ORIGINAL ARTICLE

Production and Pharmaceutical Application of Natural Chlorophyll Pigment from Marine Microalgae Chlorella vulgaris

Hamed Morad[1]
Mojtaba Katouli[2]
Ali Davoodi[2]
Fahime Mahmoudnia[3]
Shaghayegh Morad[4]
Narjesalsadat Moein[2]

[1] Assistant Professor, Department of Pharmaceutics and Pharmaceutical Nanotechnology, School of Pharmacy, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
[2] Assistant Professor, Ramsar Campus, Mazandaran University of Medical Sciences, Ramsar, Iran
[3] Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Farhangian University, Tehran, Iran
[4] Chemistry student, Department of Chemistry, Tehran Science and Research Branch, Islamic Azad University, Tehran, Iran

(Received November 9, 2025; Accepted January 25, 2026)

Abstract

Background and purpose: Synthetic dyes, particularly azo compounds, are widely used in pharmaceutical coatings and other industries but are associated with cytotoxicity, genotoxicity, and allergic reactions. The increasing demand for safer and eco-friendly alternatives has directed attention toward natural pigments from microalgae. Thus, achieving a safe and high-quality coloring agent is still in the spotlight. This study aimed to extract chlorophyll pigment from *Chlorella vulgaris* and evaluate its safety and performance as a natural coloring agent in tablet coating formulations.

Materials and methods: *C. vulgaris* was cultured in Bold's Basal Medium (BBM) under controlled light and aeration conditions. The biomass was lyophilized, and chlorophyll pigments were extracted using solvent extraction and identified by HPLC. Cytotoxicity was assessed on L929 fibroblast cells using the MTT assay. A film-coating formulation based on hydroxypropyl methylcellulose (HPMC) containing chlorophyll was prepared and compared with a control formulation containing a synthetic dye. The coated tablets were evaluated for color uniformity, mechanical stability (friability), and microbial safety.

Results: The extraction yield of chlorophyll a was approximately 87.8%. MTT assay results indicated no significant cytotoxicity at concentrations below 0.5 mg/mL, with cell viability above 95% ($p > 0.05$). Chlorophyll-coated tablets demonstrated uniform color distribution, satisfactory adhesion, and no visible surface defects. Microbial tests confirmed the absence of contamination in all coated samples.

Conclusion: Chlorophyll extracted from *C. vulgaris* represents a safe, biocompatible, and environmentally sustainable alternative to synthetic azo dyes in pharmaceutical coating formulations. The use of such natural pigments may improve patient safety and promote the development of greener, more acceptable pharmaceutical products.

Keywords: Microalgae, Chlorophyll, Cytotoxicity, Tablet Coating, Pigment Extraction

J Mazandaran Univ Med Sci 2026; 35 (253): 17-31 (Persian).

Corresponding Author: Ali Davoodi - Ramsar Campus, Mazandaran University of Medical Sciences, Ramsar, Iran.
(E-mail: adavoodi.pharm@gmail.com)

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-23]

پژوهشی

مجله دانشگاه علوم پزشکی مازندران
دوره سی و پنجم شماره ۲۵۳ بهمن سال ۱۴۰۴ (۱۷-۳۱)

تولید و کاربرد دارویی رنگدانه طبیعی کلروفیل از میکروجلبک دریایی Chlorella vulgaris

حامد مراد[۱]
مجتبی کتولی[۲]
علی داوودی[۲]
فهیمه محمودنیا[۳]
شقایق مراد[۴]
نرجس السادات معین[۲]

چکیده

سابقه و هدف: استفاده از رنگ‌های سنتتیک، به‌ویژه رنگ‌های آزو، در صنایع داروسازی به‌دلیل سمیت سلولی و احتمال بروز اثرات ژنتیکی و آلرژیک، نگرانی‌های ایمنی قابل توجهی ایجاد کرده است. در سال‌های اخیر توجه به جایگزینی این ترکیبات با رنگدانه‌های طبیعی ایمن‌تر افزایش یافته است. این مطالعه با هدف استخراج رنگدانه کلروفیل از میکروجلبک *Chlorella vulgaris* و ارزیابی کارایی و ایمنی آن در فرمولاسیون روکش قرص به‌عنوان جایگزین رنگ‌های مصنوعی، انجام پذیرفت.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی– آزمایشگاهی، میکروجلبک *C. vulgaris* در محیط کشت BBM تحت شرایط کنترل شده نوری و هوادهی رشد داده شد. پس از خشک‌سازی زیست توده، استخراج کلروفیل به روش حلالی و شناسایی ترکیبات با HPLC انجام گرفت. آزمون سمیت سلولی (MTT) بر روی سلول‌های فیبروبلاست L ۹۲۹ برای بررسی زیست‌سازگاری انجام شد. سپس فرمولاسیون روکش بر پایه HPMC حاوی کلروفیل و فرمولاسیون کنترل با رنگ سنتتیک تهیه و بر قرص‌های آسپرین بعنوان داروی مدل اعمال گردید. ارزیابی ظاهری، آزمون فرسایش (friability) و کنترل میکروبی جهت مقایسه عملکرد روکش‌ها انجام شد.

یافته‌ها: نتایج کشت نشان داد بازده استخراج کلروفیل a حدود ۸۷/۸ درصد بود. آزمون MTT نشان داد که در غلظت‌های کم‌تر از ۰/۵ mg/mL، درصد زنده‌مانی سلول‌ها بیش از ۹۵ درصد بود و تفاوت معناداری با گروه کنترل مشاهده نشد. روکش‌های حاوی کلروفیل از نظر یکنواختی رنگ، چسبندگی، فرسایش و ثبات مکانیکی با گروه کنترل قابل مقایسه و از نظر ایمنی میکروبی فاقد آلودگی بودند.

استنتاج: کلروفیل استخراج شده از *C. vulgaris* می‌تواند به‌عنوان رنگدانه‌ای طبیعی، ایمن و زیست‌سازگار جایگزین رنگ‌های مصنوعی در فرمولاسیون روکش قرص‌ها مورد استفاده قرار گیرد. این یافته‌ها چشم‌انداز مثبتی برای توسعه فرمولاسیون‌های دارویی پایدار، ایمن و دوستدار محیط‌زیست فراهم می‌سازد.

واژه های کلیدی: میکروجلبک، کلروفیل، سمیت سلولی، روکش قرص، استخراج رنگدانه

مولف مسئول: علی داوودی– رامسر، پردیس علوم پزشکی رامسر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، رامسر، ایران **Email:** adavoodi.pharm@gmail.com

۱. استادیار، گروه فارماسیوتیکس و نانوفناوری دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی ایران، تهران، ایران
۲. استادیار، پردیس علوم پزشکی رامسر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، رامسر، ایران
۳. استادیار، گروه آموزش زیست‌شناسی، دانشکده علوم، دانشگاه فرهنگیان، تهران، ایران
۴. دانشجوی شیمی، گروه شیمی، واحد علوم و تحقیقات تهران، دانشگاه آزاد اسلامی، تهران، ایران
تاریخ دریافت : ۱۴۰۴/۸/۱۸ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات : ۱۴۰۴/۸/۲۴ تاریخ تصویب : ۱۴۰۴/۱۱/۵

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-23]

مقدمه

استفاده از رنگ دهنده‌ها در فرمولاسیون‌های دارویی به‌ویژه در روکش گذاری قرص‌ها، نقشی کلیدی در پذیرش بیمار، حفاظت از فرآورده و برندینگ محصول ایفا می‌کند. با این حال نگرانی‌های مربوط به ایمنی و پیامدهای زیست محیطی رنگ‌های مصنوعی از قبیل خانواده گسترده رنگ‌های آزو، انگیزه پژوهش برای یافتن جایگزین‌های طبیعی و ایمن را افزایش داده است. مطالعات متعددی ارتباط بین محصولات تخریب برخی رنگ‌های آزو و تشکیل آمین‌های آروماتیک سرطان‌زا یا تضعیف کننده پارامترهای بیولوژیک را نشان داده‌اند که نگرانی‌های سلامتی و زیست محیطی را برجسته می‌سازد(۱).

در مقابل، میکروجلبک‌ها به‌عنوان منابع غنی و تجدیدپذیر پیگمان‌های طبیعی از جمله کلروفیل‌ها، کاروتنوئیدها و فیکوبیلین‌ها توجه زیادی را در صنایع غذایی، آرایشی و به‌طور فزاینده‌ای در کاربردهای دارویی به خود جلب کرده‌اند. زیرا این پیگمان‌ها علاوه بر نقش رنگ‌دهی، اغلب خواص زیستی مفیدی مانند فعالیت آنتی‌اکسیدانی و ضدالتهابی نشان می‌دهند که می‌تواند مزیتی در مقایسه با رنگ‌های سنتتیک عرضه کند. کلروفیل رنگ سبز طبیعی خوبی ایجاد می‌کند که در فرمولاسیون‌های دارویی، غذایی یا آرایشی کاربرد دارد(۲).

از میان گونه‌های میکروجلبکی، *C. vulgaris* به‌دلیل رشد سریع، قابلیت تولید بیوماس بالا و محتوای قابل توجه کلروفیل (خصوصا کلروفیل a) به‌عنوان یک منبع عملی و اقتصادی برای تولید رنگدانه‌های طبیعی مطرح است. مصرف‌کنندگان و برندها به‌طور فزاینده‌ای به محصولات "Clean Label " و طبیعی گرایش دارند، که موجب شده تا کلروفیل نه‌فقط به‌عنوان رنگ دهنده بلکه به‌عنوان عامل ارزش افزوده در بسته‌بندی، تبلیغات و تمایز محصول مطرح شود(۳).

با این حال، ورود کلروفیل به‌عنوان یک رنگ طبیعی در فرمولاسیون‌های دارویی با چالش‌هایی نیز همراه است. مهم‌ترین محدودیت‌ها، حساسیت کلروفیل به عوامل محیطی (نور، حرارت، اکسیژن و pH که می‌تواند منجر به تجزیه و تغییر رنگ شود، حل‌پذیری نسبتاً پایین در آب که بر طراحی فرمول و انتخاب حامل‌ها تأثیر می‌گذارد و نیاز به فرآیندهای استخراج و خالص‌سازی با بازده و خلوص مناسب برای کاربری دارویی می‌باشد(۴).

آزمون های سمیت سلولی مختلف بیانگر آن است که کلروفیل استخراج شده از *C. vulgaris* و دیگر میکروجلبک‌ها حتی در غلظت‌های بالا (100< µg/mL) باعث کاهش معنی‌دار زنده‌مانی سلولی نمی‌شود و اثرات التهابی یا نکروتیک در سلول‌های انسانی ندارد(۲، ۵).

بررسی‌های اخیر بر امکان‌پذیری تجاری و بررسی جامع ریسک-فایده تأکید دارند و نشان می‌دهند که با بهینه‌سازی مراحل تولید و فرمولاسیون، پیگمان‌های میکروجلبکی همچون کلروفیل a می‌توانند جایگزین‌های عملی و ایمنی برای رنگ‌های آزموده مصنوعی باشند(۷،۶).

در سال‌های اخیر، چندین پیگمان میکروجلبکی به مرحله تولید صنعتی و تجاری‌سازی رسیده‌اند که قابلیت بالقوه ی استفاده به‌عنوان رنگ دهنده در روکش قرص‌ها را دارند. از میان آن‌ها می‌توان به فایکوسیانین استخراج شده از Spirulina platensis اشاره کرد که به‌عنوان رنگ آبی طبیعی با مجوز مصرف غذایی (E ۱۸) در محصولات خوراکی و مکمل‌ها به‌کار می‌رود و به دلیل حلالیت آبی، پایداری نوری مناسب و ایمنی سلولی بالا، گزینه‌ای مطلوب برای استفاده در پوشش‌های فیلمی دارویی محسوب می‌شود(۲). آستازانتین حاصل از جلبک *Haematococcus pluvialis* نیز به‌صورت تجاری در محصولات (Algatech, Israel) AstaPure® و (Cyanotech, USA) BioAstin® عرضه می‌شود و به‌عنوان رنگ قرمز-نارنجی طبیعی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالا، در مکمل‌های جامد و نرم‌ژل کاربرد دارد. مطالعات نشان داده‌اند که این ترکیب ضمن رنگ

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-23]

دهی مناسب، خاصیت ضدالتهابی و ضد اکسیداتیو نیز دارد(۸). در گروه کاروتنوئیدها، بتاکاروتن استخراجی از *Dunaliella salina* محصولات تجاری BASF ®Carotene و ®LycoRed یکی از رنگ‌های زرد-نارنجی پرکاربرد در مکمل‌های غذایی و دارویی است که سازگاری مطلوبی با پوشش‌های فیلمی روغنی دارد(۹). در میان پیگمان‌های سبز، کلروفیل و مشتقات آبدوست آن (کلروفیلین) با مجوزهای رسمی E ۱۴۰ و E ۱۴۱ توسط مرجع ایمنی غذایی اروپا (EFSA) به‌عنوان رنگ خوراکی مجاز ارزیابی شده‌اند و به‌دلیل پایداری نسبی، قابلیت حل پذیری مناسب و ایمنی تایید شده، پتانسیل مطلوبی جهت پیشنهاد به منظور استفاده در فرمولاسیون‌های دارویی به‌ویژه برای روکش قرص‌های سبز رنگ دارا می باشند(۱۰). بنابراین، هدف تحقیق حاضر استخراج و خالص‌سازی کلروفیل a از *C. vulgaris*، بررسی پروفایل سمّیت و پایداری آن و ارزیابی عملکرد در فرمولاسیون روکش قرص در چارچوب نیاز به جایگزینی ایمن‌تر و پایدارتر رنگ‌های صنعتی، گامی منطقی و مورد نیاز در پژوهش‌های فارماسیوتیکس و فناوری فرمولاسیون به‌شمار می‌رود. نتایج این پژوهش می‌تواند مبنایی برای مطالعات تکمیلی در زمینه ی نانومهندسی حامل‌ها، آزمون‌های بالینی-تکمیلی و ارزیابی‌های اقتصادی-زیست محیطی در مسیر اسکیل‌آپ تولید پیگمان‌های میکروجلبکی فراهم آورد(۱۱، ۱۲).

مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی – آزمایشگاهی، حاصل طرح تحقیقاتی فناورانه ی به ثبت رسیده در دانشگاه علوم پزشکی ایران با کد اخلاق IR.IUMS.REC.1402.592 می باشد. اجزای محیط کشت (Bold's Basal (BBM Mediumشامل دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات (K_2HPO_4)، پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات (KH_2PO_4)، نیترات سدیم ($NaNO_3$)، منیزیم سولفات هفت‌آبه ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$)، کلرید سدیم (NaCl)، کلرید کلسیم دوآبه ($CaCl_2 \cdot 2H_2O$)، اتیلن دی آمین تترا استیک اسید دی سدیم ($Na_2EDTA \cdot 2H_2O$)، سولفات آهن هفت‌آبه ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) و محلول عناصر کمیاب (حاوی اسید بوریک، منگنز کلرید، روی سولفات، مولیبدات سدیم، مس سولفات و کبالت نیترات) از شرکت مرک Merck (آلمان) تهیه شدند. بی‌کربنات سدیم، سود و اسید کلریدریک، متانول (درجه HPLC)، اتانول، استون و ایزوپروپیل الکل نیز از شرکت مرک (آلمان) خریداری شدند. پترولیوم اتر و پروپیلن گلایکول از شرکت سیگما-آلدریچ Sigma–Aldrich (آمریکا) تأمین گردیدند. محلول ویتامین F/ ۲ از بانک جلبک ایران (ایران) تهیه شد.

برای فرمولاسیون و روکش‌دهی از هیدروکسی پروپیل متیل سلولز (HPMC, E۵) شرکت Colorcon(آمریکا)، دی‌اکسید تیتانیوم Merck (آلمان)، تالک Merck (آلمان)، منیزیم استئارات Merck(آلمان)، آویسل ۱۰۱ Avicel PH (شرکت FMC BioPolymer, آمریکا)، نشاسته ذرت–Sigma Aldrich(آمریکا) و قرص آسپرین ۳۲۵ میلی‌گرمی (شرکت دارو پخش، ایران) استفاده شد. تمامی محلول‌های آبی با آب دو بار تقطیر تازه تهیه گردیدند.

در این مطالعه از تجهیزات آزمایشگاهی، هود لامینار کلاس Shimaz II (ایران)، pH متر مدل ۲۰ Basic Crison Instruments, (اسپانیا)، ترازوی دقیق مدل 202 GR- A&D Company (ژاپن)، اسپکتروفتومتر UV-Vis مدل Hach DR 6000 (آمریکا)، میکروسکوپ نوری مدل CX ۲۳ Olympus (ژاپن)، دستگاه تبخیر دورانی مدل Knauer RE 2000B (آلمان)، حمام اولتراسونیک مدل Becker USC 200T (آلمان)، سانتریفیوژ مدل ۲-۱۶ Sigma P (آلمان)، انکوباتور مدل Memmert 600 IST (آلمان) و اتوکلاو مدل ۵۰۷۵ EL Systec (ایتالیا)، استفاده شد. کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) با استفاده از سیستم Smartline Series 1000 Knauer (آلمان) انجام گرفت. فرایند تهیه قرص و روکش دهی با

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-23]

دستگاه پرس قرص مدل DP ۳۰، پن روکش دهی و دستگاه فرسایش‌سنج مدل Erweka TA ۱۲۰ (آلمان) صورت پذیرفت. برای انجام آزمون‌های میکروبی نیز از هود UV مدل Azmiran UV- 200 (ایران) و تجهیزات استریل استفاده شد.

جهت آزمون سمیت سلولی از رده سلولی فیبروبلاست موشی L ۹۲۹ کد NCBI C161 تهیه شده از بانک سلولی ملی ایران (انستیتو پاستور، تهران) استفاده گردید. محیط کشت DMEM، سرم جنین گاوی (FBS) و معرف MTT (3-(5,-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) از شرکت Gibco Thermo Fisher Scientific(آمریکا) تهیه شدند.

فرایندها متشکل از سه بخش اصلی، کشت میکروجلبک، استخراج و خالص‌سازی پیگمان کلروفیل a، و فرمولاسیون و روکش‌گذاری قرص‌ها و آزمون‌های کیفی مرتبط، می باشد. در ادامه روش‌ها به‌صورت کامل و همراه با پارامترهای عملیاتی آورده شده‌اند.

کشت میکروجلبک

جمع آوری و آماده‌سازی محیط کشت

استوک *C. vulgaris* از بانک جلبک شیراز تهیه شد. کشت‌ها به‌صورت دسته‌ای (Batch culture) در محیط استاندارد BBM (Bold's Basal Medium) انجام و تکثیر گردید. محلول عناصر کم‌مصرف (Trace metal solution) شامل H_3BO_3، $MnCl_2{\cdot}4H_2O$، $ZnSO_4{\cdot}7H_2O$، $Na_2MoO_4{\cdot}2H_2O$، $CuSO_4{\cdot}5H_2O$ و $Co(NO_3)_2{\cdot}6H_2O$ تهیه شد و به‌صورت محلول استوک در طول دوره کشت به محیط افزوده شد. مقادیر و روش تهیه اجزای محیط کشت BBMبرای حجم یک لیتر، مطابق با پروتکل‌های مرجع استاندارد BBM انجام گرفت.

شرایط کشت و مقیاس

استوک *C. vulgaris* در شرایط آسپتیک در لامپ‌های ارلنر تُرَف در فلاسک‌های استریل ۲۵۰–۱۰۰۰ mLو سپس به مقیاس آزمایشگاهی (تا ≈L۸۰) محیط کشت انتقال یافت. دمای کشت در محدوده ۲۵ °C ± ۲ نگهداری شد. pH اولیه به‌کمک محلول‌های HCl یا $NaHCO_3$ در محدوده ۷/۰– ۷/۵ تنظیم و طی رشد در صورت نیاز تصحیح گردید. کشت‌ها با نور LED سفید/سرد با شدت متوسط (≈۱۰۰–۲۰۰ µmol photons m^{-2} s^{-1}) و چرخه ی نور پیوسته یا ۱۶:۸ (روز:شب) نگهداری شدند. هوا دهی ملایم و اختلاط به‌وسیله پمپ یا آیریتور فراهم شد تا گاز CO_2 مورد نیاز جهت فتوسنتز تأمین و تجمع سلولی یکنواخت برقرار گردد. نمونه‌برداری روزانه برای اندازه‌گیری جذب نوری (OD) یا جذب در طول موج مشخص برای کلروفیل و شمارش سلولی با هموسایتومتر انجام گرفت تا منحنی رشد تعیین شود. این پارامترها و تنظیمات با پروتکل‌های گزارش شده برای کشت *Chlorella* همخوانی دارد.

پایش کیفی و استریل بودن: ارزیابی آلودگی میکروبی بصورت دوره‌ای روی محیط‌های استاندارد کشت باکتریایی و قارچی صورت پذیرفت. سنجش غلظت سلولی هم به‌وسیله روش اسپکتروسکوپی (اندازه‌گیری جذب در طول موج مناسب برای بیومس جلبکی) و شمارش نئوبار/هموسایتومتر انجام شد تا همبستگی میان OD و شمارش سلولی تعیین گردد(۲).

برداشت، استخراج و خالص‌سازی پیگمان‌ها

برداشت سلول‌ها

پس از رسیدن کشت به فاز صعودی/اشباع (بر اساس منحنی رشد و تراکم مورد نظر)، بیوماس با سانتریفیوژ (مثلاً ۵–۱۰ min در ۴۰۰۰–۶۰۰۰ g × بسته به حجم) جداسازی شد یا با فیلتراسیون (فیلتر خلأ) جمع‌آوری گردید. پس از برداشت، باطله محیط کشت حذف و رسوب سلولی در دمای پایین (۴°C) تا زمان استخراج نگهداری شد.

روش استخراج

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-23]

به منظور آزادسازی و استخراج کلروفیل، رسوب سلولی با حلال‌های آلی سرد (مثلاً متانول یا استون ۹۰ درصد) ترکیب و با استفاده از لیز مکانیکی/سونیکاسیون (ultrasonic bath یا probe sonicator) سلول‌ها شکسته شدند تا پیگمان‌ها آزاد شود. جهت آنالیز HPLC و جلوگیری از تغییر ساختار برخی کلروفیل‌ها، استخراج با ۹۰ درصد استون یا تنظیم شرایط مناسب صورت پذیرفت(۳).

غلظت‌زدایی و تمرکز

پس از استخراج اولیه، محلول رنگی با استفاده از دستگاه روتاری تحت شرایط فشار و خلاء تا حجم مناسب تغلیظ شد، سپس جهت حذف ناخالصی‌های غیر قطبی یک مرحله تقسیم بخشی با پترولیوم اتر انجام گرفت تا لیپیدها و ترکیبات غیر قابل حل جدا شوند. سپس فاز حاوی کلروفیل برای خالص‌سازی وارد مرحله کروماتوگرافی شد(۲).

خالص‌سازی کروماتوگرافی و آنالیز HPLC

به‌منظور جداسازی و شناسایی رنگدانه کلروفیل a، ابتدا خالص‌سازی اولیه نمونه استخراج شده با استفاده از کروماتوگرافی ستونی فاز معکوس انجام شد. برای آنالیز نهایی، از دستگاه HPLC فاز معکوس مجهز به دتکتور UV-Visاستفاده گردید. جداسازی روی ستون C 18 (۴/۶ × ۲۵ میلی‌متر، اندازه ذرات ۵ میکرومتر) انجام شد. فاز متحرک شامل سیستم حلال دوتایی متانول (حلال A) و آب مقطر (حلال B) بود که با برنامه گرادیانی به‌کار رفت به‌طوری که در زمان صفر، نسبت A/B برابر ۸۰:۲۰ بوده و طی ۲۰ دقیقه به ۱۰۰ درصد متانول افزایش یافت و این شرایط به‌مدت ۵ دقیقه حفظ شد. دبی جریان فاز متحرک ۱/۰ میلی‌لیتر بر دقیقه تنظیم گردید و حجم تزریق نمونه ۲۰ میکرولیتر بود. دمای ستون در طول آنالیز روی ۳۰ درجه سانتی‌گراد ثابت نگه داشته شد. شناسایی و آنالیز کمی کلروفیل a در طول موج ۶۶۲ نانومتر انجام گرفت و برای بررسی سایر پیگمان‌های احتمالی، طول موج‌های مکمل نیز مورد پایش قرار گرفت. شناسایی پیک‌ها با مقایسه زمان بازداری نمونه‌ها و کروماتوگرام استاندارد مرجع کلروفیل a صورت پذیرفت. شرایط کروماتوگرافی بر اساس روش‌های گزارش شده معتبر برای آنالیز کلروفیل در میکروجلبک‌ها تنظیم و بهینه‌سازی شد.

اندازه‌گیری غلظت و شناسایی طیف‌سنجی

مشخصه‌های طیفی (UV-Vis) عصاره‌ها ثبت شد تا پیک‌های ویژه کلروفیل (حدود ۴۳۰–۴۴۰ nm و ۶۶۰–۶۶۵ nm) مشاهده و با مقادیر مرجع مقایسه شود؛ به‌علاوه میزان کلروفیل بر اساس روش‌های اسپکتروفوتومتریک استاندارد گزارش گردید(۳).

آزمایش‌های سمیت سلولی و آزمون‌های میکروبی

آزمون (MTT) سمیت سلولی: جهت بررسی سمیت پیگمان استخراج شده، آزمون MTT روی سلول‌های رده L 929 مطابق روش‌های مرسوم انجام شد. سلول‌ها در چاهک‌های ۹۶ خانه کشت داده شدند (تقریبا ۱۰۰۰۰ سلول در هر چاهک) و پس از چسبیدن، با غلظت‌های مختلف پیگمان (مشتمل بر سریال رقت؛ مثلاً ۱–۱۰۰۰ µg/mL یا محدوده‌ای که در پیش‌آزمون تعیین شد) به مدت ۲۴ و ۴۸ ساعت مواجه شدند. سپس محلول MTT افزوده و بعد از انکوباسیون مناسب، فورمازان حل و جذب در ۵۷۰ nm خوانده شد تا درصد بقای سلول محاسبه گردد. این روش استاندارد طیف وسیعی از مقالات سمیت پیگمان‌ها و کلروفیل‌ها استفاده شد و نتایج آن برای تصمیم‌گیری در ادامه فرمولاسیون ملاک قرار گرفت(۵).

آزمون‌های میکروبیولوژیک: نمونه‌های استخراج و محیط‌های کشت کنترل از نظر حضور پاتوژن‌ها و میکروارگانیسم‌های آلودگی (*E. coli*، *S. aureus*، قارچ‌ها و ...) روی محیط‌های اختصاصی تلقیح و رشد

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-23]

بررسی شد تا استریلیته یا بار میکروبی گزارش گردد؛ این آزمون‌ها مطابق دستورالعمل‌های استاندارد میکروبیولوژی مواد غذایی/دارویی انجام شد. (جزییات روش کشت و تشخیص بر اساس پروتکل‌های استاندارد آزمایشگاه بود)(۳).

فرمولاسیون هسته، روکش و آزمون‌های کیفی قرص‌ها

تهیه هسته ی قرص

قرص‌های پایه حاوی آسپرین به عنوان داروی مدل به روش گرانولاسیون مرطوب تهیه شدند. برای هر قرص از ۳۲۵ میلی‌گرم آسپرین، ۷۰ میلی‌گرم آویسل و ۱۰ میلی‌گرم نشاسته ذرت استفاده شد و چسب نشاسته ذرت ۷٫۵ درصد به میزان لازم افزوده شد تا به قوام گلوله برفی برسد. گرانول‌ها پس از عبور از الک مش ۱۰ در آون خشک شدند. سپس گرانول خشک شده با ۷۰ میلی‌گرم آویسل و ۴/۵ میلی‌گرم منیزیم استئارات مخلوط و در دستگاه پرس قرص فشرده گردید تا قرص‌های یکنواخت به‌دست آید. این فرمول بر اساس اصول گرانولاسیون مرطوب متداول در فرمولاسیون دارویی طراحی شد.

فرمول روکش

فرمولاسیون روکش بر پایه هیدروکسی پروپیل‌متیل‌سلولز (HPMC) طراحی شد. از آن‌جا که کلروفیل در آب نامحلول است، جهت افزایش یکنواختی رنگ و جلوگیری از تجمع ذرات، از ایزوپروپیل الکل به‌عنوان کمک‌حلال استفاده شد تا قابلیت انتشار رنگدانه در ماتریس پلیمری افزایش یابد. در فرمول گروه آزمون، اجزا، HPMC (۶۰ درصد)، تالک (۵ درصد) به‌عنوان لغزنده و ضدچسبندگی، دی‌اکسید تیتانیوم (۵ درصد) به‌عنوان اپاسایفایر و عامل سفید کننده، پروپیلن‌گلایکول (۱۵ درصد) به‌عنوان پلاستی‌سایزر، و رنگدانه کلروفیل طبیعی (۲ درصد) به‌عنوان عامل رنگ دهنده، با نسبت‌های وزنی به‌کار رفتند. حلال اصلی آب تصفیه شده (Purified Water) بود و مقدار آن برحسب غلظت مورد نیاز تنظیم گردید. برای گروه کنترل نیز فرمول مشابهی با جایگزینی رنگ مصنوعی خوراکی به‌جای کلروفیل و استفاده از اتانول به‌عنوان کمک حلال به‌کار رفت.

اعمال روکش

پس از تهیه محلول روکش، فرآیند پوشش‌دهی با استفاده از دستگاه پن کوتر آزمایشگاهی انجام شد. در ابتدا، پلیمر HPMC در حلال آلی انتخابی (اتانول یا ایزوپروپیل الکل) حل گردید و محلول‌های جداگانه تالک و TiO_2 نیز پس از تریتوراسیون در مقدار کمی آب تهیه شدند. محلول کلروفیل (در گروه آزمون) در ایزوپروپیل الکل و رنگ مصنوعی گروه کنترل در آب حل و سپس به محلول اصلی HPMC افزوده شدند. پس از ترکیب کامل اجزا، پروپیلن‌گلایکول به‌عنوان پلاستی‌سایزر اضافه گردید تا انعطاف‌پذیری فیلم افزایش یابد. محلول نهایی پس از همگن‌سازی کامل از الک عبور داده شد تا از یکنواختی و عاری بودن از ذرات درشت اطمینان حاصل شود.

قرص‌های آماده شده در پن کوتر در شرایط کنترل شده‌ی دمایی (دمای هوای ورودی ۴۰–۴۵ درجه سانتی گراد)، دمای خروجی ۳۵–۳۸ درجه سانتی گراد، فشار اسپری مناسب (۴ – ۲ mL/min)، و سرعت چرخش ۱۰–۱۵ rpm روکش‌دهی شدند. ضخامت فیلم، یکنواختی رنگ و درخشندگی سطح پس از پایان فرایند مورد ارزیابی چشمی و فیزیکی قرار گرفت. پس از تکمیل روکش، قرص‌ها در دمای محیط خشک و سپس در دسیکاتور نگهداری شدند تا پایداری اولیه رنگ و چسبندگی فیلم بررسی شود. در نهایت، آزمون‌های کیفی شامل یکنواختی رنگ، مقاومت فیلم، سختی، فرسایش و آزمون پایداری نوری (قرارگیری در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد و نور فلورسنت به‌مدت ۷ روز) انجام شد. نتایج نشان داد استفاده از کلروفیل طبیعی در

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-23]

ماتریس HPMC فیلمی یکنواخت و پایدار ایجاد کرده و از نظر چسبندگی و زیبایی ظاهری عملکردی مشابه رنگ‌های مصنوعی دارد، با این تفاوت که منشأ طبیعی و زیست‌سازگار آن مزیتی قابل توجه برای کاربرد دارویی محسوب می‌شود.

آزمون‌های کنترل کیفیت قرص‌ها

پس از روکش‌دهی، برای هر گروه، ارزیابی ظاهری و یکنواختی رنگ، تعیین تغییر وزن، تست فرسایش، آزمون سختی و اندازه‌گیری یکنواختی وزن و محتوا در صورت نیاز و همچنین پایداری رنگ در معرض نور و حرارت (مثلاً قرار دادن نمونه‌ها در ۴۰ درجه سانتی گراد و دو شرایط نورپردازی مشخص به مدت تعیین شده) جهت شبیه‌سازی شرایط نگهداری آزمایش شد. پارامترهای فوق مطابق روش‌های استاندارد فارماکوپه و مروری بر روش‌های ارزیابی روکش گزارش شد(۶، ۱۱، ۱۲).

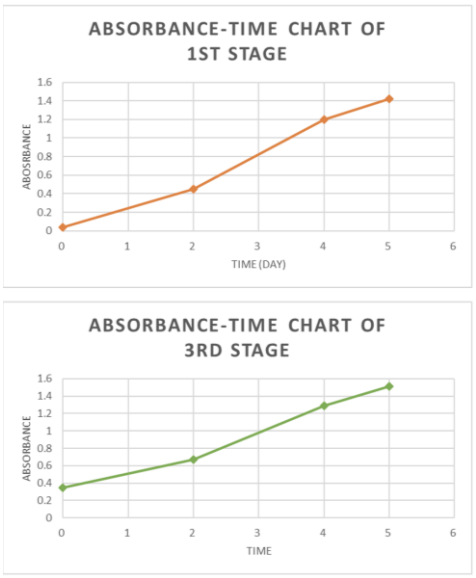
یافته‌ها

نتایج کشت و رشد میکروجلبک C. vulgaris

فرآیند کشت میکروجلبک با موفقیت تا مقیاس ۸۰ لیتر انجام شد و بیوماس حاصل پس از سانتریفیوژ و لیوفیلیزاسیون به‌صورت پودر خشک به‌دست آمد. شکل شماره ۱، مراحل رشد در فاز دوم و سوم را نشان می‌دهد.

تصویر شماره ۱: نمای مراحل دوم و سوم کشت میکروجلبک C. vulgari در مقیاس آزمایشگاهی، تصاویر از راست به چپ نشان دهنده افزایش تراکم سلولی و تغییر رنگ محیط کشت همزمان با ورود کشت به فاز نمایی و سپس فاز پایدار رشد هستند.

پایش رشد از طریق اندازه‌گیری جذب نوری در ۶۸۰ نانومتر انجام شد (تصویر شماره ۲). بیش‌ترین جذب در روز پنجم کشت ثبت گردید که مطابق با فاز نمایی رشد جلبک بود. محاسبه غلظت کلروفیل a با استفاده از فرمول Arnon (۱۹۴۹) برابر با 7.36 µg/mL در فاز نهایی بود. یافته‌ها با مطالعات اخیر درباره منحنی رشد و تولید رنگدانه در *Chlorella* همخوانی دارد(۱۳).



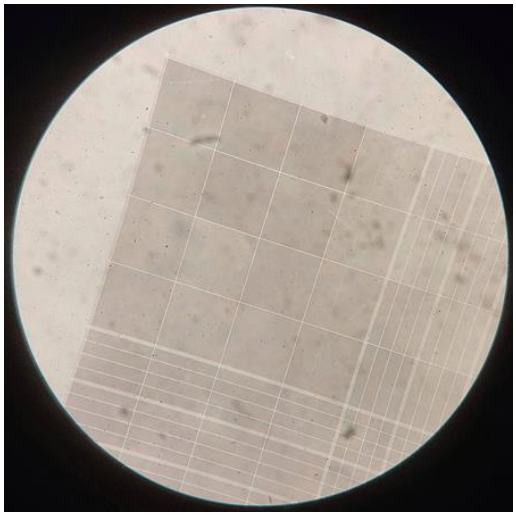
تصویر شماره ۲: منحنی رشد و تجمع کلروفیل Chlorella vulgaris بر اساس اندازه‌گیری جذب نوری در طول موج ۶۸۰ نانومتر طی روزهای مختلف کشت، افزایش جذب نوری تا روز پنجم نشان دهنده ورود جلبک به فاز نمایی رشد و بیشینه تولید کلروفیل است

شمارش سلولی میکروجلبک‌ها با استفاده از هموسایتومتر در روزهای متوالی انجام و افزایش تعداد سلول‌ها تا روز پنجم تأیید شد (تصاویر شماره ۳ و ۴) در روز پنجم میانگین سلول‌ها به بیش از دو برابر روز سوم رسید که نشان دهنده رشد مطلوب و سلامت کشت بود(۲).

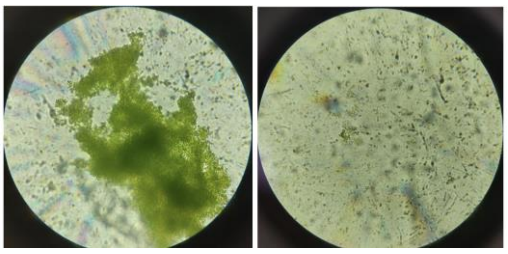
استخراج کلروفیل از بیوماس خشک شده با متانول سرد و سونیکاسیون انجام شد. تفکیک کلروفیل a و b از عصاره خام با کروماتوگرافی ستونی انجام گرفت. کروماتوگرام حاصل از HPLC دو پیک مشخص را در زمان بازداری ۵,۳ و ۶,۱ دقیقه نشان داد که به‌ترتیب با

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-23]

کلروفیل b و کلروفیل a مطابقت داشتند (تصوی شماره ۵). غلظت نهایی کلروفیل a و b به‌ترتیب 56.2 mg/mL و 24.4mg/mL برآورد شد و بازده استخراج کلروفیل aنسبت به مقدار تئوریک ۸۷٫۸ درصد بود. این بازده نسبت به مقادیر گزارش شده در مطالعات مشابه با روش‌های آلی و مافوق صوتی (۸۵ – ۷۰ درصد) در محدوده مطلوب قرار داشت(۱۴).

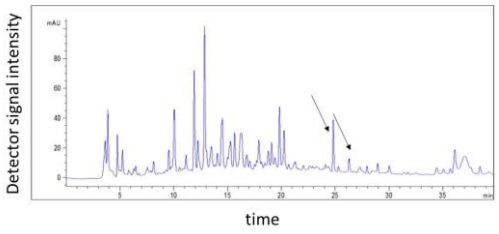


تصویر شماره ۳: شمارش سلول‌های *Chlorella vulgaris* با استفاده از هموسایتومتر در طول دوره کشت، نشان دهنده افزایش معنی‌دار تراکم سلولی در روزهای متوالی و تأیید رشد فعال جمعیت جلبکی



تصویر شماره ٤: تصویر میکروسکوپی نوری از سلول‌های *Chlorella vulgaris* در روز سوم کشت مرحله دوم با بزرگنمایی ۴۰×، که مورفولوژی کروی-بیضوی سلول‌ها و یکنواختی جمعیت جلبکی را نشان می‌دهد.*استخراج و خالص‌سازی رنگدانه کلروفیل*

پودر خشک کلروفیل پس از لیوفیلیزاسیون به رنگ سبز تیره با بوی خاص گیاهی حاصل شد و نامحلول بودن آن در آب تأیید گردید (تصویر شماره ۶). این یافته با ویژگی‌های فیزیکی گزارش شده برای کلروفیل طبیعی مطابقت دارد(۱۰).



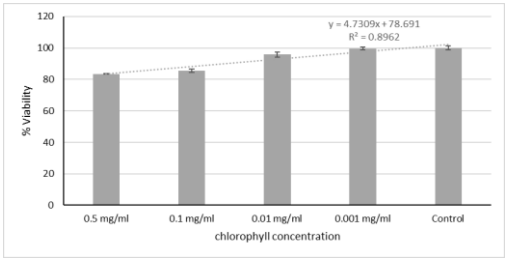
تصویر شماره ۵: کروماتوگرام HPLC عصاره استخراج شده از *C. vulgaris* تحت شرایط فاز معکوس (ستون C18، دتکتور UV-Vis) پیک‌های مشاهده شده در زمان‌های بازداری مشخص به‌ترتیب مربوط به کلروفیل b و کلروفیل a هستند که شناسایی آن‌ها با مقایسه با استاندارد مرجع انجام شده است

تصویر شماره ٦: پودر خشک شده رنگدانه کلروفیل a پس از لیوفیلیزاسیون، با رنگ سبز تیره و ماهیت نامحلول در آب، به‌دست آمده از بیوماس *C. vulgaris*

آزمون سمیت سلولی (MTT Assay)

نتایج آزمون MTT روی سلول‌های فیبروبلاست L ۹۲۹ نشان داد که کلروفیل در غلظت‌های کم‌تر از ۰/۵ mg/mL اثر سمی قابل توجهی ندارد (تصویر شماره ۷) درصد زنده‌مانی سلول‌ها در غلظت‌های ۰/۰۰۱ تا ۰/۰۱ mg/mL به‌ترتیب ۹۹/۶ و ۹۵/۸ درصد بود، و آزمون t دو نمونه‌ای تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها نشان نداد (P >۰/۰۵) این نتایج با داده‌های گزارش شده از سمیت پایین کلروفیل و مشتقات آن در سلول‌های انسانی مطابقت دارد(۱۴، ۱۵).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-23]



تصویر شماره ۷: نتایج آزمون سمیت سلولی (MTT assay) رنگدانه کلروفیل طبیعی استخراج‌شده از *C. vulgaris* بر سلول‌های فیبروبلاست L 929 در غلظت‌های مختلف، داده‌ها به‌صورت درصد زنده‌مانی سلولی نسبت به کنترل گزارش شده‌اند (میانگین ± انحراف معیار).

بنابراین غلظت ۰/۰۱mg/mL به‌عنوان سطح ایمن و مناسب برای استفاده در فرمولاسیون روکش قرص انتخاب شد. نتایج فوق تأیید می‌کند که رنگدانه‌های میکروجلبکی در محدوده‌های کاربردی دارویی فاقد سمیت سلولی هستند و می‌توانند جایگزین رنگ‌های سنتتیک شوند(۱۴، ۱۶).

آزمون‌های میکروبی و کنترل کیفیت محصول

آزمایش‌های میکروبی نشان داد هیچ‌گونه رشد در محیط‌های اختصاصی برای *Pseudomonas aeruginosa* (Cetrimide agar) و *Escherichia coli* (MacConkey agar) مشاهده نشد، که بیانگر عدم آلودگی این پاتوژن‌ها در فرآورده است. رشد محدود در محیط Vogel-Johnson بدون تشکیل هاله زرد نشان دهنده حضور احتمالی *Staphylococcus epidermidis* به‌عنوان فلور طبیعی پوست بود و حضور *S. aureus* تأیید نشد (تصویر شماره ۸) نتایج مطابق با الزامات GMP برای محصولات دارویی طبیعی و با داده‌های مشابه در رنگ‌های طبیعی گزارش شده توسط سایر محققان مطابقت دارد(۱۷، ۱۸).

ارزیابی ویژگی‌های قرص و روکش

تغییر وزن و یکنواختی روکش

مقایسه وزن قرص‌های گروه تست (حاوی کلروفیل) و کنترل (با رنگ مصنوعی) پیش و پس از روکش‌دهی نشان داد اختلاف معنی‌داری بین دو گروه وجود ندارد (P = ۰/۵۲) میانگین وزن قرص‌ها پس از روکش برای گروه تست mg ۵/۶± ۴۱۷/۹ و برای گروه کنترل mg ۵/۱± ۴۱۷/۸ گزارش می‌گردد (جدول شماره ۱).

تصویر شماره ۸: نتایج آزمون‌های میکروبیولوژیک عصاره کلروفیل و قرص‌های روکش‌دار در محیط‌های کشت انتخابی برای پاتوژن‌های شاخص دارویی، نشان‌دهنده عدم رشد *Escherichia coli*، *Pseudomonas aeruginosa* و *Staphylococcus aureus*

جدول شماره ۱: مقایسه میانگین وزن قرص‌ها قبل و بعد از روکش‌دهی در گروه تست (حاوی رنگدانه کلروفیل طبیعی) و گروه کنترل (حاوی رنگ مصنوعی)

سطح معنی داری	میانگین وزن بعد از روکش (MG)	میانگین وزن قبل از روکش (MG)	گروه
۰/۵۲	۱۷/۹ ± ۵/۶	۴۰۹/۹ ±۳/۳	تست (کلروفیل)
۰/۵۲	۱۷/۸ ± ۵/۱	۱۰/۶ ±۳/۰	کنترل (رنگ مصنوعی)

داده‌ها به‌صورت میانگین ± انحراف معیار گزارش شده‌اند و اختلاف آماری معنی‌داری بین دوگروه مشاهده نشد (p >۰/۰۵).

کیفیت ظاهری روکش

ارزیابی کیفی قرص‌ها از نظر یکنواختی رنگ، درخشندگی و پخش‌پذیری نشان داد که رنگ کلروفیل توانست پوشش سبز یکنواختی مشابه رنگ مصنوعی ایجاد کند. امتیاز دهی بین دو گروه اختلاف معناداری نداشت (P >۰/۰۵). حتی در برخی نمونه ها روکش‌های حاوی کلروفیل از نظر درخشندگی رنگ و یکنواختی سطح، نمره بالاتری دریافت کردند (جدول شماره ۲). این یافته با گزارش های پیشین درباره ویژگی های اپتیکی مطلوب رنگ‌های طبیعی در پوشش دارویی همسو است(۱۹، ۲۰).

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-23]

جدول شماره ۲: ارزیابی کیفی ظاهر قرص‌های روکش‌دار در گروه کنترل و گروه تست بر اساس امتیازدهی یکنواختی رنگ، درخشندگی و کیفیت سطحی

قرص های گروه کنترل	امتیاز	قرص های گروه تست	امتیاز
Mean±SD	۲/۶ ±۰/۸۰		۲/۵۵ ±۰/۸۶

داده‌ها نشان می‌دهند که عملکرد روکش حاوی کلروفیل از نظر ویژگی‌های ظاهری با رنگ مصنوعی قابل مقایسه است.

آزمون فرسایش (Friability)

کاهش وزن پس از آزمون سایش برای گروه کنترل ۰/۹ درصد و برای گروه تست ۰/۸ درصد بود که هر دو کم‌تر از حد مجاز ۱ درصد بر اساس (USP ۴۳) United States Pharmacopeia هستند. هیچ‌گونه شکستگی یا پوسته پوسته شدن در فیلم روکش مشاهده نشد (جدول شماره ۳).

جدول شماره ۳: نتایج آزمون فرسایش (Friability test) قرص‌های روکش‌دار در گروه کنترل و گروه تست، شامل وزن اولیه و ثانویه پس از آزمون

.	وزن اولیه	وزن ثانویه
گروه کنترل	۶/۶۴۰	۶/۳۰۶.
گروه تست	g۶/۶۳۱	g۶/۲۵

کاهش وزن کم‌تر از ۱ درصد نشان دهنده مقاومت مکانیکی مناسب فیلم روکش مطابق با الزامات فارماکوپه USP است.

این نتایج نشان دادند که فیلم‌های تهیه شده با HPMCو کلروفیل از نظر مقاومت مکانیکی و چسبندگی با فیلم‌های حاوی رنگ مصنوعی قابل مقایسه هستند. پایداری مکانیکی مطلوب و رنگ یکنواخت فیلم، کلروفیل را به‌عنوان رنگی طبیعی و ایمن برای کاربرد دارویی تأیید می‌کند.

بحث

انتخاب گونه‌ی *C. vulgaris* در این پژوهش با هدف دستیابی به بیشترین بازده کلروفیل a انجام شد. مطالعات تطبیقی نشان داده‌اند که گونه‌های *Chlorella* در مقایسه با دیگر میکروجلبک‌های سبز مانند *Scenedesmus obliquus* و *Spirulina platensis*، دارای محتوای بالاتری از کلروفیل a و پایداری نوری بهتر هستند که آن را برای کاربردهای دارویی و غذایی مناسب‌تر می‌سازد. علاوه بر این، این گونه توانایی رشد بالا در شرایط نیمه استریل و محیط‌های ارزان قیمت (مانند محیط BBM) را داراست که باعث کاهش هزینه تولید در مقیاس صنعتی می‌شود. یافته‌های مطالعه حاضر نشان می‌دهد که استفاده از کلروفیل استخراج شده از *C. vulgaris* به عنوان رنگ دهنده روکش قرص، هم از منظر ایمنی سلولی (آزمون MTT) و هم از منظر عملکرد فرمولاسیونی (یکنواختی رنگ، پایداری مکانیکی فیلم) نتایجی مشابه یا بهتر از رنگ‌های سنتتیک ارائه می‌دهد. این نتیجه در چارچوب شواهد فعلی در ادبیات نیز قابل تبیین است(۲۱، ۲۲). بازنگری‌های جامع اخیر نشان می‌دهند که پیگمان‌های میکروجلبکی از جمله کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها خواص زیست‌سازگاری مطلوب و فعالیت‌های فواید بخشی (آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی) دارند که ریسک سیستمیک آن ها را در سطوح کاربردی کاهش می‌دهد و آن‌ها را برای کاربردهای غذایی و دارویی جذاب می‌سازد(۲). از منظر ایمنی مقایسه‌ای، رنگ‌های آزو به‌دلیل متابولیسم میکروبی-فرآیندی در روده که منجر به شکستن پیوند آزو و تولید آمین‌های آروماتیک می‌شود، با نگرانی‌های سمیت ژنتیکی و کارسینوژنی همراه بوده‌اند. این امر سابقه حذف یا محدودیت مصرف برخی رنگ‌های آزو را توجیه می‌کند و نشان می‌دهد که جایگزین‌های طبیعی باید از منظر ژنوتوکسیستی و متابولیت‌های بالقوه نیز ارزیابی شوند(۲۳). بنابراین، داده‌های MTT مطالعه حاضر که نشان‌دهنده بقای بالای سلولی در حضور کلروفیل در غلظت‌های کاربردی هستند، مبنایی معتبر برای ادعای «ایمن‌تر بودن نسبیِ کلروفیل » فراهم می‌آورد؛ اما باید

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-23]

توجه داشت که آزمایشات ژنوتوکسیستی Ames، micronucleus و comet برای اثبات قطعی عدم ایجاد آسیب ژنتیکی لازم است و در مطالعات مروری نیز بر این نقطه تاکید شده است(۲۴).

از منظر فرمولاسیون، دو چالش فنی کلیدی مربوط به کلروفیل، حل‌پذیری پایین در فاز آبی و حساسیت به نور، حرارت و pH که می‌تواند منجر به تغییرات رنگ و از دست رفتن کیفیت ظاهری شود، می باشد. راه‌حل‌های فرمولاسیون که در این مطالعه و در منابع بین‌المللی موفق نشان داده شده‌اند شامل استفاده از کلروفیلین‌های آبدوست، کمک حلال‌های آلی کنترل شده (مثلاً ایزوپروپیل الکل در مقادیر کم) و کپسوله‌سازی یا ادغام در حامل‌های پلیمری (مثل ماتریس‌های HPMC یا نانومولسیون‌ها) هستند که هم پخش‌پذیری را افزایش می‌دهند و هم پایداری را بهبود می‌بخشند. مطالعات نشان داده‌اند که تکنیک‌های کپسوله‌سازی (اسپری‌درایِنگ، میکروکپسوله‌سازی با پلیمرها یا کوآکروِسیشن) می‌توانند پایداری کلروفیل را به‌طور معنی‌داری ارتقاء دهند و از اکسیداسیون یا فوتودگراداسیون جلوگیری کنند(۲۵).

در بخش بهره‌وری و مقیاس‌پذیری، بازده استخراج بالا (تقریبا ۸۷/۸ درصد) که در این پژوهش به‌دست آمد، نشان دهنده کارآیی روش انتخابی استخراج (حلالی با سونیکاسیون و کروماتوگرافی) است و با مطالعات به‌روز در زمینه استخراج برون‌دادِ بالا از *Chlorella* همخوانی دارد. با این حال، مقیاس‌پذیری اقتصادی نیازمند بهینه‌سازی‌های مهندسی فرایند است (در زمینه کاهش مصرف حلال، بازیابی حلال، استفاده از استخراج‌های سبز و جریان پیوسته) تا هزینه‌های سرمایه‌ای و عملیاتی کاهش یابد و توجیه اقتصادی در سطح صنعتی حاصل شود(۲۶).

نکته دیگری که باید در تفسیر نتایج مورد توجه قرار گیرد، تفاوت میان «ایمنی ماده خام» و «ایمنی محصول فرمولاسیون شده » است. حتی اگر کلروفیل خام در آزمون‌های in vitro بی‌خطر نشان دهد، رفتار آن پس از فرمولاسیون (تعامل با پلیمرها، واکنش‌های بالقوه اکسیداتیو در شرایط فرآوری یا نگهداری، تشکیل محصولات جانبی) ممکن است پروفایل ایمنی را تغییر دهد. بنابراین، علاوه بر آزمون‌های پایه سلولی و میکروبی، مطالعات پایداری شیمیایی و آزمایش‌های متابولیت شناسی محصولات دارویی نهایی ضروری است(۲۷).

هم‌چنین یافته‌های فرمولاسیون تهیه شده مانند یکنواختی رنگ، عدم افزایش قابل توجه وزن و عملکرد مکانیکی فیلم مشابه رنگ مصنوعی، نشان می‌دهد که با طراحی دقیق فرمول (انتخاب HPMC مناسب، نسبت پلاستی‌سایزر، استفاده از TiO_2 به‌عنوان اپاسایفایر جهت افزایش پوشش) می‌توان محدودیت‌های فیزیکوشیمیایی کلروفیل را از لحاظ صنعتی مدیریت نمود. این نتایج با مطالعات توسعه روکش‌های مبتنی بر رنگ‌های طبیعی همخوانی دارد که نشان داده‌اند کنترل ویسکوزیته و نرخ اسپری و استفاده از حامل‌های مناسب، تعیین کننده موفقیت روکش‌دهی است(۲۸).

علاوه بر نتایج حاصل در این مطالعه، شواهد گسترده در ادبیات علمی نشان می‌دهد که پیگمان‌های میکروجلبکی به‌ویژه کلروفیل در قیاس با رنگ‌های طبیعی سنتی از منابع گیاهی، نه تنها بازده بالاتری از نظر تولید و تجمع ارائه می‌دهند، بلکه از نظر پتانسیل بیولوژیکی و کاربرد صنعتی نیز در حال تبدیل شدن به گزینه‌ای برتر هستند. بررسی‌های اخیر نشان داده‌اند که پتانسیل تولید پیگمان‌ها در میکروجلبک‌ها به سبب سیستم‌های فتوسنتزی کارآمد و رشد سریع، می‌تواند موجب افزایش پایداری بیوتولید و کاهش وابستگی به منابع زمینی شود، که این نکته مورد تأکید در مطالعات مروری معاصر قرار گرفته است(۲، ۳، ۲۹). همچنین، طیف وسیعی از تحقیقات بهبود روش‌های استخراج و تجزیه پیگمان‌ها را مورد بررسی قرار داده‌اند که نشان می‌دهد تکنیک‌های نوین مانند استخراج با سیستم‌های فاز دو آبی و استخراج با کمک امواج فراصوت می‌توانند بازده و خلوص کلروفیل را به‌طور

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-23]

معنی‌داری افزایش دهند، که این موضوع همسو با یافته‌های مطالعه حاضر در بهینه‌سازی شرایط جداسازی کروماتوگرافی است(۱۳، ۳۰). علاوه بر این، نقش کلروفیل و مشتقات آن در فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضدالتهابی و حتی اثرات ضدتوموری در مطالعات دارویی به‌خوبی بررسی شد که این کاربردهای بیولوژیکی، ارزش افزوده این پیگمان‌ها را فراتر از کاربرد صرف رنگ‌دهی نشان می‌دهد(۱۴، ۱۵، ۳۱).

در پایان، از منظر ترجمه‌ی دانش به تولید صنعتی، مسیر پیشنهادی روشن است که شامل، تکرار آزمون‌های ژنوتوکسیستی و مطالعات ایمنی تغذیه/مصرف طولانی مدت برای اثبات ایمنی جامع، اعمال استراتژی‌های پایدارسازی (کپسوله‌سازی، آنتی‌اکسیدان‌های همراه، استفاده از کلروفیلین) برای افزایش پایداری نوری/حرارتی، بهینه‌سازی فرایند استخراج با رویکردهای «استخراج سبز» برای کاهش هزینه‌ها و مخاطرات محیطی و اجرای مطالعات مقیاس نیمه‌صنعتی برای تحلیل اقتصاد مقیاس (CAPEX/OPEX) قبل از سرمایه‌گذاری صنعتی، می باشد. مروری جامع بر بازار و امکان سنجی نشان می‌دهد که تقاضا برای رنگ‌های طبیعی در صنایع غذایی و دارویی در حال رشد است و ادغام بهبودهای فرایندی می‌تواند پذیرش صنعتی این پیگمان‌ها را تسریع کند(۲).

نتایج این پژوهش نشان داد که کلروفیل استخراج شده از میکروجلبک *C.vulgaris* به‌عنوان رنگدانه‌ای طبیعی، ایمن و زیست سازگار بوده و پتانسیل لازم جهت پیشنهاد جایگزینی مؤثر برای رنگ‌های سنتتیک آزو در فرمولاسیون روکش قرص‌ها را دارا می باشد. فرایند کشت در شرایط کنترل شده منجر به دستیابی به زیست توده‌ای با محتوای بالای کلروفیل شد و روش استخراج بهینه شده توانست بازده قابل توجهی از رنگدانه خالص را فراهم کند. ارزیابی سمیت سلولی نشان داد که کلروفیل در غلظت‌های مورد استفاده فاقد اثرات سیتوتوکسیک قابل توجه است و از نظر ایمنی زیستی برای کاربردهای دارویی مناسب می‌باشد. همچنین، بررسی‌های فیزیکوشیمیایی و میکروبی نشان دادند که روکش‌های حاوی کلروفیل از نظر یکنواختی رنگ، چسبندگی، پایداری مکانیکی و فقدان آلودگی میکروبی عملکردی مشابه با روکش‌های دارای رنگ‌های مصنوعی دارند. با توجه به این نتایج، استفاده از کلروفیل میکروجلبکی در تولید روکش قرص‌ها نه‌تنها می‌تواند موجب ارتقای ایمنی و پذیرش بیمار گردد، بلکه از منظر اقتصادی و زیست محیطی نیز گزینه‌ای مقرون‌به‌صرفه و پایدار محسوب می‌شود. پیشنهاد می‌شود در مطالعات آتی پایداری نوری، حرارتی و شیمیایی فرمولاسیون‌های حاوی کلروفیل و نیز امکان مقیاس‌پذیری صنعتی آن مورد بررسی قرار گیرد تا مسیر استفاده گسترده از رنگ‌های طبیعی در صنایع داروسازی هموار گردد..

References

1. Goswami D, Mukherjee J, Mondal C, Bhunia B. Bioremediation of azo dye: strategies, toxicity assessment, mechanisms, bottlenecks and prospects. Sci Total Environ. 2024;954:176426. doi:10.1016/j.scitotenv.2024.176426. PMID: 39326754.
2. Sun H, Wang Y, He Y, Liu B, Mou H, Chen F, Yang S. Microalgae-derived pigments for the food industry. Mar Drugs. 2023;21(2):82. doi:10.3390/md21020082. PMID: 36827122.
3. Mendes AR, Spínola MP, Lordelo M, Prates JAM. Advances in bioprocess engineering for optimising *Chlorella vulgaris* fermentation. Foods 2024; 13(24): 4154. doi: 10.3390/ foods13244154. PMID: 39767096.
4. Indrasti D, Andarwulan N, Purnomo EH, Wulandari NU. Stability of chlorophyll as a natural colorant: a review of suji (*Dracaena*

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-23]

angustifolia Roxb.) leaves. Curr Res Nutr Food Sci J 2018;6(3):609–625.

5. Ngamwonglumlert L, Devahastin S, Chiewchan N. Molecular structure, stability and cytotoxicity of natural green colorants from *Centella asiatica* L. leaves. Food Chem 2017;232:387–394. PMID: 28490089.
6. Heng PW, Liew CV. Surfactants and colors in tablets. Pharmaceutical Dosage Forms—Tablets. 3rd ed. Boca Raton: CRC Press; 2008. p. 285–308.
7. Chen Z, Wu W, Wen Y, et al. Recent advances of natural pigments from algae. Food Prod Process Nutr 2023;5:39. doi:10.1186/s43014-023-00155-y.
8. Dang Y, Li Z, Yu F. Recent advances in astaxanthin as an antioxidant in food applications. Antioxidants (Basel) 2024; 13(7): 879. doi:10.3390/antiox13070879. PMID: 39061947.
9. Ferraz CAA, Grougnet R, Nicolau E, Picot L, de Oliveira Junior RG. Carotenoids from marine microalgae as antimelanoma agents. Mar Drugs 2022; 20(10): 618. doi:10.3390/ md20100618. PMID: 36286442.
10. Solymosi K, Mysliwa-Kurdziel B. Chlorophylls and their derivatives used in food industry and medicine. Mini Rev Med Chem 2017;17(13):1194–1202. PMID: 27719668.
11. Schoneker DR. Coloring agents for use in pharmaceuticals. In: Encycloedia of Pharmaceutical Tech 3rd ed. New York: Informa Healthcare; 2007. p. 648.
12. Usop R, Abidin ZH, Mazni NA, et al. Colour stability of chlorophyll-based coating films after UV-A exposure. Pigment Resin Technol 2016;45(3):149–157.
13. Hosikian A, Lim S, Halim R, Danquah MK. Chlorophyll extraction from microalgae: process engineering aspects. Int J Chem Eng 2010;2010:391632. doi:10.1155/2010/391632.
14. Sun D, Liu Y, Xue J, et al. Structure, functions and potential medicinal effects of microalgal chlorophylls. Mar Drugs 2024;22(2):65. doi:10.3390/md22020065.
15. Ferruzzi MG, Failla ML, Schwartz SJ. Antioxidant and antimutagenic activity of dietary chlorophyll derivatives. J Food Sci 2002;67(7):2589–2595. doi:10.1111/j.1365-2621.2002.tb08886.x.
16. Kiki MJ. Biopigments of microbial origin and cosmetic applications. Cosmetics 2023;10(2):47. doi:10.3390/cosmetics10020047.
17. Mulyana A, Haryati G, Asri A, et al. Natural pigments: innovative extraction technologies and health applications. Front Pharmacol 2024;15:1507108. doi: 10. 3389/ fphar.2024.1507108.
18. Ansari FA, Perazzolli M, Husain FM, et al. Decontamination approaches for herbal drug stability and shelf-life improvement. Microbe 2024; 3: 100070. doi: 10.1016/j. microb. 2024.100070.
19. Dalmoro A, Smeraldo A, Baldi A, Barba AA, Lamberti G. Multilayer natural coating for fed-state gastric protection. Pharmaceutics 2022; 14(2): 283. doi: 10. 3390/pharmaceutics14020283.
20. Malviya R, Sundaram S, Fuloria S. Pharmaceutical coating approaches: a review. Polymers (Basel) 2022; 14(16): 3314. doi:10.3390/polym14163314.
21. Cunningham C, Hansell J, Nuneviller III F, Rajabi-Siahboomi AR. Evaluation of recent advances in continuous film coating processes. Drug development and industrial pharmacy. 2010 Jan 21;36(2):227-33.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-23]

22. Mehaffey T, Ghimire M, Cunningham C, Rajabi-Siahboomi A. Stability of non-synthetic pigments in fully formulated film coating systems. AAPS PharmSciTech 2019;20(Suppl 2):Poster.
23. Barciela P, Perez-Vazquez A, Prieto MA. Azo dyes in the food industry: features, classification, toxicity, alternatives and regulation. Food Chem Toxicol 2023; 178: 113935. doi: 10.1016/j. fct.2023.113935. PMID: 37429408.
24. Martins T, Barros AN, Rosa E, Antunes L. Enhancing health benefits through chlorophylls and chlorophyll-rich agro-foods. Molecules 2023;28(14):5344. doi:10.3390/molecules28145344. PMID: 37513218.
25. Agarry IE, Wang Z, Cai T, et al. Chlorophyll encapsulation by complex coacervation and vibration nozzle technology. Innov Food Sci Emerg Technol 2022;78:103017. doi:10. 1016/j. ifset.2022.103017.
26. Matesanz MC, Villa-Carvajal M, Linares J, et al. Chemical characterization of the lichen-symbiont microalga *Asterochloris erici* and its cytostatic effect on L929 cells. Processes. 2021;9(9):1509.
27. Martins T, Barros AN, Rosa E, Antunes L. Enhancing health benefits through chlorophylls and chlorophyll-rich agro-foods. Molecules. 2023;28(14):5344. doi:10.3390/molecules28145344.
28. Hsiao CJ, Lin JF, Wen HY, et al. Enhancement of chlorophyll stability using chlorophyll encapsulated polycaprolactone microparticles. Food Chem 2020; 306: 125300. PMID: 31562927.
29. Reimão M, Almeida L, Ramos C, Eusébio N, Martins R, Vieira da Silva M, Vasconcelos V, Freitas M. Colouring applications of microalgae and cyanobacteria photosynthetic pigments: Challenges for industrial and market acceptance. J Clean Prod 2025; 520:146071. doi: 10. 1016/j. jclepro. 2025.146071
30. Nikolova K, Petkova N, Mihaylova D, et al. Extraction of phycocyanin and chlorophyll from Spirulina by "green methods". Separations 2024;11(2):57. doi:10.3390/separations11020057.
31. Chettri S, Altemimi AB, Das P, Singh R, Pandey VK, Nath PC, Rustagi S. Recent advances in microalgal pigments as a source of natural colors and their application in next-generation functional foods. Sustain Food Technol 2026; Advance Article. doi: 10. 1039/ D5FB00537J.

[Downloaded from jmums.mazums.ac.ir on 2026-05-23]