

(Original Research Paper)

## Preparation of Propolis Hydroalcoholic Extract Nanoemulsion by Freeze Drying Technique and Evaluation of Its Physicochemical Properties as a Food Preservative

Farhan Ahadi<sup>1</sup>, Afshin Javadi<sup>1\*</sup>, Hoda Jafarizadeh-Malmiri<sup>3</sup>, Navideh Anarjan<sup>4</sup>, Hamid Mirzaie<sup>5</sup>

Ph.D Graduated of Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

Associate Professor, Faculty of Chemical Engineering, Sahand University of Technology, Tabriz, Iran.

Assistant Professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

Associate professor, Department of Food Hygiene, Faculty of Veterinary, Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran.

Received:29/11/2022

Accepted:10/01/2023

DOI: [10.30495/jfst.2023.1973945.1836](https://doi.org/10.30495/jfst.2023.1973945.1836)

### Abstract

Propolis as a by-product of bee activity has been known for its unique antioxidant properties and antimicrobial activity against broad range of microorganisms. In the present study, hydroalcoholic extract of propolis was prepared (the ratio of ethanol to the water was 80:20). After removing the solvent from the extract using a vacuum rotary evaporator, the dried powder of propolis was produced using a freeze dryer at -70 °C after 40 h. Also, the nanoemulsion of propolis was synthesized using the powder. GC-MS analyses of samples showed numerous phenolic and flavonoid compounds in the produced powder. Total phenolic and flavonoid contents, and antioxidant activity of the produced nanoemulsion were 86.93, 34.21 (mg/ g gallic acid), and 97.68 %, respectively. The particle size, polydispersity index and zeta potential in the nanoemulsion were 86 nm, 0.299 and -23.34 mV, respectively. The results of this study showed that the hydroalcoholic extract and powder of propolis prepared by the freeze drying method had high phenolic and flavonoid content and antioxidant properties. However, these properties in the powder were higher than that was detected for the hydroalcoholic extract. According to the findings of this study, using a freeze dryer, it is possible to produce the powder of propolis hydroalcoholic extract with spherical and nano-sized particles, which can easily be applicable as a preservative in the food industry.

**Keywords:** Freeze Dryer, Hydroalcoholic Extract, Physicochemical Properties, Propolis.

---

\*Corresponding Author: [Javadi@iaut.ac.ir](mailto:Javadi@iaut.ac.ir)

(مقاله پژوهشی)

## تولید نانوامولسیون عصاره هیدروالکلی بره موم به روش خشک کردن انجمادی و ارزیابی خواص فیزیکی - شیمیایی آن به عنوان نگهدارنده مواد غذایی

فرحان احدی<sup>۱</sup>، افشین جوادی<sup>۲\*</sup>، هدا جعفری زاده - مالمیری<sup>۳</sup>، نویده انرجان<sup>۴</sup>، حمید میرزایی<sup>۵</sup>

۱- دانش آموخته دکتری، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۲- استاد، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۳- دانشیار، گروه مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی سهند، تبریز، ایران.

۴- استادیار، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

۵- دانشیار، گروه بهداشت مواد غذایی، دانشکده دامپزشکی، واحد تبریز، دانشگاه آزاد اسلامی، تبریز، ایران.

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۰/۲۰

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۹/۰۸

DOI: [10.30495/jfst.2023.1973945.1836](https://doi.org/10.30495/jfst.2023.1973945.1836)

### چکیده

بره موم به عنوان فرآورده جانبی حاصل از فعالیت زنبور عسل به عنوان یک محصول با ویژگی های بیولوژیکی برجسته مانند خواص آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی در برابر طیف وسیعی از میکروب ها شناخته شده است. در تحقیق حاضر، ابتدا عصاره هیدروالکلی (نسبت الکل به آب ۸۰ به ۲۰) بره موم تهیه گردید و با استفاده از تبخیرکننده دوار تحت خلاء، حلال جدا شد. سپس با استفاده از خشک کن انجمادی در دمای  $70^{\circ}\text{C}$  - و به مدت ۴۰ ساعت، به صورت پودر در آورده شد و نهایتاً از پودر حاصله، نانوامولسیون تهیه گردید. نتایج کروماتوگرافی گازی نشان داد که پودر حاصله دارای محتوای فنولی، فلاونوئیدی و خاصیت آنتی اکسیدانی به ترتیب ۸۶/۹۳ و ۳۴/۲۱ (میلی گرم بر گرم بر حسب اسید گالیک)، و ۹۷/۶۸ درصد بود. اندازه ذرات، شاخص پراکندگی و پتانسیل زتا در نانوامولسیون تولید شده به ترتیب ۸۶ نانومتر، ۰/۲۹۹ و ۲۳/۳۴ - میلی ولت بود. نتایج این مطالعه نشان داد که عصاره هیدروالکلی و پودر تولید شده بره موم توسط دستگاه خشک کن انجمادی دارای محتوای فنولی و فلاونوئیدی، و خاصیت آنتی اکسیدانی بالایی می باشند. هر چند این خواص در داخل پودر، بالاتر از خواص در عصاره هیدروالکلی بره موم بود. از این رو استفاده از پودر این عصاره به عنوان یک ماده نگهدارنده در صنایع غذایی پیشنهاد می شود. با توجه به یافته های این تحقیق، با استفاده از دستگاه خشک کن انجمادی، قابلیت تولید پودر عصاره هیدروالکلی بره موم با ذرات کروی شکل و در ابعاد نانو وجود دارد که می توان از محصولات به دست آمده به عنوان نگهدارنده در صنایع مواد غذایی به راحتی استفاده نمود.

**واژه های کلیدی:** بره موم، خشک کن انجمادی، خواص فیزیکی - شیمیایی، عصاره هیدروالکلی.

## ۱- مقدمه

بره موم یک محصول طبیعی مشتق شده از رزین (صمغ) گیاهان مختلف بوده که زنبورهای عسل پس از جمع آوری، به آن ترشحاتی اضافه نموده و پس از عمل آوری نهایی، برای مقاصد مختلفی از جمله پوشش دیواره داخلی کندو، پوشاندن سطح بدن حیوانات نفوذی به کندو و محافظت از خود استفاده میکنند (۱۵). بیش از ۳۰۰ ترکیب مختلف نظیر پلی فنولها (فلاونوئیدها و اسیدهای فنول)، استرها، مونوترپن ها، اسیدهای آمینه، استروئیدها، اسید کافئیک، روغن های ضروری و ترکیبات غیر آلی در بره موم یافت شده است (۵). بره موم از زمان های بسیار دور به عنوان یک داروی سنتی در درمان بسیاری از بیماری ها استفاده می شد. این ماده دارای فعالیت بیولوژیکی متنوعی است که مهم ترین آن ها شامل خواص ضد التهابی، آنتی اکسیدانی، ضد میکروبی، ضد سرطانی، تنظیم کننده سیستم ایمنی، ترمیم سوختگی و محافظت کننده کبدی می باشد (۱۵). همچنین بره موم حاوی حدود ۵۰ درصد صمغ یا رزین گیاهی، ۳۰ درصد موم، ۱۰ درصد اسیدهای چرب ضروری، ۵ درصد گرده گل و ۵ درصد ترکیبات آلی، ویتامین ها و عناصر معدنی مانند نقره، سدیم، جیوه، مس، منگنز، آهن، کلسیم، وانادیم و سیلیس است (۱). مقدار و نوع ترکیبات بره موم بسته به مکان، زمان جمع آوری و روش تولید آن متفاوت است (۲). رنگ بره موم از زرد تا قهوه ای تیره بسته به منشاء رزین های آن متغیر است. بره موم در دماهای  $45^{\circ}\text{C}$  تا  $250^{\circ}\text{C}$  به شکل ماده ای نرم، انعطاف پذیر و بسیار چسبنده است. در دماهای پایین و به خصوص در حالت منجمد یا نزدیک به انجماد، بره موم به شدت سفت و شکننده می شود. در واقع، هرچه دما از  $45^{\circ}\text{C}$  بالاتر رود، بره موم به طور فزاینده ای خاصیت چسبندگی به خود می گیرد (۳). بره موم به طور معمول در دماهای  $60^{\circ}\text{C}$  تا  $70^{\circ}\text{C}$  مایع است، اما برای برخی از نمونه ها، دمای ذوب بالاتر از  $100^{\circ}\text{C}$  نیز گزارش شده است (۴). اتانول، اتر، گلیکول و آب از جمله حلال های متداول برای استخراج بره موم در مقیاس تجاری هستند. ولی به منظور آنالیز شیمیایی

و استخراج طیف گسترده ای از اجزای آن، از انواع مختلفی از حلال ها، استفاده می شود. بسیاری از اجزای آنتی باکتریال موجود در بره موم در الکل یا آب قابل انحلال می باشند (۷). فعالیت های آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی بره موم زمینه استفاده از این ماده را در صنایع غذایی فراهم می کند. یک مزیت ویژه آن، این است که به نظر می رسد بر خلاف برخی از نگهدارنده های معمولی، بره موم اثرات مفیدی بر روی سلامتی انسان می گذارد. با این حال، مطالعات اندکی در خصوص اثرات جانبی احتمالی افزایش مصرف بره موم انجام شده است (۸). در سال های اخیر استفاده از بره موم به عنوان ماده نگهدارنده در بسته بندی های مواد غذایی و به عنوان نگهدارنده مواد غذایی (مانند افزایش طول مدت نگهداری ماهی منجمد شده تا حدود ۲ الی ۳ برابر) و یا به عنوان مکمل خوراکی در جیره غذایی مرغ های تخم گذار (موجب افزایش تولید تخم مرغ و نیز افزایش وزن مرغ ها) مطرح شده است (۲۴). خشک کردن مواد حساس به حرارت با روش های معمول مانند گرم کردن، ممکن نیست. خارج کردن حلال و به ویژه آب از ساختمان پلیمرها، ترکیبات زیستی و غیر آلی، از مهم ترین مسایل صنایع داروسازی، غذایی، پزشکی، پتروشیمی، بیوشیمی و فناوری نانو به شمار می رود. از میان روش های موجود، خشک کردن انجمادی نقش مهمی را در این صنایع و به ویژه در فناوری نانو به دست آورده است. استفاده از این روش، کاربرد فراوانی در تولید نانوذرات در صنایع الکترو شیمی، محیط زیست، مهندسی مواد و صنایع دارویی پیدا کرده است (۲۳). هدف از انجام این پژوهش حاضر، تولید پودر عصاره هیدروالکلی بره موم توسط خشک کن انجمادی و سنتز نانوامولسیون پودر حاصله و ارزیابی خواص فیزیکی و شیمیایی آن بود.

## ۲- مواد و روش ها

## ۲-۱- مواد

۲-۱-۲- دی فنیل-۲-پیکریل هیدرازیل و ۲ و ۴ و ۶- تریس-۲-پیریدیل اس تریازین از شرکت سیگما آلد ریچ<sup>۱</sup> (آمریکا) خریداری

شد. بره موم خام نیز از بازار تبریز خریداری شد. محیط‌های کشت پلیت کانت آگار<sup>۱</sup> و سابرو دکستروز آگار<sup>۲</sup> نیز از شرکت مرک<sup>۳</sup> (آلمان) تهیه شد.

## ۲-۲-۲ روش‌ها

### ۲-۲-۱- تهیه عصاره بره موم

ابتدا بره موم به لایه‌های نازک با ضخامت ۳ تا ۵ میلی‌متر برش داده شد و به مدت یک شبانه روز در فریزر خانگی نگهداری شد. سپس با استفاده از آسیاب برقی (نیما-8300-NM-نقره، ژاپن) بره موم تبدیل به پودر شد. این کار موجب کاهش اندازه ذرات و افزایش نسبت سطح به حجم ذرات شده و راندمان استخراج را افزایش می‌دهد. جهت تهیه عصاره اتانولی بره موم، ۱۰۰ گرم از بره موم آسیاب شده به مخلوط ۴۰ میلی لیتر آب و ۱۶۰ میلی لیتر اتانول ۹۶٪ افزوده شده و مخلوط حاصله با استفاده از یک همزن مغناطیسی با سرعت ۱۵۰ دور در دقیقه به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط هم زده شد. سپس قسمت نامحلول توسط فیلتراسیون جدا گردید و قسمت محلول قبل از فیلتر مجدد، جهت سهولت جدا شدن موم‌ها و صمغ‌های باقی مانده در عصاره، به مدت یک شبانه روز در فریزر ۱۰°C قرار گرفت. در ادامه جهت تبخیر حلال، نمونه به یک تبخیرکننده تحت خلاء (TAT-Rdig, Iran) با دمای ۴۵°C منتقل گردید. در نهایت عصاره عاری از الکل که به صورت خمیر چسبنده بود، حاصل گردید که تا زمان مصرف در ظروف شیشه‌ای تیره در بسته در دمای ۴°C نگهداری شد (۹).

### ۲-۲-۲- تهیه پودر عصاره بره موم

به منظور تولید پودر عصاره بره موم، ابتدا ۱۰۰ گرم از عصاره تهیه شده در ظرف پلاستیکی درب‌دار، پهن گردید و در فریزر در دمای ۲۰°C به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد تا کاملاً منجمد گردد. پس از آن نمونه منجمد شده در دستگاه خشک کن انجمادی

به مدت ۴۰ ساعت در دمای ۷۰°C قرار گرفت. نهایتاً با استفاده از آسیاب، ورقه‌های خشک شده عصاره بره موم به صورت پودر بدست آمد (۱۹).

## ۲-۲-۳- تولید نانوامولسیون عصاره و پودر بره موم در آب

### با استفاده از تکنیک آب مادون بحرانی

جهت تولید نانوامولسیون عصاره و پودر بره موم، بر اساس مطالعات قوامی و همکاران (۲۰۱۸)، ۰/۵ گرم ساپونین به ۴۵ میلی لیتر آب مقطر اضافه شده و محلول‌ها با استفاده از همزن مغناطیسی در دمای ۶۰°C با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه مخلوط گردید. پس از حل شدن کامل امولسیفایر، ۰/۵ گرم پودر بره موم تولید شده به محلول‌های تهیه شده اضافه و نمونه‌ها تحت شرایط مشابه به مدت ۵ دقیقه هم زده شدند. در نهایت، محلول‌ها پس از اختلاط کامل در آون (شرکت تولیدی پزشکی بهداد، SP88، تهران، ایران) در دمای ۱۲۰°C و فشار ۱/۵ اتمسفر، به مدت ۲ ساعت حرارت داده شدند (۱۹، ۲۶، ۲۷).

## ۲-۲-۴- اندازه گیری شاخص بریکس<sup>۴</sup> و pH

ضریب شکست نور عصاره، به عنوان شاخصی از کل مواد جامد محلول آن توسط دستگاه رفاکتومتر (NAR- Atago, ABBE, IT, Tokyo, Japan) اندازه گیری شد. از آب مقطر برای تنظیم دستگاه استفاده گردید و برای اندازه گیری pH نمونه از دستگاه pH متر (pH lab 827-Swiss) استفاده شد.

## ۲-۲-۵- اندازه گیری میزان کدورت

جهت اندازه گیری میزان کدورت عصاره بره موم از دستگاه اسپکتروفوتومتر مرئی فرابنفش (Pharmacia Biotech Co.) انگلستان، مدل (802106-00) در طول موج ۶۲۵ نانومتر استفاده گردید (۱۱).

1- Plate Count Agar

2- Sabouraud's Dextrose Agar

3- Merck

### ۲-۲-۶- شناسایی کیفی ترکیبات موثر بره موم

از دستگاه کروماتوگرافی گازی/طیف سنجی جرمی، جهت تعیین ترکیبات شیمیایی پودر عصاره بره موم استفاده گردید. ابتدا نمونه به وسیله یک میلی لیتر n-Heptane هگزان رقیق شد. پس از مخلوط کردن کامل نمونه با حلال و آماده سازی عصاره، یک میکرو لیتر از آن، به ستون دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف سنج جرمی (GC/MS)<sup>۱</sup> تزریق گردید. دستگاه کروماتوگرافی (Agilent 7890 A، ساخت آمریکا)، مجهز به آشکارساز جرمی با ستون موبینه به طول ۳۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی متر و ضخامت ۰/۲۵ میکرومتر و ستون از نوع (HP-5 M) بود. برنامه دمایی ستون شامل دمای اولیه آون ۸۰°C به مدت سه دقیقه بود. سپس با سرعت ۸°C بر دقیقه تا ۱۸۰°C افزایش یافت و توقف در این دما به مدت ۳ دقیقه بود. دمای دریچه تزریق در ۲۵۰°C تنظیم شد. از گاز هلیوم به عنوان گاز حامل استفاده گردید. سرعت جریان (فلوو) گاز حامل یک میلی لیتر بر دقیقه و روش یونیزاسیون (EI) با ولتاژ ۷۰ الکترون ولت بود. محدوده اسکن جرمی ۵۰ تا ۵۵۰ تنظیم گردید. به منظور شناسایی ترکیبات از کتابخانه جرمی Wily 2007 و NIST 2005 استفاده شد. پردازش داده های دستگاه با استفاده از نرم افزار Chemstation در محیط ویندوز انجام شد (۱۲).

### ۲-۲-۷- اندازه گیری ترکیبات فنلی

میزان ترکیبات فنلی کل بر اساس روش رنگ سنجی فولین سیو کالچو و بر حسب اسید گالیک اندازه گیری شد. برای این منظور، ابتدا محلول های استاندارد اسید گالیک در اتانول ۷۰ درصد با غلظت های (۵۰، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰، ۲۵۰ و ۳۰۰ میلی گرم بر گرم) تهیه و ۰/۵ میلی لیتر از آن ها با ۲/۵ میلی لیتر معرف فولین-سیو کالتو<sup>۲</sup> مخلوط شد و طی مدت ۰/۵ تا ۸ دقیقه، ۲ میلی لیتر کربنات سدیم ۷/۵ درصد (وزنی/حجمی) به آن اضافه شد. نمونه ها به مدت ۳۰ دقیقه در دمای محیط نگهداری شد و سپس جذب نوری آن ها به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر (DR5000-Hach، ساخت

آمریکا) در طول موج ۷۶۰ نانومتر خوانده شد و نمودار استاندارد رسم گردید. برای تعیین مقدار فنل تام نمونه های بره موم، مقدار ۰/۰۵ گرم از عصاره بره موم در ۱۰ میلی لیتر اتانول ۷۰ درصد حل شد. در مرحله بعد، ۱ میلی لیتر از محلول تهیه شده تا حجم ۱۰ میلی لیتر رقیق سازی شد. سپس ۰/۵ میلی لیتر از این محلول با ۲ میلی لیتر کربنات سدیم و ۲/۵ میلی لیتر معرف فولین-سیکالتو مخلوط شد و به مدت ۱ تا ۸ دقیقه در تاریکی نگهداری شد. سپس میزان جذب نمونه ها در طول موج ۷۶۰ نانومتر خوانده شد و مقدار ترکیبات فنلی بر حسب میلی گرم اسید گالیک در گرم عصاره خشک محاسبه گردید (۱۳).

### ۲-۲-۸- اندازه گیری ترکیبات فلاونوئیدی

سنجش فلاونوئیدها بر اساس آزمون رنگ سنجی صورت گرفت. بدین ترتیب که ابتدا ۰/۵ میلی لیتر از عصاره هیدروالکلی بره موم تهیه شده نهایی در قسمت ترکیبات فنلی کل، به ۱ میلی لیتر از محلول ۲ درصد کلرید آلومینیوم (AlCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O) اضافه شد و پس از ۱۵ دقیقه نگهداری در محل تاریک، جذب آن در طول موج ۴۳۰ نانومتر اندازه گیری گردید. در این روش از کوئرستین (محلول آبی کوئرستین با غلظت های ۵، ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۰۰ میلی گرم بر گرم) به عنوان استاندارد استفاده شد. منحنی استاندارد رسم و نتایج بر اساس میلی گرم کوئرستین در گرم عصاره بیان گردید (۶).

### ۲-۲-۹- اندازه گیری خاصیت آنتی اکسیدانی

به منظور اندازه گیری فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره بره موم از ۲،۲ دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) استفاده گردید. یکی از روش های معمول برای ارزیابی پتانسیل مهار رادیکال آزاد مولکول کول های آنتی اکسیدان، استفاده از رادیکال آزاد DPPH است. اساس این روش بر مبنای احیای رادیکال آزاد DPPH به وسیله آنتی اکسیدان ها در غیاب سایر رادیکال های آزاد در محیط می باشد که نتیجه این عمل موجب ایجاد رنگ در محیط می گردد که شدت آن با استفاده از دستگاه طیف سنجی قابل

### ۲-۲-۱۱- آنالیز آماری

آزمایشات فیزیکی و شیمیایی با سه تکرار انجام پذیرفتند و میانگین داده‌ها توسط آنالیز واریانس یک طرفه (One-way Anova) با سطح اطمینان ۹۵ درصد ( $P\text{-value} \leq 0.05$ ) مورد ارزیابی قرار گرفتند.

### ۳- نتایج و بحث

#### ۳-۱- ویژگی‌های عصاره هیدروآلكلى

عصاره هیدروآلكلى با رنگ قهوه‌ای تیره پس از جداسازی حلال در دستگاه تبخیرکننده تحت خلاء حاصل گردید و نتایج نشان داد که میزان pH، بریکس و کدورت عصاره به ترتیب ۵، ۲۱ ( $Bx^{\circ}$ ) و ۱/۷۵ درصد واحد جذب (% a.u.) می‌باشد.

#### ۳-۲- نتایج شناسایی کیفی ترکیبات موثر بره موم

کروماتوگرام مربوط به آنالیز GC-MS برای پودر عصاره هیدروآلكلى بره موم تهیه شده با استفاده از خشك كن انجمادى در شكل (۱) آورده شده است. همانگونه که نتایج نشان می‌دهد بیش از ۵۰ ماده فعال، به صورت پیک‌های مجزا در پودر عصاره بره موم در مدت زمان ۳۲ دقیقه مشخص گردید که Coumaran، Alpha-Terpinne، p-Methoxycinnamic acid، Dimethyl Pinostrobin chalcone و caffeic acid پنج ماده مهم موجود در بره موم بودند که به ترتیب در زمان‌های ۶/۷۲، ۱۱/۵۷، ۲۲/۵۲، ۲۴/۱۹ و ۲۴/۵۰ دقیقه از دستگاه خارج گردید. Pinostrobin chalcone مهم‌ترین ماده موجود در بره موم بود که از دسته فلاونوئیدها می‌باشد و خواص آنتی‌اکسیدانی و بیولوژیکی بره موم، عمدتاً مربوط به این ماده می‌باشد (۲۰).

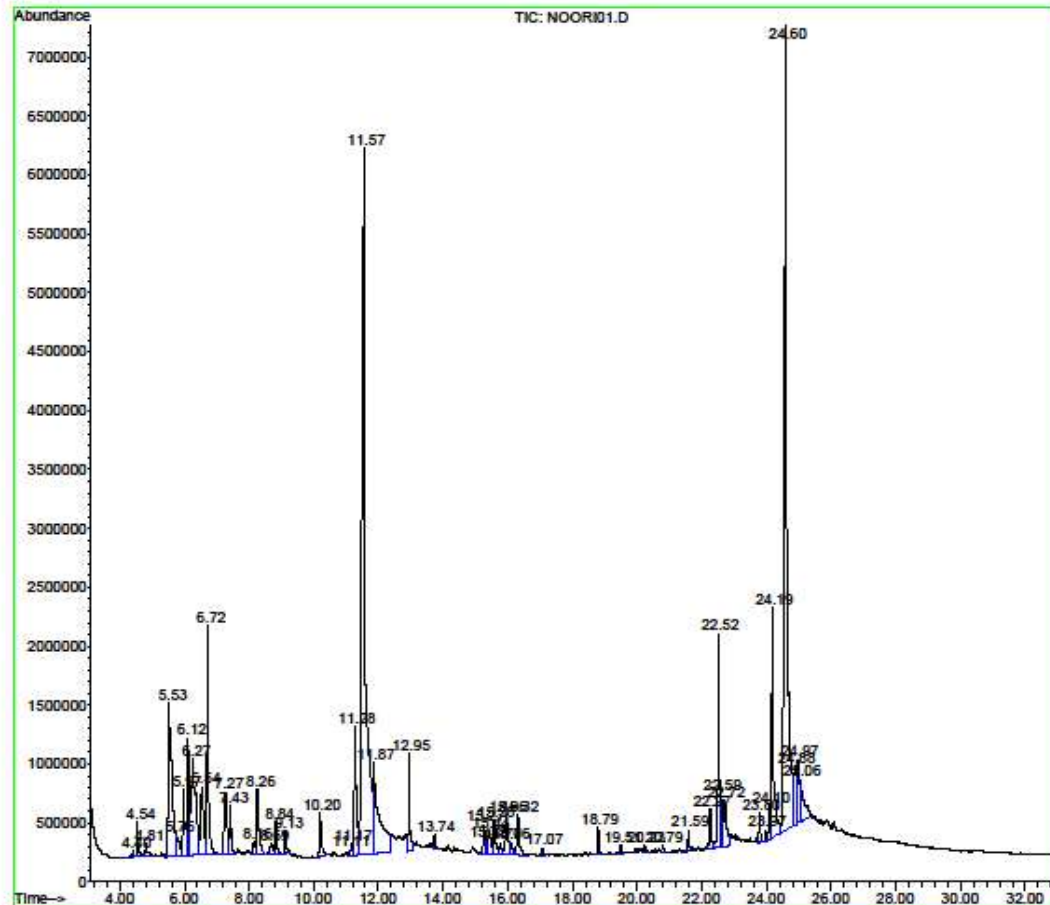
اندازگیری است. در این روش ۰/۱ میلی لیتر از نمونه به ۳/۹ میلی لیتر محلول رادیکال DPPH (۰/۳۹ گرم در ۱ لیتر متانول) اضافه و به شدت مخلوط شد. پس از ۳۰ دقیقه آنکوباسیون در محیط تاریک در دمای اتاق، مقادیر جذب آنها در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.  $A_{\text{sample}}$  جذب عصاره بره موم و  $A_{\text{control}}$  جذب محلول DPPH در متانول است. فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها بر اساس درصد توانایی مهار، با استفاده از (معادله ۱) محاسبه شد (۱۷).

معادله (۱)

$$\% \text{ Radical scavenging activity} = \frac{A_{\text{sample}} - A_{\text{control}}}{A_{\text{control}}} \times 100$$

#### ۲-۲-۱۰- پراکندگی نور دینامیکی (DLS)<sup>۱</sup>

برای تعیین میانگین اندازه ذرات، شاخص پراکندگی ذرات (PDI)<sup>۲</sup> و همچنین مقدار پتانسیل زتای نانوامولسیون‌های سنتز شده، از روش پراکندگی نور دینامیکی (DLS) با استفاده از دستگاه (Malvern instruments, Zetasizer Nano ZS, UK) استفاده گردید. داده‌ها به صورت میانگین سه قرائت در قالب z-average (متوسط اندازه ذرات)، پتانسیل زتا و PDI به عنوان شاخص بدون بعد پراکندگی، در محدوده ۰ تا ۱ و مقادیر پایین تثبیت گردیدند که نشان دهنده همگنی بیشتر سیستم از نظر اندازه ذرات فاز پراکنده است (۱۰). این روش که روشی فیزیکی برای تعیین توزیع ذرات موجود در محلول‌ها و سوسپانسیون‌هاست به برهمکنش نور با ذره بستگی دارد. در این روش، حرکت براونی ذرات که وابسته به اندازه آن‌هاست اندازه‌گیری می‌گردد، به این ترتیب که ذرات توسط نور لیزر تابش داده می‌شوند و شدت نوسانات نور پراکنده شده مورد آنالیز قرار می‌گیرد (۴).



شکل ۱- کروماتوگرام GC-MS پودر عصاره بره موم

### ۳-۳- محتوای فنولی و فلاونوئیدی و خاصیت آنتی اکسیدانی پودر بره موم

نتایج آنالیزهای شیمیایی عصاره بره موم و پودر آن در جدول (۱) آورده شده است. یافته‌های مطالعه حاضر نشان دادند که ویژگی شیمیایی پودر بره موم (فنول کل، فلاونوئید و آنتی اکسیدان) از ویژگی‌های مشابه عصاره هیدروالکلی آن بیشتر است. آهنگری و همکاران (۲۰۱۸) گزارش کردند که ۷۰-۵۰ درصد بره موم را رزین، ۵۰-۳۰ درصد را موم، ۱۰-۵ درصد را گرده و مابقی آن را ترکیباتی نظیر اسیدهای آمینه، قندها، ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی، مواد معدنی و ویتامین‌های C، B و E تشکیل داده و در حدود ۵ درصد آن رطوبت می‌باشد. ترکیبات فنلی، گروهی از متابولیت‌های ثانویه معطر (آروماتیک) گیاهی هستند که به

صورت گسترده در سراسر گیاه، پخش شده‌اند و اثرات بیولوژیکی متعددی از قبیل فعالیت آنتی اکسیدانی و فعالیت ضدباکتریایی دارند. ترکیبات فنلی به دو دسته چربی دوست و آبدوست تقسیم می‌شود. فلاونوئیدها به شکل آزاد و گلیکوزیدی یافت می‌شوند و بزرگترین گروه فنل‌های موجود در طبیعت را تشکیل می‌دهند. فلاونوئیدها از مشتقات فنیل پروپانویید با ساختمان ۱۵ کربنه هستند. این ترکیبات باعث افزایش مقاومت به عوامل بیماری‌زا در گیاهان می‌شوند. همچنین جذب کننده قوی اشعه ماورای بنفش در محدوده (۲۵۰-۳۴۰) نانومتر می‌باشند. فلاونوئیدها از طریق مهار عنصرهای کاتالیز شده از اکسایش (اکسیداسیون) جلوگیری می‌کنند فلاونوئیدها

آنتی‌اکسیدانی بره موم می‌باشند. طی تحقیقی که روی بره موم انجام شد، میزان ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی به ترتیب از ۵۹ تا ۴۹۳ و ۱۳ تا ۳۷۹ میلی‌گرم بر گرم (اسید گالیک) متغیر می‌باشد. همچنین عصاره هیدروالکلی بره موم دارای ۷۰ میلی-گرم بر گرم اسید گالیک، محتوای فنولی می‌باشد (۱۸).

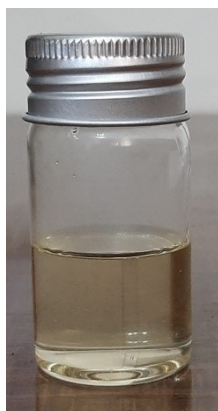
مهارکننده یاخته‌های سرطانی از راه بیان ژن، تقویت سیستم ایمنی بدن (آنتی‌اکسیدان، ضد ویروس، ضد باکتری، ضد التهاب، ضد آلرژی و ضد موتاسیون)، کاهش دهنده نفوذپذیری و شکنندگی مویرگ‌ها می‌باشند (۱ و ۲۵). ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی موجود در بره موم عامل اصلی خاصیت

### جدول ۱- آنالیز شیمیایی عصاره و پودر عصاره بره موم

ویژگی	عصاره بره موم	پودر بره موم
فنول کل (میلی‌گرم بر گرم بر حسب اسید گالیک)	۸۲/۵۲	۸۶/۹۳
فلاونوئید (میلی‌گرم بر گرم بر حسب اسید گالیک)	۳۰/۲۵	۳۴/۲۱
آنتی‌اکسیدان	۹۳/۳۲	۹۷/۶۸

(به عنوان امولسیفایر)، تحت شرایط آب مادون بحرانی در شکل (۲) نشان داده شده است.

۳-۴- ویژگیهای نانوامولسیون روغن در آب پودر بره موم نانوامولسیون تهیه شده با استفاده از پودر بره موم و ساپونین



شکل ۲- نانوامولسیون پودر بره موم

عصاره الکلی بره موم در شرایط مشابه و نسبت‌های عصاره و ساپونین یکسان با تحقیق حاضر، تولید نمودند و نتایج نشان داد که نانوامولسیون تولید شده دارای اندازه ذرات، شاخص پراکندگی و پتانسیل زتای به ترتیب ۱۴۴/۶ نانومتر، ۰/۲۸۶ و ۲۱/۷۱ - میلی‌ولت می‌باشد. پتانسیل زتا نیز از پارامترهای مهم و تاثیرگذار در خواص نهایی بوده و در تعیین پایداری نانوامولسیون نیز

شفافیت نانوامولسیون تولید شده، نشان‌دهنده کوچک بودن اندازه ذرات بره موم پراکنده شده در سیستم آبی می‌باشد. نتایج نشان داد که نانوامولسیون تولید شده دارای اندازه ذره، شاخص پراکندگی و پتانسیل زتای به ترتیب ۸۶ نانومتر، ۰/۲۹۹ و ۲۳/۳۴ - میلی‌ولت بود. در تحقیق مشابهی که قوامی و همکاران (۲۰۱۸) انجام دادند، نانوامولسیون روغن در آب



نقش مهمی دارد. نانوامولسیون پودر بره موم در آب، با توجه به اینکه ذرات چرب پودر در فاز پیوسته آب به صورت معلق می‌باشند، دارای بار سطحی بوده و همواره در اطراف سطح این ذرات، افزایش غلظت یون‌های با بار مخالف سطح ذره، دیده می‌شود. بنابراین یک لایه اضافی از این یون‌ها، سطح ذره را احاطه می‌کند و یک لایه اضافی را در دور ذره بوجود می‌آورد. وقتی ذره درون سیال حرکت می‌کند، لایه اطراف آن نیز به همراه ذره جابه جا می‌شوند و با ذره حرکت می‌کنند و می‌توان یک فاصله فرضی بین ذره و محیط سیال تصور کرد که این فاصله فرضی همان لایه مضاعفی است که ذره را احاطه کرده است. این فاصله را اصطلاحاً فاصله هیدرودینامیکی می‌نامند و پتانسیلی را که در این فاصله وجود دارد، به نام پتانسیل زتا می‌شناسند. در واقع پتانسیل زتا یک پارامتر برای ثبات بالقوه سیستم کلئیدی می‌باشد. اگر همه ذرات داخل محلول دارای بار منفی و یا مثبت باشند، ذرات تمایل به دفع یکدیگر داشته و تمایلی به هم‌انباشتگی از خود نشان نمی‌دهند که این معیاری از پایداری محصول تولید شده می‌باشد. در واقع، هرچقدر مقدار عددی پتانسیل زتا بالاتر باشد، نانو امولسیون تولید شده از پایداری بالاتر برخوردار می‌باشد و بالعکس (۲۱ و ۲۶). اندازه ذره، پراکندگی و یکنواختی نانو ذرات محصول تولید شده از اهمیت بسیار بالایی برخوردار است، هر چه اندازه ذرات کوچک‌تر و یکنواختی ذرات تولید شده بالاتر باشد، محصول تولید شده خواص مطلوب‌تری داشته و دارای پایداری بیشتری خواهند بود. شاخص پراکندگی (PDI)، مرتبط با یکنواختی اندازه نانوذرات شکل گرفته در امولسیون می‌باشد و مقدار آن در محدوده ۰ تا ۱ قابل تغییر می‌باشد. هرچقدر عدد شاخص پراکندگی کوچکتر باشد، اندازه نانوذرات یکنواخت تر بوده و مطلوب می‌باشد (۲۱ و ۲۲).

#### ۴- نتیجه گیری

نتایج این مطالعه نشان داد که با استفاده از خشک کن انجمادی می‌توان پودر عصاره بره موم از عصاره هیدروالکلی تولید نمود و آن را به مدت زمان طولانی در شرایط محیطی، با کیفیت بالا نگهداری نمود. آلکالوئیدها، اسیدهای آمینه، اسیدهای آروماتیک و استرهای آن‌ها، اسیدهای چرب و استرهای آن‌ها، فلاونوئیدها و ترپن‌ها مواد اصلی موجود در پودر بره موم تولید شده می‌باشند که به راحتی می‌توان با استفاده از اتانول آن‌ها را استخراج نمود. به طور مشخص، Coumaran، Alpha-Terpinne، p-Dimethyl caffeic acid، Methoxycinnamic acid و Pinostrobin chalcone پنج ماده مهم موجود در پودر بره موم می‌باشند که چالکن‌ها مهم‌ترین ماده در بین آنها بوده و از دسته فلاونوئیدها می‌باشد و غالب خواص بیولوژیکی بره موم از این ماده ناشی می‌شود. نتایج نشان داد که عصاره هیدروالکلی و پودر تولید شده آن توسط دستگاه خشک کن انجمادی دارای محتوای فنولی و فلاونوئیدی، و خاصیت آنتی‌اکسیدانی بالایی می‌باشند. هرچند این خواص در داخل پودر، بالاتر از خواص در عصاره هیدروالکلی بره موم است. علت این موضوع می‌تواند به دلیل اثرات منفی حرارت بر روی ترکیبات فنولی و فلاونوئیدی، در مرحله حذف حلال اشاره نمود.

#### ۵- سپاسگزاری

نویسندگان این مقاله، مراتب تشکر و قدردانی خود را از کارشناسان دانشکده دامپزشکی دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز بابت همکاری ایشان در اجرای این مطالعه، اعلام می‌دارند.

#### ۶- منابع

1. Ahangari Z, Naseri M, Vatandoost F. Propolis: chemical composition and its applications in endodontics. *Iranian Endodontic Journal*, 2018;13(3): 285.
2. Ahdno H, Jafarizadeh-Malmiri H. Development of a sequenced enzymatically pre-treatment and filter

- using clove hydroalcoholic extract and optimization of the process. *Green Processing and Synthesis*. 2020; 9(1): 375-385.
10. Azhdarzadeh F, Hojjati M. Chemical composition and antimicrobial activity of leaf, ripe and unripe peel of bitter orange (*Citrus aurantium*) essential oils. *Nutrition and Food Sciences Research*. 2016; 3(1): 43-50.
  11. Azmir J, Zaidul I. S. M., Rahman M. M, Sharif K. M, Mohamed A, Sahena F, Omar A. K. M. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of Food Engineering*. 2013; 117(4): 426-436.
  12. Bankova V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *Journal of Ethnopharmacology*. 2005; 100(1-2): 114-117.
  13. Bankova V. S, de Castro S. L, Marcucci, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie*. 2000; 31(1): 3-15.
  14. Banskota A. H, Tezuka Y, Kadota S. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytotherapy Research*. 2001; 15(7): 561-571.
  15. Castaldo S, Capasso F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia*. 2002; 73: 1-6.
  16. Eskandari-Nojehdehi M, Jafarizadeh-Malmiri H, Rahbar-Shahrouzi J. Optimization of processing parameters in green synthesis of gold nanoparticles using microwave and edible mushroom (*Agaricus bisporus*) extract and evaluation of their antibacterial activity. *Nanotechnology Reviews*. 2016; 5(6): 537-548.
  17. Ezazi A, Javadi A, Jafarizadeh-Malmiri H, Mirzaei H. Development of a chitosan-propolis extract edible coating formulation based on physico-chemical attributes of hens' eggs: Optimization and characteristics edible coating of egg using chitosan and pre-coating process to clarify date syrup. *Food and Bioproducts Processing*, 2017;101. 193-204.
  3. Ahmadi O Jafarizadeh-Malmiri H. Green approach in food nanotechnology based on subcritical water: effects of thyme oil and saponin on characteristics of the prepared oil in water nanoemulsions. *Food Science and Biotechnology*. 2020; 29(6):783-792.
  4. Ahmadi O, Jafarizadeh-Malmiri H, Jodeiri N. Eco-friendly microwave-enhanced green synthesis of silver nanoparticles using Aloe vera leaf extract and their physico-chemical and antibacterial studies. *Green Processing and Synthesis*. 2018; 7(3): 231-240.
  5. Akca A. E, Akca G, Topçu F. T, Macit E, Pıkdöken L, Özgen, I. Ş. The comparative evaluation of the antimicrobial effect of propolis with chlorhexidine against oral pathogens: An in vitro study. *BioMed Research International*, 2016; 2016-2120.
  6. Alami M, Ghorbani M. Evaluation of total phenolic, flavonoid, anthocyanin compounds, antibacterial and antioxidant activity of hawthorn (*Crataegus Elbursensis*) fruit acetic extract. *Journal of Rafsanjan University of Medical Sciences*. 2014; 13(1): 53-66.
  7. Alencar S. M, Oldoni T. C, Castro M. L, Cabral I. S. R, Costa-Neto C. M, Cury J. A Ikegaki M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: red propolis. *Journal of Ethnopharmacology*. 2007; 113(2): 278-283.
  8. Anarjan N, Jaberi N, Yeganeh-Zare S, Banafshehchin, E, Rahimirad A, Jafarizadeh- Malmiri H. Optimization of mixing parameters for  $\alpha$ -tocopherol nanodispersions prepared using solvent displacement method. *Journal of the American Oil Chemists Society*. 2014; 91(8):1397-405.
  9. Anvarinezhad M, Javadi A, Jafarizadeh-Malmiri H. Green approach in fabrication of photocatalytic, antimicrobial, and antioxidant zinc oxide nanoparticles-hydrothermal synthesis

23. Oyinloye T. M Yoon W. B. Effect of freeze-drying on quality and grinding process of food produce: A review. *Processes*. 2020; 8(3):354.
24. Pobiega K, Kraśniewska K, Gniewosz M. Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of food quality—A review. *Trends in Food Science & Technology*. 2019; 83: 53-62.
25. Pourazadi L, Nehzati G. A, Ghaziani F, Abbasai S. Evaluation the quality and quantity of phenolic compound and antioxidant activity of propolis in the vicinity of Karaj. *Iranian Journal of Animal Science*. 2017; 47(4): 499-506.
26. Sayyar Z, Jafarizadeh-Malmiri H. Process intensification for curcumin nanodispersion preparation using subcritical water—Optimization and characterization. *Chemical Engineering and Processing-Process Intensification*. 2020; 153: 107938.
27. Sayyar Z, Jafarizadeh-Malmiri H. Preparation of Curcumin Nanodispersions Using Subcritical Water—Screening of Different Emulsifiers. *Chemical Engineering & Technology*. 2020; 43(2):263-272.
- propolis. *Food Bioscience*. 2021; 40: 100894.
18. Galeotti F, Maccari F, Fachini A, Volpi N. Chemical composition and antioxidant activity of propolis prepared in different forms and in different solvents useful for finished products. *Foods*. 2018; 7(3): 41.
19. Ghavami-Lahiji M, Behroozibakhsh M, Kashi T. S. J. A review of applications of fourier transform infrared spectroscopy in dental research. *Journal of Dental Medicine*. 2018; 30(4): 243-253.
20. González-Martín M. I, Revilla I, Betances-Salcedo E. V, Vivar-Quintana A. M. Pesticide residues and heavy metals in commercially processed propolis. *Microchemical Journal*. 2018; 143: 423-429.
21. Jaberi N, Anarjan N, Jafarizadeh-Malmiri H. Optimization the formulation parameters in preparation of  $\alpha$ -tocopherol nanodispersions using low-energy solvent displacement technique. *International Journal for Vitamin and Nutrition Research*. 2019;16(1): 201-241.
22. Jafari A, Anarjan N, Jafarizadeh-Malmiri H. Effects of rotation speed and time, as solvent removal parameters, on the physico-chemical properties of prepared  $\alpha$ -tocopherol nanoemulsions using solvent-displacement technique. *Food Science and Biotechnology*. 2019; 1-8.

