المجلة العربية للبحث العلمي
Arabian Journal of Scientific Research

https://doi.org/10.5339/ajsr.2021.2

المجلة العربية للبحث العلمي، 2021، 1 من 7

ورقة بحثية

صبغة الأنثوسيانين الطبيعية تضاهي الصبغات الكيميائية

السيد طاهر السيد حسن عقيل[1]، نجوى إبراهيم البرهاوي[2]

[1] قسم الثقافة والعلوم والإعلام بالرابطة العلمية العالمية للأنساب الهاشمية، مكة المكرمة، المملكة العربية السعودية
[2] كلية التربية للعلوم الصرفة، جامعة الموصل، العراق

[1] tahiraqeil@yahoo.com, [2] Najwa_ibrahim@yahoo.com

الملخص

تستخدم هذه الدراسة الماء المقطر لاستخلاص صبغة الأنثوسيانين من بذور الرمان وأوراق اللهانة البنفسجية، وذلك أن الماء ليس له أي تأثير سُمّي، ويتبخر عند درجات الحرارة المنخفضة من دون التأثير في التركيب الكيمياوي للصبغة المستخلصة. وتبين الدراسة أن الصبغة الحمراء المستخلصة من الرمان كانت ذات وسط حامضي (pH= 3.0)، بينما كانت الصبغة البنفسجية المستخلصة من اللهانة ذات وسط حامضي خفيف (pH=6.0)، وبلغت تراكيز الصبغة في عصير كلا النباتين بعد إسقاط القيمة الامتصاصية لكل منها على منحنى المحاليل القياسية 130 و503 ملغم/ 100 مل من عصير كل نبات، على التعاقب، ونجحت هذه الصبغة، بلونيها الأحمر والبنفسجي، في صبغ مسحات البكتيريا والمقاطع النسيجية الحيوانية والنباتية، وباستخدام مثبّتي اليود وكبريتات النحاس، على التعاقب، وعلى نحو يضاهي الصبغات الكيمياوية المتعارف عليها. كما كان لهذه الصبغة تأثير فعال في صبغ الأقمشة القطنية والصوفية على نحو جيد باستخدام عصير الليمون وصودا الخبز كمثبّت.

الكلمات المفتاحية: الأنثوسيانين، الصبغات الطبيعية والكيميائية، بذور الرمان، أوراق اللهانة.

Title

Natural anthocyanin dye is comparable to chemical dyes

Alsayid Tahir Aqeil[1], Najwa I. AL-Barhawi[2]

[1] Department of Science, Culture and Media, World Scientific Association Hashimi Lineage, Makkah, Saudi Arabia.
[2] College of Education for Pure Sciences, Mosul University, Mosul, Iraq

Abstract

In this study we used distilled water to extract pigment anthocyanin from seeds of the pomegranate and violet cabbage leaves because the water does not have any toxic effect, their evaporates happened at low temperatures, and without influence on the chemical composition of the extracted dye. It was found that the red dye extracted from the pomegranate had an acidic medium (pH 3.0), while the violet dye extracted from the cabbage leaves had a light acid medium (pH 6). The amount of dye in the juice of both plants after dropping the absorbance value of each on the curve of standard solutions was 310 and 50 0mg/ 100 ml of juice from each plant, respectively. This dye, with its red and violet colors, succeeded in dyeing bacterial smears, animal, and plant tissue sections, with iodine and copper sulfate fixers respectively, and in a way similar compared to conventional chemical dyes. It was also an effective dye in the dyed cotton and wool fabrics well with lemon juice and baking soda as add fixative.

Keywords: Anthocyanin, natural and chemical dyes, pomegranate seeds, cabbage leaves.

Received 22 April 2020; accepted: 24 November 2020; published 30 April 2021.

© 2021 The Author(s), licensee HBKU Press. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Comments Attribution License CC BY 4.0 (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Cite this as: Aqeil AT & Al-Barhawi NI. Natural anthocyanin dye is comparable to chemical dyes. Arabian Journal of Scientific Research 2021:1.2.
https://doi.org/10.5339/ajsr.2021.2

1- المقدمة

توجد الصبغات الطبيعية في أغلب أجزاء النباتات الراقية، مثل السيقان والجذور والأوراق والثمار والأزهار، ومنها صبغة الأنثوسيانين (Anthocyanin) المسؤولة عن إعطاء اللون الأحمر والبنفسجي والأزرق والبرتقالي للعديد من الثمار والخضراوات والحبوب والأزهار المستخلصة منها.[1] ونظرًا إلى خاصية هذه الصبغة على تغيير لونها بسبب اختلاف الأس الهيدروجيني (pH) لكل منها، فلونها الأحمر والبنفسجي والأزرق يظهر بوضوح في الأوساط الحامضية (pH<6) والحامضية الضعيفة (6<pH<7) والقاعدية (pH>7)، على التعاقب،[2] لذلك فقد تم استخدام هذه الصبغة دليلًا (Indicator) للكشف عن الأس الهيدروجيني للعديد من المواد الكيميائية.[3] ومن خصائص هذه الصبغة أنها عديمة الرائحة (Odorless) وعديمة الطعم (Flavorless)،[4] وغير سامة (Non-toxic)،[5] كما أنها ذات فاعلية مضادة للأكسدة (Antioxidant) ومضادة للتسرطن (Anti-carcinogenic) ومضادة للالتهابات (Anti-inflammatory)،[6,7,8] وهي من الناحية الكيميائية عبارة عن مركبات فلافونويدية (Flavonoid compounds)، بشكل جزيئات قطبية ذات مجاميع (Hydroxyl) و(Carboxyl) و(Methoxyl) و(Glycoxyl) مرتبطة بحلقات عطرية (Aromatic rings)، لها القابلية على الذوبان في الماء بدرجة أفضل من ذوبانها في المحاليل غير القطبية؛ لذلك امتازت بسهولة استخلاصها وفصلها من النباتات المختلفة.[9] أما الصبغات الكيميائية فهي عبارة عن مواد عضوية ملونة تكون في الغالب أملاحًا وتمتلك من الخواص بحيث تستطيع الأنسجة إمساكها بثبات ولا يمكن إزالتها منها حتى عند استخدام مذيبات المادة العضوية نفسها، وذلك لأن جميع الصبغات تكون محتوية على مجموعتين أساسيتين، هما: مجموعة ذرية مرتبطة باللون تدعى حاملات اللون (Chromophores) وتكون عديمة اللون، ومجموعة لها القابلية على ربط المركبات الكيميائية للصبغات مع الأنسجة وتعرف بماسكات اللون (Auxochromes) ووظيفتها تعزيز وتكثيف وتعميق اللون،[10] وقد تبين أن صبغة الأنثوسيانين تمتلك هاتين المجموعتين مما يجعلها تحافظ، وبنجاح، على ثباتية الألوان التي تمتاز بها.[11,12]

كما أن هذه الصبغة تعتبر من أصناف الكيميائيات النباتية، وعادة ما تكون موجودة في السوائل التي تجري حول خلايا النباتات وفيها، ولا سيما في الزهور والفواكه والخضر، كالعنب والبرتقال والشاي والثوم وغيرها من النباتات الأخرى. ومن أكثر المصادر التجارية شيوعًا لهذه الصبغة (E163)، مستخلص ثمرة جلد العنب، والملفوف الأحمر، والتوت، والكرز، والخوخ، وفي الجزر الغامق واللهانة الحمراء والبطاطا البنفسجية.[13,14] وقد تميزت هذه الصبغة في عصير الرمان الغامق بوفرتها قياسًا بمحتواها في النباتات الأخرى.[15]

عادة ما يتم استخلاصها بالماء او بالإيثانول او بالميثانول.[14] وحاليًا هناك عدة طرق لاستخلاصها، من أهمها: استخلاص السوائل الصلبة (Solid Liquid Extraction, SLE)، واستخلاص السوائل فوق الحرجة (Supercritical Fluid Extraction, SFE)، والاستخلاص بمساعدة الموجات فوق الصوتية (Ultrasound Assisted Extraction, UAE)، واستخلاص السائل المضغوط (Pressurized Liquid Extraction, PLE)، والاستخلاص بمساعدة الميكروويف (Microwave Assisted Extraction, MAE).[16]

ونظرًا إلى عدم وجود دراسة بحثية تبين أهمية هذه الصبغة في صبغ مسحات البكتيريا والمقاطع النسيجية، بنوعيها الحيوانية والنباتية، فضلًا عن الأنسجة القطنية والصوفية، لذلك تهدف هذه الدراسة إلى استخدام صبغة الأنثوسيانين بلونيها الأحمر والبنفسجي المستخلصين من عصير الرمان واللهانة، على التعاقب، كصبغة طبيعية بديلة من الصبغات الكيميائية الصَفرانين (Safranin) والبنفسج البلوري (Crystal violet) والأيوسين (Eosin) والهيماتوكسلين (Haematoxylin) وأزرق المثيلين (Methylene blue) والفوكسين الحامضي (Acid fuchsin)، المعروفة بتأثيرها السُّمّي على الإنسان.

2- المواد وطرائق العمل

2-1 النباتات المستخدمة

تم استخدام نباتي الرمان (*Punica granatum*) واللهانة البنفسجية (*Brassica oleracea*) لاستخلاص صبغة الأنثوسيانين منهما.

2-2 البكتيريا المستخدمة

استخدمت البكتيريا الكروية الموجبة والعصوية السالبة لصبغة غرام وهما: (*Staphylococcus aureus*) و(*Pseudomonas eroginosa*)، على الترتيب.

2-3 الأقمشة المستخدمة

استخدم نوعين من الأقمشة هما القطنية و الصوفية.

2-4 الصبغات الكيميائية

تم استخدام صبغة غرام المتكونة من البنفسج البلوري والصّفرانين لصبغ مسحات البكتيريا، وصبغتي الأيوسين والهيماتوكسلين لصبغ مقاطع الأنسجة الحيوانية، أما المقاطع النباتية فقد تم صبغها بصبغتي أزرق المثيلين والفوكسين الحامضي.

2-5 استخلاص صبغة الأنثوسيانين الخام

غُسلت بذور الرمان وأوراق اللهانة بالمحلول الملحي العادي (Normal saline) بتركيز (0.9%)، ثم بماء الحنفية الجاري، وعُصرت ثم رُشحت بأوراق من نوع (Whatman NO.1)، وذلك للتخلص من الأجزاء الصلبة، ثم أُخذ الراشح وطُرد مركزيًا بجهاز (Centerifuge) بسرعة 5000 دورة/ دقيقة ولمدة ربع ساعة، ثم طُرح الراسب وأُخذ الراشح الذي عُقّم بطريقة البسترة،[17] ثم جُفد بجهاز التجفيد الجاف (Lyophilizer) لغرض تركيزه وحفظه في الثلاجة إلى حين استخدامه عند درجة حرارة 4°م.

2-6 قياس الأس الهيدروجيني للمستخلص

تم قياس الأس الهيدروجيني لصبغة الأنثوسيانين المستخلصة من نباتي الرمان واللهانة باستخدام جهاز (pH meter).

2-7 قياس محتوى المستخلص من صبغة الأنثوسيانين

استخدم جهاز مطياف الضوء (UV-vis Spectrophotometer) لقياس امتصاصية الصبغة الحمراء والبنفسجية في كلا المستخلصين عند الطول الموجي 400-700 نانومتر،[18] ثم حُضّر المنحنى القياسي من صبغة أحمر الكونغو (Congo red)،[19] والمنحنى القياسي من صبغة البنفسج البلوري كصبغات قياسية بتركيز 5 و10 و25 و50 ملغم/ لتر، وقيست امتصاصيتهما عند الطول الموجي 525 نانومترًا بالجهاز المذكور، ثم أسقطت على هذا

المنحنى قيم امتصاصية الصبغة في كلا المستخلصين وقُدرت كميتها بوحدة ملغم/ 100 مل من عصير كل نبات.

8-2 صبغ العينات

1-8-2 صبغ مسحات من البكتيريا

تم تحضير مسحة من البكتيريا السالبة والموجبة لصبغة غرام والنامية في وسط المرق المغذي (Nutrient broth) مدة 24ساعة، وذلك بأخذ جزء صغير يطلق عليه (Loopful)، تعادل 0.01 مل، من كل بكتيريا وفرشها على سطح شريحة زجاجية نظيفة، وتُركت بجو المختبر لتجف، ثم تم تثبيتها ولصقها بتمريرها ثلاث مرات على لهب مصباح غازي، ثم صبغت بطريقة غرام (Gram method)[20] المتكونة من الصبغتين المتعاكستين البنفسج البلوري والصّفرانين كصبغة قياسية، وصُبغت مسحات أخرى بصبغة الأنثوسيانين الطبيعية وبلونيها البنفسجي والأحمر، باستخدام كبريتات النحاس كمثبت لصبغة الأنثوسيانين البنفسجية، واليود كمثبت لصبغة الأنثوسيانين الحمراء.

2-8-2 صبغ المقاطع النسيجية

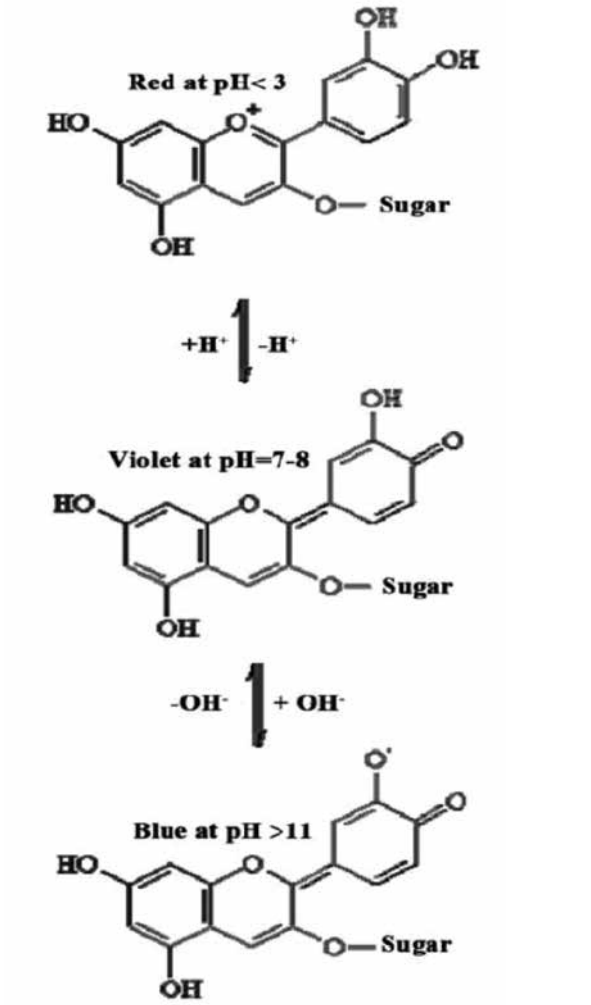
تم صبغ المقاطع النسيجية لكبد الفارة المختبرية والمقاطع النسيجية لساق النبات والمحضرة باستعمال الشمع كوسط تشريب، وطُمرت ثم صُبغت المقاطع الحيوانية بصبغتي الهيماتوكسلين القاعدية والأيوسين الحامضية، وصُبغت المقاطع النباتية بصبغة أزرق المثيلين والفوكسين الحامضي[21] كعينات قياسية، في حين صُبغت مقاطع أخرى بصبغة الأنثوسيانين الطبيعية وبلونيها البنفسجي والأحمر، وذلك بتركها في كل لون مدة 24 ساعة فيها، وباستخدام كبريتات النحاس كمثبت للصبغة الأولى، والأيودين كمثبت للصبغة الثانية.

3-8-2 صبغ الأنسجة القطنية والصوفية

غُسلت الأنسجة القطنية والصوفية بمحلول مكون من 0.5 غم/ لتر كربونات الصوديوم و2 غم/ لتر عديد السوربات 80 (Polysorbate 80)، عند درجة حرارة 50°م، ومدة 25 دقيقة، ثم غسلت بماء الحنفية الجاري، وتُركت لتجف في درجة حرارة المختبر، ثم غُمرت بماء نظيف مدة نصف ساعة،[22,23] ونقلت بعدها إلى حاوية زجاجية تحتوي على صبغة الأنثوسيانين الطبيعية بلونيها البنفسجي والأحمر، كل على حدة، مع إضافة عدة قطرات من صودا الخبز وعصير الليمون للصبغة الأولى والثانية، على التعاقب، كمثبت، وتُركت في كل منها مدة ساعة، ثم غُسلت بماء بارد وتُركت لتجف بدرجة حرارة المختبر.

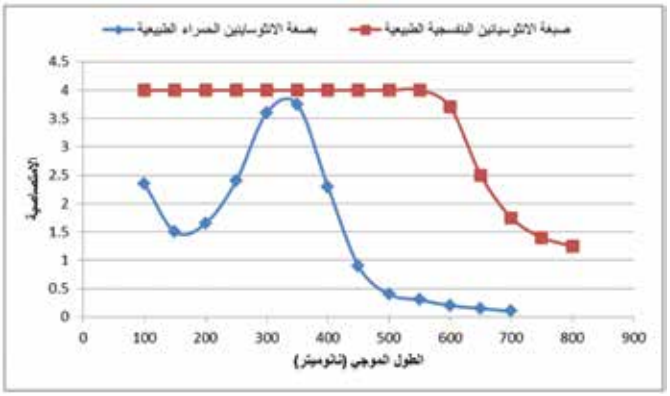
3- النتائج والمناقشة

في هذه الدراسة، استُخلصت صبغة الأنثوسيانين مائيًا من بذور الرمان وأوراق اللهانة البنفسجية وذلك لأن الماء ليس له أي تأثير سُمّيّ، كما يمكن تبخيره عند درجات الحرارة المنخفضة من دون التأثير في التركيب الكيمياوي للصبغة المستخلصة.[24] أظهرت نتائج الدراسة أن الصبغة الحمراء الطبيعية والمستخلصة من بذور نبات الرمان كانت حامضية الوسط، بينما الصبغة البنفسجية المستخلصة من أوراق نبات اللهانة البنفسجية كانت ذات حامضية ضعيفة بدلالة قياس الأس الهيدروجيني لها، الذي بلغ 3.0 و6.2، لكليهما على التعاقب، وهذا مطابق لدراسة،[2] فإن لون صبغة الأنثوسيانين الطبيعية تعتمد على الأس الهيدروجيني لها، فتظهر بلون أحمر عند (pH<3) وبلون بنفسجي عند (pH=7-8)، لذلك يتغير لونها من الأحمر الزاهي إلى الازرق عند زيادة أعداد مجموعة الهيدروكسيل القاعدية (pH>11)، انظر الشكل (1)،[25] ويُعزى ذلك غالبًا إلى تغيير التركيب الجزيئي لها بسبب الطبيعة الأيونية لهذه الصبغة وما تسبّبه من اختلاف فى قيم الأس الهيدروجينى.[26,27]



الشكل 1. التركيب الكيميائي لصبغة الأنثوسيانين في الأوساط الحامضية والمتعادلة والقاعدية.[25]

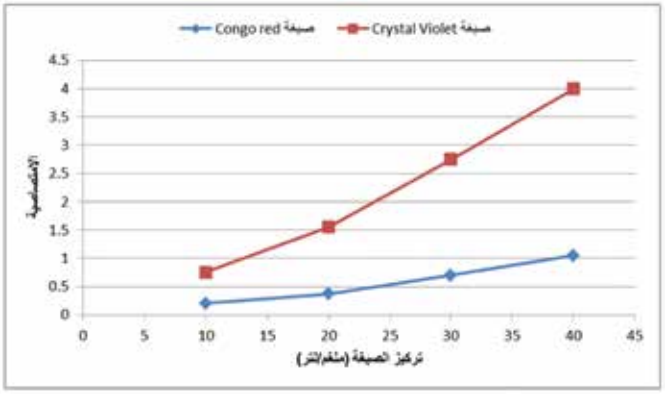
وعند قياس تركيز الصبغة في كل مستخلص بجهاز (UV-vis Spectro-photometer)، تبيّن أن صبغة الأنثوسيانين الحمراء بلغت أقصى امتصاصية لها (3.82) عند الطول الموجي 525 نانومترًا، في حين وصلت امتصاصية صبغة الأنثوسيانين البنفسجية 4.0، وذلك عند مدى واسع من الطول الموجي 216-575 نانومترًا، انظر الشكل (2).



الشكل 2. امتصاصية صبغة الأنثوسيانين الحمراء الطبيعية وصبغة الأنثوسيانين البنفسجية الطبيعية عند الأطوال الموجية المختلفة باستخدام جهاز (UV-Vis Spectrophotometer).

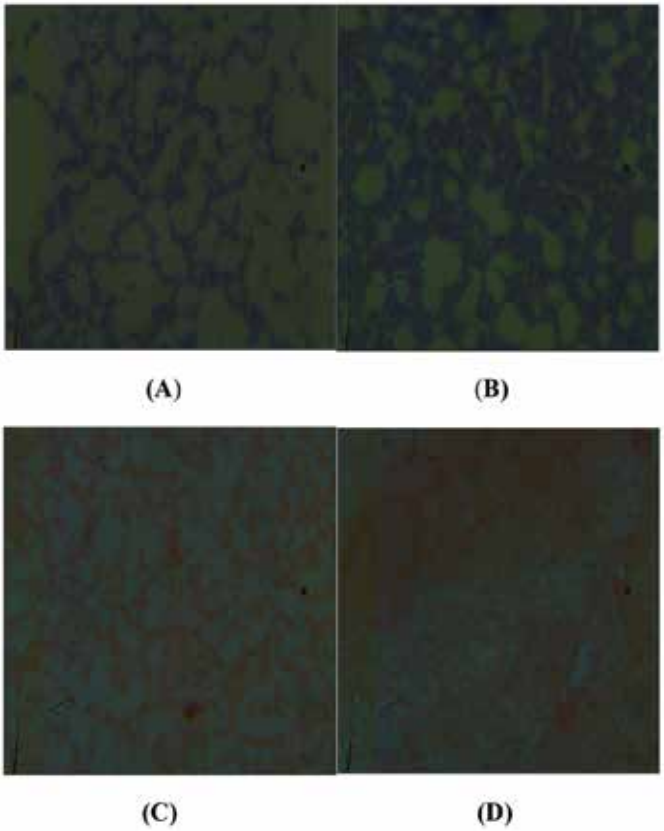
يُعزى هذا الاختلاف في الامتصاصية غالبًا إلى اختلافهما في الأس الهيدروجيني وتأثيره المباشر في ما تعانيه هذه الصبغات من تغييرات عكسية في تركيبها الكيميائي.[9] وقد أشارت بحوث عديدة إلى أن امتصاصية هذه الصبغة تكون على الأغلب عند الطول الموجي 525 نانومترًا،[28,29] والذي ظهر لدينا أثناء قياسه بجهاز المطياف الضوئي كما هو مذكور سابقًا.

وعند استخدام الصبغات الكيميائية كصبغات قياسية وبأوزان معينة وعند الطول الموجي ذاته (525 نانومترًا)، انظر الشكل (3)، بلغت كمية الصبغة الحمراء والبنفسجية 130 و035 ملغم/ 100 مل (لأنه تم تخفيف الصبغة 10 مرات) من عصير كل نبات على التعاقب، بينما بلغت هذه الصبغة المستخلصة من الرمان في دراسات أخرى 364 ملغم/ 100 غم،[15] وتراوحت ما بين 28-447 ملغم/ لتر،[30] وفي أوراق اللهانة البنفسجية غامقة اللون بلغت 134 ملغم/100 غم،[31] علمًا أن هذا التباين يرجع إلى الاختلاف في شدة اللون الذي كلما اشتد يعني زيادة في كمية الأنثوسيانين،[15,31] كما وجدت هذه الصبغة بمحتوى عالٍ (52 ملغم/ 100 مل) في عصير (Crowberry).[32]

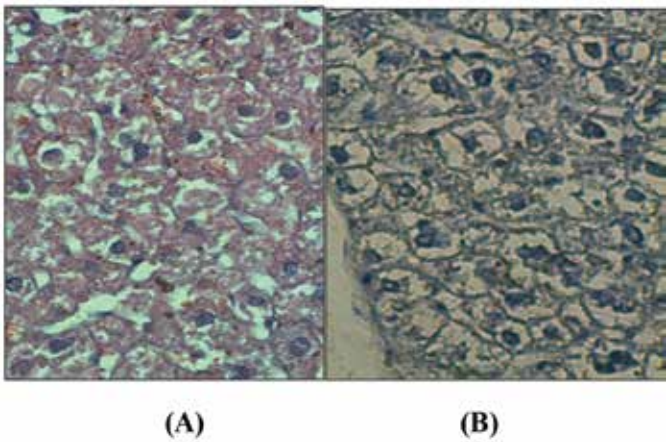


الشكل 3. المنحنى القياسي لأربعة تراكيز مختلفة من صبغتي (Congo Red) و(Crystal Violet) عند الطول الموجي 525 نانومترًا.

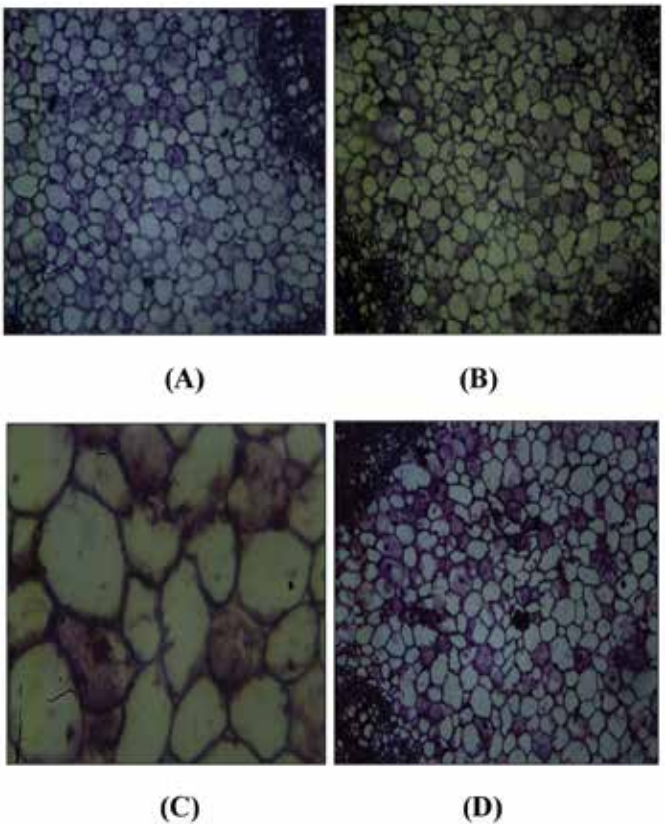
وبعد معاملة مسحات البكتيريا (الشكل 4) والمقاطع النسيجية الحيوانية (الشكل 5) والنباتية (الشكل 6) بالصبغات الكيميائية، تبيّن أن جميع أجزاء الخلايا قابلة للاصطباغ بمعظم الصبغات، لأن الأساس في عملية تصبيغ الأنسجة، سواء كانت حية أم ميتة، يتضمن غمر الأنسجة في محاليل الصبغات وتركها فترة زمنية يتم خلالها اتحاد بعض مكونات الأنسجة مع أيونات الصبغات منتجةً ألوانًا معينة، ويُعزى سبب ذلك إلى تعادل الشحنات المحمولة على الصبغات مع شحنات الجزيئات المصبوغة، لذلك فإن صبغة الهيماتوكسلين القاعدية تميل إلى الارتباط بجزيئات الأنسجة التي تحتفظ بشحنات سالبة، مثل جزيئات الحامض النووي. وعلى العكس من ذلك، فإن معظم جزيئات البروتين في السايتوبلازم تحتفظ بشحنات موجبة، لذلك فإن صبغة الأيوسين الحامضية تميل إلى الارتباط بجزيئات البروتين،[10] لذلك ظهرت النواة بلون غامق، والسايتوبلازم بلون وردي، بينما فشلت صبغة الأنثوسيانين الطبيعية بلونيها الأحمر والبنفسجي بعملية التصبيغ إلا بعد استخدام المرسخ (Mordant)، وقد يعود ذلك إلى أن قسمًا من الصبغات لا يمكنه الاتحاد بثبات وبصورة مباشرة مع الأنسجة أو الخلايا إلا بوجود بعض المواد الوسطية، وعادة تكون أملاحًا معدنية مثل (Cu وFe وSn و K وMg)،[33,34] لأنها تعزز التفاعل ما بين النسيج والصبغة بواسطة ارتباطها بمجموعة الهيدروكسيل الحرة عند الحلقة (B) (الشكل 7)،[35] لتعمل على زيادة اتحاد ألوان الصبغات بالأنسجة، ويطلق على هذه المواد «المرسخات»، والتي تتحد، من جهة، مع أجزاء الأنسجة أو الخلايا، ومن جهة أخرى، فإن ألوان الصبغات تلتصق على سطوح هذه المرسخات، وبذلك يكون موقع المرسخ وسطًا بين لون الصبغة والأنسجة المصبوغة.[36,37]



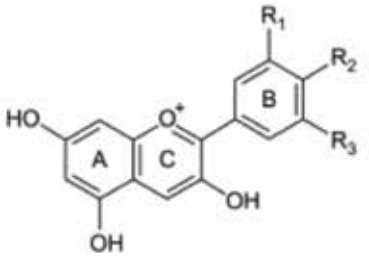
الشكل 4. صبغ البكتيريا بصبغتي الأنثوسيانين وصبغة غرام (100x)
(A): بكتيريا (*Staphylococcus aureus*) موجبة لصبغة غرام؛ **(B):** بكتيريا (*Staphylococcus aureus*) أخذت لون صبغة الأنثوسيانين البنفسجية؛ **(C):** بكتيريا (*Pseudomonas eroginosa*) سالبة لصبغة غرام؛ **(D):** بكتيريا (*Pseudomonas eroginosa*) أخذت صبغة الأنثوسيانين الحمراء.



الشكل 5. صبغ مقاطع نسيج كبد الفارة المختبرية.
(A): بصبغة الهيماتوكسلين والأيوسين (40x)؛ **(B):** بصبغة الأنثوسيانين الحمراء والبنفسجية (40x)



الشكل 6. صبغ مقاطع ساق النبات.
(A): بصبغة أزرق المثيلين (25x)؛ **(B):** بصبغة الأنثوسيانين البنفسجية (25x)؛ **(C):** بصبغة الفوكسين الحامضية (40x)؛ **(D):** بصبغة الأنثوسيانين الحمراء (25x)



Basic chemical structure of anthocyanins

الشكل 7. موقع الحلقة (B) في تركيب صبغة الأنثوسيانين.[35]

من ناحية اخرى لوحظ ان هذه الصبغة بلونيها الاحمر والبنفسجي نجحت في النفاذ الى داخل الانسجة القطنية والصوفية (الشكل 8)، ولم تثبت الصبغة بعد غسل هذه الانسجة بالماء الا عند اضافة بضع قطرات من عصير الليمون او الصودا كمرسخ الى الصبغة، ويرجع ذلك الى تكوين معقد ما بين الصبغة والمرسخ والذي وفر الحماية لماسك اللون من تحطيمه بعمليات التحلل المختلفة،[38] وبعبارة أخرى فإن هذا المعقد يمنع ذوبان الصبغة عند غسل النسيج المصبوغ بها بالماء ويعمل على ثبات اللون وترسيخه داخل النسيج.[23,39]

الشكل 8. صبغ الأقمشة الصوفية* والقطنية** بصبغتي الأنثوسيانين الحمراء والبنفسجية.
* المستوية أفقيًا: من القماش الصوفي؛ ** المستوية عموديًا: من القماش القطني.

4- الاستنتاجات

تبين لنا سهولة استخلاص هذه الصبغة من النباتات وبتراكيز جيدة، فضلًا عن قلة تكلفة الاستخلاص، ووفرة المواد المثبتة للصبغة وبأسعار زهيدة، وأخيرًا فإن نجاح استخدامها لصبغ المقاطع النسيجية الحيوانية والنباتية ومسحات البكتيريا والأقمشة الصوفية والقطنية، سيشجع مستقبلًا لاستخدامها على المستويين التعليمي للطلبة والتجاري بدلًا من الأصباغ الصناعية الضارة بالصحة العامة.

5- التوصيات

- عزل الصبغة المستخلصة بطريقة قمع الفصل وتنقيتها بتقنية كروماتوغرافيا الطبقة الرقيقة (Thin Layer Chromatography, TLC) وكروماتوغرافيا السائل عالي الأداء (High-performance liquid chro-matography, HPLC)، وباستخدام الصبغات الكيمياوية كمحاليل قياسية.
- التأكد من هوية الصبغة المستخلصة بطريقة تحديد درجة انصهارها ودرجة غليانها، فضلًا عن تحديد تركيبها بجهاز (IR) وتجفيدها بجهاز التجفيد الجاف (Lyophilizer) لاستخدامها كمسحوق بتركيز مدروس.
- تطبيقها على بعض الحالات المرضية باعتبارها موادً مؤكسدة.

المراجع

1. Jackman RL, Smith JL. Anthocyanins and betalains. In: Hendry GAF, Houghton JD, editors. Natural food colorants. 2nd ed. London: Blackie; 1996. pp. 244–309.
2. Vukosavljević P, Bukvić B, Janković M, Mašović S. Change of anthocyanins content during raspberry extraction. Journal of Agricultural Sciences. 2003;48(1):85–102.
3. Chigurupati N, Saiki L, Gayser C, Dash AK. Evaluation of red cabbage dye as a potential natural color for pharmaceutical use. International Journal of Pharmaceutics. 2002;241(2):293–299.
4. Lebling RW, Pepperdine D. Natural remedies of Arabia. Saudi Aramco World. 2006;57(5):12–21.
5. Zhou H, Wu L, Gao Y, Ma T. Dye-sensitized solar cells using 20 natural dyes as sensitizers. Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry. 2011;219(2–3):188–194.
6. Clifford MN. Anthocyanins – Nature, occurrence and dietary burden. Journal of the Science of Food and Agriculture. 2000;80(7):1063–1072.
7. Kong JM, Chia LS, Goh NK, Chia TF, Brouillard R. Analysis and biological activities of anthocyanins. Phytochemistry. 2003;64(5):923–933.
8. Rossi A, Serraino I, Dugo P, Di Paola R, Mondello L, Genovese T, et al. Protective effects of anthocyanins from blackberry in a rat model of acute lung inflammation. Free Radical Research. 2003;37(8):891–900.
9. Harbome JB, Grayer RJ. The anthocyanins. In: Harborne JB, editor. The flavonoids. London: Chapman and Hall; 1988. pp. 1–20.
10. Bancroft JD, Gamble M. Theory and practice of histological techniques. New York: Churchill Livingstone;4thEd.,2007. pp.744.
11. Dangles O, Saito N, Brouillard R. Kinetic and thermodynamic control of flavylium hydration in the pelargonidin-cinnamic acid complexation. Origin of the extraordinary flower color diversity of Pharbitis nil. Journal of the American Chemical Society. 1993;115(8):3125–3132.
12. Kallio H, Pallasaho S, Kärppä J, Linko RR. Comparison of the half-lives of the anthocyanins in the juice of crowberry, Empetrum nigrum. Journal of Food Science. 1986;51(2):408–410.
13. محمد، سعيد حميد. التأثيرات الحيوية للأنثوسيانيات المستخلصة من ثمرة البرتقال في بعض أنواع البكتيريا. مجلة ابن الهيثم للعلوم الصرفة والتطبيقية. 2014؛27(3):110-117.
14. المضافات الغذائية: صبغة الأنثوسيانين. مجلة اخبار الخليج (البحرين، 1437هـ)، العدد 13934.
15. Zhu F, Yuan Z, Zhao X, Yin Y, Feng L. Composition and contents of anthocyanins in different pomegranate cultivars. Acta Horticulturae. 2015;1089:35–41.
16. Silva S, Costa EM, Calhau C, Morais RM, Pintado ME. Anthocyanin extraction from plant tissues: A review. Critical Reviews in Food Science and Nutrition. 2017;57(14):3072–3083.
17. Liu X, Xiao G, Chen W, Xu Y, Wu J. Quantification and purification of mulberry anthocyanins with macroporous resins. Journal of Biomedicine and Biotechnology. 2004;2004(5):326–331.
18. Lee J, Rennaker C, Wrolstad RE. Correlation of two anthocyanin quantification methods: HPLC and spectrophotometric methods. Food Chemistry. 2008;110(3):782–786.
19. Sondheimer E, Kertesz ZI. The anthocyanin of strawberries. Journal of the American Chemical Society. 1948;70(10):3476–3479.
20. Black J.G. Microbiology: principles and applications. Englewood Cliffs, NJ: Prentice Hall; 1993.
21. Al-Hajj HA. Light microscopic techniques: Theory and practice. Amman, Jordan: Jordan Book Center; 1998.
22. Salam MA, Salam A. Study on color fastness properties onto bleached sulfonated jute–cotton blended fabrics with basic dyes. Journal of Textile and Apparel, Technology and Management. 2005;4(4):1–6.
23. Adeel S, Ali S, Bhatti, IA, Zsila F. Dyeing of cotton fabric using pomegranate (Punica granatum) aqueous extract. Asian Journal of Chemistry. 2009;21(5):3493–3499.
24. Ncube NS, Afolayan AJ, Okoh AI. Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: Current methods and future trends. African Journal of Biotechnology. 2008;7(12):1797–1806.
25. Mortazavi SM, Kamali Moghaddam M, Safi S, Salehi R. Saffron petals, a by-product for dyeing of wool fibers. Progress in Color, Colorants and Coatings. 2012;5(2):75–84.
26. Brouillard R. Chemical structure of anthocyanins. In: Markakis P, editor. Anthocyanins as food colors. New York: Academic Press; 1982. pp. 1–40.
27. von Elbe JH, Schwartz SJ. Colorants. In: Fennema OR, editor. Food chemistry. 3rd ed. New York: Marcel Dekker; 1996. pp. 651–722.
28. Lee J, Durst RW, Wrolstad RE. Determination of total monomeric anthocyanin pigment content of fruit juices, beverages, natural colorants, and wines by the pH differential method: Collaborative study. Journal of the AOAC International. 2005;88(5):1269–1278.
29. Giusti MM, Wrolstad RE. Characterization and measurement of anthocyanins by UV–visible spectroscopy. In: Wrolstad RE, editor. Handbook of analytical food chemistry. New York: John Wiley; 2005. pp. 19–31.
30. Türkyılmaz M. Anthocyanin and organic acid profiles of pomegranate (Punica granatum L.) juices from registered varieties in Turkey. International Journal of Food Science and Technology. 2013;48(10):2086–2095.
31. Al-Abdulla By, Oleiwi SD. Estimation of some phytochemicals in extract of eggplant peels and cabbage leaves and using of pigment of them in drinks industry. Mesopotamia Journal of Agriculture. 2019;47(2):128–138.
32. Rein M. Copigmentation reactions and color stability of berry anthocyanins. University of Helsinki, Department of Applied Chemistry and Microbiology, Food Chemistry Division, PhD Thesis; 2005.

33. Starr MS, Francis FJ. Effect of metallic ions on color and pigment content of cranberry juice cocktail. Journal of Food Science. 1973;38(6):1043–1046.
34. Markakis P. Stability of anthocyanins in foods. In: Markakis P, editor. Anthocyanins as food colors. New York: Academic Press; 1982. p. 163–178.
35. Valavanidis A, Vlachogianni T. Plant polyphenols: Recent advances in epidemiological research and other studies on cancer prevention. Studies in Natural Products Chemistry. 2013;39:269–295.
36. Osawa Y. Copigmentation of anthocyanins. In: Markakis P, editor. Anthocyanins as food colors. New York: Academic Press; 1982. pp. 41–65.
37. Kulkarni SS, Gokhale AV, Bodake UM, Pathade GR. Cotton dyeing with natural dye extracted from pomegranate (Punica granatum) peel. Universal Journal of Environmental Research and Technology. 2011;1(2):135–139.
38. Goodarzian H, Ekrami E. Wool dyeing with extracted dye from pomegranate (Punica granatum L.) peel. World Applied Sciences Journal. 2010;8(11):1387–1389.
39 Jothi D. Extraction of natural dyes from African marigold flower (Tagates ereectal) for textile coloration. AUTEX Research Journal. 2008;8(2):49–53.