

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

Hamed Morad<sup>1</sup>  
Mojtaba Katouli<sup>2</sup>  
Ali Davoodi<sup>2</sup>  
Fahime Mahmoudnia<sup>3</sup>  
Shaghayegh Morad<sup>4</sup>  
Narjesalsadat Moein<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Assistant Professor, Department of Pharmaceutics and Pharmaceutical Nanotechnology, School of Pharmacy, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran

<sup>2</sup> Assistant Professor, Ramsar Campus, Mazandaran University of Medical Sciences, Ramsar, Iran

<sup>3</sup> Assistant Professor, Department of Biology, Faculty of Science, Farhangian University, Tehran, Iran

<sup>4</sup> 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)

# تولید و کاربرد دارویی رنگدانه طبیعی کلروفیل از میکرو جلبک دریایی *Chlorella vulgaris*

حامد مراد<sup>۱</sup>  
مجتبی کتولی<sup>۲</sup>  
علی داوودی<sup>۲</sup>  
فهیمه محمودنیا<sup>۳</sup>  
شقایق مراد<sup>۴</sup>  
نرجس السادات معین<sup>۲</sup>

## 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 ایمن تر افزایش یافته است. این مطالعه با هدف استخراج رنگدانه کلروفیل از میکرو جلبک *Chlorella vulgaris* و ارزیابی کارایی و ایمنی آن در فرمولاسیون روکش قرص به‌عنوان جایگزین رنگ‌های مصنوعی، انجام پذیرفت.

**مواد و روش‌ها:** در این مطالعه تجربی-آزمایشگاهی، میکرو جلبک *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 فیروبلست 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.

**واژه‌های کلیدی:** میکرو جلبک، کلروفیل، سمیت سلولی، روکش قرص، استخراج رنگدانه

Email: adavoodi.pharm@gmail.com

**مؤلف مسئول:** علی داوودی-رامسر، پردیس علوم پزشکی رامسر، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، رامسر، ایران

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

## مقدمه

استفاده از رنگ دهنده‌ها در فرمولاسیون‌های دارویی به‌ویژه در روکش‌گذاری 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 تضعیف‌کننده 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* به دلیل رشد سریع، قابلیت تولید بیوماس بالا و محتوای قابل توجه کلروفیل (خصوصاً 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).

آزمون‌های سمیت سلولی مختلف بیانگر آن است که کلروفیل استخراج شده از *C. vulgaris* و دیگر میکروجلبک‌ها حتی در غلظت‌های بالا ( $>100 \mu\text{g/mL}$ ) باعث کاهش معنی‌دار زنده‌مانی سلولی نمی‌شود و اثرات التهابی یا نکروتیک در سلول‌های انسانی ندارد (۵، ۶).

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 (۶، ۷).

در سال‌های اخیر، چندین پیگمان میکروجلبکی به مرحله تولید صنعتی و تجاری‌سازی رسیده‌اند که قابلیت بالقوه‌ی 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 به کار 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

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 پر کاربرد 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 حل‌پذیری مناسب و ایمنی تایید شده، پتانسیل مطلوبی جهت پیشنهاد به منظور استفاده در فرمولاسیون‌های دارویی به‌ویژه برای روکش قرص‌های سبز رنگ دارا می‌باشند (۱۰). بنابراین، هدف تحقیق حاضر استخراج و خالص‌سازی کلروفیل a از *C. vulgaris* بررسی پروفایل سمیت 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 زمینه‌ی نانومهندسی حامل‌ها، آزمون‌های بالینی-تکمیلی و ارزیابی‌های اقتصادی-زیست محیطی در مسیر اسکیل آپ تولید پیگمان‌های میکرومبلکی فراهم آورد (۱۱، ۱۲).

## مواد و روش‌ها

این مطالعه تجربی - آزمایشگاهی، حاصل طرح تحقیقاتی فناورانه‌ی به ثبت رسیده در دانشگاه علوم پزشکی ایران با کد اخلاق IR.IUMS.REC.1402.592 می‌باشد. اجزای محیط کشت (BBM) Bold's Basal (K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>)، پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات (KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>)، نیتрат سدیم (NaNO<sub>3</sub>)، منیزیم سولفات هفت‌آبه (MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O)،

کلرید سدیم (NaCl)، کلرید کلسیم دوآبه (CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O)، اتیلن دی آمین تترااستیک اسید دی سدیم (Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O)، سولفات آهن هفت‌آبه (FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O) 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 گلیکول از شرکت سیگما-آلدردیج 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 میلی گرمی (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 Basic ۲۰ Crison Instruments، (اسپانیا)، ترازوی دقیق مدل 202 GR- A&D Company (ژاپن)، اسپکتروفتومتر UV-Vis مدل DR 6000 Hach (آمریکا)، میکروسکوپ نوری مدل Olympus CX ۲۳ (ژاپن)، دستگاه تبخیر دورانی مدل RE 2000B Knauer (آلمان)، حمام اولتراسونیک مدل USC 200T Becker (آلمان)، سانتریفیوژ مدل ۶۰۰ Sigma P (آلمان)، انکوباتور مدل 600 Memmert (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

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

جهت آزمون سمیت سلولی از رده سلولی فیروبلست موشی ۹۲۹ L کد NCBI C161 تهیه شده از بانک سلولی ملی ایران (انستیتو پاستور، تهران) استفاده گردید. محیط کشت DMEM، سرم جنین گاوی (FBS) و معرف dimethylthiazol-2-yl)-2,5-) MTT (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 روکش گذاری قرص‌ها و آزمون‌های کیفی مرتبط، می باشد. در ادامه روش‌ها به صورت 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 به صورت دسته‌ای (Batch culture) در محیط استاندارد BBM (Bold's Basal Medium) انجام و تکثیر گردید. محلول عناصر کم مصرف (Trace metal solution) شامل  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ ،  $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ ،  $H_3BO_3$ ،  $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$  و  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ،  $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$  تهیه شد و به صورت محلول استوک در طول دوره کشت به محیط افزوده شد. مقادیر و روش تهیه اجزای محیط کشت BBM برای حجم یک لیتر، مطابق با پروتکل‌های مرجع استاندارد BBM انجام گرفت.

##### شرایط کشت و مقیاس

استوک *C. vulgaris* در شرایط آسپتیک در لامپ‌های ارلنر تُرف در فلاسک‌های استریل ۲۵۰-۱۰۰۰ mL سپس به مقیاس آزمایشگاهی (تا  $\sim 80$  mL) محیط

کشت انتقال یافت. دمای کشت در محدوده  $25 \pm 2^\circ C$  نگهداری شد. pH اولیه به کمک 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 ( $\sim 100-200 \mu mol photons m^{-2} s^{-1}$ ) و چرخه ی نور پیوسته یا ۱۶:۸ (روز:شب) نگهداری شدند. هوا دهی ملایم و اختلاط به وسیله پمپ یا آیریتور فراهم شد تا گاز  $CO_2$  مورد نیاز جهت فتوسنتز تأمین و تجمع سلولی یکنواخت برقرار گردد. نمونه برداری روزانه برای اندازه گیری جذب نوری (OD) یا جذب در طول موج مشخص برای کلروفیل و شمارش سلولی با هموسایتمتر 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 به وسیله روش اسپکتروسکوپی (اندازه گیری جذب در طول موج مناسب برای بیومس جلبکی) و شمارش نئوبار/هموسایتمتر 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) جمع آوری گردید. پس از برداشت، باطله محیط کشت حذف و رسوب سلولی در دمای پایین ( $4^\circ C$ ) تا زمان استخراج نگهداری شد.

##### روش استخراج

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 دکتور UV-Vis استفاده 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 به کار 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 به مدت 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 (تقریباً ۱۰۰۰۰ سلول در هر چاهک) و پس از چسبیدن، با غلظت‌های مختلف پیگمان (مشمول 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 (*S. aureus*, *E. coli*)، قارچ‌ها و ... روی محیط‌های اختصاصی تلقیح و رشد

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

#### 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  $\text{TiO}_2$  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 اجزاء، پروپیلن گلايکول به عنوان 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 به مدت ۷ روز) انجام شد. نتایج نشان داد استفاده از کلروفیل طبیعی در

#### فرمولاسیون هسته، روکش و آزمون‌های کیفی قرص‌ها

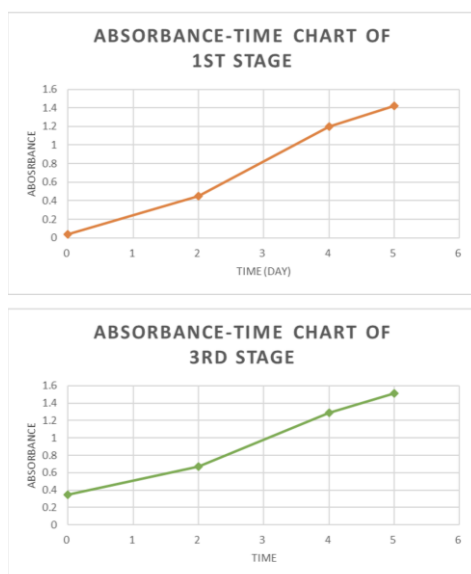
##### تهیه هسته ی قرص

قرص‌های پایه حاوی اسپرین به عنوان داروی مدل به روش گرانولاسیون مرطوب تهیه شدند. برای هر قرص از ۳۲۵ میلی گرم اسپرین، ۷۰ میلی گرم آویسل و ۱۰ میلی گرم نشاسته ذرت استفاده شد و چسب نشاسته ذرت ۷۰۵ درصد به میزان لازم افزوده شد تا به قوام گلوله برفی برسد. گرانول‌ها پس از عبور از الک مش ۱۰ در آن خشک شدند. سپس گرانول خشک شده با ۷۰ میلی گرم آویسل و ۴/۵ میلی گرم منیزیم استئارات مخلوط و در دستگاه پرس قرص فشرده گردید تا قرص‌های یکنواخت به دست آید. این فرمول بر اساس اصول گرانولاسیون مرطوب متداول در فرمولاسیون دارویی طراحی شد.

##### فرمول روکش

فرمولاسیون روکش بر پایه هیدروکسی پروپیل متیل سلولز (HPMC) طراحی شد. از آن‌جا که کلروفیل در آب نامحلول است، جهت افزایش یکنواختی رنگ و جلوگیری از تجمع ذرات، از ایزوپروپیل الکل به عنوان کمک حلال استفاده شد تا قابلیت انتشار رنگدانه در ماتریس پلیمری افزایش یابد. در فرمول گروه آزمون، اجزاء HPMC (۶۰ درصد)، تالک (۵ درصد) به عنوان لغزنده و ضدچسبندگی، دی‌اکسید تیتانیوم (۵ درصد) به عنوان اپاسیفاير و عامل سفید کننده، پروپیلن گلايکول (۱۵ درصد) به عنوان پلاستی‌سایزر، و رنگدانه کلروفیل طبیعی (۲ درصد) به عنوان عامل رنگ دهنده، با نسبت‌های وزنی به کار

پایش رشد از طریق اندازه گیری جذب نوری در ۶۸۰ نانومتر انجام شد (تصویر شماره ۲). بیش ترین 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  $7.36 \mu\text{g/mL}$  در فاز نهایی بود. یافته ها 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 اندازه گیری 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 میکروجلبک ها با استفاده از هموسایتومتر در روزهای متوالی انجام و افزایش تعداد سلول ها تا روز پنجم تأیید شد (تصاویر شماره ۳ و ۴) در روز پنجم میانگین سلول ها 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 به ترتیب با

ماتریس HPMC فیلمی یکنواخت و پایدار ایجاد کرده و از نظر چسبندگی و زیبایی ظاهری عملکردی مشابه رنگ های مصنوعی دارد، با این تفاوت که منشأ طبیعی و زیست سازگار آن مزیتی قابل توجه برای کاربرد دارویی محسوب می شود.

### آزمون های کنترل کیفیت قرص ها

پس از روکش دهی، برای هر گروه، ارزیابی ظاهری و یکنواختی رنگ، تعیین تغییر وزن، تست فرسایش، آزمون سختی و اندازه گیری یکنواختی وزن و محتوا در صورت نیاز و همچنین پایداری رنگ در معرض نور و حرارت (مثلاً قرار دادن نمونه ها در ۴۰ درجه سانتی گراد و دو شرایط نورپردازی مشخص به مدت تعیین شده) جهت شبیه سازی شرایط نگهداری آزمایش شد. پارامترهای فوق مطابق روش های استاندارد فارماکوپه و مرور بر روش های ارزیابی روکش گزارش شد (۶، ۱۱، ۱۲).

## یافته ها

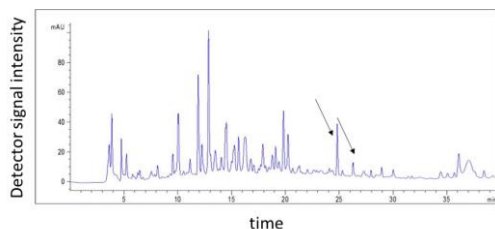
### نتایج کشت و رشد میکروجلبک *C. vulgaris*

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



**تصویر شماره ۱:** نمای مراحل دوم و سوم کشت میکروجلبک *C. vulgaris* 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.

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، دکتور UV-Vis) پیک‌های مشاهده شده در زمان‌های بازداری مشخص به ترتیب مربوط به کلروفیل b و کلروفیل a هستند که شناسایی آن‌ها با مقایسه با استاندارد مرجع انجام شده است

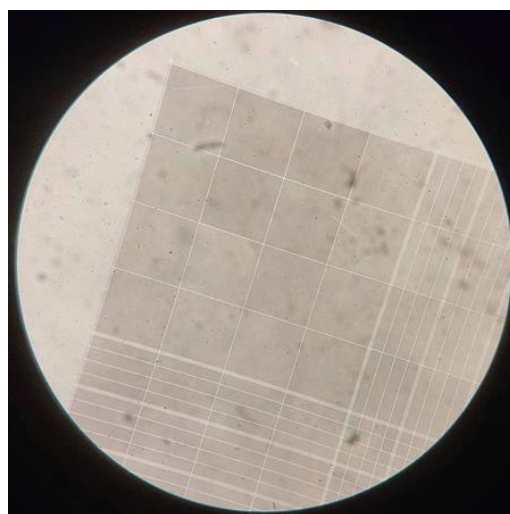


**تصویر شماره ۶:** پودر خشک شده رنگدانه کلروفیل a پس از لیوفیلیزاسیون، با رنگ سبز تیره و ماهیت نامحلول در آب، به دست آمده از بیوماس *C. vulgaris*

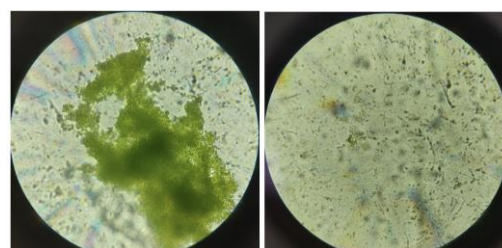
#### آزمون سمیت سلولی (MTT Assay)

نتایج آزمون MTT روی سلول‌های فیروبللاست ۹۲۹ L 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 ۰/۰۱ تا ۰/۰۱ mg/mL به ترتیب ۹۹/۶ و ۹۵/۸ درصد بود، و آزمون t دو نمونه‌ای تفاوت معنی‌داری بین گروه‌ها نشان نداد ( $P > 0/05$ ) این نتایج با داده‌های گزارش شده از سمیت پایین کلروفیل و مشتقات آن در سلول‌های انسانی مطابقت دارد (۱۴، ۱۵).

کلروفیل b و کلروفیل a مطابقت داشتند (تصوی شماره ۵). غلظت نهایی کلروفیل a و b به ترتیب 56.2 mg/mL و 24.4 mg/mL برآورد شد و بازده استخراج کلروفیل نسبت به مقدار تئوریک ۸۷/۸ درصد بود. این بازده نسبت به مقادیر گزارش شده در مطالعات مشابه با روش‌های آلی و مافوق صوتی (۷۰ – ۸۵ 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 ۴:** تصویر میکروسکوپی نوری از سلول‌های *Chlorella vulgaris* در روز سوم کشت مرحله دوم با بزرگنمایی ۴۰×، که مورفولوژی کروی-بیضی 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

گروه تست  $417/9 \pm 5/6$  mg و برای گروه کنترل  $417/8 \pm 5/1$  mg گزارش می گردد (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*

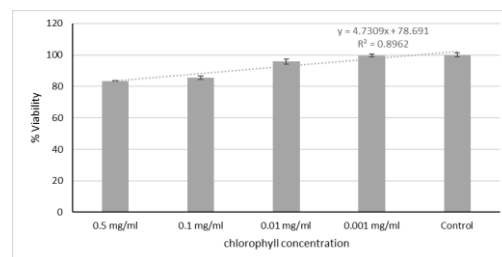
جدول شماره ۱: مقایسه میانگین وزن قرصها قبل و بعد از روکشدهی در گروه تست (حاوی رنگدانه کلروفیل طبیعی) و گروه کنترل (حاوی رنگ مصنوعی)

| گروه               | میانگین وزن قبل از روکش (MG) | میانگین وزن بعد از روکش (MG) | سطح معنی داری |
|--------------------|------------------------------|------------------------------|---------------|
| تست (کلروفیل)      | $409/9 \pm 3/3$              | $17/9 \pm 5/6$               | ۰/۵۲          |
| کنترل (رنگ مصنوعی) | $10/6 \pm 3/0$               | $17/8 \pm 5/1$               | ۰/۵۲          |

دادهها به صورت میانگین  $\pm$  انحراف معیار گزارش شدهاند و اختلاف آماری معنی داری بین دو گروه مشاهده نشد ( $p > 0/05$ ).

#### کیفیت ظاهری روکش

ارزیابی کیفی قرصها از نظر یکنواختی رنگ، درخشندگی و پخش پذیری نشان داد که رنگ کلروفیل توانست پوشش سبز یکنواختی مشابه رنگ مصنوعی ایجاد کند. امتیاز دهی بین دو گروه اختلاف معناداری نداشت ( $P > 0/05$ ). 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).



تصویر شماره ۷: نتایج آزمون سمیت سلولی (MTT assay) رنگدانه کلروفیل طبیعی استخراج شده از *C. vulgaris* بر سلولهای فیروپلاست L 929 در غلظت های مختلف، دادهها به صورت درصد زندهمانی سلولی نسبت به کنترل گزارش شدهاند (میانگین  $\pm$  انحراف معیار).

بنابراین غلظت  $0/01 \text{ mg/mL}$  به عنوان سطح ایمن و مناسب برای استفاده در فرمولاسیون روکش قرص انتخاب شد. نتایج فوق تأیید می کند که رنگدانههای میکروجلبکی در محدودههای کاربردی دارویی فاقد سمیت سلولی هستند و می توانند جایگزین رنگهای سنتتیک شوند (۱۴، ۱۶).

#### آزمونهای میکروبی و کنترل کیفیت محصول

آزمایشهای میکروبی نشان داد هیچ گونه 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* به عنوان 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 معنی داری بین دو گروه وجود ندارد ( $P = 0/52$ ) میانگین وزن قرصها پس از روکش برای

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

| قرص‌های<br>گروه کنترل | امتیاز     | قرص‌های<br>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 | ۶/۳۰۶      |
| گروه تست   | ۶/۶/۲۵     |

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 HPMC و کلروفیل از نظر مقاومت مکانیکی و چسبندگی با فیلم‌های حاوی رنگ مصنوعی قابل مقایسه هستند. پایداری مکانیکی مطلوب و رنگ یکنواخت فیلم، کلروفیل را به عنوان 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 میکرو جلبک‌های سبز مانند *Spirulina platensis* و *Scenedesmus obliquus* 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 میکرو جلبکی از جمله کلروفیل‌ها و کاروتنوئیدها خواص زیست‌سازگاری مطلوب و فعالیت‌های فواید بخشی (آنتی اکسیدانی، ضد التهابی) دارند که ریسک سیستمیک آن‌ها را در سطوح کاربردی کاهش می‌دهد و آن‌ها را برای کاربردهای غذایی و دارویی جذاب می‌سازد (۲). از منظر ایمنی مقایسه‌ای، رنگ‌های آزو به دلیل 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 «ایمن تر بودن نسبی کلروفیل» فراهم می‌آورد؛ اما باید

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، حل پذیری پایین در فاز آبی و حساسیت به نور، حرارت و pH که می تواند منجر به تغییرات رنگ و از دست رفتن کیفیت ظاهری شود، می باشد. راه حل های فرمولاسیون که در این مطالعه و در منابع بین المللی موفق نشان داده شده اند شامل استفاده از کلروفیلین های آبدوست، کمک حلال های آلی کنترل شده (مثلاً ایزوپروپیل الکل در مقادیر کم) و کپسوله سازی یا ادغام در حامل های پلیمری (مثل ماتریس های HPMC یا نانوامولسیون ها) هستند که هم پخش پذیری را افزایش می دهند و هم پایداری را بهبود می بخشند. مطالعات نشان داده اند که تکنیک های کپسوله سازی (اسپری دراینگ، میکرو کپسوله سازی با پلیمرها یا کوآکروسیشن) می توانند پایداری کلروفیل را به طور معنی داری ارتقاء دهند و از اکسیداسیون یا فوتودگرا داسیون جلوگیری کنند (۲۵).

در بخش بهره وری و مقیاس پذیری، بازده استخراج بالا (تقریباً ۸۷/۸ درصد) که در این پژوهش به دست آمد، نشان دهنده کارآیی روش انتخابی استخراج (حلالی با سونیکاسیون و کروماتوگرافی) است و با مطالعات به روز در زمینه استخراج برون داد بالا از *Chlorella* همخوانی دارد. با این حال، مقیاس پذیری اقتصادی نیازمند بهینه سازی های مهندسی فرایند است (در زمینه کاهش مصرف حلال، بازیابی حلال، استفاده از استخراج های سبز و جریان پیوسته) تا هزینه های سرمایه ای 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 آزمون های *in vitro* بی خطر نشان دهد، رفتار

آن پس از فرمولاسیون (تعامل با پلیمرها، واکنش های بالقوه اکسیداتیو در شرایط فرآوری یا نگهداری، تشکیل محصولات جانبی) ممکن است پروفایل ایمنی را تغییر دهد. بنابراین، علاوه بر آزمون های پایه سلولی و میکروبی، مطالعات پایداری شیمیایی و آزمایش های متابولیت شناسی محصولات دارویی نهایی ضروری است (۲۷).

هم چنین یافته های فرمولاسیون تهیه شده مانند یکنواختی رنگ، عدم افزایش قابل توجه وزن و عملکرد مکانیکی فیلم مشابه رنگ مصنوعی، نشان می دهد که با طراحی دقیق فرمول (انتخاب HPMC مناسب، نسبت پلاستی سایزر، استفاده از  $TiO_2$  به عنوان اپاسایفایر جهت افزایش پوشش) می توان محدودیت های فیزیکوشیمیایی کلروفیل را از لحاظ صنعتی مدیریت نمود. این نتایج با مطالعات توسعه روکش های مبتنی بر رنگ های طبیعی همخوانی دارد که نشان داده اند کنترل ویسکوزیته و نرخ اسپری و استفاده از حامل های مناسب، تعیین کننده موفقیت روکش دهی است (۲۸).

علاوه بر نتایج حاصل در این مطالعه، شواهد گسترده در ادبیات علمی نشان می دهد که پیگمان های میکروجلبکی به ویژه کلروفیل در قیاس با رنگ های طبیعی ستی از منابع گیاهی، نه تنها بازده بالاتری از نظر تولید و تجمع ارائه می دهند، بلکه از نظر پتانسیل بیولوژیکی و کاربرد صنعتی نیز در حال تبدیل شدن به گزینه ای برتر هستند. بررسی های اخیر نشان داده اند که پتانسیل تولید پیگمان ها در میکروجلبک ها به سبب سیستم های فتوسنتزی کارآمد و رشد سریع، می تواند 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 روش های استخراج و تجزیه پیگمان ها را مورد بررسی قرار داده اند که نشان می دهد تکنیک های نوین مانند استخراج با سیستم های فاز دو آبی و استخراج با کمک امواج فراصوت می توانند بازده و خلوص کلروفیل را به طور

معنی داری افزایش دهند، که این موضوع همسو با یافته‌های مطالعه حاضر در بهینه‌سازی شرایط جداسازی کروماتوگرافی است (۳۰، ۱۳). 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، می‌باشد. مروری جامع بر بازار و امکان‌سنجی 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 میکروجلبیک *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 می‌باشد. 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 نه تنها 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

- 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.
- 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.
- 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.
- Indrasti D, Andarwulan N, Purnomo EH, Wulandari NU. Stability of chlorophyll as a natural colorant: a review of suji (*Dracaena*

- 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-Kurdzial 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.

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.