology, P.O.Box: 16765-654, Tehran, Iran

Received: 20-07-2010 Accepted: 31-01-2011 Available online: 11-09-2011

Abstract

In this work, betacyanin food colorant were extracted from amaranthus by two different methods and purified with sephedex(LH20) and cellulose microcrystaline as solid phases. After extraction of colorant, spectrophotometric method was used for determination of extraction yield and quantification of colorant. Two extraction method was compared regarding to their content of the colorant and purity. High level colorant was observed in the methanolic extraction. But more colorant purity observed in acidic extracts. Applying the Sephadex column rised the purity to 3.6% for acidic and 8% for methanolic extraction. Final pure colorant was characterized by various spectroscopic techniques and high performance liquid chromatography. J. Color Sci. Tech. 5(2011), 145-151© Institute for Color Science and Technology.

Keywords: Amaranthus, Betacyanin, Food colorant, Extraction.

***Corresponding author: alizaden@modares.ac.ir**

۱ـ مقدمه

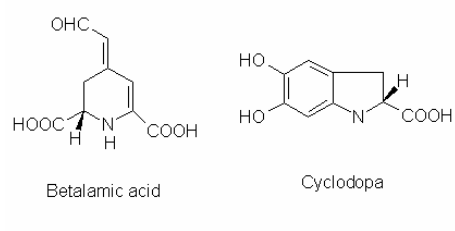
در سال‌های اخیر استفاده از ترکیبات طبیعی به جای ترکیبات سنتزی و به عنوان افزودنی‌های غذایی، رنگ و دارو بسیار مورد توجه بوده و تحقیقات گسترده‌ای در زمینه‌های مختلف از فرآوری و نگهداری گرفته تا بررسی اثرات مختلف فیزیولوژی در مناطق مختلف جهان در حال انجام می‌باشد. استفاده از رنگ‌های طبیعی علی‌رغم ثبات و قدرت رنگی کمتر نسبت به رنگ‌های مصنوعی به دلیل مطمئن‌تر بودن و داشتن ارزش غذایی و مواد بیولوژیکی فعال مثل ویتامین‌های مختلف و همچنین داشتن خاصیت آنتی‌بیوتیکی و عدم اثرات مسمومیت‌زایی آنها ترجیح داده می‌شوند و نیز تحقیقات اخیر، اثرات نامطلوب برخی از رنگ‌های مصنوعی مجاز از جمله سرطان‌زایی آنها را به اثبات رسانیده است. برای مثال مادهٔ رنگزای زرد کره که زمانی برای رنگ کردن کره مورد استفاده قرار می‌گرفت، امروزه دیگر به دلیل عوارض جانبی و مضر بودن مصرف نمی‌شود یا مصرف ماده رنگزای زرد اریتروزین و مواد رنگزای قرمز آمارانت و کارموزین اخیراً ممنوع شده‌اند [۴-۱]. با توجه به مصرف روزافزون رنگ‌های خوراکی و درنتیجه حفظ سلامتی نسل حاضر و نسل‌های آینده سازمان بهداشت جهانی اعلام نمود که به دلایل زیست‌محیطی و بهداشتی، مصرف رنگ‌های مصنوعی در تهیه مواد غذایی و آرایشی تا سال ۲۰۰۰ میلادی متوقف و به جای آنها رنگ‌های طبیعی به کار گرفته شود. درسال ۱۳۵۰ خورشیدی مؤسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران با کمک اداره نظارت بر مواد خوراکی، استاندارد رنگ‌های مجاز مصرفی در مواد خوراکی را منتشر کرد [۵]. درسال ۱۳۵۸ خورشیدی اداره کل نظارت بر مواد خوراکی و مؤسسه استاندارد اعلام کردند که مصرف رنگ‌های مصنوعی در مواد خوراکی کلا در کشور غیر مجاز می‌باشد و استاندارد جدیدی را تدوین کردند. تصمیم مذبور از طرف کارخانجات مواد غذایی و متخصصین وزارت بهداشت به علت نبودن جانشین مناسب برای رنگ‌های حذف شده و نیز به علت وجود آمدن مشکلات در امر تولید، فروش و افزایش میزان تقلب در رنگ‌های مصرفی در مواد غذایی که به سلامت مصرف کننده آسیب می‌رساند، مورد اعتراض قرار گرفت. درسال ۱۳۶۰ خورشیدی استاندارد جدیدی تدوین و طبق آن مصرف برخی از رنگ‌های مصنوعی در مواد خوراکی و غذایی موقتاً تا پیدا شدن جانشین طبیعی برای آنها، مجاز اعلام شد. در حال حاضر در بسیاری از کشورهای پیشرفته صنعتی جایگزینی رنگ‌های طبیعی را در بسیاری از محصولات غذایی به ویژه در فرآیندهای لبنی، بستنی‌ها، کره مارگارین، بیسکویت‌ها، ژله‌ها، نوشابه‌های غیر الکلی، مواد غذایی خشک، کنسرو مرباجات، سبزیجات و میوه‌جات توصیه می‌کنند [۵].

از سال ۱۸۷۰ میلادی رنگزای جدیدی در گیاهان متعلق به خانواده کاریوفیلالس شناخته شدند که قبلاً در سال ۱۹۶۸ میلادی توسط مابری و دریدینگ [۵-۱]، با توجه به ساختار آنها و توجیهات بیولوژیکی بتالاین نامگذاری شده بود. بتالاین‌ها از نظر طبقه‌بندی گیاهی، دارای اهمیت زیادی در گیاهان هستند زیرا حضور آنها در یک گیاه، تعلق آن گیاه را به خانواده کاریوفیلالس نشان می‌دهد تاکنون وجود همزمان بتالاین‌ها به همراه آنتوسیانین‌ها در یک گیاه گزارش نشده است.

بتالاین‌ها رنگزاهای نیتروژن‌دار محلول در آب هستند که به دو گروه عمده بتاسیانین‌های قرمز رنگ و بتازانین‌های زرد رنگ تقسیم می‌شوند. تاکنون تقریباً ۵۰ نوع رنگزای بتاسیانین و ۲۰ نوع رنگزای بتازانتین شناسایی شده‌اند. چغندر معمولی هم حاوی بتاسیانین‌ها و هم دارای بتازانتین‌هاست که ۷۵ تا ۹۵ درصد بتاسیانین آن از نوع بتانین و ۹۵ درصد بتازانتین آن از نوع ولگازانتین است. بتالاین‌ها در گیاهان تیره کاریوفیلاس از قبیل آمارانتاسیا که شامل چند گونه مهم مثل گومفرنا، سلوزیا و ایرزین است، یافت می‌شوند [۷، ۶].

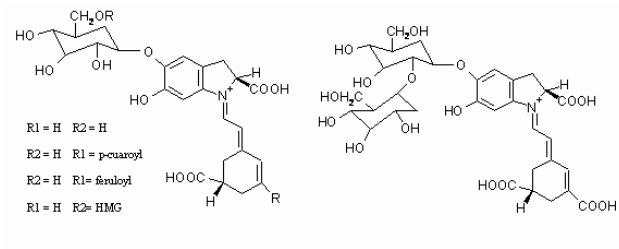
امروزه آمارانتوس در مرکز جنوب آمریکا و بعضی قسمت‌های آسیا و آفریقا کشت می‌شود. گیاه آمارانتوس، به دلیل کیفیت تغذیه‌ای خوب و مقاومت مناسب گیاه نسبت به شرایط سخت (مثل خشکی و کم آبی، شوری، اسیدی و قلیایی بودن خاک و یا ضعیف بودن خاک)، طی بیست سال گذشته به عنوان یک نوع غلّه جدید اهمیت یافته است. در چین تولید آمارانتوس برای استفاده به عنوان خوراک دام رایج است و این کشور یکی از مهم‌ترین تولید کنندگان آمارانتوس می‌باشد. رنگزای به دست آمده از گیاه آمارانتوس می‌تواند به عنوان منبع جایگزین مناسبی، به جای چغندر مورد توجه قرار گیرد زیرا بعضی از گونه‌های آمارانتوس فراوان‌تر بوده و میزان رنگزایی بیشتری دارند. تولید تجاری رنگزای بتالاین نه تنها به تکنیک‌های فرآوری مؤثر (از قبیل کنترل آنزیمی، استخراج، خالص‌سازی، تغلیظ، عملیات خشک‌سازی) بلکه به یک منبع با قدرت رنگی بالا که به راحتی در دسترس باشد، وابسته است. امروزه، چغندر مهم‌ترین منبع تولید بتاسیانین‌ها به صورت تغلیظ شده و پودر شناخته شده است. روند تحقیقات جاری در دنیا، یافتن جایگزین مناسب برای چغندر، به عنوان منبع بتالاین‌ها می‌باشد. بعضی از گیاهان‌گونه آمارانتاسیا به ویژه سلوزیا و آمارانتوس توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند. بتالاین‌ها در صنایع غذایی بسیار مورد توجه می‌باشند [۱۱-۸]، چون بتاسیانین‌ها به عنوان افزودنی برای بعضی سیستم‌های غذایی بسیار مناسب هستند، از این رو، بتاسیانین به دست آمده از ریشه چغندر برای رنگ کردن بستنی، مربا و کنسرو میوجات استفاده می‌شود. بعضی از گونه‌های این رنگزا، خواص آنتی‌اکسیدانتی تا حدود سه تا چهار برابر قوی‌تر از آسکوربیک اسید را دارند [۱۲].

بتالاین‌ها به دو گروه ساختاری بتا زانتین‌های زرد رنگ و بتاسیانین‌های قرمزِ صورتی تقسیم می‌شوند. بتاسیانین‌ها، گلی‌کوزیدها یا آسیل گلی‌کوزیدهای آگلیکون، بتانیدین هستند که محصول تراکم سیلکودوپا با بتالامیک اسید می‌باشند. رنگ‌ساز در بتالاین‌ها را می‌توان به صورت سیستم ۱،۷- دی آزا هپتامین که در موقعیت‌های ۱،۲،۴،۷،۷ پروتون‌دار شده باشد، شرح داد. ساختار سیلکودوپا و بتالامیک اسید در شکل ۱ نشان داده شده است.



شکل ۱: ساختار سیلکودوپا و بتالامیک اسید.

بیشتر بتاسیانین‌ها دارای ساختار پایه بتانیدین هستند. گروه‌های هیدروکسیل سیلکودوپا قادر به تشکیل پیوند گلی‌کوزید هستند که بیشتر در کربن شماره پنج تشکیل می‌شود. ساختار بعضی گونه‌های بتاسیانین در شکل ۲ آورده شده است.



شکل ۲: ساختار بتا سیانین‌ها- آمارانتین.

ساختار بتاسیانین‌ها از نظر داشتن بعضی گروه‌های آسیل و قسمت‌های قندی با هم متفاوت است. بعضی از گروه‌های آسیل که به قسمت قندی ملکول رنگزا پیوند می‌شود در شکل ۲ نشان داده شده است. تاکنون بیش از پنجاه نوع ساختار بتاسیانین شناسایی شده است[۷].

وجود بتالاین‌ها در گیاهان آلی به گونه‌های کاریو فیلاس محدود می‌شود. بتالاین‌ها در بعضی از قارچها مانند آمانیتا، هیگروسایب، هیگروسپروس هم یافت می‌شوند. بتالاین‌ها در قسمت‌های مختلف گیاه از قبیل ریشه مثل چغندر، گل مثل پرچولاسا و ایزوکاسیاویا در میوه‌های کاکتوس و یا در برگ و دانه گونه‌های مختلف آمارانتوس یافت می‌شوند. نام‌گذاری بتالاین‌ها بطور کلی براساس گونه گیاهی که از آن به دست آمده‌اند انجام می‌شود. به عنوان مثال رنگزای آمارانتین از گیاه آمارانتوس تری کلر، و رنگزا بتانین از گیاه بتا ولگاریس (چغندر) و گومفرنین از گیاه گومفرنا گلوبوسا به دست آمده است [۶].

سرزمین ایران به دلایل شرایط آب و هوایی و اقلیمی‌گوناگون دارای پوشش گیاهی بسیار غنی بوده وگنجینه‌های گیاهی رنگزای با ارزشی دارد لذا فعالیت جهت شناسایی، استفاده و مصرف آنها می‌تواند در اقتصاد کشور بسیار مؤثر واقع گردد.

در تحقیق حاضر میزان و درصد ماده رنگزای بتاسیانین موجود در گیاه تاج خروس[1] بومی ایران مورد مطالعه قرار گرفته است. دو روش استخراج مایع- جامد از لحاظ بازده و خلوص بررسی و روش مناسب برای دست یابی به خلوص بالاتر ارائه شده است. شناسایی رنگزای تخلیص شده نهایی با روش‌های مختلف اسپکتروسکوپی نظیر NMR و Mass انجام شد.

۲ـ بخش تجربی

۲ـ۱ـ مواد

حلال‌های مورد نظر از شرکت مرک تهیه و به همان صورت مورد استفاده قرار گرفت. از آب دو بار تقطیر برای انجام استخراج استفاده شده است.

۲ـ ۲ـ روش کار

اندازه‌گیری‌های اسپکتروفوتومتری با دستگاه UV-Vis2100 شرکت Sinco انجام شدند. آزمون‌های جرمی در این تحقیق با دستگاه جرمی با ترپ یونی چهار قطبی ساخت شرکت Daltonik Bruker با آشکار ساز گزینش جرمی منبع الکترو اسپری انجام شد. طیف‌های ^{1}H NMR در این کار، با استفاده از یک اسپکترومتر Bruker DRX-500 با قدرت میدان ۱۱,۷ تسلا در حلال آب سنگین ثبت شدند. از دستگاه HPLC با شرایط، ستون C_{18} واترز، پمپ دستگاه Knawer آلمانی با آشکار ساز PDA برای ثبت کروماتوگرام‌ها استفاده گردید.

۲ـ۲ـ۱ـ آماده‌سازی نمونه خام

نمونه برگ از گیاه تاج خروس (شکل ۳) را چیده، شسته و در بسته‌های ۲۰۰ گرمی در مشمع در دمای ۱۸°C- نگهداری شدند. برای انجام هر آزمایش یک بسته ۲۰۰ گرمی را توسط دستگاه خرد کن تا حد امکان به ذرات ریز تبدیل و برای انجام عملیات استخراج آماده شد.

شکل ۳: گیاه آمارانتوس کادوس (تاج خروس).

1- *Amaranthus caudatus*

۲ـ۲ـ۲ـ تعیین میزان آب برگ‌های تازه گیاه آمارانتوس

دو بسته ۲۰۰ گرمی از برگ‌های تازه گیاه مورد مطالعه انتخاب و روی پارچه و در غیاب نور خشک گردید. بعد از خشک شدن وزن باقی‌مانده آنها ۳۵,۱۴ و ۴۱,۳۵ گرم شد. بنابراین مشخص شد که حدود ۸۳-۸۰ درصد گیاه تازه آمارانتوس را آب تشکیل می‌دهد.

۲ـ۲ـ۳ـ استخراج متانولی رنگزا از بافت گیاه

با توجه به روش‌هایی که برای استخراج و خالص‌سازی ماده رنگزا بتاسیانین در مراجع آمده است روش استخراج جامد ـ مایع برای استخراج و خالص‌سازی رنگزا مورد استفاده قرار گرفت [۸]. ۲۰۰ گرم نمونه گیاه تازه کاملاً خرد شده در ۱۰۰۰ میلی‌لیتر مخلوط حلال (۸۰٪ متانول- ۲۰٪ آب) با استفاده از همزن مغناطیسی در دمای اتاق به مدت ۱۲۰ دقیقه هم‌زده شد. سپس محتویات صاف شد و طی چند مرحله متوالی استخراج رنگزا تکرار شد. استخراج رنگزا تا بی‌رنگ شدن مایع استخراجی ادامه یافت.

جهت خالص سازی رنگزا با استفاده از فاز جامد، مایع استخراج شده حاصل از مرحله قبل از صافی معمولی عبور داده شد تا بعضی بافت‌های درشت گیاهی از محلول جدا شود. حجم محلول رنگزا در این مرحله حدود یک لیتر است در این مرحله برای رسوب دادن ذرات کلوئیدی و بعضی بافت‌های گیاهی از سانتریفوژ با سرعت rpm ۱۴۰۰۰ در دمای ۴ ºC به مدت ۲۰ دقیقه استفاده شد. سپس مایع بالایی از یک ستون شیشه‌ای با ابعاد ۱cm × ۳cm حاوی میکروکریستالین سلولز با ابعاد ذرات زیر μm ۲۰ ، عبور داده شد. در این مرحله بسیاری از بافت‌های گیاهی روی سلولز مانده و از ستون عبور نمی‌کند، مایع صاف شده با استفاده از دستگاه روتاری و پمپ خلاء در دمای ۴۰ ºC تغلیظ شد تا به حجم ۵۰ میلی‌لیتر برسد، سپس این محلول با استفاده از نیتروژن مایع منجمد شد و با استفاده از دستگاه خشک‌کن تصعیدی خشک گردید و ماده ناخالص به صورت فیلم به دست آمد. ماده خشک به دست آمده در تماس با مقداری متانول قرار گرفت تا بخش‌های سبز رنگ کلروفیل جدا شوند. بعد از این مرحله ماده خشک در معرض هگزان قرار داده شد تا بخش‌های چربی دوست خارج شوند. در انتها پس از تبخیر حلال یک پودر خشک به دست آمد.

۲ـ۲ـ۴ـ استخراج اسیدی رنگزا از بافت گیاه

۵۰ گرم گیاه خشک شده درون یک ستون با قطر ۳ cm ریخته و با اتانول شستشو داده شد تا ماده سبز رنگی از ستون خارج نشود. بلافاصله با استفاده از محلول ۱٪ استیک اسید استخراج را انجام شد. بعد از اتمام کار استخراج محلول به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ ºC با دور ۱۴۰۰۰ سانتریفیوژ شد تا مواد نامحلول از آن جدا شوند. سپس از ستون سلولزی (۱cm ×۱۰cm) عبور داده شد تا ذرات معلق آن گرفته شود. محلول حاصله روتاری شد تا حجم محلول به حدود ۷۰-۵۰ میلی لیتر رسید. سپس محلول حاصله با استفاده از نیتروژن مایع منجمد و با دستگاه خشک کن تصعیدی، خشک گردید. در نهایت ۱۱,۸۰۲۹ گرم ماده خشک بدست آمد.

۲ـ۲ـ۵ـ خالص سازی رنگزای حاصل از روش‌های مختلف استخراجی با ستون ژل سفادکس

به منظور خالص‌سازی بیشتر رنگزای حاصل از روش‌های مختلف استخراجی، از یک ستون حاوی ژل سفادکس استفاده گردید. برای تهیه ژل سفادکس از حلال آب استفاده شد. ژل تهیه شده در یک ظرف مناسب گاززدایی گردید، سپس در یک مرحله ستون با آن پر شد. ابعاد ستون مورد استفاده در این تحقیق $1\ cm^2 \times 150\ cm$ بود. پس از فشرده شدن، ستون با حلال مناسب با حجم حدود دوبرابر حجم ستون شستشوی داده شد. هنگام نمونه‌گذاری اجازه داده شد تا میزان حلال روی سطح رزین به کمترین مقدار ممکن، حدود ۱mm برسد سپس در حداقل مقدار حلال حل شد و با توجه به حجم نمونه‌گذاری که ۲-۱ درصد حجم بستر ژل می‌باشد با استفاده از پی‌پت، نمونه روی ستون بارگذاری شد و اجازه داده شد تا محلول نمونه وارد ژل شود و کم کم حلال اضافه گردید و از پایین توسط پمپ با سرعت مناسب مکش ایجاد شد. از آب به عنوان فاز متحرک استفاده شد. در هنگام عبور نمونه از ژل سفادکس سه جزء جدا شد. یک قسمت قهوه‌ای رنگ که در ابتدا از ستون خارج شد، سپس قسمت اصلی که حاوی رنگزای قرمزرنگ بود و قسمت سوم زرد رنگ که آخر از همه از ستون بیرون آمد. جهت انجام مراحل شناسایی فقط جزء اصلی رنگزا برای کارهای بعدی جمع‌آوری و خشک شد.

۲ـ۲ـ۶ـ تعیین بازده استخراج ومیزان خالص‌سازی رنگزا

مقدار مشخصی از پودر حاصل از روش‌های مختلف استخراجی در حجم مشخصی از آب دوبار تقطیر حل شده و پس از ثبت طیف UV-Vis جذب آن در طول موج nm ۵۳۶ اندازه‌گیری شد. براساس ضریب جذب مولی $۵۶۶۰۰\ cm^{-1}M^{-1}$ که در مراجع گزارش شده است میزان رنگزای استخراج و خالص‌سازی شده در روش‌های مختلف با یکدیگر مقایسه گردید.

۳ـ نتایج و بحث

۳ـ۱ـ تعیین میزان رنگزای آمارانتوس در روش‌های مختلف استخراج

۳ـ۱ـ۱ـ به دست آوردن میزان رنگزای آمارانتوس در برگ‌های گیاه با استفاده از استخراج متانولی:

حدود یک میلی‌لیتر محلول استخراج شده متانولی (از ۱۰ گرم بافت

تازه گیاهی) با ۹ میلی‌لیتر آب مخلوط و با استفاده از اسپکتروفوتومتر UV-Vis جذب آن در nm ۵۳۶ قرائت شد. جذب به دست آمده از این محلول ۰,۶۴۹۷ واحد جذبی بود. براساس عدد ضریب جذب مولی $cm^{-1}M^{-1}$ ۵۶۶۰۰ میزان رنگزا در ۱۰۰ گرم ماده اولیه تازه برابر ۷۲,۶ میلی‌گرم به دست آمد. همان‌طور که در استخراج متانولی رنگزا (۲-۲-۳) توضیح داده شد، برای خالص‌سازی بیشتر در روش متانولی و آماده شدن برای خالص‌سازی با فاز جامد، از محلول استخراجی پس از خشک کردن تصعیدی و شستشو با فاز متانولی و هگزان پودر جامدی آمد. برای تعیین میزان خالص‌سازی تا این مرحله ۰,۰۱۰۷۲گرم نمونه پودر جامد با آب به حجم ml ۲۵ رسانده و جذب آن ۰,۴۳۶۰ اندازه‌گیری شد. درصد خالص‌سازی رنگزا با روش استخراج متانولی قبل از عبور از ستون سفادکس برابر ۱,۳۸ درصد به دست آمد.

۳ـ۱ـ۲ـ به دست آوردن میزان رنگزای آمارانتوس در برگ‌های گیاه با استفاده از استخراج اسیدی

مقدار ۰,۰۱۷۶۵ گرم از پودر خشک شده حاصل از استخراج اسیدی با آب به حجم ۵۰ میلی لیتر رسانده شد. جذب محلول در طول موج nm ۵۳۶ برابر ۰,۴۲۹ به دست آمد. بنابراین درصد خالص‌سازی معادل ۱,۵۶ درصد می‌باشد. میزان رنگزای آمارانتوس با استفاده از استخراج اسیدی ۱۰۰ گرم از برگ‌های گیاه خشک، ۳۶۸ میلی‌گرم به دست آمد. باتوجه به اینکه میزان آب موجود در برگ‌های گیاه تازه حدود ۸۳-۸۰ درصد تعیین شده با احتساب مقدار متوسط ۸۱,۵ درصد، میزان رنگزای آمارانتوس در ۱۰۰ گرم برگ تازه گیاه ۶۸,۳ میلی‌گرم می‌باشد. مقایسه این مقدار با مقدار رنگزای استخراج شده متانولی بدون خالص‌سازی با فاز جامد نشان می‌دهد که استخراج متانولی بازده استخراجی بیشتری دارد. نتایج درصد خلوص پودر خشک پس از استخراج متانولی و اسیدی نشان می‌دهد که خلوص رنگزا در استخراج اسیدی ۰,۱۸ درصد بیشتر از استخراج متانولی است.

۳ـ۱ـ۳ـ اثر استفاده از فاز جامد سفادکس بر درصد خلوص رنگزا

جهت خالص‌سازی بیشتر رنگزا یک گرم از پودر خشک شده حاصل از روش‌های مختلف استخراجی به ستون سفادکس تهیه شده تزریق و بعد از عملیات جداسازی حدود ۲ میلی‌گرم از محصول خشک بدست آمده با ترازویی با دقت ۰,۰۱ میلی‌گرم وزن و در ۲۵ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر حل شد و جذب محلول در طول موج nm ۵۳۶ اندازه‌گیری شد. نتایج اندازه‌گیری نشان داد که درصد خلوص رنگزا در روش استخراج اسیدی پس از عبور از ستون سفادکس به ۳,۶ درصد و برای روش استخراج متانولی به ۸ درصد افزایش می‌یابد.

۳ـ۲ـ آنالیز و شناسایی ماده رنگزا

۳ـ۲ـ۱ـ آنالیز HPLC رنگزای حاصل ازاستخراج متانولی خالص شده با ستون سفادکس

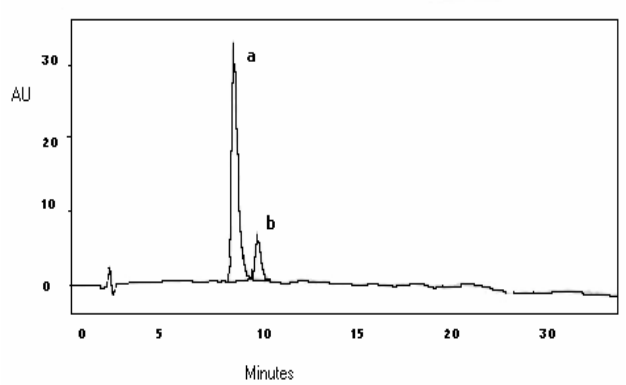
آنالیز تجزیه‌ای این رنگزا با استفاده از دستگاه HPLC و روش گرادیان حلال (۱۰٪ حلال B در حلال A که در مدت ۳۰ دقیقه به ۵۵٪ حلال B در حلال A تبدیل می‌شود) انجام گرفت. حلال A از محلول ۱,۵٪ فسفریک اسید در آب و حلال B مخلوطی از ۱,۵٪ فسفریک اسید و ۲۰٪ استیک اسید و ۲۵٪ استونتریل در آب تهیه شد و درطول موج nm ۵۳۶ دنبال شد. دو پیک اصلی در زمان‌های ۹,۱۶ min و ۱۰,۳۸min به دست آمد که با توجه به کروماتوگرام گزارش شده در مرجع [۹] متعلق به رنگزای آمارانتین و ایزوآمارانتین می‌باشد. کروماتوگرام در شکل ۴ نشان داده شده‌است.

۳ـ۲ـ۲ـ خالص سازی رنگزای با استفاده از HPLC-preparative

برای بررسی خالص‌سازی بیشتر ماده رنگزای استخراج شده به روش متانولی و عبور داده شده از ستون سفادکس در زمان ۶۰ دقیقه جداسازی توسط دستگاه کروماتوگرافی با کارایی بالا با یک برنامه گرادیان حلال (۲۰٪ حلال B (MeOH ۸۰٪) که به ۴۰٪ حلال B در A+B تبدیل می‌شود) انجام گرفت. حلال A اسیدفرمیک ۱٪ و حلال B متانل ۸۰٪ بود. نمونه خالص شده با دستگاه خشک‌کن تصعیدی خشک شد و به صورت پودر درآمد. برای به دست آوردن درصد خلوص، حدود یک میلی‌گرم از پودر در حجم مشخصی از آب حل شد و جذب آن در طول موج nm ۵۳۶ اندازه‌گیری گردید. با این روش خلوص رنگزا به۱۵,۳ درصد افزایش یافت. نتایج نشان داد که با چهار بار استخراج در شرایط بالا می‌توان به درجه خلوص ۹۹,۹٪ رسید.

۳ـ۲ـ۳ـ آنالیز اسپکتروسکوپی

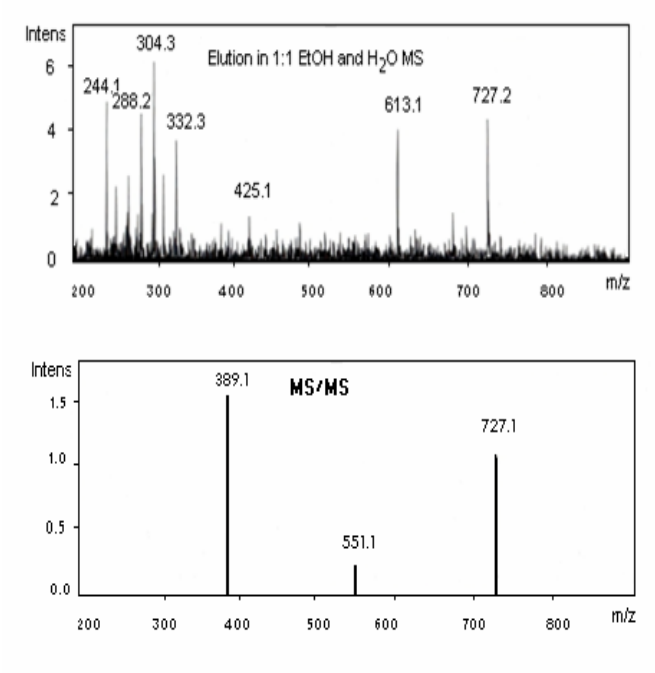
شکل ۵ آنالیز جرمی رنگزای حل شده در حلال آب: اتانول ۱:۱ را که با استفاده از دستگاه جرمی کوادروپل ثبت شده نشان می‌دهد.



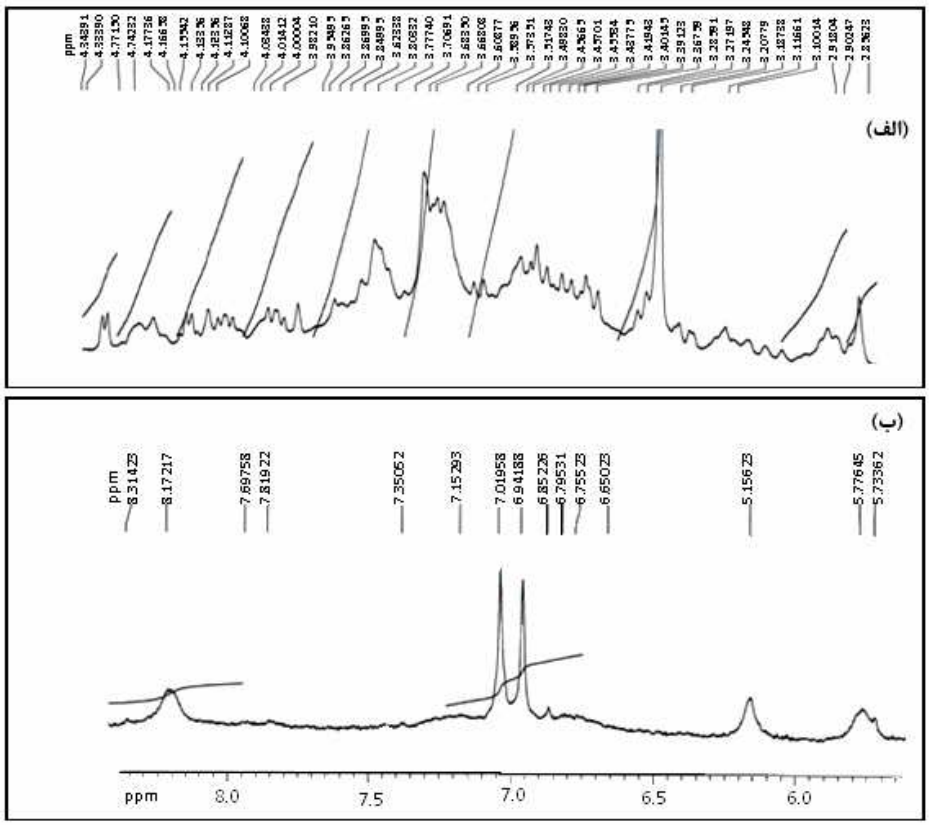
شکل۴: کروماتوگرام متعلق به (a) آمارانتین و (b) ایزوآمارانتین.

پیک یون مولکولی ۷۲۷٫۲ گرم بر مول مشخصه آمارانتین می‌باشد. اطلاعات MS/MS در شکل‌های ۵ نشان داده شده‌اند. پیک با جرم ۳۸۹ گرم بر مول مربوط به بتا آنیدین و پیک با جرم ۵۵۱ گرم بر مول مربوط به ایزوآمارانتین می‌باشد. نتایج طیف جرمی با مراجع کاملاً هم‌خوانی دارند [۱۴، ۱۳].

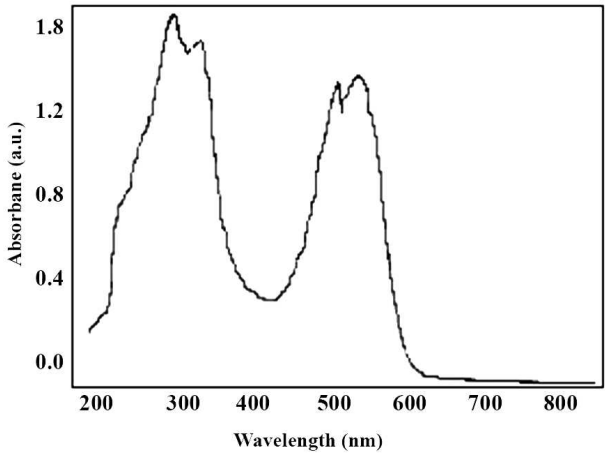
طیف‌های ^{1}H NMR رنگزا در شکل ۶ آورده شده است. همان‌طور که در ساختار مولکول (شکل ۲) مشاهده می‌شود، مولکول دارای سه قسمت اصلی بتالامیک، سیلکودوپا و قسمت قندی می‌باشد که در نواحی مختلف طیفی ظاهر می‌شوند. باتوجه به جابجایی شیمیایی و شکافتگی پیک‌های گزارش شده در مراجع علمی [۱۶، ۱۵] می‌توان پیک‌ها را به صورت زیر تفسیر نمود: δ =۸٫۱۷ به صورت یکتایی پهن مربوط به H11, δ =۷٫۰۲ به صورت یکتایی مربوط به H4, δ =۶٫۹۴ به صورت یکتایی H7, δ =۶٫۱۵ به صورت یکتایی پهن مربوط به H18, δ =۵٫۷۷ به صورت دوتایی پهن H12, δ =۴٫۳۴ به صورت دوتایی H14, δ =۴٫۲۳ به صورت سه تایی H15, δ =۴٫۱۳ به صورت دوتایی H2 و δ =۳٫۵۹ به صورت دوتایی مربوط به H3 می‌باشد. جابجایی قسمت قندی به غیر از H^1 که در δ=۵-۵٫۵ ظاهرمی‌شود بقیه هیدروژن‌ها به علت جفت‌شدگی با هیدروژن‌های مجاور و دور به صورت پیچیده در ناحیه ۳< δ≤۴ ظاهر می‌شوند (شکل ۶ ب).



شکل۵: طیف جرمی آمارانتین.



شکل ۶: الف) طیف^{1}H NMR معمولی آمارانتین، ب) طیف ^{1}H NMR واجفت‌شده آمارانتین.



شکل ۷: طیف جذبی آماراتین

طیف UV-Vis رنگزا در متانول ۸۵٪ در شکل ۷ نشان داده شده است. همان‌طور که دیده می‌شودترکیب دارای یک قله جذبی در ناحیه ۳۵۰-۳۰۰ نانومتر می‌باشدکه مربوط به انتقالات $\pi \rightarrow \pi^*$ در حلقه‌های آروماتیک می‌باشد و دو قله جذبی نزدیک به هم در ناحیه ۵۱۰ و ۵۵۰ نانومتر که مربوط که مربوط به حلقه‌های بتاسیانینی است که به رنگ ارغوانی دیده می‌شوند.

۴ـ نتیجه‌گیری

استخراج مواد رنگزای گیاهی ترکیبات خانواده بتاسیانین و آنتوسیانین، به طور عمده درحلال‌های آلی قطبی و یا درمحیط‌های اسیدی انجام می‌شود. لذا در این کار برای استخراج ماده رنگزا از محیط متانولی، اسیدی و فاز جامد- مایع استفاده شد. برای دستیابی به خلوص بالاتر و جداسازی پلی ساکاریدها، سفادکس و فاز جامد بلوری به کار گرفته شد. نتایج استخراج در شرایط متفاوت نشان داد که استفاده از حلال متانول بازده بیشتری نسبت به حلال اسیدی دارد، زیرا به دلیل حلالیت بهتر ترکیب با جرم ملکولی نسبتاً بالا در محیط غیر آبی و با قطبیت کمتر از آب ، امکان داشتن پیوندهای هیدروژنی را همزمان با حلالیت بهتر ملکول فراهم میسازد. خلوص ماده رنگزای حاصل از استخراج اسیدی حدود ۰,۱۸ درصد بالاترمی‌باشد. خلوص بالاتر را می‌توان به حضور دسته‌ای از ترکیبات آلی موجود در گیاه و محلول در محیط الکلی دانست که همراه با ماده رنگزا استخراج می‌شوند. به کارگیری ستون سفادکس خلوص ماده رنگزا را در استخراج اسیدی تا ۳,۶ درصد و در استخراج متانولی تا ۸ درصد افزایش داد. با استفاده از سیستم HPLC-preparative ماده رنگزا با خلوص ۱۵,۳ به دست آمد، محاسبات نشان داد که با تکرار آن تا چهار بار می‌توان به درجه خلوص حدود ۹۹,۹ درصد دست یافت.

۵ـ مراجع

1. A. R. Fakhari, S. Baghipour, Eextraction of a food colorant from red beet and evaluation of its stability. *J. Color Sci. Tech.* 3(2010), 243-250. (in persian).
2. D. B. Macdougall, Colour in food: Improving quality. Wood Head ,2002.
3. H.-D. Belitz, W. Grosch , P. Schieberle, Food chemistry. Springer-Verlag ,Berlin Hidelberg,2009.
4. F. Delgado-Vargas, O. Paredes-Lopez, Natural colorants for food and nutraceutical uses. CRC Press LLC.,Wnshingtone, D.C., 2003.
5. J. M. Ames,T. Hofman, Chemistry and physiology of selected food colorants. An American Chemical Society Publication, 2001.
6. D. Strack, W. Steglich, V. Wray, Betalains; In methods in plant biochemistry. Academic Press, Orlando, 8(1993), 421-450.
7. F. Delgado, Natural pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains- characteristics, biosynthesis, processing and stabilit. *Crit. Rev. Food Sci.* 40(2000), 173-289
8. Y. z. Cai,Characterization and application of betalain pigments from plants of amaranthaceae. *Trends in Food Sci. Technol*. 16 (2005), 370-376.
9. Y. z. Cai, Identification and distribution of simple and acylated betacyanin in the amaranthaceae. *J. Agric. Food. Chem.* 49 (2001), 1971-1978.
10. Y. z. Cai, Colorant properties and stability of Amaranthus betacyanin piments. *J. Agric. Food. Chem.* 46(1998), 4491-4495.
11. Y. z. Cai ,Characterization and quantification of betacyanin pigments from diverse amaranthus species *J. Agric. Food. Chem.* 46(1998), 2063-2070.
12. Y. z. Cai, Antioxidant activity of betalains from plants of the amaranthaceae. *J. Agric. food. Chem.* 51(2003), 2288-2294.
13. C. S. Florian, Identification of betalains from yellow beet (beta vulgaris)and Cactus pear [Opuntia ficus-indica (L.) Mill] by HPLC-ESI-MS. *J. Agric. Food. Chem.* 50(2002), 2302-2307.
14. C. S. Florian, Structural investigation on betacyanin pigments by LC-NMR and 2D-NMR spectroscopy. *Phytochem.* 65(2004), 415-422.
15. S. Wybraniec, B. Nowak-Wydrab, Y. Mizrahic, ^{1}H and ^{13}C NMR spectroscopic structural elucidationof new decarboxylated betacyanins. *Tetrahed. Lett.* 47(2006), 1725-1728.
16. S. Wybraniec, B. Nowak-Wydrab, Mammillarinin: A new malonylated betacyanin from fruits of mammillaria. *J. Agric. Food Chem.* 55(2007), 8138-8143.