

بررسی، استخراج و ارزیابی شیمیایی رنگدانه قرمز آنتوسیانین در برگ پاییزی گیاه نادینا دامستیکا (بربریداسئا)

ذاکر بحرینی

دانشیار، گروه صنایع آلی و دارویی، پژوهشکده فناوری‌های شیمیایی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، صندوق پستی: ۳۳۵۳۵۱۱۱

چکیده

مطالعات نشان داده است که بروز رنگ‌های زرد و قرمز در برگ‌های پاییزی به ترتیب ناشی از رنگدانه‌های کاروتنوئید و آنتوسیانین است. آنتوسیانین‌ها در گیاهان خاصی بسته به گونه و طبیعت آنها، در طول پیری برگ، در فصل پاییز با وجود افتاب کافی اما کاهش دما و طول روز سنتز می‌شوند. در این پژوهش، پدیدار شدن رنگدانه قرمز فام آنتوسیانین در برگ پاییزی گیاه نادینا دامستیکا بربریداسئا مورد بررسی و آنالیز شیمیایی قرار گرفت. برگ قرمز پاییزی از گیاهان در محیط تهران جمع‌آوری، خشک و آسیاب گردید. آنگاه رنگدانه‌های موجود در آن به وسیله حلال اتانل به طور کامل استخراج شد. رنگدانه‌های کاروتنوئیدی و آنتوسیانینی موجود در محلول استخراجی با استفاده از حلال هگزان نرمال از هم جدا شدند. رنگدانه غالب آنتوسیانینی مورد آزمایش‌های طیف‌سنجی نوری مرئی، کروماتوگرافی لایه نازک، رنگ‌سنجی و کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) قرار گرفت. نتایج بیانگر وجود ترکیبات آنتوسیانینی، شامل دلفینیدین، سیانیدین، پتونیدین، پلارگونیدین و مالویدین با مقادیر متفاوت در برگ پاییزی گیاه نادینا است که موجب فام قرمز غالب و جذاب آن شده است.

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله:
تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۲/۶
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۴/۵
در دسترس به صورت الکترونیکی: ۱۴۰۱/۱/۳۰
شاپا چاپی: ۱۷۳۵-۸۷۷۹
شاپا الکترونیکی: ۲۳۸۳-۲۱۶۹

DOR: 20.1001.1.17358779.1401.16.1.2.4

واژه‌های کلیدی:

آنتوسیانین
رنگدانه‌های گیاهی
برگ‌های پاییزی
گیاه نادینا

Investigation, Extraction and Chemical Evaluation of Anthocyanin Red Pigment of *Nadina Domestica* (berberidaceae) shrub in autumn leaves

Zaker Bahreini

Department of Chemical Technologies, Iranian Research Organization for Science and Technology, P. O Box: 3353511, Tehran, Iran

ARTICLE INFO

Article history:

Received: 24-02-2021

Accepted: 26-06-2021

Available online: 19-04-2022

Print ISSN: 1735-8779

Online ISSN: 2383-2169

DOR: 20.1001.1.17358779.1401.16.1.2.4

Keywords:

Anthocyanin
Plant pigments
Autumn leaves
Nadina shrub.

ABSTRACT

Studies have proved that the appearance of yellow and red colors in autumn leaves results from carotenoid and anthocyanin pigments, respectively. Anthocyanins are synthesized in certain plants, depending on species composition and phenology, during leaf senescence, in the autumn season at enough sunshine but decreased temperature and day length. In this study, the accumulation of red anthocyanin pigment in *Nadina domestica* (berberidaceae) shrub autumn leaves was investigated. Leaves of the mentioned shrub were collected from Tehran environment, fully dried, and ground. The anthocyanins and carotenoid content of the powder were extracted using ethanol as a solvent. These pigments were separated by n-hexane solvent. Anthocyanin components were characterized by the following methods: UV-visible spectrophotometry, thin-layer chromatography (TLC), colorimetry parameters (CIE LAB), and high-performance liquid chromatography (HPLC). The results showed that anthocyanin compounds, including Cyanidin, Delphinidin, Petunidin, Plargonidin, and Malvinidin, are the major and attractive red color anthocyanins of the leaves extract.

۱- مقدمه

زندگی انسان‌ها از آغاز با پدیده رنگ مرتبط بوده است. بیشترین تماس انسان‌ها با جهان خارج و یا درون خودشان از راه بینایی است و در این مسیر رنگ برجسته‌ترین عامل است. در واقع یکی از وجوه تفاوت و تمایز انسان‌ها با دیگر جانوران، همین قدرت تشخیص رنگ انسان است. اگرچه انتخاب بسیاری از رنگ‌ها به وسیله انسان ناخودآگاه است، پدیده رنگ در هر لحظه توسط عوامل مختلف مانند طبیعت، نور، لباس، تجهیزات و خوراک بر زندگی انسانها از جمله بر حالات روحی و ادراکی آنها اثر می‌گذارد. در نتیجه رنگدانه‌های سنتزی و طبیعی بگونه وسیعی در رنگرزی پوشاک، پوشش سطوح، مواد آرایشی، جوهرهای چاپ، افزودنی خوراکی‌ها و داروها مصرف می‌شوند [۱، ۲].

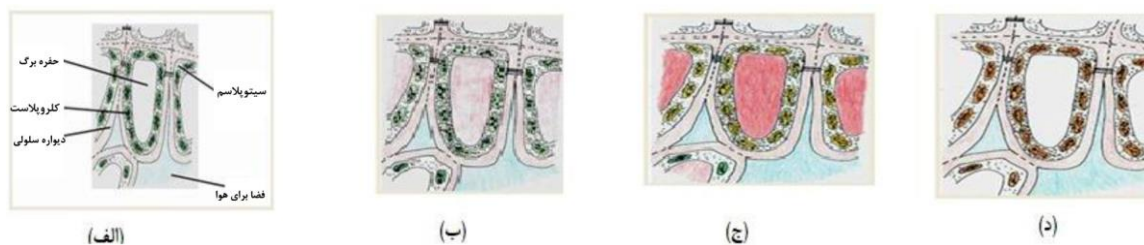
قابلیت‌های مسمومیت‌زایی رنگ‌های سنتزی و ملاحظات زیست‌محیطی پژوهشگران را بسوی رنگ‌های طبیعی گیاهی جهت داده است. رنگدانه‌های استخراجی از گیاهان از نوع آلی و طبیعی می‌باشند. به بیان دیگر چون از اندام موجود زنده به دست می‌آیند، به آنها بیوکرم^۱ نیز گفته می‌شود. چهار گروه مهم رنگدانه‌های گیاهی کلروفیل‌ها، آنتوسیانین‌ها، کارتنوئیدها و بتالائین‌ها هستند [۳، ۴]. رنگدانه‌های طبیعی نه تنها حشرات را جذب و موجب گرده افشانی می‌شوند، بلکه در بقای زیست‌بوم نیز نقش مهمی دارند. درصد اندکی از محتوای شیمیایی میوه‌ها و دیگر اندام‌های گیاهی را رنگدانه‌ها تشکیل می‌دهند و مواد دیگری مانند پروتئین‌ها، چربی‌ها، قندها، مواد معدنی و الیاف نیز وجود دارند. بنابراین فرآیندهای استخراج و خالص‌سازی و شناسایی اجزاء اهمیت بسزایی دارند [۵-۹]. گیاهان معمولاً در طول تابستان دارای مقداری زیاد ولی گوناگون از رنگدانه‌های کلروفیل و کاروتنوئید می‌باشند. رنگ سبز برگ‌ها در طول تابستان، به دلیل غلظت بیشتر کلروفیل نسبت به دیگر رنگدانه‌ها است. فام شدید سبز کلروفیل، فام زرد و نارنجی کاروتنوئیدها را پوشش داده که در نتیجه دیده نمی‌شوند. تغییر رنگ برگ‌ها یکی از پدیده‌های شگفت‌انگیز روی کره زمین است که به ویژه در فصل پاییز مناطق سردسیر و معتدله، بسیار تماشایی است. در اواخر تابستان و آغاز پاییز، یک سری تغییرات محیطی مانند کوتاه شدن طول روز، کاهش دما و افزایش طول موج‌های آبی و پرتو فرابنفش، پیام‌هایی هستند که توسط گیاهان دریافت شده و باعث ایجاد یک سری تغییرات درونی به ویژه تغییرات هورمونی مانند کاهش تولید اکسین، افزایش تولید اتیلن و افزایش آبسزیک اسید می‌شود. به دنبال این تغییرات هورمونی، سنتز کلروفیل و تولید کربوهیدرات‌ها کاهش می‌یابد و سرانجام به طور کامل متوقف می‌شود [۱۰-۱۷].

در فصل پاییز با تخریب کلروفیل سبز فام، کاروتنوئید زرد یا نارنجی فام امکان بروز می‌یابد. در برخی از گیاهان فام برنزی و یا قرمز ناشی از تولید آنتوسیانین پدیدار می‌شود. آنتوسیانین‌ها پس از تجزیه

حدود نیمی از کلروفیل و پیش از ریزش برگ‌ها، تولید می‌شوند. این امر توجه پژوهشگران و زیست‌شناسان زیادی را بخود جلب نموده است. در این راستا تا کنون مطالعات متعددی در مورد رنگ پاییزی برگ گیاهان به انجام رسیده است. آقای سنجر و همکارانش [۱۰] در زمینه فروپاشی رنگدانه کلروفیل در فصل پاییز و متعاقباً تولید و انباشت رنگدانه آنتوسیانین در برگ گیاهان صنوبر، فندق و بلوط بررسی مفیدی ارائه نموده‌اند. تیلور و همکارانش [۱۴] نقش رنگدانه‌های آنتوسیانینی را به عنوان غربالگر و حفاظ اندام‌های گیاهی در برابر نور مطالعه نموده‌اند. Tsukasa Iwashina و همکارانش [۱۵] مقدار آنتوسیانین‌ها را در برگ پاییزی گیاه *Acer Palmatum* اندازه‌گیری نموده و مشاهده نمودند که با کاهش و زوال رنگدانه کلروفیل، رنگدانه‌های آنتوسیانینی افزایش می‌یابند. Xu Z, Rothstein [۱۲] در بررسی خود به این نتیجه رسید که با توجه به کاهش طول روز و دما در فصل پاییز، رنگدانه کلروفیل بتدریج تجزیه و در عوض رنگدانه آنتوسیانین تولید می‌گردد. Susanne S. Renner و همکارانش [۱۶] تولید و زوال رنگدانه‌های کلروفیل و آنتوسیانین را در چند گیاه متفاوت در نیمکره شمالی زمین مطالعه نموده و وابستگی این تحولات را به دما، طول روز و اقلیم مشاهده کردند. سانگ و همکارانش [۱۸] ارتباط بین متابولیسم آنتوسیانین‌ها و تشکیل رنگ در برگ گیاه *Pakchoie* (*Brassica rapa*) را مطالعه و به ۱۳ ترکیب متفاوت دست یافتند. نمونه و سیر تحول تغییر رنگ برگ پاییزی و انباشت آنتوسیانین‌ها در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است [۱۰-۱۲].

آنتوسیانین‌ها از جمله بیشترین و مهم‌ترین رنگدانه‌های گیاهی هستند. از نظر شیمیایی، آنتوسیانین‌ها، زیر مجموعه پلی‌فنل‌ها و فلاونوئیدها هستند. آنتوسیانین‌ها غالباً از اجزاء اصلی گروه‌های رنگ‌ساز هستند که دامنه فام‌های نارنجی تا آبی را در ساقه‌ها، میوه‌ها و برگ‌ها فراهم می‌آورند. آنتوسیانین‌ها به عنوان رنگ خوراکی نیز مصرف دارند. آنتوسیانین‌ها خواص ضددیابتی، ضدسرطان، ضد التهاب، ضد میکروبی و ضد چاقی از خود نشان داده‌اند. رنگدانه‌های آنتوسیانین در گیاهان بسیار متنوع هستند. تا کنون حدود ۵۰۰ ترکیب آنتوسیانینی و ۲۳ آنتوسیانیدینی مختلف شناسایی شده‌اند. آنتوسیانین‌ها نسخه گلوکوزیدی از آنتوسیانیدین‌ها می‌باشند که دارای ساختارهای شیمیایی مشخصی هستند. در این ساختارها یک حلقه آروماتیک به یک ناجور حلقه دارای اتم اکسیژن متصل می‌باشد که یون فلاویلوم را ایجاد می‌کنند. این دو حلقه به واسطه یک پیوند کربن - کربن به حلقه آروماتیک دیگر اتصال دارند. حلقه‌ها می‌توانند زنجیرهای جانبی متعدد داشته باشند که در ترکیب خواص گوناگونی را ایجاد می‌کند. معمولاً زنجیرهای جانبی از گروه‌های هیدروژن، هیدروکسیل و متیل درست شده‌اند. به هر حال از مجموع ۲۳ ترکیب آنتوسیانیدینی، فقط شش تا از آنها شامل سیانیدین، پئونیدین، پتونیدین، مالویدین، پلاگونیدین و دلفینیدین، غالباً در گیاهان خوراکی یافت می‌شوند (شکل ۳) [۱۴-۲۹].

1- Biochrom



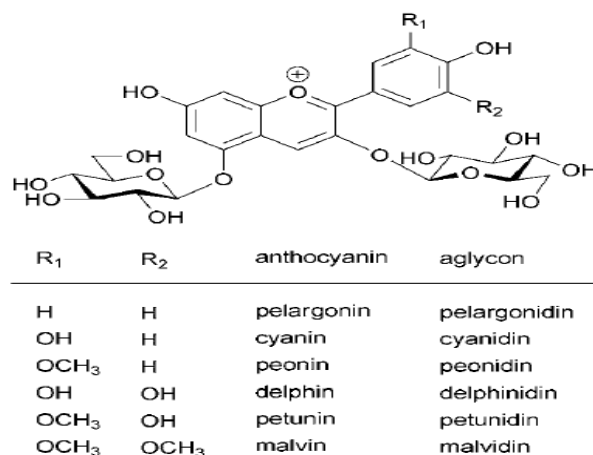
شکل ۱: سیر تحول و چگونگی تجزیه کلروفیل و تشکیل آنتوسیانین در برگ پاییزی درختان [۱۰، ۲۶، ۲۷، ۴۱]. الف: اندام حاوی کلروفیل در برگ، ب: (۱) کلروفیل در کلروپلاست از دست می‌رود، (۲) آنتوسیانین ساخته و وارد حفرات برگ می‌شود، ج: (۱) مولکول‌های کلروفیل گسسته شده‌اند، (۲) افزایش غلظت آنتوسیانین، (۳) بقای کاروتنوئید در کلروپلاست، (۴) سلول‌های پایین‌تر محتوای کلروپلاست، د) گسست کلروفیل و آشکار شدن کاروتنوئیدها بدون آنتوسیانین.

Figure 1: Mechanism of chlorophyll decomposition and anthocyanin formation in autumn leaves of trees [10, 26, 27, 41]. A: Organ contains chlorophyll in the leaf, B: 1) Chlorophyll is lost in the chloroplast, 2) Anthocyanin is made and enters the leaf cavities C: 1) Chlorophyll molecules are disintegrated, 1) Increase in anthocyanin concentration, 3) carotenoid survival in chloroplasts, 4) Lower cells chloroplast content, D) Chlorophyll cleavage and carotenoids appearance without anthocyanins.



شکل ۲: درختچه نادینا - الف) تابستان، ب) پاییز (تهران - جاده مخصوص کرج - سه راه تهرانسر)

Figure 2: Nadina Shrub - A) Summer, B) Autumn, (Tehran - Karaj Special Road - Tehransar junction).



شکل ۳: ساختار شیمیایی عمومی آنتوسیانین‌ها و مشتقات آگلیکون (قندی) آنها [۱۸].

Figure 3: General chemical structure of anthocyanins and their aglycone (sugar) derivatives [18].

۲-۲-۲- روش کار

۲-۲-۱- استخراج رنگدانه‌ها

برگ قرمز پاییزی از گیاهان نادینا در محیط تهران جمع‌آوری، در دمای محیط خشک نموده و تا مش ۵۰ آسیاب گردید. در یک بالن ته گرد به حجم ۲ لیتر، مقدار ۲۰۰ گرم برگ گیاه را با ۵۰۰ میلی‌لیتر اتانل ۵۰ درصد با ۰٫۱ درصد وزنی اسید سیتریک مخلوط نموده و در pH برابر ۳-۴ به مدت ۲ ساعت در دمای زیر ۵۰ درجه سانتی‌گراد، مواد رنگی آن استخراج گردید. محلول استخراجی صاف گردید. محلول بالای صافی چند بار با اتانل شسته شد تا جایی که دیگر ماده رنگی استخراج نشد. ماده استخراج شده فام کاملاً قرمز غالب را دارد. رنگدانه‌های کاروتنوئیدی، چربی‌ها و یا دیگر مواد محلول در چربی‌ها با استفاده از ترکیبات دی اتیل اتر و هگزان نرمال از رنگدانه‌های آنتوسیانینی جداسازی شدند [۳۵-۳۲].

۲-۳-۲- آنالیز

۲-۳-۲-۱- طیف‌سنجی اسپکتروفوتومتر مرئی

آنتوسیانین استخراجی از برگ پاییزی گیاه در محلول اتانل در محدوده طول موج ۳۸۰-۷۰۰ نانومتر با دستگاه اسپکتروفوتومتر Jasco-V570 در pH اسیدی و قلیایی مورد آزمایش طیف‌سنجی قرار گرفت. طیف‌های حاصل در شکل ۴ ارائه شده است [۳۸-۳۵].

۲-۳-۲-۲- کروماتوگرافی لایه نازک

آزمایش کروماتوگرافی لایه نازک با استفاده از سیستم (فاز) حلالی متحرک شامل بوتانل نرمال- اسید استیک - آب- دی اتیل اتر به نسبت ۴-۱-۵-۱ و فاز ثابت ورقه‌های آلومینا سیلیکاژل ۶۰ تجارتي به انجام رسید [۳۹، ۳۵، ۳۲].

۲-۳-۲-۳- آنالیز کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)

آنالیز رنگینه‌های استخراجی با دستگاه HPLC از نوع Knauer series Wellchrom, Germany با ستون C18 (perfect sil, target, ODS-) 3HD 5um با ابعاد ۲۵۰ × ۴٫۶ میلی‌متر، تنظیم آشکارساز در طول موج ۵۲۰ نانومتر برای آنتوسیانین‌ها به انجام رسید. فاز متحرک شامل استونیتریل: آب: اسید استیک گلاسیال به نسبت بترتیب ۲۰ : ۸۰ : ۱ با سرعت جریان یک میلی‌لیتر بر دقیقه و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، مقدار تزریق ۲۰ میکرولیتر، غلظت رنگدانه در محدوده ۰٫۰۰۰۱ مول بر دسی‌متر مکعب انتخاب گردید. کروماتوگرام حاصل در شکل ۸ ارائه گردیده است [۳۹، ۳۲].

تمام آنتوسیانین‌ها از نظر رفتار شیمیایی آمفوتر هستند و در نتیجه با اسیدها و یا قلیاها نمک تشکیل می‌دهند. علاوه بر این، آنتوسیانین‌ها در گیاهان به صورت نمک (بصورت بار مثبت روی ناجور حلقه) وجود دارند و فام آنها در سلول گیاهی بصورت عمده به چگونگی استخلاف‌ها بستگی دارد. علیرغم شمار زیاد آنتوسیانین‌ها، آنها معمولاً خواص جذبی خاصی نشان می‌دهند. آنتوسیانین‌ها بشدت به pH وابسته هستند و فام‌های مختلفی در pH های مختلف دارند که پایداری آنها به دما، نور، فلزات و آنزیمها نیز بستگی دارد. در pH برابر ۲ جذب فرابنفش در طول موج ۲۸۰-۲۶۰ نانومتر و یک پیک در طول موج مرئی ۵۲۳-۴۱۵ نانومتر نشان می‌دهد. تفاوت ساختاری آنتوسیانین‌ها موجب تفاوت در فام آنها می‌شود. دو آنتوسیانین شامل سیانیدین و پتونییدین عامل فام نارنجی - قرمز در گیاهان و سه آنتوسیانین شامل مالویدین، دلفینیدین و پتونییدین موجب فام آبی - قرمز در گیاهان می‌شود [۱۴].

اگرچه در نشریات داخلی در خصوص وجود انواع رنگ‌های مختلف طبیعی در گیاهان، خواص و فایده آنها، به‌منظور استفاده خوراکی از آنها، به‌طور پراکنده مطالبی منتشر شده است. در پژوهش فعلی به‌دلیل فقدان شرح علمی کافی، در منابع علمی و نشریات داخلی، در زمینه سازوکار و چگونگی زوال رنگدانه سبزی کلروفیل و بروز رنگ‌های زرد و قرمز، بویژه آنتوسیانین‌ها در برگ پاییزی گیاهان و رفتار آنها در محیط، به‌عنوان نمونه رنگ قرمز در برگ پاییزی گیاه نادینا دامستیکا بربریداسنا مورد بررسی قرار گرفت.

نادینا دامستیکا از جمله گیاهان گلدار است که از خانواده بربریداسنا می‌باشد که تا ۲ متر ارتفاع، ساقه‌ای صاف با معدودی شاخه است. ساقه تازه‌اش فام صورتی دارد. شکوفه‌های آن درتابستان سفید و یا صورتی است. این گیاه بومی آسیای شرقی است که از هیمالایا تا ژاپن گسترده است. این گیاه به دلیل تولید برگ‌های قرمز روشن جذاب در فصل پاییز، اگرچه دانه میوه‌های آن سمی می‌باشند، به لحاظ زینتی در باغچه‌ها، پارک‌ها و خیابان‌ها کاشته می‌شود (شکل ۲) [۳۱].

۲- بخش تجربی

۲-۱- مواد مصرفی و دستگاه‌های مورد استفاده

برگ قرمز پاییزی از گیاهان نادینا در محیط تهران جمع‌آوری گردید. حلال‌های مصرفی از جمله اتانل، دی اتیل اتر، استونیتریل، نرمال بوتانل و هگزان با خلوص آزمایشگاهی از بازار تهیه گردید. در بخش آنالیز از دستگاه طیف‌سنج مرئی مدل Jasco-V570 و دستگاه HPLC مدل Knauer series Wellchrom, Germany استفاده گردید.

۲-۳-۴- پارامترهای رنگ‌سنجی

عصاره رنگی قرمز فام در محدوده ۷۸۰-۳۸۰ نانومتر با توجه به طول موج بیشینه جذب و سل با طول ۱ سانتی‌متر با دستگاه طیف‌سنج تحت نوری D65 و زاویه دید ۱۰ درجه مورد آزمایش a^* و b^* CIE L* قرار گرفت. بر این اساس a^* برابر ۳۶۰۰ و b^* = ۰۰ = قرمز - ارغوانی، ۹۰۰ = زرد و b^* برابر ۱۸۰۰ = سبز و ۲۷۰۰ = آبی مورد ملاحظه می‌باشد.

۳- نتایج و بحث

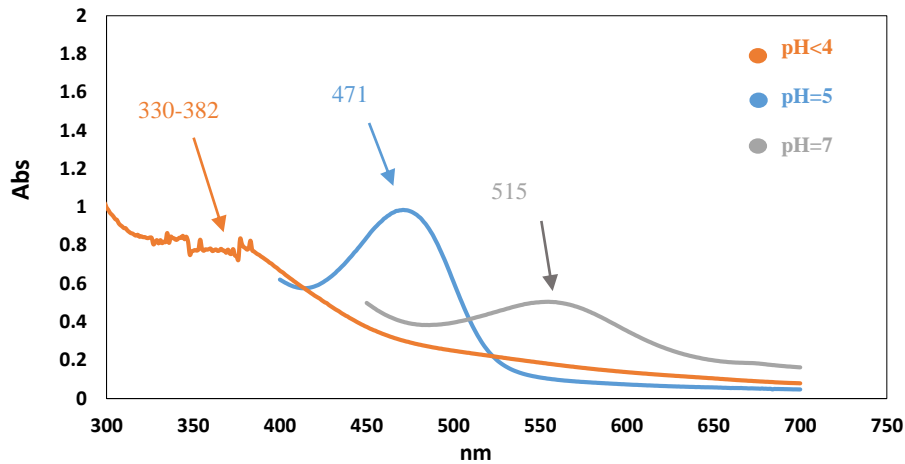
از آنجا که آنتوسیانین‌ها در آب، اتانل و دیگر حلال‌های قطبی براحتی حل می‌شوند، استخراج آنها از بافت گیاهی نیز شرایط آسانی را دارد. شرایط بهینه برای استخراج حداکثر مقدار آنتوسیانین به‌کارگیری اتانل ۵۰ درصد همراه با اسید سیتریک ۰.۱ درصد در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد در pH ۳-۴، در مدت ۱۲۰ دقیقه با بازده بالا است. فام‌های گوناگون آنتوسیانین‌ها در طبیعت به ساختارهای متفاوت آنها مربوط می‌شود که در بین فاکتورهای محیطی به شدت به pH حساس هستند. عصاره آنتوسیانین استخراجی به‌طور معمول دارای پی اچ ۳-۴ و فام شدید قی رمز است. زمانی که در برگ گیاه نسبت آنتوسیانین به کلروفیل بالا است، برگ ارغوانی متمایل به قرمز بنظر می‌رسد. هنگامی که نسبت‌ها پایین است، برگ‌ها ارغوانی شدید در حد ارغوانی - سیاه نشان داده می‌شوند. غالباً آنتوسیانین‌ها فام‌های چندگانه مانند آبی، زرد، قرمز و نارنجی را موجب می‌شوند. در pH برابر و یا کمتر از ۲ عصاره استخراجی رنگ قرمز شدید و با افزایش pH، فام قرمز - صورتی محلول زایل و در pH ۵.۵، محلول فام کم رنگ صورتی - آبی دارد. در pH بالای ۷ عصاره استخراجی فام آبی - سبز را نشان می‌دهد. این نشانه تعادل آنتوسیانینی به شکل‌های مختلف است. در pH اسیدی کمتر و یا برابر ۲، کاتیون فلاویلیوم، حامل بار مثبت، مربوط به آنتوسیانین‌ها غالب است که رنگ قرمز دارد. هنگامیکه پی اچ (pH) افزایش یابد، آنتوسیانین به دلیل پروتون‌زدایی حالت خنثی و یا بازی یونی کوینونوئیدی می‌یابد. در نتیجه کاتیون فلاویلیوم قرمز فام به ترکیب همی‌استال بیرنگ و شکل کوینون آبی فام تبدیل می‌شود (شکل ۶). این ویژگی‌های خاص دلالت بر حضور رنگدانه‌های آنتوسیانینی در برگ پاییزی گیاه نادینا دارد. در pH اسیدی حدود ۳-۴ بیشینه جذب در طیف جذبی فرابنفش - مرئی در طول موج‌های ۳۳۰ تا ۳۸۲ نانومتر ظاهر و در pH ۵ به ۴۷۲ نانومتر جابجا شده و در pH حدود ۷ و یا بالاتر رنگدانه در ۵۲۰-۵۱۵ نانومتر جذب دارد (شکل ۴). در pH

قلیایی فام‌ها ناپایدارند، در حالی که فام قرمز در pH اسیدی تا حدی پایدار است. همان‌گونه که در شکل ۶ بیان شده است، با توجه به تغییر pH، فام عصاره و در نتیجه طول موج بیشینه جذب (قله پیک، شکل ۴) نیز تغییر نموده است. آنالیز عصاره استخراجی برگ پاییزی گیاه نادینا گویای آن است که دو آنتوسیانین دلفینیدین-۳ - گلوکوزید و سیانیدین-۳ - گلوکوزید از جمله آنتوسیانین‌های اصلی در آن هستند که در فصل پاییز تولید شده و در pH اسیدی موجب فام قرمز مشهودی در برگ گیاه می‌گردند. نتایج رنگ‌سنجی عصاره بترتیب $L^* = ۲۹,۲$ ، $a^* = ۸,۳۳$ و $b^* = ۳,۱۷$ را نشان می‌دهد که با فام قرمز عصاره استخراجی مطابقت دارد. در آزمایش کروماتوگرافی لایه نازک، با مشاهده صفحات حاصل زیر نور فرابنفش و با توجه به جدایش اجزاء حضور ۵ ترکیب کاملاً مشهود است.

برای آنتوسیانین‌ها و آنتوسیانیدین‌ها معمولاً مواد استاندارد به سادگی در دسترس نیست. بدین جهت آنها را با توجه به طیف جذبی، زمان بازدارندگی در آنالیزهای کروماتوگرافی و دیگر اطلاعات موجود در منابع علمی مقایسه و شناسایی می‌کنند. همه آنتوسیانین‌ها دارای یک باند جذبی مشخص در ناحیه فرابنفش (۲۸۰-۲۶۰ نانومتر) و دیگری در ناحیه مرئی (۵۵۰-۴۹۰ نانومتر) هستند که البته با توجه به pH جابجایی در جذب نور وجود خواهد داشت. طیف جذبی ماده استخراجی با اطلاعات مندرج در منابع علمی هم‌خوانی مناسبی را نشان می‌دهد (شکل ۴) [۳۷].

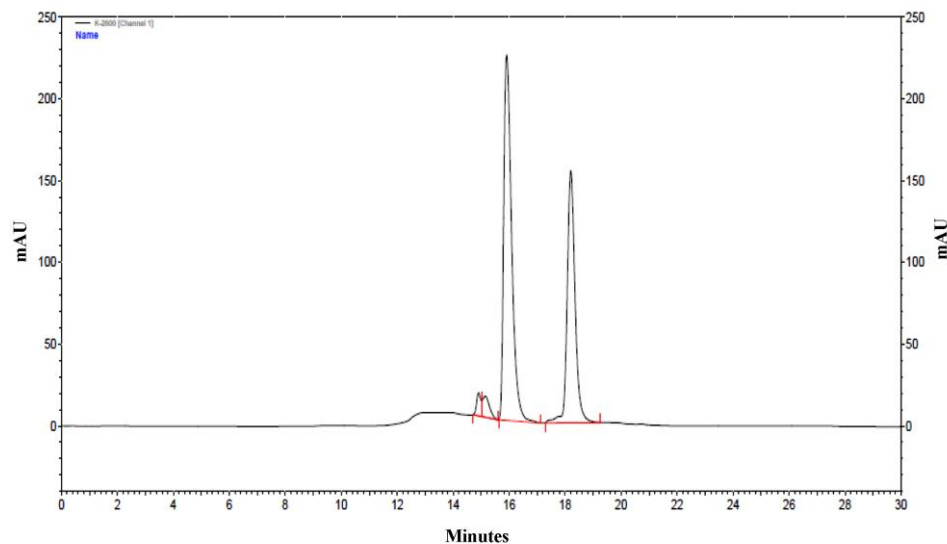
زمان بازدارندگی آنها در کروماتوگرافی به میزان آب‌دوستی آنها ارتباط زیادی دارد. بر اساس اطلاعات مندرج در منابع علمی معمولاً ترکیبات آب‌دوست زودتر از ترکیبات آبریز از ستون کروماتوگرافی خارج می‌شوند. با ملاحظه این واقعیت و با مقایسه کروماتوگرام HPLC مربوط به مواد آنتوسیانینی برگ گیاه نادینا (شکل ۵) با منابع علمی می‌توان نتیجه گرفت که زمان‌های بازدارندگی در دقیقه ۱۱,۹۵، ۱۳,۸۸، ۱۵,۱، ۱۶,۴ و ۱۸,۲ به آنتوسیانین‌های غالب موجود در گیاهان بترتیب به دلفینیدین^۱، سیانیدین^۲، پتونیدین^۳، پلارگونیدین^۴ و مالویدین^۵ اختصاص داشته و به همین ترتیب از ستون خارج می‌شوند، که با گزارش‌های علمی مطابقت مطلوبی را نشان می‌دهند [۴۴-۴۲، ۴۰، ۳۷، ۳۲].

- 1- Delphinidin
- 2- cyanidin
- 3- petunidin
- 4- plargonidin
- 5- malvidin



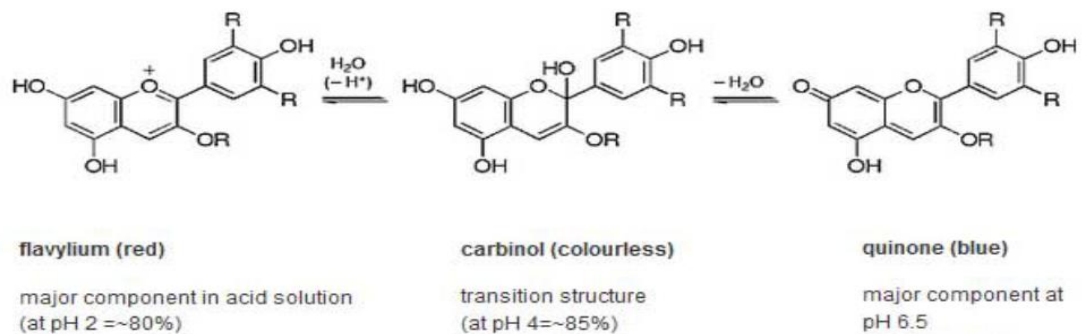
شکل ۴: طیف جذبی مرئی آنتوسیانین استخراج شده از برگ پاییزی گیاه نادینا در pH های مختلف.

Figure 4: Uv-Visible spectrophotometric spectrum of anthocyanins extracted from autumn leaves of Nadina plant at different pH.



شکل ۵: کروماتوگرام HPLC آنتوسیانین استخراج شده از برگ پاییزی گیاه نادینا.

Figure 5: HPLC chromatogram of anthocyanin extracted from autumn leaves of Nadina plant.



شکل ۶: تغییر ساختار کروموفور آنتوسیانین‌ها در اثر تغییر pH در محیط آبی [۱۴، ۳۷، ۴۰].

Figure 6: Chromophore structure change of anthocyanins due to pH change in aqueous medium [14, 37, 40].

۴- نتیجه گیری

کامل از پودر برگ پاییزی گیاه استخراج می‌گردند. آنالیز HPLC در مجموع تعداد ۵ آنتوسیانین، از جمله پلارگونیدین، مالونیدین و پئونیدین در برگ پاییزی گیاه را نشان می‌دهد. فام شدید قرمز ماده استخراجی نشانه وجود بیشترین مقدار از دو آنتوسیانین دلفینیدین-۳ - گلوکوزید و سیانیدین-۳- گلوکوزید از جمله آنتوسیانین‌های اصلی در آن هستند که در فصل پاییز تولید شده و در pH اسیدی موجب فام قرمز مشهودی در برگ گیاه می‌گردند.

تشکر و قدردانی

از سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده فناوری‌های شیمیایی، با عنایت به حمایت مالی و همکاری علمی- فنی تشکر و قدردانی به عمل می‌آید.

تغییر رنگ برگ‌ها در پاییز و به ویژه در مورد درختان و درختچه‌های مناطق سردسیر و معتدله، در اغلب موارد سرآغاز فرآیند پیری است و سرانجام با مرگ و ریزش برگ‌ها همراه است. تغییر رنگ برگ‌ها، پیامدهای بسیار پیچیده، هماهنگ، پویا و پیوسته است که با دریافت پیام‌هایی مانند کوتاه شدن طول روز، کاهش دما و افزایش طول موجهای آبی و پرتو فرابنفش در پاییز آغاز می‌شود و با تغییرات گسترده در سطح سلولی، مولکولی و سرانجام تغییر در بیان ژنها ادامه می‌یابد. تغییر رنگ برگ گیاهان در فصل پاییز، به دلیل فروپاشی رنگدانه کلروفیل و متعاقباً پدیدار شدن فام‌های زرد و قرمز بترتیب ناشی از رنگدانه‌های کاروتنوئیدی و آنتوسیانینی می‌باشند. با استفاده از حلال اتانل ۵۰ درصد در محیط اندک اسیدی، در دمای زیر ۵۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲ ساعت رنگینه‌های آنتوسیانینی به‌طور

۵- مراجع

1. F. Delgado-Vargas, A. R. Jimenez, O. Paredes-Lopez, Natural pigments: Carotenoids, Anthocyanins, and Betalains-characteristics, biosynthesis, processing, and stability. *Crit. Rev Food Sci. Nutr.* 40(3) (2000), 173-289.
2. J. A. Fernandez, L. Lopez, V. Fernandez L. Ledob, J. M. Angostoa, New insights into red plant pigments: more than just natural colorants. *RSC Adv.* 10(2020), 24669.
3. G. T. Sigurdson, P. Tang, M. M. Giusti, Annu. Natural colorants: Food colorants from natural sources, *Rev. Food Sci. Technol.* 8(2017), 261-280.
4. R. K. Hari, T. R. Patel, A. M. Martin, An overview of pigment production in biological systems: functions, biosynthesis, and applications in food industry. *Food Rev. Int.* 10(1994), 49-70.
5. Y. Tanaka, N. Sasaki, A. Ohmiya, Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *Plant J.* 54(2008), 733-749.
6. R. F. Carvalho, M. Takaki, R. A. Azevedo, Plant pigments: The many faces of light perception, *Acta Physiol. Plant.*, 33(2011), 241-248.
7. H. Y. Leong, P. L. Show, M. H. Lim, C. W. Ooi and T. C. Ling, Natural red pigments from plants and their health benefits: A review, *Food Rev. Int.*, 34(2018), 463-482.
8. R. H. Liu, Health-Promoting components of fruits and vegetables in the diet, *Adv. Nutr.*, 4(2013), 384-392.
9. D. B. Rodriguez-Amaya, Natural food pigments and colorants, *Curr. Opin. Food Sci.*, 7(2016), 20-26.
10. J. E. Sanjer, Quantitative investigation of leaf pigments from their inception in buds through autumn coloration to decomposition in falling leaves, *Ecol.*, 52(1971), No. 6, 1075-1089.
11. K. B. Wilson, D. D. Baldocchi, P. J. Hanson, (2001) Leaf age affects the seasonal pattern of photosynthetic capacity and net ecosystem exchange of carbon in a deciduous forest. *Plant Cell Environ.* 24(2001), 571-583.
12. Xu Z, Rothstein S.J. 2018. ROS-Induced anthocyanin production provides feedback protection by scavenging ROS and maintaining photosynthetic capacity in Arabidopsis. *Plant Sign. & Behav.* 13(2018), 1451708.
13. M. Archetti M. Phylogenetic analysis reveals a scattered distribution of autumn colours. *Ann. Bot.* 103(2003), 703-713.
14. T. Iwashina, Y. Murai, Quantitative Variation of Anthocyanins and Other Flavonoids in Autumn Leaves of *Acer palmatum*, *Bull. Natl. Mus. Nat. Sci.*, 34(1) (2008), 53-62.
15. S. F. Taylor, David W. Lee, and N. M. Holbrook, Why Leaves Turn Red in Autumn, The Role of Anthocyanins in Senescing Leaves of Red-Osier Dogwood1, *Plant Phys.* 127, 566-574.
16. S. S. Renner, C. M. Zohner, The occurrence of red and yellow autumn leaves explained by regional differences in insolation and temperature, *New Phytol.* 224 (2019), 1464-1471.
17. D. W. Lee, Anthocyanins in autumn leaf senescence. *Adv. in Botan. Resear.* 37(2002), 37-53.
18. B. Song, H. Xu, L. Chen, X. Fan, Z. Jing, S. Chen and Z. Xu, Study of the Relationship between leaf color formation and anthocyanin metabolism among different purple Pakchoi lines, *Mol.* 25(2020), 4809.
19. J. Keskitalo, G. Bergquist, P. Gardestrum, S. Jansson A cellular time table of autumn senescence, *Plant Phys.* 139(2005), 1635-1648.
20. E. Mlodzinska, Survey of plant pigments: molecular and environmental determination of plant colors. *Acta Biol. Cracovien. Series Botan.* 51(2009), 7-16.
21. H. Ougham, P. Morris, H. Thomas, The colors of autumn leaves as symptoms of cellular recycling and defenses against environmental stresses. *Cur. Top. Develop. Biol.* 66(2005), 135-160.
22. L. Chalker-Scott, Environmental significance of anthocyanins in plant stress responses, *Photochem. and Photobio.*, 70(1999), 1-9.
23. J. B. Harborne, R. J. Grayer, The anthocyanins. In "The Flavonoids, *Adv. in Resear.* (1988), pp. 1-20. Academic Press, New York.
24. B. F. Quirino, Y. S. Noh, E. Himelblau and R. M. Amasino, Molecular aspects of leaf senescence. *Trends in Plant Sci.*

- 5(2000), 278-282.
25. T. S. Feild, D. W. Lee, N. M. Holbrook, Why leaves turn red in autumn. The role of Anthocyanins in senescing leaves of Red-Osier Dogwood. *Plant Physi.* 127(2001), 566-574.
 26. P. Matile, Biochemistry of Indian summer: physiology of autumn leaf coloration. *Exp. Gerontol.* 35(2000), 145-158.
 27. F. Mattivi, R. Guzzon, U. Vrhovsek, M. Stefanini, R. Velasco, Metabolite profiling of grape: flavonols and anthocyanins. *J. Agr. Food Chem.* 54(2006), 7692-7702.
 28. Z. Y. Guo, Z. Y. Zhang, J. Q. Xiao, J. H. Qin, W. Zhao, Antibacterial effects of leaf extract of nandina domestica and the underlined mechanism. *Hindawi Evidence-Based Complem. Altern. Medicine.* (2018), 9.
 29. Ph. Punyachareonnon, V. Deerattrakul, K. Luepong, The influence of pH, temperature and time on dyeing of silk fabric by black bean Anthocyanin-rich extract as colorant. *Prog. Color Colorants Coat.* 14 (2021), 179-186.
 30. H. Hariadi, M. Sunyoto, B. Nurhadi, A. Karuniawan, Study of drying method types on the physicochemical characteristics of purple-fleshed sweet potato extract powder. *Prog. Color Colorants Coat.* 13 (2020), 41-51.
 31. S. M. Dam, K. K. Lam, Extraction of anthocyanins from leaves of perilla ocymoides L. var. *Acta Hort.* (2013), 989.
 32. G. L. Liu, H. H. Guo, Y. M. Sun, Optimization of the extraction of anthocyanins from the fruit skin of rhodomyrtus tomentosa (Ait.) Hassk and identification of anthocyanins in the extract using high-Performance liquid chromatography-electrospray ionization-mass spectrometry (HPLC-ESI-MS). *Inter. J. Mol. Sci.* 13(2012), 6292-6302.
 33. Z. Hasni, J. S. Yaacob, A. I. M. Yusoff, R. M. Taha, R. Yahya, A. Bakrudeen Ali Ahmed, K. Ramesh, Effect of different solvents extraction on recovery of pigments in *Xylocarpus granatum*, endangered medicinal plant. *Mater. Resear. Innov.* 15(2011), 141-143.
 34. J. E. Cacace, G. Mazza, Optimization of extraction of anthocyanins from black currants with aqueous ethanol. *J. Food Sci.* 68(2003), 240-248.
 35. C. Qin, Y. Li, W.N. Ding, R. Zhang, X. Shang, Analysis and Characterisation of Anthocyanins in Mulberry Fruit. *Czech J. Food Sci.* 28(2010), 117-126.
 36. M. Filip, M. Vlassa, F. Copaciu, V. Coman, Identification of anthocyanins and anthocyanidins from berry fruits by chromatographic and spectroscopic techniques to establish the juice authenticity from market. *J. Plan. Chromat.* 25 (2012), 534-541.
 37. P. Shetty, A. Roche, S. B. Somappa, Characterization of Pigments from the Berries of *Syzygium caryophyllatum*: Novel Source of Anthocyanins. *Int. J. Appl. Sci. Biotechnol.* 7(2019), 291-297.
 38. R. Blackburn, M. Benohoud, C. Rayner, Industrial application of anthocyanins extracted from food waste. In: 20th Ann. Green Chem. Eng. Conf., 14-16 Jun 2016, Portland, Oregon, USA.
 39. J. Lee, R. Durst, R. Wrolstad (2005). Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. *J. AOAC Intern.* 88 (2005), 1269-1278.
 40. L. H. Xue, L. P. Yuan, H. E. Qiang, Composition and color stability of anthocyanin-based extract from purple sweet potato. *Food Sci. Technol. Campinas,* 35(2015), 468-473.
 41. Harvardforest.fas.harvard.edu, Harvard university brochure, the process of leaf color change, (2016) .
 42. R. Nabil, S. Anhour, M. Jourdes, P. L. Teissedre, A. N Helal, B. Ezzili, Anthocyanin composition and extraction from Grenachi Noir (*Vitis Vinifera L.*) Vine leaf, using an experimental design II- by ethanol, or sulfur dioxide in acidified water. *J. Int. Sci. Vigne. Vin.* 47(2013), 301-310.
 43. C. Ovando, P. Hernandez, P. Hernandez, E. Rodriguez, G. Vidal, Chemical studies of anthocyanins: A Review. *Food Chem.* 113 (2009), 859-871.
 44. R. N. Cavalcanti, D. T. Santos, & M. A. Meireles, Non-thermal stabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems – an overview. *Food Resear. Inter.,* 44(2) (2011), 499-509.

How to cite this article:

Z. Bahreini, Investigation, Extraction and Chemical Evaluation of Anthocyanin Red Pigment of Nadina Domestica (berberidaceae) shrub in autumn leaves. *J. Color Sci. Tech.* 16, 1(2022), 17-25.

DOR: 20.1001.1.17358779.1401.16.1.2.4