Archive of SID

مقاله علمی پژوهشی/ نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۳۰ شماره ۴/ سال ۱۳۹۹/ صفحات ۱۳۷ تا ۱۴۹

DOI: 10.22034/fr.2021.39570.1736

پایدارسازی آنتوسیانین‌های عصاره چای ترش با استفاده از پلی فنول‌ها

محبوبه اکثیری[۱]، سید احمد شهیدی[۲] و لیلا ناطقی[*۳]

تاریخ دریافت: ۹۹/۲/۱ تاریخ پذیرش: ۹۹/۷/۱۴

[۱] دانشجو دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

[۲] دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد آیت الله آملی، دانشگاه آزاد اسلامی، آمل، ایران

[۳] دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، واحد ورامین- پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین، ایران

[*] مسئول مکاتبه: Email: leylanateghi@yahoo.com

چکیده

زمینه مطالعاتی: آنتوسیانین‌ها به طور گسترده به عنوان رنگ‌های طبیعی در غذاها مورد استفاده قرار می‌گیرند اما در هنگام ذخیره سازی بسیار مستعد تخریب شیمیایی هستند و این مسئله منجر به از بین رفتن رنگ آنها می‌شود. یکی از راهکارهای مؤثر در حفظ رنگ و پایداری آنتوسیانین‌ها، کوپیگمنتاسیون است. **هدف از این تحقیق**: بررسی اثر عصاره‌های گیاهی طبیعی (چای سبز، رزماری، مریم گلی و گل سرخ) در جلوگیری از تخریب رنگدانه‌های آنتوسیانینی موجود در عصاره چای ترش طی دوره نگهداری (۷ روز/ دمای ۴۰°C در حضور نور) بود. **روش کار**: در این مطالعه به عصاره چای ترش با بریکس ۱۲ (به‌عنوان منبع غنی از آنتوسیانین)، ۳۰ درصد وزنی/ وزنی از عصاره‌های گیاهی (به‌عنوان کوپیگمنت) برای مهار تخریب آنتوسیانین‌ها اضافه گردید. به منظور ارزیابی اثر کوپیگمنتاسیون عصاره‌ها و سرعت بخشیدن به تخریب رنگ دانه‌های آنتوسیانینی، به نمونه‌ها میزان ۰/۰۵ درصد وزنی/ وزنی اسید آسکوربیک اضافه شد و سپس تیمارها در دمای ۴۰°C در مقابل نور به مدت ۷ روز نگهداری شدند. **نتایج**: افزودن عصاره‌های گیاهی به طور معنی داری ($P\leq ۰/۰۵$) توانست محتوای آنتوسیانینی عصاره چای ترش را حفظ کند. در این میان پلی فنول‌های موجود در عصاره چای سبز اثر کوپیگمنتاسیون مؤثرتری را نسبت به سایر عصاره‌های گیاهی دیگر از خود نشان دادند و شاخص تخریب آنتوسیانین در حضور این ترکیب، در روز ۷ نگهداری از ۳/۱۵۰ به ۱/۹۳۰ تقلیل یافت. **نتیجه گیری کلی**: نتایج نشان دادند که پایداری آنتوسیانین‌ها در حضور اسید آسکوربیک به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت. افزودن عصاره‌های گیاهی (چای سبز، رزماری، مریم گلی و گل سرخ) به عنوان منابع غنی از پلی فنول توانست به طور قابل توجهی پایداری آنتوسیانین‌ها را افزایش دهد. مؤثرترین عصاره در مهار تخریب آنتوسیانین‌ها، عصاره چای سبز بود. به طور کلی، این مطالعه استفاده بالقوه از پلی فنول‌های خاص در تقویت پایداری رنگ دانه‌های آنتوسیانینی در هنگام استفاده از اسید آسکوربیک را نشان می‌دهد.

واژگان کلیدی: آنتوسیانین، چای ترش، کوپیگمنتاسیون، اسید آسکوربیک، چای سبز

www.SID.ir

Archive of SID

مقدمه

چای ترش با نام علمی(*Hibiscus sabdariffa*. L) گیاهی یک ساله یا دو ساله متعلق به خانواده پنیرکیان است که ارتفاع آن گاهی به ۴ متر نیز می‌رسد. این گیاه در سراسر جهان، در مناطق گرمسیر و نیمه گرمسیر کشت می‌شود و در نواحی تولید کننده به نام روسل معروف می‌باشد (یادونگ و همکاران ۲۰۰۵). چای ترش بومی غرب آفریقا می‌باشد و در ایران تنها در استان سیستان و بلوچستان کشت می‌شود (صندوق داران ۱۳۷۹). مهمترین بخش گیاه چای ترش، کاسبرگ‌های آن است. کاسبرگ خشک گیاه چای ترش حاوی فلاونوئید، آنتوسیانین، گوسیپتین، مقدار بالایی اگزالیک اسید، سوکسینیک اسید و اسیدهای آلی است. از کاسبرگ این گیاه برای درمان فشار خون بالا، اسهال، آبسه دهان و درمان اسکوربیت (کمبود ویتامین ث) استفاده می‌شود. همچنین چای ترش در مقایسه با خانواده مرکبات دارای اسید آسکوربیک بیشتری می‌باشد (نورهیزان و همکاران ۲۰۱۰ و یوردیانسیا و همکاران ۲۰۱۲ و میلنا و همکاران ۲۰۱۲). چای ترش به صورت بالقوه منبع خوبی از آنتی اکسیدان‌های طبیعی است که می‌توانند از بدن در برابر آسیب‌های ناشی از رادیکال‌های آزاد و پراکسیداسیون لیپیدی محافظت کنند. اثرات محافظتی احتمالاً از طریق مقادیر بالای آسکوربیک اسید، بتاکاروتن و ترکیبات فنولی و به خصوص آنتوسیانین‌ها (دلفنیدین ۳-گلوکوزید، دلفینیدین-۳-سمبوبیوساید و سیانیدین-۳-سمبوبیوساید) اعمال می‌شود (پاولینگ و همکاران ۲۰۰۲ و عزیز و همکاران ۲۰۰۷). آنتوسیانین‌ها، مشتقات گلیکوزیدی پلی هیدروکسیل و متوکسیل نمک‌های ۲ فنیل بنزوپیریلیوم، رنگ دانه غیر سمی و محلول در آب است که به طور گسترده‌ای در طبیعت یافت می‌شود. امروزه به دلیل خواص فراوان نظیر فعالیت آنتی اکسیدانی و ویژگی های فیزیولوژیکی مختلف از جمله خواص ضد سرطانی، ضد التهاب، ضد حساسیت و پیشگیری از انسداد شریان قلب، کاهش کلسترول و فشار خون بالا و... مصرف آنتوسیانین‌ها در دنیا بسیار مورد توجه قرار گرفته است (تولکر و همکاران ۲۰۰۷، اولالی ۲۰۰۷ و الیانا و همکاران ۲۰۰۷). آنتوسیانین‌ها بسیار ناپایدار بوده و به راحتی مستعد تخریب می‌باشند. مطالعات نشان می‌دهد که عوامل مختلفی روی رنگ و پایداری رنگ دانه‌های آنتوسیانین اثر دارند که از آن جمله می‌توان به ساختار و غلظت آن، pH، دما، نور، اکسیژن، آنزیم، قندها، اسید آسکوربیک و حضور کوپیگمنت[1] اشاره کرد (مالین-آبرت و همکاران ۲۰۰۱).

خطیب زاده و جعفر زاده، (۱۳۹۵) به بررسی اثر pH بر کوپیگمانتاسیون آنتوسیانین گلبرگ زعفران پرداختند و گزارش کردند بهترین محدوده pH برای کوپیگمنتاسیون آنتوسیانین گلبرگ زعفر ان ۱ تا ۳ بوده است.

مطالعات نشان می‌دهد که یکی از راه‌های مؤثر در حفظ رنگ و پایداری آنتوسیانین‌ها تجمع آن‌ها با ترکیباتی به نام کوپیگمنت می‌باشد (کاوالکانتی و همکاران ۲۰۱۱). کوپیگمانتاسیون[2] پدیده‌ای است که در آن رنگدانه‌های ناپایدار با ترکیبات آلی در نقش کوپیگمنت، تشکیل تجمع یا کمپلکس مولکولی می‌دهند و در طی این عمل پایداری شان افزایش می‌یابد (گوردیلو و همکاران ۲۰۱۲). انواع زیادی از ترکیبات به عنوان کوپیگمنت عمل می‌کنند. کوپیگمنت‌ها به طور طبیعی در گیاهان عالی یافت می‌شوند و تاکنون محدوده بسیار وسیعی از ترکیبات با ساختار متفاوت به عنوان کوپیگمنت شناسایی شده‌اند که متداول ترین آنها فلاونوئیدها، اسیدهای آلی و ترکیبات فنولی می‌باشند (مازا و برویلارد ۱۹۹۰).

یکی از بهترین منابع آنتی اکسیدان‌های طبیعی، ترکیبات فنولی هستند که توزیع فراوانی هم در گیاهان دارند (شهیدی ۲۰۰۰). پلی‌فنول‌ها یک گروه ویژه از متابولیت‌های ثانویه هستند که مشخصه آن‌ها داشتن چندین گروه فنولی است (امس و همکاران ۱۹۹۳). خاصیت آنتی اکسیدانی گیاهان به میزان ترکیبات پلی - فنولی آنها بستگی دارد (ویسمن و همکاران ۱۹۹۶). از منابع گیاهی مختلف می‌توان به چای سبز (حاوی اپی کاتچین، اپی کاتچین گالات، اپی گالو کاتچین و اپی گالو کاتچین گالات)، رزماری (حاوی فلاونوئیدها و فنول‌های

[1] Co-pigment

[2] Copigmentation

www.SID.ir

Archive of SID

دی ترپن)، گل سرخ (دارای فلاونوئیدها و آنتوسیانین‌ها به ویژه سیانیدین‌ها) و مریم گلی (دارای فلاونوئیدها و اسیدهای فنول همچون کوئرستین، کامفرول، لوتئولین، میریستین) اشاره کرد که منابع بسیار خوبی از ترکیبات فنول هستند که در صنایع غذایی بسیار مورد توجه واقع شده‌اند (دوک ۱۹۸۹، باگات و همکاران ۲۰۰۳، اسچیبر و همکاران ۲۰۰۵ و آکول ۲۰۰۸). در سال‌های اخیر به منظور پایداری سازی آنتوسیانین‌ها بررسی‌های مختلفی به انجام رسیده است. ایرو و هاینونن (۲۰۰۲) به بررسی اثر کوپیگمنت‌های مختلف نظیر اسید گالیک، اسید کافئیک، اسید فرولیک، اسید رزمارینیک و اسید کلروژنیک بر پایداری رنگ آنتوسیانین‌های پلارگونیدین۳ گلوکوزید، سیانیدین۳ گلوکوزید، مالویدین ۳- گلوکوزید، سیانیدین۳ (کومارویل-گلوکوزیل) گالاکتوزید، سیانیدین۳ (گلوکوزیل-گزیلوزیل) گالاکتوزید پرداختند. آن‌ها دریافتند قویترین کوپیگمنت برای تمامی آنتوسیانین‌ها اسید فرولیک و اسید رزمارینیک است. اما افزایش رنگ آنتوسیانین‌ها در طول ۶ ماه انبارمانی توسط اسید رزمارینیک پایداری کمی در طی نگهداری داشت. تالکوت و همکاران (۲۰۰۳) به بررسی افزایش شدت رنگ آب انگور قرمز توسط کوپیکمنتاسیون پرداختند، نتایج نشان داد افزودن اسید رزمارینیک در مقادیر ۰/۲ و ۰/۴ درصد حجمی/ حجمی در روز اول منجر به افزایش میزان کل آنتوسیانین های آب انگور قرمز از ۱۲۱۰mg/l در لیتر در نمونه شاهد به ترتیب به ۱۲۲۰mg/l و ۱۲۴۰ گردید. کلمنت و گالی (۲۰۱۱)، اثر افزودن میزان کوپیگمنت کافئیک اسید را روی کوپیگمانتاسیون آنتوسیانین‌های ضایعات انگور بررسی کردند و مشاهده نمودند که افزایش میزان کوپیگمنت نسبت به عصاره خام سبب افزایش جذب می‌شود. در واقع با افزایش غلظت کوپیگمنت، امکان ایجاد کمپلکس بین کوپیگمنت و آنتوسیانین بیش‌تر می‌شود که در نتیجه پایداری بیش‌تر و جذب بالاتری مشاهده می‌شود. چانگ و همکاران (۲۰۱۶)، مطالعه‌ای بر روی پایدار آنتوسیانینی عصاره هویج بنفش در حضور چای سبز، وانیل و اسید آسکوربیک انجام دادند که نتایج حاصله نشان داد که عصاره چای سبز به طور قابل توجهی توانست پایداری آنتوسیانین‌ها را در طی مدت زمان نگهداری افزایش دهد. جادهاوا و بهوجبال (۲۰۱۹)، به بررسی اثر کوپیگمنتاسیون بر پایداری حرارتی آنتوسیانین‌های چای ترش پرداختند. در این مطالعه عصاره آنتوسیانین‌های استخراج شده از چای ترش که با اسید فرولیک به نسبت ۱ به ۶ در pH=۲/۵ کوپیگمنت شده بودند به طور قابل توجهی باعث افزایش پایداری آنتوسیانین‌ها شدند. افزودن اسید آسکوربیک به محصولات صنایع نوشیدنی، علی‌الخصوص به نوشیدنی‌هایی که از آب میوه به دست می‌آید، امری متداول است. از طرفی دیگر اسید آسکوربیک باعث افزایش سرعت تخریب آنتوسیانین در نوشیدنی‌های حاوی آنتوسیانین می‌گردد. روش کوپیگمنتاسیون می تواند یک راهکار عملی برای جلوگیری از تخریب آنتوسیانین‌ها باشد.

در این مطالعه به بررسی اثر کوپیگمنتاسیونی هر چه بیشتر ترکیبات آنتوسیانینی موجود در عصاره چای ترش توسط عصاره های گیاهی (رزماری، مریم گلی، گل سرخ و چای سبز) حاوی ترکیبات فنول به عنوان کوپیگمنت پرداخته شد. به‌منظور سرعت بخشیدن به تخریب رنگ دانه‌های آنتوسیانینی از عوامل افزایش دهنده تخریب مانند دمای بالای نگهداری، نور و حضور اسید آسکوربیک استفاده شد.

مواد و روش‌ها

نمونه‌های برگ گل چای ترش، چای سبز، رزماری، مریم گلی و گل سرخ از عطاری واقع در تبریز خریداری گردید. سپس توسط هرباریوم گیاهان دارویی دانشکده داروسازی دانشگاه تهران نام علمی آنها به شرح زیر تایید گردید. چای ترش با نام علمی *Hibiscus sabdariffa Linn.* از واریته *Sabdariffa* و چای سبز با نام علمی *Camelliasinensise L.* از واریته *Sinensis*بود. نام علمی رزماری *Rosmarinusofficinalis L.* و نام علمی مریم گلی ایرانی *Saliva Officinalis L.* شناسایی شد. نام علمی گل سرخ، *Rosadamascene* تایید شد که به

www.SID.ir

Archive of SID

عنوان گل محمدی در ایران شناخته شده است و یکی از گونه‌های مهم خانواده *Rosaceae* می‌باشد.

سایر مواد شیمیایی شامل متانول، پتاسیم کلرید ۰/۲ مولار، کلریک اسید ۰/۲ کولار، سدیم استات ۱ مولار، سود ۰/۱ نرمال، اسید سیتریک ۱ مولار و اسید آسکوربیک دارای درجه آزمایشگاهی بوده و از شرکت مرک آلمان تهیه گردید.

عصاره گیری چای ترش

به منظور عصاره گیری از چای ترش به عنوان منبع غنی از آنتوسیانین، از کاسبرگ‌های خشک شده چای ترش که حاوی ۵ درصد رطوبت بودند استفاده شد. متانول و آب به نسبت ۰/۵ به ۱/۵ به عنوان سیستم حلال برای استخراج استفاده گردید. ۵۰ میلی لیتر از حلال به ۱۵۰ سی‌سی آب در ارلن ۲۵۰ میلی لیتر مخروطی حاوی ۶ گرم از گلبرگ اضافه گردید. ارلن توسط پوشش پلی اتیلن محکم به منظور جلوگیری از تبخیر حلال پوشش داده شد. سپس در یک تکان دهنده مداری در دمای ۴۰°C به مدت ۴ ساعت به منظور استخراج کامل رنگ دانه آنتوسیانینی نگه داشته شد. سپس عصاره استخراج شده توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۱ از کاسبرگ‌ها جدا گردید و توسط روتاری اواپراتور در دمای ۶۰°C تا بریکس ۱۲ تغلیظ گردید (کومار و همکاران ۲۰۱۷).

عصاره گیری ترکیبات گیاهی/ پلی فنول

به منظور تهیه سایر عصاره‌های گیاهی (چای سبز، رزماری، مریم گلی و گل سرخ) ۲۶۰ گرم برگ این گیاهان خشک و به صورت پودر درآمدند، گلبرگ‌های خشک شده چای سبز، رزماری، مریم گلی و گل سرخ حاوی ۵ درصد رطوبت بودند.

سپس هر کدام در ۲۶۰۰ میلی لیتر آب مقطر مخلوط گردیدند و به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۶۰ درجه سانتی گراد باقی ماندند تا عصاره ۱۰ درصد تهیه شود. میزان ترکیبات فنلی عصاره‌های چای سبز، رزماری، گل سرخ و مریم گلی به ترتیب برابر(mg/l)۵/۸۵، ۴/۴۰۶۷/۴۰ و ۴/۵۴ بود. به منظور بررسی اثر کوپیگمنتاسیونی عصاره‌ها ۳۰ درصد وزنی/وزنی از این عصاره‌ها به عصاره چای ترش (به‌عنوان منبع آنتوسیانینی) با بریکس ۱۲ اضافه گردید. همچنین به منظور سرعت بخشیدن به روند تخریب رنگ دانه‌های آنتوسیانینی، به همه تیمارها (به جز تیمار شاهد) میزان ۰/۰۵ درصد وزنی/ وزنی اسید آسکوربیک اضافه گردید و به مدت ۳۰ دقیقه مخلوط شدند (جدول ۱). شایان ذکر است که روند تخریبی آنتوسیانین‌های عصاره چای ترش در حضور ۰/۰۵ درصد وزنی/وزنی اسید آسکوربیک و بدون حضور کوپیگمنت هم مورد بررسی قرار گرفت. pH تمامی محلول‌ها توسط اسید سیتریک ۱ مولار، روی ۲ تنظیم گردید. سپس تمام محلول‌ها به مدت ۷ روز در دمای ۴۰°C در معرض نور محیط به منظور سرعت بخشیدن به روند تخریبی آنتوسیانین ذخیره شدند و در **روزهای ۳ و ۷ نمونه برداری گردید** (چانگ و همکاران ۲۰۱۶).

جدول ۱- تیمارهای مورد استفاده مطابق با طرح کاملاً تصادفی

Table 1-Treatmentsof studyaccording to a completely randomized design

Treatment	Sample
1	Anthocyanin (control)
2	Anthocyanin + Ascorbic acid 0.05%
3	Anthocyanin + Ascorbic acid 0.05% + Green tea extract 30% w/w
4	Anthocyanin+ Ascorbic acid 0.05% + Rosemary extract 30% w/w
5	Anthocyanin+ Ascorbic acid 0.05% + Rose extract 30% w/w
6	Anthocyanin+ Ascorbic acid 0.05% + Sage extract 30% w/w

آزمون اندازه‌گیری مقدار آنتوسیانین‌ها

مقدار ترکیبات آنتوسیانین با استفاده از روش تغییر pH تعیین گرد ید. بدین صورت که ابتدا ۲ میلی لیتر از عصاره استخراج شده گیاهی با ۲۵ میلی لیتر محلول بافر دارای pH=۱ که شامل پتاسیم کلرید ۰/۲ مولار و کلریک اسید ۰/۲ مولار به حجم رسانده شده و سپس ۲

www.SID.ir

Archive of SID

میلی لیتر دیگر از این عصاره ا ستخراج شده گیاهی با محلول بافر دارای pH = ۴/۵ که شـامل سدیم استات ۱ مولار و کلریدریک اسید ۱ مولار به حجم ۲۵ میلی لیتر رسانده شده و جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۱۰ نانومتر توسـط دسـتگاه اسـپکتوفوتومتر UV-vis (مـدل Biochrom S200، ساخت انگلیس) قرائت گردید. غلظت آنتوسیانین‌ها توسط فرمول ۱ محاسبه گردید.

Anthocyanin content mg/l = (Abs pH 1- Abs pH 4.5) × 484.82 × 1000/24825 × DF[فرمول ۱]

اعداد ۴۸۴/۸۲ و ۲۴۸۲۵ به ترتیب وزن مولکولی و ضریب جذب مولی (ζ) مولکول سیانیدین -۳- گلوکوزید در طول موج ۵۱۰ نانومتر در محلول بافری می‌باشد. DF نیز عامل رقت محسوب می‌شود (رپیساردا و همکاران ۲۰۰۰).

آزمون شاخص تخریب آنتوسیانین (DI)[1]

شاخص تخریب آنتوسیانین با استفاده از تقسیم میزان جذب در ۴۲۰ نانومتر به میزان جذب در ۵۲۰ نانومتر به دست آمد (فرمول ۲). بدین صورت که جذب نمونه‌ها در طول موج‌های ۵۲۰ و ۴۲۰ نانومتر اندازه‌گیری شد و از بافر سیترات ۰/۱ مولار جهـت صـفر کردن دستگاه استفاده گردید. افزایش در DI بعد از تخریب رنگ دانه معمولاً نشان دهنده کاهش رنگ قرمز (A520) و افزایش رنگ قهوه‌ای (A420) اسـت. جذب در طول موج ۴۲۰ (A420) و جذب در طول موج ۵۲۰ (A520) مارکاکیس (۱۹۸۲).

DI = A420 /A520[فرمول ۲]

آزمون تعیین میزان کل پلی فنول‌ها

مقدار کل ترکیبات پلی فنول موجود در تیمارهای مورد بررسی توسط رنگ سنجی با معرف فولین سیوکالتو مورد بررسی قرار گرفت. اساس کار بدین صورت است که ۱۰ میلی لیتر از هر نمونه در ۱۰ میلی لیتر اتانول ۹۶ درصـد مخلوط گردید، به همین روش اسید گالیک با اتانل رقیق شد. سپس به لوله آزمایش مربوط به نمونه ۱۰۰µl از نمونه رقیق شده و به لوله آزمایش کنترل مثبت ۱۰۰ µl از محلول اسید گالیک رقیق شده اضافه گردید و به لوله آزمایش کنترل منفی مقدار ۱۰۰µl از معرف فولین سیوکالتو اضافه شد. پس از اختلاط کامل لوله‌های مورد آزمایش را به مدت ۵ دقیقه نگه داری گردید. به هر لوله آزمایش مقدار ۷۵۰µl کربنات سدیم ۶ درصد به منظور انجام واکنش احیا و تشدید رنگ اضافه شد. لوله‌ها را برای انجام واکنش برای مدت زمان ۶۰ دقیقه در تاریکی قرار گرفتند. در نهایت شدت جـذب بـا دسـتگاه اسـپکتروفتومتر در طول موج ۷۸۰ نانومتر قرائت شد. میزان کل ترکیبات پلی فنولی موجود در عصاره توسط فرمول ۳ محاسبه گردید و بر حسب میلی گرم هم ارز اسید گالیک در میلی لیتر نمونه با استفاده از منحنی استاندارد بیان شد در انجام این آزمون از استاندارد ملی شماره ۱۱۷ کمک گرفته شد (موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران ۱۳۹۲).

$$TP=\frac{A2\times C2}{A1}$$ [فرمول ۳]

که در آن TP پلی فنول کل نمونه بر حسب mg/ml و C2 غلظت اسید گالیک بر حسب A1،mg/ml جذب اسید گالیک استاندارد و A2 جذب نمونه است.

آنالیز آماری

تمام آزمایش‌ها در قالب طـرح کاملاً تصـادفی در سـه تکرار انجام شد. داده‌های حاصل از سنجش‌های انجام شده بر اساس روش آنالیز واریانس یک طرفه دانکن با ۹۵ درصد اطمینان با استفاده از نرم افزار مینی تب[2]۱۶ مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت.

نتایج و بحث

تأثیر اسید آسکوربیک بر پایداری آنتوسیانین‌ها

شکل ۱ پایداری رنگ آنتوسیانین در نمونه‌ها در حضور و عدم حضور اسید آسکوربیک را نشان می‌دهد. در مطالعه حاضـر حضـور اسـید آسـکوربیک تأثیر منفی بر روی پایداری آنتو سیانین‌ها دا شت و باعث کاهش معناداری در میزان پایداری آنتوسیانین‌ها در مقایسه با نمونه شاهد که

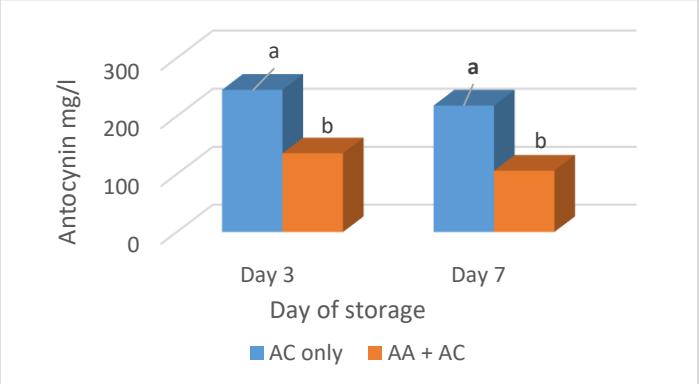
[1] Destructive Index

[2] Minitab

www.SID.ir

Archive of SID

میزان آن در روز صفر(mg/l) ۴۹/ بود، شده است($P\leq ۰/۰۵$). بطوریکه محتوای آنتوسیانینی در نمونه شاهد در روز هفتم از ۲۱۸ به ۱۰۶ mg/ml در نمونه حاوی اسید آسکوربیک می‌رسد. در همین راستا نتایج به دست آمده با نتایج وست و مائور (۲۰۱۳) و هرنانـدز-هررو و فروتوس (۲۰۱۵) و چانگ و همکاران (۲۰۱۶) مطابقت داشت.



شکل ۱- نمونه‌های حاوی آنتوسیانین بدون (AC) و با اسید آسکوربیک(AA) در دمای ۴۰°C در طی ۳ و ۷ روز نگهداری در مقابل نور

Figure 1-Samples containing anthocyanin without and with ascorbic acid (0.05%) at 40 °C for 3 and 7 days of exposure to light

کاهش رنگ آنتوسیانین در حضور اسید آسکوربیک می‌تواند از طریق دو مکانیسم اصلی اتفاق بیفتد: (الف) واکنش تراکمی بین آنتوسیانین و اسید آسکوربیک و یا (ب) اتوکسیداسیون اسید آسکوربیک و تولید رادیکال‌های آزاد (به عنوان مثال، پراکسید هیدروژن) که هسته فلاویلیوم آنتوسیانین‌ها را شکاف می‌دهد (مرکادانته و بوبیو ۲۰۰۷ و وست و مائور ۲۰۱۳). در بسیاری از نوشیدنی‌ها آنتوسیانین‌ها و اسید آسکوربیک به ترتیب به خاطر افزایش رنگ طبیعی و طعم و ویژگی‌های تغذیه‌ای افزوده می‌شوند؛ بنابراین، در این مطالعه، ما مزایای بالقوه اضافه کردن عصاره‌های گیاهی و پلی فنول‌ها (۳۰ درصد وزنی/ وزنی) را برای تقویت پایداری آنتوسیانین به منظور جلوگیری از تخریب رنگ ارزیابی کردیم.

جدول ۲- بررسی روند تغییرات محتوای آنتوسیانینی(mg/l) محلول‌های آنتوسیانین حاوی اسید آسکوربیک و عصاره‌های گیاهی/ پلی فنول چای سبز، گل سرخ، مریم‌گلی و رزماری طی روزهای ۳ و ۷ نگهداری در دمای۴۰°C در مقابل نور

Table 2-Change of anthocyanin content (mg/l) in anthocyanin solutions containing ascorbic acid and plant extract/polyphenol green tea, rose, sage and rosemary stored at 40 °C for 3 and 7 days of exposure to light

Treatment	Sample	3 Days	7Days
1	Anthocyanin (control)	161.40 ± 3.23^{dA}	140.20 ± 2.80^{Db}
2	Anthocyanin + Ascorbic acid 0.05%	136.12 ± 5.44^{eA}	106.12 ± 4.24^{eB}
3	Anthocyanin + Ascorbic acid 0.05% + Green tea extract 30% w/w	260.49 ± 7.81^{aA}	254.56 ± 7.60^{aA}
4	Anthocyanin + Ascorbic acid 0.05% + Rosemary extract 30% w/w	189.15 ± 3.78^{cA}	169.18 ± 3.38^{cB}
5	Anthocyanin + Ascorbic acid 0.05% + Rose extract 30% w/w	224.25 ± 6.73^{bA}	207.12 ± 6.21^{bB}
6	Anthocyanin + Ascorbic acid 0.05% + Sage extract 30% w/w	200.53 ± 8.02^{cA}	181.57 ± 7.26^{cB}

The results are shown as mean ± SD

a-e Showed Significant differences each column ($P\leq0.05$) A-D Showed Significant differences each row ($P\leq0.05$)

www.SID.ir

Archive of SID

تأثیر عصاره گیاهی یا پلی فنول بر پایداری آنتوسیانین

چهار فیتوکمیکال به دلیل پتانسیل خوب به منظور مهار کاهش تخریب آنتوسیانین در عصاره چای ترش مورد بررسی قرار گرفتند. افزودن عصاره‌های گیاهی چای سبز، رزماری، گل سرخ و مریم گلی به عنوان منابع غنی از پلی فنول در حضور اسید آسکوربیک باعث افزایش محتوای آنتوسیانینی نسبت به نمونه شاهد و تیمار شماره ۲ گردید و همچنین پایداری محتوای آنتوسیانینی را در طی مدت زمان نگهداری افزایش داد (جدول ۲).

در بین کوپیگمنت‌های به کاررفته (عصاره‌های گیاهی)، تیمار شماره ۳ که حاوی ۳۰ درصد وزنی/ وزنی چای سبز بود دارای بالاترین میزان ترکیبات آنتوسیانینی است (۲۶۰/۴۹mg/l) که این مسئله می‌تواند به علت پدیده کوپیگمنتاسیون باشد. به بیان دیگر پایداری بیشتر آنتوسیانین در هنگام افزودن چای سبز به عنوان منبع پلی فنول که غنی از ترکیباتی همچون کاتچین، گالو کاتچین، اپی کاتچین، اپی گالوکاتچین، اپی کاتچین گالاتو اپی گالوکاتچین گالات می‌باشد این است که از حمله مولکول‌های آب به یون فلاویلیوم که باعث از بین رفتن رنگ می‌شود جلوگیری می‌کنند (کوپچار و همکاران ۲۰۱۴). به دنبال آن، افزودن عصاره‌های گل سرخ، مریم گلی و رزماری (به‌عنوان منابع دیگر پلی فنول) در مرتبه‌های بعدی به منظور محافظت از آنتوسیانین قرار گرفته‌اند. تمامی نمونه‌های کوپیگمنته شده در شرایط تعریف شده نسبت به تیمار شاهد و تیمار شماره ۲ (نمونه حاوی اسید آسکوربیک) اثر محافظتی قابل توجهی را در طی مدت زمان نگهداری از خود نشان دادند که در این عصاره چای سبز اثر کوپیگمنتاسیونی قوی تری را نسبت به سایر عصاره های گیاهی دیگر از خود نشان داد که علت آن می‌تواند مربوط به میزان بالاتر ترکیبات فنلی در عصاره چای سبز نسبت به سایر عصاره ها و همچنین حضور اسید گالیک در عصاره چای سبز باشد که باعث حفاظت بیشتر از آنتوسیانین شده است. اسید گالیک می‌تواند ساختار آنتوسیانینی چای ترش را از حمله آب به عوامل آبدوست آن محافظت نماید و در نتیجه باعث پایداری بیشتر ساختار آنتوسیانین شود (خطیب زاده و جعفر زاده، ۱۳۹۵).

یافته‌های این پژوهش با نتایج پلیزوتا و همکاران (۲۰۱۳) و کوپچار و همکاران (۲۰۱۴) و چانگ و همکاران (۲۰۱۶) و جادهاوا و بهوجبال (۲۰۱۹) مطابقت داشت. بطوریکه کوپچار و همکاران (۲۰۱۴) که به بررسی تأثیر افزودن عصاره‌های گیاهی برگ زیتون، چای سبز، شراب قرمز بر پایداری آنتوسیانینی آب توت سیاه پرداختند و نتایج نشان داد که در میان عصاره‌های گیاهی مذکور عصاره چای سبز بهترین عملکرد را داشته است. پلیزوتا و همکاران (۲۰۱۲) به بررسی تأثیر افزودن عصاره چای سبز در پایداری مربا رژیمی بلوبری پرداختند و دریافتند که محتوای آنتوسیانین در حضور عصاره چای سبز به خوبی حفظ گردید. جادهاوا و بهوجبال (۲۰۱۹)، به بررسی اثر کوپیگمنتاسیونی بروی پایداری حرارتی آنتوسیانین‌های چای ترش پرداختند. در این مطالعه عصاره آنتوسیانین‌های استخراج شده از چای ترش همراه با اسید فرولیک به طور قابل توجهی باعث افزایش پایداری آنتوسیانین‌ها شدند.

نتایج اندازه‌گیری تغییرات DI (شاخص تخریب)

شاخص تخریب نیز محاسبه و نتایج آن در جدول ۳ ارائه شده است. همان‌طور که مشاهده می‌شود، تیمار شماره ۳ دارای کمترین شاخص تخریب (۱/۹۳۰) و تیمار شماره ۲ دارای بالاترین شاخص تخریب (۳/۱۵۰) در روز هفتم نگهداری در بین نمونه‌های مورد مطالعه بودند. این نتایج مطابق با نتایج مربوط به محتوای آنتوسیانین آن بود. به بیان دیگر، پس از آماده سازی نمونه‌ها، تیمار شماره ۲ بالاترین محتوای آنتوسیانینی و پایین ترین شاخص تخریب را داشت. به طور کلی افزایش در شاخص تخریب نشان دهنده افزایش در تخریب رنگ دانه آنتوسیانین‌ها می‌باشد. در طی نگهداری، آنتوسیانین‌ها تجزیه می‌شوند و شاخص تخریب افزایش می‌یابد. از دلایل افزایش شاخص تخریب می‌توان به دما، pH، اکسیژن، آنزیم‌ها، اسید آسکوربیک و... اشاره کرد. افزودن عصاره‌های گیاهی به عصاره چای ترش به طور معناداری توانست شاخص تخریب را کاهش دهد ($P\leq ۰/۰۵$)؛ زیرا

www.SID.ir

Archive of SID

عصاره‌های گیاهی حاوی ترکیبات پلی فنولک هستند که می‌تواند با آنتوسیانین‌ها بر همکنش های هیدرو فوبیکی بدهند و این تعامل فیزیکی که کوپیگمنتاسیون نامیده می‌شود، باعث حفاظت آنتوسیانین از واکنش تراکمی با اسید آسکوربیک یا اکسیداسیون توسط پراکسید هیدروژن می‌شود. نتایج به دست آمده از این مطالعه با یافته‌های پلیزوتا و همکاران (۲۰۱۲) و کوپجار و همکاران (۲۰۱۴) داشت.

جدول ۳- شاخص تخریب محلول‌های آنتوسیانین حاوی عصاره های گیاهی چای سبز، گل سرخ، مریم گلی و رزماری و اسید آسکوربیک در ۴۰°C طی ۳ و ۷ روز نگهداری در مقابل نور

Table 3- Destructive index in anthocyanin solutions containing ascorbic acid and plant extract/polyphenol green tea, rose, sage and rosemary stored at 40 °C for 3 and 7 days of exposure to light

Treatment	Sample	3 Days	7Days
1	Anthocyanin (control)	2.510 ± 0.05^{abB}	2.850 ± 0.057^{bA}
2	Anthocyanin + Ascorbic acid 0.05%	2.670 ± 0.080^{aB}	3.150 ± 0.094^{aA}
3	Anthocyanin + Ascorbic acid 0.05% + Green tea extract 30% w/w	1.880 ± 0.075^{eA}	1.930 ± 0.077^{eA}
4	Anthocyanin + Ascorbic acid 0.05% + Rosemary extract 30% w/w	2.390 ± 0.047^{bcB}	2.610 ± 0.052^{cA}
5	Anthocyanin + Ascorbic acid 0.05% + Rose extract 30% w/w	2.200 ± 0.066^{dA}	2.310 ± 0.069^{dA}
6	Anthocyanin + Ascorbic acid 0.05% + Sage extract 30% w/w	2.280 ± 0.045^{cdB}	2.460 ± 0.049^{cdA}

The results are shown as mean ± SD

a-e Showed Significant differences each column ($P\leq0.05$) A-B Showed Significant differences each row ($P\leq0.05$)

بررسی تغییرات ترکیبات فنولیک

محتوای تام ترکیبات فنولی با استفاده از معرف فولینسیو کالتو اندازه‌گیری گردید. میزان ترکیبات فنلی عصاره های استخراج شده چای سبز، رزماری، گل سرخ و مریم گلی به ترتیب برابر (**mg/l**) ۵/۸۵، ۴/۴۰، ۴/۶۷ و ۴/۵۴ بود. از آنجائی که چای سبز، رزماری، مریم گلی و گل سرخ منابع غنی از ترکیبات پلی فنول هستند بنابراین انتظار می‌رود که تیمارهای حاوی این عصاره‌ها دارای ترکیبات پلی فنول کل بالاتری نیز باشند. با توجه به نتایج به دست آمده از این تحقیق مندرج در جدول ۴، محتوای فنولی کل بین تمامی گروه‌ها در تمامی روزها در دمای نگهداری ۴۰°C از لحاظ آماری اختلاف معنی دار آماری وجود داشت ($P\leq۰/۰۵$). در شرایط تعریف‌شده، تیمار شماره ۳ که حاوی ۳۰ درصد وزنی/ وزنی عصاره چای سبز بود دارای ترکیبات فنولیکی بیشتری نسبت به سایر تیمارها می‌باشد (۵/۷۸ mg/l) و تیمار شماره ۲ که حاوی اسید آسکوربیک است دارای کمترین محتوای پلی‌فنول (۲/۸۵ mg/l) می‌باشد. تیمارشماره ۲ در مقایسه با تیمار شاهد که حاوی آنتوسیانین بدون کوپیگمنت بود (۳/۰۵mg/l) دارای میزان ترکیبات فنولیک کمتری بود که این مسئله می‌تواند به علت افزودن اسید آسکوربیک به نمونه مورد نظر باشد چرا که همان طور هم پیشتر ذکر شد، اسید آسکوربیک از طرفی می‌تواند با تجزیه آنتوسیانین‌ها و یا تشکیل آنتوسیانین پلیمریزه شده باعث بد رنگ شدن و یا بی رنگ شدن آنتوسیانین‌ها می‌شود و از طرفی با اتوکسیداسیون اسید آسکوربیک و تولید رادیکال‌های آزاد اثر نامطلوبی بر روی کوپیگمنتاسیون داشته باشد (مرکادانته و بوبیو ۲۰۰۷ و وست و مائور ۲۰۱۳). در تیمار شماره ۳، غلظت ترکیبات پلی فنول بالاتر از سایر نمونه‌ها بود بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که افزایش غلظت کوپیگمنت می‌تواند در معرض قرارگیری ساختارهای آنتوسیانینی و کوپیگمنت را بیشتر کند و کوپیگمانتاسیون مؤثرتری رخ دهد. به بیان دیگر امکان ایجاد کمپلکس بین کوپیگمنت و آنتوسیانین بیش‌تر می‌شود که در نتیجه باعث پایداری بیش‌تر آنتوسیانین می‌شود. در این راستا کلمنت و گالی (۲۰۱۱)، اثر افزودن میزان کوپیگمنت کافئیک اسید را روی کوپیگمانتاسیون آنتوسیانین‌های ضایعات انگور را بررسی کردند و مشاهده نمودند که افزایش میزان کوپیگمنت نسبت به عصاره خام سبب افزایش پایداری می‌شود. همچنین در طی مدت زمان نگهداری محتوای فنول تمامی تیمارها کاهش پیدا کرد که در مقایسه با تغییرات محتوای آنتوسیانینی روند آهسته تری را از خود نشان دادند؛ زیرا ترکیبات فنول در مقایسه با

www.SID.ir

Archive of SID

ترکیبات آنتوسیانینی دارای گروه‌های هیدروکسیل (OH) کمتری هستند و همین امر باعث می‌شود که این ترکیبات نسبت به ترکیبات آنتوسیانینی دیرتر اکسید شوند. نتایج این مطالعه با چانگ و همکاران (۲۰۱۶) و پلیزوتا و همکاران (۲۰۱۲) و حسینی و همکاران (۲۰۱۴) مطابقت داشت.

جدول ۴-محتوای فنولی (mg/l) محلول‌های آنتوسیانین حاوی اسید آسکوربیک و عصاره‌های گیاهی چای سبز، گل سرخ، مریم‌گلی و رزماری در دمای ۴۰°C در طی روزهای سوم و هفتم نگهداری در مقابل نور

Table 4-Phenolic content (mg / l) in anthocyanin solutions containing ascorbic acid and plant extract/polyphenol green tea, rose, sage and rosemary stored at 40 ° C for 3 and 7 days of exposure to light

Treatment	Sample	3 Days	7Days
1	Anthocyanin (control)	3.050 ± 0.061^{dB}	2.590 ± 0.051^{dC}
2	Anthocyanin + Ascorbic acid 0.05%	2.85 ± 0.085^{dB}	2.250 ± 0.067^{dC}
3	Anthocyanin + Ascorbic acid 0.05% + Green tea extract 30% w/w	5.780 ± 0.231^{aA}	$5.630\pm0/225^{aA}$
4	Anthocyanin + Ascorbic acid 0.05% + Rosemary extract 30% w/w	4.090 ± 0.081^{cB}	3.770 ± 0.075^{cC}
5	Anthocyanin + Ascorbic acid 0.05% + Rose extract 30% w/w	4.510 ± 0.135^{bAB}	4.290 ± 0.128^{bB}
6	Anthocyanin + Ascorbic acid 0.05% + Sage extract 30% w/w	4.310 ± 0.172^{bcAB}	4.020 ± 0.160^{bcB}

The results are shown as mean ± SD

a-d Showed Significant differences each column ($P\leq0.05$) A-C Showed Significant differences each row ($P\leq0.05$)

نتیجه گیری

این پژوهش با هدف بررسی اثر کوپیگمنتاسیونی هر چه بیشتر ترکیبات آنتوسیانینی موجود در عصاره چای ترش توسط عصاره‌های گیاهی (رزماری، مریم گلی، گل سرخ و چای سبز) حاوی ترکیبات فنول به عنوان کوپیگمنت پرداخته شد و به منظور سرعت بخشیدن به روند تخریب رنگ دانه‌های آنتوسیانینی از عوامل افزایش دهنده تخریب مانند دمای بالای نگهداری، نور و حضور اسید آسکوربیک استفاده شد.

نتایج نشان دادند که پایداری آنتوسیانین‌ها در حضور اسید آسکوربیک به طور قابل ملاحظه‌ای کاهش یافت. افزودن عصاره‌های گیاهی (چای سبز، رزماری، مریم گلی و گل سرخ) به‌عنوان منابع غنی از پلی فنول توانست به طور قابل توجهی پایداری آنتوسیانین‌ها را افزایش دهد. مؤثرترین عصاره در مهار تخریب آنتوسیانین‌ها، عصاره چای سبز بود. مکانیسم موجود در تثبیت آنتوسیانین به تعامل آب گریز بین آنتوسیانین و عصاره چای سبز نسبت داده شد. همچنین محتوای فنول چای سبز نسبت به سایر عصاره‌های گیاهی مذکور بالاتر بود و همین امر باعث در معرض قرارگیری بیشتر ساختارهای آنتوسیانینی و کوپیگمنت گردید و کوپیگمانتاسیون مؤثرتری بین آن‌ها رخ داد و منجر به پایداری بیشتر آنتوسیانین ها در طول مدت زمان نگهداری شد. به طور کلی این مطالعه استفاده بالقوه از عصاره‌های گیاهی که حاوی پلی فنول‌های خاص هستند را در تقویت پایداری رنگ آنتوسیانین‌ها در حضور اسید آسکوربیک نشان داد.

منابع مورد استفاده

موسسه استاندارد و تحقیقات صنعتی ایران، ۱۳۹۲.آب میوه لیمو ترش–ویژگی‌ها، استاندارد شماره ۱۱۷.

صندوق داران م، ۱۳۷۹. گزارش پیرامون کشت آزمایشی گیاهان چای ترش در چاه نیمه زابل، معاونت آموزش و تحقیقات مرکز تحقیقات منابع طبیعی و امور دام استان سیستان و بلوچستان.

خطیب زاده م، جعفر زاده م،)، کوپیگمانتاسیون آنتوسیانین گلبرگ زعفران با اسیدهای آلی و بررسی اثر pH، غلظت و نوع کوپیگمنت بر آن. دومین کنفرانس بین المللی دستاوردهای نوین پژوهشی در شیمی و مهندسی شیمی، ۱۶ اردیبهشت ۱۳۹۵.

www.SID.ir

Archive of SID

Akkol E. K, Goger F, Kosar, M. and Baser K. H. C, 2008. Phenolic composition and biological activities of Salvia halophila and Salvia virgata from Turkey. Food Chemistry 108(3): 942-949.

Ames BN, Shigenaga M and Hagen TM, 1993. Oxidants, antioxidants and the degenerative diseases of aging. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 90(17): 7915–7922.

Aziz E, Gad N, and Badran N.M, 2007. Effect of cobalt and nickel on plant growth, yield and flavonoids content of Hibiscus sabdariffa L. Australian Journal of Basic Applied Sciences 1(2): 73-78.

Bhagwat S, Beecher G. R, Haytowitz D. B, Holden J.M, Dwyer J, Peterson J. and Gebhardt S E, 2003. Flavonoid composition of tea: Comparison of black and green teas. Agricultural Research Service. Usda database for the flavonoid content of selected foods. Home Page. Available:http://www.nal.usda.gov/fnic/food comp

Cavalcanti R, Santos D, Meireles M, 2011. Non-thermalstabilization mechanisms of anthocyanins in model and food systems-An overview, Food Research International, 44:499-509.

Clemente E & GallI D, 2011. Stability of the anthocyanins extracted from residues of the wine industry, Ciência e Tecnologia de Alimentos, 31(3): 765-768.

Chung C, Rojanasasithara T, Mutilangi W & McClements D. J, 2016. Stabilization of natural colors and nutraceuticals: Inhibition of anthocyanin degradation in model beverages using polyphenols. Food chemistry, 212: 596-603.http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.06.025

Duke J A, 1989. CRC Handbook of Medicinal Herbs. Boca Raton: CRC Press, 412-413.

Eliana FO, Paulo CS and Milton CC, 2007. Stability of anthocyanin in spinach vine (*Basella rubra*) fruits.Ciencia e investigación agraria. 34(2): 115-120.

Eiro M & Heinonen M, 2002. Anthocyanin color behavior and stability during storage. J. Agric. Food Chemistry 4: 7461-7466.

Gordillo, B., Rodríguez-Pulido, F.J., Escudero-Gilete, M.L., González-Miret, M.L. and Heredia, F.J., 2012. Comprehensive colorimetric study of anthocyanic copigmentation in model solutions. Effects of pH and molar ratio. Journal of agricultural and food chemistry, 60(11), pp.2896-2905.

Hosseini E, RafieiM, MirzaeiM, 2014. Determination of Antioxidant Power of Some Various Grape Juices by Voltammetric Method and Its Correlation with Polyphenolic Content, International Journal of Advanced Biological and Biomedical Research, 2(11): 2842-2849.

Hernandez-Herrero J. A& Frutos M. J, 2015. Influence of rutin and ascorbic acid in colour, plum anthocyanins and antioxidant capacity stability in model juices. Food Chemistry, 173: 495-500.

Katz B & Williams L. A, 2011. Cleaning up processed foods. Food Technology, 65(12): 33 – 37.

Kumar, S.N.A., Ritesh, S.K., Sharmila, G. and Muthukumaran, C., 2017. Extraction optimization and characterization of water soluble red purple pigment from floral bracts of Bougainvillea glabra. Arabian Journal of Chemistry, 10, pp.S2145-S2150.

Kopjar M, Bilic B & Pilizota V,2014. Anthocyanins, phenols, and antioxidant activity in blackberry juice with plant extracts addition during heating. Acta Alimentaria, 43(2): 333-343.

Mazza G, Brouillard R, 1990. The mechanism of copigmention of anthocyanins in aqueous solution. Phytochemistry 29: 1097 - 1102.

Malien-Aubert C, Dangles O, Amiot M, 2001. Color stability of commercial anthocyanin-based extracts in relation to the phenolic composition. Protective effects by intra and intermolecular copigmentation. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 49: 170-176.

Markakis P, 1982, Stability of anthocyanins in foods. Pp. 163-180. In: Markakis, P (eds.). Anthocyanins as food colors. New York- Academic Press.

Mercadante A, & Bobbio F. O, 2007. Anthocyanins in foods: Occurrence and physicochemical properties. In C. Socaciu (Ed.), Food Colorants Chemical and Functional Properties, Boca Raton, FL, USA: CRC Press, 241 – 276.

Milena M, Ramírez-Rodrigues A, Maria L, Plaza A, Alberto Azeredo A, Murat O, Balaban B, Maurice R, and Marshall A, 2012. Phytochemical, sensory attributes and aroma stability of dense phase carbon dioxide processed Hibiscus sabdariffa beverage during storage. Food Chemistry 134: 1425-1431.

www.SID.ir

Archive of SID

Norhaizan M, Fong S. H,Ismail A,Yee C. L, 2010.Antioxidant activity in different parts of roselle (Hibiscus sabdariffa L.) extracts and potential exploitation of the seeds, Food Chemistry 122: 1055–1060.

Olaleye M.T, 2007. Cytotoxicity and antibacterial activity of methanolic extract of Hibiscus sabdariffa.Journal of Medicinal Plants Research, 1(1): 9-13.

Pau-Ling T, Salmah Y, Suhaila M, 2002. Antioxidative properties of roselle (Hibiscus sabdariffa L.) in linoleic acid model system. Nutrition & Food Science ISSN, pp 0034-6659.

Pilizota V, Kopjara M, Zupanic N & Balija N, 2013. Anthocyanin content and antioxidant activity of reduced-calorie blueberry jams fortified with green tea or pine bark extracts. Acta Alimentaria, 41(4):424-432.

Rapisarda P, Fanella F, and Maccarone E, 2000. Reliability of Analytical Methods for Determining Anthocyanins in Blood Orange Juices, Journal of Agricultural and Food Chemistry, 48:2249–2252.

Reshma V. Jadhav, Santosh S. Bhujbal, 2019. Effect of Copigmentation on Thermal Stability of Hibiscus sabdariffa anthocyanins. Research Journal of Pharmacy and Technology. 12(6):2949-2954.

Schieber A, Mihalev K, Berardini N, Mollov P,Carle R, 2005. Flavonol Glycosides from distilled petals of Rosa damascene Mill. Zeitschrift fur Natuforschung. J Boisciences(C). 60: 379- 84.

Shahidi F,2000. Antioxidants in food and food antioxidants, Molecular Nutrition & Food Research,44: 158-63.

Talcott ST, Brenes CH, Pires DM,Del Pozo-Insfran D, 2003. phytochemical stability and color retention of copigmented and processed muscadine grape juice. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51:957-963.

Tzulker R, Glazer I, Bar-Ilan I, Holland D, Aviram M, Amir R, 2007. Antioxidant activity, polyphenol content and related compounds in different fruit juices and homogenates prepared from 29 different pomegranate accessions. Journal of Agricultural and Food Chemistry,55: 9559-957.

West M. E, &Mauer L. J, 2013. Color and Chemical Stability of a Variety of Anthocyanins and Ascorbic Acid in Solution and Powder Forms. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 61(17): 4169-4179.

Wiseman H and Halliwell B, 1996. Damage to DNA by reactive oxygen and nitrogen species: Role of inflammatory disease and progression to cancer. Biochemistry Journal, 313: 17 – 29.

Yadong Qi, Chin L. Malekian F.Berhane M.Gager J, 2005. Biological Characteristics, Nutritional and Medicinal Value of Roselle, Hibiscus Sabdariffa, CIRCULAR – Urban Forestry Natural Resources and Environment 604.

Yurdiansyah A, Suhartanti D, Dahlan A, 2012. Test Activities Antifungal Methanol Extract Red Flowers Rosella Calyx (*Hibiscus sabdariffa L.*) on Candida albicans, As In Vitro, and Screening Phytochemicals. IC-GWBT2012, 23-24.

www.SID.ir

Archive of SID

Journal of Food Researches/vol.30 No.4/ 2021/pp 137-149
https://foodresearch.tabrizu.ac.ir
DOI: 10.22034/fr.2021.39570.1736

Stabilization of *Hibiscus sabdariffa* anthocyanins using polyphenols

M Eksiri[1], SA Shahidi[2] and L Nateghi[*3]

Received: April 20, 2020 Accepted: October 5, 2020
[1]PhD student, Department of Food Science and Technology, Islamic Azad University, Ayatollah Amoli Branch, Amol, Iran
[2]Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Islamic Azad University, Ayatollah Amoli Branch, Amol, Iran
[3]Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Varamin-Pishva Branch, Islamic Azad University, Varamin, Iran
[*]Corresponding author: E mail: leylanateghi@yahoo.com

Introduction : Natural colorants are widely used in food and beverage products due to increasing consumer demand for natural ingredients (Katz & Williams 2011). Anthocyanin is one of the most commonly utilized water-soluble natural colorants and a subclass of flavonoids (Mercadante & Bobbio 2007). They are typically extracted from the red and blue parts of certain plants, including fruits, vegetables, flowers, and leaves. The color stability of anthocyanin is strongly dependent on the pH of the surrounding aqueous phase and they are more stable in acidic rather than in neutral or alkaline solutions. The rate of degradation is affected by many factors including pH, light, temperature, oxygen, enzymes, and ingredient interactions (Malien-Aubert et al. 2001). Besides, anthocyanin also has anti-oxidant and bioactive properties linked to certain health benefits e.g. anti-diabetic, anti-inflammatory, and anti-cancer effects (Tzulker et al. 2007, Olaleye 2007).
The stability of anthocyanin color can be enhanced by co-pigmentation phenomenon where the anthocyanin molecule reacts with other natural plant substances through weak interactions forming an enhanced and stabilized color (Gordillo et al. 2012). Co-pigmentation is a solution phenomenon in which pigments and co-pigment molecules form molecular complexes. These cause the pigments to exhibit high color intensity than would be expected from their original. This interaction prevents water attack on the flavylium cation. The most common co-pigments are flavonoids, polyphenolic compounds, alkaloids, amino acids and organic acids (Mazza & Brouillard 1990). *Hibiscus sabdariffa* is a tropical plant, which belongs to the Malvaceae fam. It is rich in anthocyanins, minerals, pectin. The major reported anthocyanins are delphinidin-3-glucoside, delphinidin-3-sambubioside, and cyanidin-3-sambubioside chiefly responsible for their color and antioxidant properties (Pau-Ling et al. 2002, Jadhav & Bhujbal 2019). Phytochemicals, these natural components, may be able to inhibit the chemical degradation of the anthocyanins and to prolong their color stability. For this reason, many investigations have been carried out to improve the stability of anthocyanins. Therefore, they can be used more widely in food products (Eiro & Heinonen. 2002, Talcott et al. 2003, Clemente & GallI 2011, Jadhav & Bhujbal 2019). The present study is carried out to extract anthocyanins from *Hibiscus saddariffa* and to improve its stability by copigmentation by four polyphenols (green tea extract, rosemary extract, rose extract, sage extract and in the presence of ascorbic acid). The color stability of anthocyanins is determined by evaluation of the amount anthocyanins, destructive index and total polyphenol during storage at elevated temperature in the presence of light and ascorbic acid in order to accelerate the degradation of anthocyanin pigments.
Material and methods: In order to extract *Hibiscus saddariffaas,* a rich source of anthocyanins, the sepals of this plant were used. First, a weighed amount (6 g) of Hibiscussepal was dissolved in

www.SID.ir

Archive of SID

Methanol and water in a ratio of 0.5 to 1.5 as a solvent system. Then, it was kept in an orbital shaker at 40 ℃ for 4 hours to complete anthocyanin pigment extraction. The extract was filtered using whatman No.1 filter paper and concentrated by rotary evaporator at 60℃ to reach 12 brix. In order to prepare other phytochemical extracts (green tea, rosemary, sage and rose), a weighed amount of (260 g) of each phytochemical was dissolved in deionized water and stirred until fully hydrated. Next, 30% w/w of each extract were added to the hibiscus extraction (as a source of anthocyanins) as well as 0.05% w/w ascorbic acid. The pH of the solutions was then adjusted to pH2 using 1 M citric acid. Then, the amount of anthocyanin compounds was determined using pH change method. Besides, destructive index of anthocyanins was evaluated by using absorbance at 420 nm divided by the absorbance at 520 nm. The total amount of polyphenolic compounds of treatments by the folin-ciocalteu reagents was investigated. For this aim, all experiments were analyzed in triplicate in a completely randomized design using the Minitab 16 software using one-way analysis of variance Duncan's test.

Result and discussion: The color stability of anthocyanin in the sample reduced in the presence of ascorbic acid. In the absence of ascorbic acid, the anthocyanin color was stable over seven days. The color fading caused by the presence of ascorbic acid had been proposed to occur through two main mechanisms: (a) a condensation reaction between anthocyanin and ascorbic acid and/or (b) autoxidation of ascorbic acid generating free radicals (e.g., hydrogen peroxide) that cleave the flavylium core of the anthocyanins (Mercadante & Bobbio 2007). In addition, the polyphenols extracts in the presence of ascorbic acid increased the anthocyanin content compared to the control and treatment sample (T_2) and also increased the stability of anthocyanin content during storage. Among the co-pigments used (polyphenols extracts), T_3 treatment, which contained 30% w/w green tea, had the highest amount of anthocyanin compounds (260/49 mg / l), which could be due to the phenomenon of co-pigmentation. In other words, the higher anthocyanin stability upon green tea addition was due to co-pigmentation, inhibited the ability of water molecules to attack the flavylium ion and caused color loss (Kopjar et al. 2014). According to the obtained results of Degradation index, treatment (T_3) with addition of ascorbic acid and green tea extract had the lowest, while the sample (T_2) with the addition of ascorbic acid only had the highest degradation index. Those results were in correspondence with the results for anthocyanin content. After preparation, samples with green tea extract addition had the highest anthocyanin content and the lowest degradation index, which means that anthocyanins were more stable. During storage, degradation of anthocyanin occurred and the destructive index increased (Piližota et al. 2012). In terms of total phenolic content, under the defined conditions, T_3 treatment containing of green tea extract (30% w/w) had more phenolic compounds than other treatments (5.78 mg/l) and T_2 treatment containing ascorbic acid had the lowest polyphenol content (2.85 mg/l). Whereas T_3 treatment had more polyphenolic compounds than other samples, anthocyanins and polyphenol structures could be more exposed to each other and more effective co-pigmentation occurred.

Conclusion: The results revealed that by using plant extract/polyphenol, solutions could significantly increase the stability of anthocyanins. Among these extracts, green tea extract was the most effective extract in inhibiting the destruction of anthocyanins.

Keywords: Anthocyanin, *Hibiscus saddariffa,*Copigmentation, Ascorbic acid, Green tea

www.SID.ir