

(مقاله پژوهشی)

## طراحی و بررسی ویژگی های فیزیکی حامل های لیپیدی نانوساختار حاوی اولئوروپئین

منصوره سلیمانی فرد<sup>۱</sup>، علیرضا صادقی ماهونک<sup>۲\*</sup>، محمد قربانی<sup>۳</sup>، روح الله حیدری<sup>۳</sup>، خسرو عزیزی<sup>۴</sup>، اصغر سپهوند<sup>۵</sup>، سید پیمان هاشمی<sup>۶</sup>

۱- دانشجوی دکتری مهندسی علوم و صنایع غذایی، شیمی مواد غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۲- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

۳- دانشیار، مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی لرستان، خرم آباد، ایران

۴- دانشیار، گروه اکولوژی، دانشکده علوم کشاورزی و منابع طبیعی خرم آباد، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران.

۵- استادیار، گروه انگل شناسی، مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی لرستان، خرم آباد، ایران.

۶- استاد، گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم آباد، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۸/۲۱

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۴/۰۱

### چکیده

اولئوروپئین دارای خاصیت آنتی اکسیدانی بوده و فراوانترین ترکیب فنلی برگ زیتون است. استخراج و اندازه گیری مقدار اولئوروپئین از برگ زیتون به عنوان یک منبع غنی، بسیار ارزشمند است. از طرفی انکپسولاسیون این ترکیب ایده ای موثر جهت حفظ ویژگی های منحصر به فرد آن طی نگهداری می باشد. در این تحقیق، حامل های لیپیدی نانوساختار (NLC) با مواد دیواره ای (گلیسرول مونواسترات روغن سویا، اسید لینولئیک)، امولسیفایر (لیستین) و هسته ای (اولئوروپئین) تهیه و ویژگی های فیزیکی نانوساختار حاصل مورد بررسی قرار گرفت. جهت بهینه سازی استخراج اولئوروپئین با حلال های اتانول: آب (۷۰:۳۰) از دستگاه HPLC، تعیین اندازه ذرات، شاخص پراکندگی ذرات، و پتانسیل زتای نانوحامل ها توسط دستگاه زتاسایزر، جهت تشخیص ساختار کریستالی و آمورف، همچنین میزان کریستالینیتی نانوحامل ها از دستگاه XR-D، و در نهایت جهت بررسی ساختار سطحی نانوساختارها از دستگاه FE-SEM استفاده گردید. نتایج حاصل از کروماتوگرام ها نشان داد که روش بهینه جهت استخراج اولئوروپئین با حلال های اتانول و آب (۷۰:۳۰)، در حمام بخار آب با دمای ۴۰ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه می باشد که حاوی ۲۲۱.۳۷۰ میلی گرم بر گرم اولئوروپئین و درصد خلوص اولئوروپئین ۲۲.۱۳۷ می باشد. همچنین نتایج حاصل از آزمون پراکندگی دینامیکی نور نشان داد که فرمول بهینه دارای میانگین اندازه ذرات ۱۲۱.۹ نانومتر، شاخص پراکندگی ۰.۱۵۳، و پتانسیل زتای ۴۳.۳- میلی ولت می باشد. نتایج حاصل از بررسی ساختار و فازهای تشکیل دهنده نانوحامل بهینه نشان داد که نانوحامل لیپیدی دارای ساختار کلی صفحه ای یا پولک مانند با ریزساختارهای زنجیره ای متشکل از واحدهای کروی می باشد این نانوساختار حاوی ساختمانی کریستالی بوده و میزان کریستالینیتی آن حدود ۵۲ درصد می باشد.

واژه های کلیدی: نانوحامل لیپیدی اولئوروپئین، HPLC، FE-SEM، XRD، DLS.

**۱-مقدمه**

همکاران (۲۰۱۵) با بررسی سیستم‌های هیدروفلیک با پایه کیتوزان، که حاوی عصاره برگ زیتون می‌باشند، ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی آن را مورد ارزیابی قرار دادند. در این پژوهش نتایج حاصل از XRD و FT-IR نشان داد که هیچ تراکشن ویژه و چشمگیری بین پلی‌فنل‌های عصاره برگ زیتون با ماتریکس کیتوزان صورت نگرفته است. همچنین نتایج نگه‌داری در شرایط اتاق نشان داد که فرمول حاصل در دمای اتاق کاملاً پایدار بوده و دارای کارایی ریزپوشانی ۴۴ درصد می‌باشد (۷). با توجه به آنچه که در قبل ذکر شد و بررسی مقالات و پژوهش‌های انجام شده در این زمینه، به نظر می‌رسد تا کنون هیچ کار تحقیقاتی بر پایه طراحی و بررسی ویژگی‌های فیزیکی نانو ساختارهای لیپیدی (NLC) عصاره برگ زیتون گزارش نشده است، لذا این پژوهش با اهداف بهینه‌سازی استخراج عصاره برگ زیتون، بهینه سازی تولید نانوذرات حاوی عصاره، و بررسی آزمون‌های فیزیکی این نانو ساختارهای لیپیدی شکل گرفته است.

**۲-مواد و روش****۲-۱-مواد**

۲-۱-۱- تهیه پودر برگ زیتون: پس از جمع‌آوری برگ‌های زیتون واریته خرم‌آبادی، این برگ‌ها با آب شهری شستشو و در سایه، به دور از نور، و دمای اتاق خشک شدند. سپس برگ‌های خشک شده با استفاده از آسیاب، به شکل پودر تهیه و در یخچال نگهداری شدند.

**۲-۱-۲- سایر مواد شیمیایی**

مواد شیمیایی از جمله اولئوروپتین (درجه خلوص ۹۸ درصد)، لیستین، گلیسرول مونواسترات، اسید کلریدریک، کلروفرم، استونیتریل (درجه خلوص HPLC)، نمک فسفات دی هیدروژن پتاسیم، و متانول (درجه خلوص HPLC، ساخت شرکت Sigma Aldrich، از شرکت نگین طب خرم‌آباد و روغن سویای بکر از سوپر مارکت بازار محلی گرگان خریداری شد.

اولئوروپتین؛ استر گلوکوزیدی النویک اسید و هیدروکسی تیروزول؛ جزء اصلی بیوفنول موجود در برگ زیتون است (۱۱، ۱۲، ۲۸). این گلیکوزید به شدت تلخ بوده و عامل تلخی زیتون خام و فرآوری نشده می‌باشد (۱۱). از جمله معایب این ترکیب تلخی، تجزیه تحت شرایط اسیدی، بازی، نور و دمای بالا و تبدیل به ترکیبات سازنده آن می‌باشد که امکان استفاده از آن را به عنوان یک جزء افزودنی در فرمولاسیون‌های غذایی مختلف، با چالش مواجه ساخته است. در این راستا، انواع سیستم‌های ریزپوشانی (نظیر نانوحامل‌ها) جهت حفاظت ترکیبات فعال و حساس به شرایط نامساعد محیطی در مواد غذایی و دارویی به کار می‌رود (۳۶، ۳۷). در ادامه برخی پژوهش‌های انجام شده در زمینه نانوذرات ذکر شده است. هاشمی‌زاده و همکاران (۱۳۹۵) با بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی و ویژگی‌های فیزیکی حامل‌های لیپیدی نانو ساختار حاوی عصاره آویشن شیرازی گزارش نمودند در روز اول فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی نانوحامل‌های حاوی عصاره آویشن شیرازی در مقایسه با عصاره آزاد در غلظت‌های برابر بیش‌تر بوده ولی به مرور با نگهداری در دمای محیط به مدت ۱۶ روز این خاصیت در نانوحامل‌های حاوی عصاره کم‌تر از عصاره آزاد گردیده است (۵). همچنین با بررسی کارایی ریزپوشانی نانوحامل مشخص شد این ذرات حاوی ۷۱ درصد آویشن با اندازه ذره‌ای ۱۲۲ نانومتر می‌باشند. پزشکی و همکاران (۱۳۹۳) با بررسی عوامل موثر بر اندازه حامل‌های لیپیدی نانو ساختار حاوی ویتامین A پالمیتات و پایداری و کارایی ریزپوشانی این نانوحامل‌ها گزارش نمودند که افزایش غلظت سورفاکتانت‌ها موجب افزایش کارایی انکپسولاسیون و همچنین افزایش پایداری درون پوشانی گردید. همچنین گزارش نمودند نانوحامل‌های حاصل دارای اندازه ۷۸ نانومتر و درصد پراکندگی ۰/۶۰۲ با کارایی درون پوشانی ۹۸/۵ درصد می‌باشند (۱). آکوستا و

## ۲-۲-روش‌ها

۲-۲-۱- بهینه‌سازی استخراج عصاره از برگ‌های زیتون با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)، و تعیین غلظت اولئوروپئین حاصل از کروماتوگرام‌ها

آب دو بار تقطیر با استفاده از دستگاه Fisons تمام پیرکس تهیه شد. برای استخراج اولئوروپئین از برگ‌های زیتون، برگ‌های خشک شده توسط آسیاب الکتریکی (Sunny مدل SG-80) پودر شد و سپس دقیقاً ۱ گرم از پودر حاصل به بطری شیشه‌ای درب دار منتقل و ۱۰ میلی‌لیتر حلال استخراج اتانول-آب (۷۰:۳۰) به آن اضافه شد. سپس بطری به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم و به مدت ۱۵ دقیقه در حمام فرا صوت قرار داده شد. به منظور اطمینان از استخراج کامل همین عملیات استخراج یک بار بر روی تفاله حاصل از جداسازی عصاره و تفاله، انجام گردید. سپس محلول با عصاره جدا شده در مرحله قبل مخلوط و خشک شد. نمونه خشک شده قبل از تزریق با حلال مورد استفاده در استخراج به صورت محلول در آمده و پس از صاف شدن از فیلتر ۰/۴۵ میکرون مورد استفاده قرار گرفت. به منظور کشیدن نمونه و تزریق به دستگاه HPLC از میکروسرنگ ۲۵ میکرولیتری (شرکت SGE ساخت استرالیا مدل F-LC25) استفاده شد. برای جداسازی و اندازه‌گیری کمی اولئوروپئین<sup>۱</sup> در نمونه‌های استخراجی از دستگاه HPLC با ستون C-8 مدل Shim-Pack clc-c8 (M) به طول ۲۵ سانتی‌متر، قطر ۴.۶ میلی‌متر و اندازه ذرات پر کننده ۵ میکرومتر و ستون محافظ به طول ۱ سانتی‌متر استفاده شد. این دستگاه مجهز به دو پمپ رفت و برگشتی، یک آون، یک گاز زدای پیوسته، یک لوپ نمونه به اندازه ۲۰ میکرولیتر و یک آشکار ساز UV/Visible مدل SPD-10 AVP مجهز به سل کوارتز با حجم ۸ میکرولیتر بود. نرم افزار مورد استفاده Class-vp v.R 6.1 بود. حلال‌های HPLC (بافر فسفات، استونیتربیل و آب مقطر) و نمونه استخراجی قبل از استفاده توسط

سیستم نگهدارنده فیلتر غشایی ۰.۴۵ میکرون (مدل Millipore) صاف شدند. شناسایی پیک اولئوروپئین با استفاده از مقایسه زمان بازداری<sup>۲</sup> (Rt) آن با نمونه استاندارد صورت گرفت. برای اطمینان بیشتر، مقداری از استاندارد اولئوروپئین به نمونه افزوده شد و مجدداً تزریق گردید. مطابق انتظار ارتفاع پیک شناسایی شده به عنوان اولئوروپئین افزایش یافت. برای اندازه‌گیری کمی اولئوروپئین از رسم منحنی کالیبراسیون توسط نمونه استاندارد بر اساس سطح زیر پیک استفاده شد. برای جداسازی گونه‌ها در روی ستون HPLC از یک برنامه شویی گرادینانی (۰.۲، ۰.۴، ۰.۶، ۰.۸، ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه) با استفاده از دو حلال الف: بافر استات فسفات ۰.۰۵ مولار (pH=۲.۸) و حلال ب: استونیتربیل استفاده شد. سرعت جریان فاز متحرک ۱ میلی-لیتر بر دقیقه بود.

## ۲-۲-۲- بهینه‌سازی روش تهیهی نانو حامل‌های لیپیدی

به روش همگن‌سازی در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد ابتدا با مقادیر فرضی مواد با استفاده از نرم افزار Design Expert و بررسی مقالات تحقیقاتی در این زمینه، فرمول‌های نانوحامل طراحی شد. سپس با بررسی روش‌های مختلف به کار برده شده در مقالات و تغییر در پروتوکل‌های موجود، و آزمون و خطاهای متفاوت، روش بهینه و مناسب حاصل شد. در این روش مخلوط لیپیدی در دمای ۵ تا ۱۰ درجه بالاتر از نقطه ذوب لیپید جامد (۷۰-۶۰ درجه سانتی‌گراد) حرارت داده شد. ابتدا پودر عصاره یا اولئوروپئین در آب حل یا پراکنده، سپس محلول آبی حاوی عصاره یا اولئوروپئین به فاز لیپیدی مذاب (چربی ذوب شده و روغن به همراه امولسیفایر لیستین) که تحت همزدن یا نیروی برشی زیاد (۵۰۰۰-۲۰۰۰ دور در دقیقه) قرار داشت، به مدت ۱.۵-۱ ساعت به صورت قطره قطره با فاصله زمانی ۱-۲ ثانیه با سمپلر (۱۰۰۰ لاند) افزوده شد. اندازه ذرات در امولسیون نهایی ابتدا ۱۵ دقیقه در حمام اولتراسونیک (دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد) و سپس ۱۵ دقیقه به وسیله

<sup>2</sup>. Retention Time<sup>1</sup> Oleuropein

تحقیقاتی در این زمینه، مقادیر اولیه در نظر گرفته شد. در این مورد محتوای فاز لیپیدی، ۱ درصد در نظر گرفته شد، که از این مقدار ۸۵ درصد فاز چربی (گلیسرول مونواستئارات) و ۱۵ درصد فاز روغن (اسید لینولئیک، روغن سویا)، و مقادیر لیستین و پودر عصاره برگ زیتون ۰.۰۷۵ درصد (وزنی/وزنی) یا به عبارتی ۱۶.۶۰۲ میلی گرم اولئوروپتین در نظر گرفته شد. بعد از آزمون و خطا و اندازه گیری میانگین اندازه ذرات و HPLC در نهایت مقادیر در ۴ ضرب و سپس بر عدد سه تقسیم شد. سپس با بررسی و تغییر دادن مقادیر در هر ماده و ثابت نگه داشتن مقادیر دیگر، فرمولاسیون های متفاوت تهیه و تاثیر تغییرات پودر عصاره (اولئوروپتین) مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۱). با توجه به فرمول نهایی نانوحامل ها و دستیابی به فرمولاسیون بهینه نهایی، سایر آزمون ها برای فرمول بهینه مورد بررسی قرار گرفت.

اولتراسونیک پروب دار (در ۵ سیکل سه دقیقه ای با فاصله زمانی ۱ دقیقه، و همچنین بزرگی نیرویی با بزرگی ۶۰ فرکانس ۱ هرتز) کاهش یافت. پس از مراحل مذکور جهت سانتریفوژ نمودن، به هر لوله فالكون (حاوی ۳۵ میلی لیتر سوسپانسیون) ۱ سی سی اسید کلریدریک ۱ مولار جهت کمک به ترسیب نانوذرات افزوده شده، سپس طی دو مرحله (به ترتیب، ۳۰ دقیقه در دور ۷۰۰۰rpm دمای ۲۵ درجه سانتی گراد، ۱۵ دقیقه در دور ۱۵۰۰۰rpm در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد) سانتریفوژ صورت گرفت. پس از عمل جداسازی در سانتریفوژ، رسوب که حاوی نانوذره حامل عصاره بود جداسازی شده و توسط خشک کن تصعیدی (دمای ۸۰- درجه سانتی گراد در فشار ۰.۰۰۱ میلی بار به مدت ۲۴ ساعت) خشک شد و پودر نانو حامل- های لیپیدی حاصل گردید.

## ۲-۳-۲-۳- بهینه سازی غلظت و نسبت مواد در حامل های لیپیدی نانو ساختار

به منظور تهیه نانوحامل های لیپیدی حاوی اولئوروپتین، ابتدا با استفاده از نرم افزار Design Expert و مقالات

جدول ۱- بهینه سازی مقدار و نوع ترکیبات موجود در حامل های لیپیدی نانو ساختار

کد فرمولاسیون	آب (سی سی)	گلیسرول مونواستئارات (گرم)	اسید لینولئیک (گرم)	روغن سویا (گرم)	لیستین (گرم)	پودر عصاره برگ زیتون (گرم)	اولئوروپتین** (میلی گرم)
۱	۱۲۰	۰/۹۳	۰/۲	۰/۲	۰/۳	۰/۱	۲۲/۱۳۷
۲	۱۲۰	۰/۹۳	۰/۲	۰/۲	۰/۳	۰/۰۵	۱۱/۰۶۸۵
۳	۱۲۰	۰/۹۳	۰/۲	۰/۲	۰/۳	۰/۲	۴۴/۲۷۴
۴	۱۲۰	۰/۹۳	۰/۲	۰/۲	۰/۳	۰/۴	۸۸/۵۴۸
۵	۱۲۰	۰/۹۳	۰/۲	۰/۲	۰/۳	۰/۵	۱۱۰/۶۸۵

\*\* در این جدول مقادیر اولئوروپتین (میلی گرم) معادل مقادیر پودر عصاره برگ زیتون (گرم) بکار رفته در هر فرمول گزارش شده است (جهت درک از مقدار اولئوروپتین موجود در پودر عصاره برگ).

یک فلز متصل شده با طلا پوشیده شد و ویژگی‌های سطحی و شکل نانوذرات با استفاده از FE-SEM مشاهده گردید.

### ۲-۲-۶- تجزیه و تحلیل آماری

نتایج کروماتوگرام‌های بهینه‌سازی استخراج عصاره برگ زیتون در قالب طرح کاملاً تصادفی با ۲۵ بار تزریق انجام گردید و بهترین نمونه بر اساس بیشترین غلظت اولئوروپتین در طول موج ۲۵۴ نانومتر انتخاب شد. به منظور بهینه‌سازی تولید فرمولاسیون، از روش سطح پاسخ با طراحی مرکب مرکزی و نرم افزار Expert Design استفاده شد. ترکیبات اولئوروپتین، گلیسرین مونواسترات، روغن سویا، اسید لینولئیک، لسیتین و پودر عصاره برگ زیتون به عنوان متغیرهای مستقل مورد استفاده قرار گرفتند. نتایج اندازه‌گیری میانگین ذرات و شاخص پراکندگی ذرات به منظور رسیدن به فرمول بهینه در قالب ۵ فرمول طراحی و به همراه اندازه‌گیری پتانسیل زتای فرمول بهینه یک بار انجام شد. انتخاب بهترین نمونه بر اساس کمترین اندازه ذره‌ای و کمترین شاخص پراکندگی (در محدوده  $PDI \leq 0.2$ ) انجام گردید. بازدهی ریزپوشانی تیمارها با استفاده از HPLC و جهت تحلیل داده‌های مربوطه از نرم افزار SPSS 10 و آنالیز واریانس و آزمون مقایسه میانگین‌های دانکن در سطح ۵ درصد انجام شد.

### ۳- نتایج و بحث

#### ۳-۱- بهینه‌سازی استخراج و تعیین غلظت اولئوروپتین حاصل از کروماتوگرام‌ها

سیستم‌های چند حلالی جهت بهینه‌سازی استخراج و حصول ترکیبات فنولیک از ماتریکس گیاهان استفاده می‌شود. اتانول به عنوان یک ماده سالم (GRAS) طبقه‌بندی شده و به عنوان حلال موثری جهت استخراج ترکیبات فنولیک گزارش شده است، بنابراین برای حصول و ریکاوری این گروه‌های فیتوشیمیایی، به ویژه زمانی که این ترکیبات برای تولید محصولات نوتراسوتیکال (غذا-دارو) کاربرد دارند، از اتانول استفاده می‌شود (۲۷). برخی پژوهشگران موثر بودن حصول و استخراج ترکیبات پلی فنولیک از طریق استخراج حلال اتانولی با افزودن نسبت‌های متفاوت آب به

۲-۲-۴- تعیین میانگین اندازه ذرات، شاخص پراکندگی ذرات، شاخص بس پاشیدگی و پتانسیل زتا به منظور مطالعه اندازه ذرات نمونه‌ها از دستگاه پارتیکل سایزر استفاده شد. فرمول حامل‌های لیپیدی نانو ساختار بعد از یک شبانه روز نگهداری در دمای محیط، در بافر فسفات رقیق تا غلظت رقیق شد، به طوری که غلظت فاز لیپیدی به ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر رسید. سپس اندازه ذرات و شاخص بس پاشیدگی به وسیله طیف‌سنجی همبستگی فوتونی با دستگاه آنالیز کننده اندازه ذرات در زاویه ۹۰ درجه و دمای محیط اندازه‌گیری شد. همچنین بار الکتریکی نانوذرات نیز به وسیله این دستگاه تعیین شد (۱۲). بعد از مشخص شدن نمونه بهینه، تست شاخص بس پاشیدگی و پتانسیل زتا برای نمونه بهینه انجام شد.

### ۲-۲-۵- بازدهی ریزپوشانی

بازدهی ریزپوشانی نسبت ماده ریزپوشانی شده درون نانو-ذرات به کل ماده اضافه شده به فاز لیپیدی است. در این تحقیق میزان ریزپوشانی اولئوروپتین با استفاده از دستگاه HPLC مشخص و محاسبه گردید (۲۲).

### ۲-۲-۶- آزمون تعیین فازها و ساختار مواد در فرمول بهینه

این تکنیک با استفاده از تفرق پراش اشعه X توسط دستگاه پراش اشعه  $X^3$  انجام می‌شود. به منظور تشخیص ساختار کریستالی و یا آمورف نانوذرات، الگوهای X-RD توسط دستگاه پراش اشعه X مشخص می‌شوند، جمع‌آوری اطلاعات با استفاده از آنود مس و ولتاژ مونو کروماتور ۴۰ کیلو ولت انجام می‌شود. الگوهای انکسار در دامنه  $2\theta \leq 80^\circ$  با استفاده از اسکن مداوم انجام می‌گیرد (۳۱).

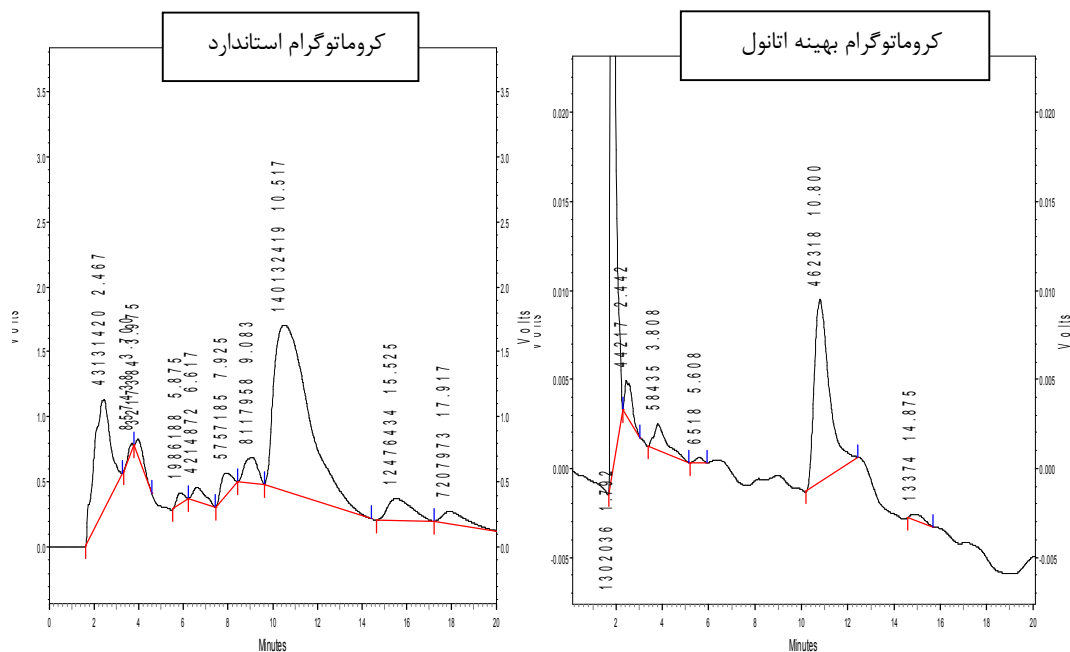
### ۲-۲-۷- آزمون بررسی ساختار سطحی فرمول بهینه با FE-SEM

ویژگی‌های مورفولوژی نانوذرات فریزدرای شده با استفاده از FE-SEM تعیین شد. یک قطره از نانوذره لیوفیلیزه به

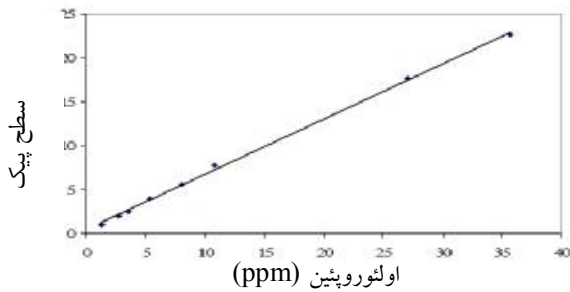
<sup>3</sup>. X-ray Powder Diffraction (XRD)

بیشترین میزان جذب را در ماکسی موم یا بیشینه مختص به اولئوروپتین (۲۵۴ نانومتر) داشتند. پس از بررسی کروماتوگرام های حاصل از بررسی عصاره های حاصل، کروماتوگرام بهینه (شکل ۱) حاصل شد.

این حلال، را گزارش نمودند (۸، ۳۸). در این تحقیق پس از بررسی میزان غلظت حلال های اتانول و آب در دماهای مختلف مشخص شد که عصاره مستخرج با حلال های اتانول- آب به ترتیب از چپ به راست با نسبت های ۷۰:۳۰



شکل ۱- کروماتوگرام های حاصل از بررسی اولئوروپتین خالص (نمونه استاندارد) و عصاره برگ استخراج شده با حلال های اتانول و آب



شکل ۲- منحنی کالیبراسیون برای اندازه‌گیری کمی اولئوروپتین توسط دستگاه HPLC

بعد از تهیه پودر برگ زیتون و استخراج با حلال‌ها، حدود ۱ گرم پودر عصاره برگ از ۱۰ گرم پودر برگ زیتون حاصل شد. بعد از رسم گراف استاندارد (شکل ۲) و به دست آوردن منحنی استاندارد معادله خط (معادله ۱) حاصل شد و در ادامه نتایج حاصل از کروماتوگرام‌ها و گراف و معادله استاندارد (جدول ۲) ارائه شده است.

$$Y = 630995X + 448993$$

$$R2 = 0.9987$$

جدول ۲- نتایج حاصل از آنالیز اولئوروپتین در برگ زیتون واریته خرم‌آبادی

نام نمونه	انتگرال سطح زیر پیک	اولئوروپتین (میلی-گرم بر گرم)	درجه خلوص	درصد خلوص
اتانول:آب	۱۴۰۱۳۲۴۱۹	۲۲۱.۳۷۰	۰.۲۲۱۳۷۰	۲۲.۱۳۷۰

منجر به بهبود استخراج عصاره برگ زیتون و کیفیت عصاره حاصل می‌شود؛ با این وجود ترکیب اتانول یا متانول با آب منجر به افزایش ترکیبات فنلی و کیفیت عصاره حاصل می‌شود، که با نتایج حاصل در این تحقیق همخوانی داشت (۱۵). هاشمی و همکاران (۱۳۸۷) جهت استخراج عصاره برگ زیتون از واریته‌های کشت شده در مرکز تحقیقات کشاورزی خرم‌آباد گزارش نمودند که با استفاده از حلال-های اتانول-آب به ترتیب به نسبت ۷۰ به ۳۰ در دمای ۴۰ به مدت ۳۰ دقیقه در اولتراسونیک، می‌توان پودر عصاره‌ای سرشار از اولئوروپتین استخراج نمود. همچنین گزارش نمودند که اولئوروپتین در ارقام مختلف زیتون دارای تنوع زیادی بوده به طوری که این مقدار در رقم کالامون ۱۱۲.۹ میلی‌گرم/گرم و برای رقم سویلانا ۲۳۵.۷ میلی‌گرم بر گرم بود و اختلاف کاملاً معنی‌داری بین مقدار اولئوروپتین ارقام مختلف زیتون وجود داشت (۶). بنابراین روش بهینه مذکور، به دلیل راندمان بالای عصاره برگ زیتون، حضور اولئوروپتین بالا و ایمن بودن حلال کاربردی در صنعت غذا و دارو، جهت ادامه تحقیق به کار گرفته شد. جبار الحمد (۲۰۱۴) با بررسی تاثیر ترکیب الکل-آب و باز-آب جهت استخراج عصاره برگ زیتون گزارش نمود ترکیب دو سیستم حلال مذکور

در این بخش از تحقیق، روشی نسبتاً سریع جهت استخراج اولئوروپتین ارائه گردید. با استفاده از برنامه گرادیان شویشی به کار رفته و رقیق‌سازی نمونه جداسازی مناسبی برای آنالیز حاصل شد. این نتایج با مشاهدات سایر محققین همخوانی داشت (۲، ۶، ۹، ۲۴، ۱۰، ۲۹). همانطور که در نتایج مشخص شد در این پژوهش کروماتوگرام پودر عصاره برگ زیتون حاصل از مخلوط حلال‌های اتانول-آب بالاترین میزان اولئوروپتین را دارا بود. همچنین استاموفولوس و همکاران (۲۰۱۴) با بررسی نسبت‌های متفاوت از اتانول و آب (۲۰، ۴۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰) گزارش نمودند که بیشترین ترکیبات فنولی حاصل از استخراج حلال اتانول-آب زمانی حاصل می‌شود که نسبت اتانول به آب به ترتیب ۷۰ به ۳۰ (۷۰:۳۰) باشد (۳۲)، که با نتایج حاصل در این پژوهش کاملاً همخوانی و مطابقت داشت. بنابراین این روش به دلیل حضور اولئوروپتین بالا و ایمن بودن حلال‌های کاربردی در صنعت غذا و دارو، جهت ادامه تحقیق به کار گرفته شد. جبار الحمد (۲۰۱۴) با بررسی تاثیر ترکیب الکل-آب و باز-آب جهت استخراج عصاره برگ زیتون گزارش نمود ترکیب دو سیستم حلال مذکور

## ۳-۲-آزمون پراکندگی دینامیکی نور

## ۳-۲-۱- اندازه گیری میانگین قطر ذرات، شاخص

## پراکندگی ذرات و تعیین پتانسیل زتا

اندازه گیری اندازه ذرات یکی از مهم ترین تکنیک های مشخصه ای جهت تعیین و تأیید تولید نانوذرات می باشد. همچنین پتانسیل زتا اندیکاتوری از میزان دفع بار بین ذرات با بار مشابه در فرمولاسیون و یا به عبارتی پایداری ذرات را نشان می دهد. در جدول ۴، میانگین قطر ذرات، PDI، پهنای، میزان گسستگی و قطع شدن منحنی نمایش داده می شود. همانطور که در جدول ۴ مشاهده می شود فرمول با کد ۵ و ۴ به ترتیب دارای بیشترین و کمترین میانگین قطر ذرات هستند؛ با این وجود به دلیل نامعقول بودن اندیس پراکندگی ذرات و همچنین نامناسب بودن اندازه ذرات، فرمول با کد ۱ با میانگین قطر ذرات ۱۲۱.۹ نانومتر و اندیس شاخص پراکندگی ۰.۱۵۳ به عنوان مناسب ترین فرمول انتخاب گردید. فرمول با کد ۱ به طور معقول به دلیل تفاوت کمتر در اندازه ذرات، دارای یکنواختی بیشتر و سطوحی نرم تر بود. همچنین از نمودار عریض و پهنی نیز برخوردار بوده و گسستگی آن در مقادیر بالا رخ می دهد (مقدار Intercept). همچنین بین نمونه های حاضر فرمول با کد ۲ تشابه زیادی با فرمول با کد ۱ داشت با این وجود تفاوت بسیار معنی داری مشاهده شد. شه و همکاران (۲۰۱۴) گزارش نمودند که هر چقدر میزان امولسیفایر بیشتر باشد اندازه ذرات و شاخص پراکندگی ذرات نیز کمتر خواهد بود و میزان لیپید تأثیری در اندازه ذرات ندارد. که با نتایج حاضر مطابقت داشت (۳۰) اما مطلب عدم تأثیر لیپید بر اندازه ذرات با نتایج حاصل در این پژوهش مغایرت داشت.

میناردس و همکاران (۲۰۰۶) در بررسی آنالیز حرارتی نانوذرات کوانتل پلی لاکتید-کو-گلایکولید<sup>۴</sup> گزارش کردند که هر چقدر اندازه ذرات ریزتر باشد میزان کارایی ریزپوشانی بیشتر خواهد بود (۲۳) که با نتایج حاصل در این پژوهش همخوانی داشت. در رابطه با شاخص پراکندگی ذرات در نانوحامل های لیپیدی، احتمال می رود افزایش اندازه ذرات به دلیل به کار بردن مقدار بیشتر ذرات بزرگ بودر عصاره برگ زیتون در فرمول و یا تجمع ذرات نانوحامل چرب به دلیل تمایل ذرات چربی به تشکیل زنجیره باشد. در رابطه با پتانسیل زتا همانطور که در جدول ۵، قابل مشاهده است میزان پتانسیل زتا ۴۳.۳- میلی ولت می باشد که میزان دفع ذرات و پایداری نانوذرات را در شرایط نگهداری نشان می دهد. در این رابطه شه و همکاران (۲۰۱۴) گزارش نمودند که هر چقدر میزان امولسیفایر بیشتر باشد پتانسیل زتای ذرات نیز بیشتر خواهد بود که یک فاکتور مثبت به شمار می رود و میزان لیپید و امولسیفایر بر پتانسیل زتا و یا به عبارتی بر پایداری فیزیکی ذرات تأثیر دارد (۳۰). مارتین و همکاران (۲۰۱۲) گزارش نمودند که سورفاکتانت های غیر یونی علی رغم داشتن پتانسیل زتای کمتر، تمایل به پوشش تقریباً کامل نانوذرات دارد و پایداری استریک بیشتر، و پایداری الکترواستاتیک کمتر مسئول چنین رفتاری می باشد. سطح پوششی نانوذرات توسط امولسیفایر های غیر یونی تحریک الکتروفوریتیک نانوذرات را کاهش می دهد، بنابراین ذرات پتانسیل زتای کمتری خواهند داشت. در نهایت این که اندازه گیری پتانسیل زتا فاکتور مناسبی برای بهینه سازی و انتخاب فرمول مناسب نانوذرات نمی باشد (۲۵).

<sup>4</sup>. Poly-lactide-co-glycolide



جدول ۴- جدول مقادیر ویژگی‌های فیزیکی مهم در تعیین بهترین نوع فرمولاسیون

کد فرمولاسیون	میانگین قطر ذرات (نانو)	قطر ذرات غالب ذرات (نانو)	PDI	Intercept	پهنا (نانومتر)	شدت (درصد) Intensity
کد ۱	۱۲۰/۹	۱۱۱.۵	۰.۲۰۲	۰.۹۱۹	۳۲.۳۶	۱۰۰
کد ۲	۱۲۱/۹	۸۸.۷۲	۰.۱۵۳	۰.۹۲۲	۱۷.۵۳	۱۰۰
کد ۳	۳۸۲/۶	۱۱۵.۳	۰.۴۲۸	۰.۸۴۸	۱۶.۰۸	۱۰۰
کد ۴	۳/۴۱۶	۰.۰۰	۰.۶۳۸	۱.۷۷	۰	۰
کد ۵	۴۰۰/۴	۱۳۴.۱	۰.۴۳۵	۰.۹۱۵	۲۳.۹۵	۸۵.۸

جدول ۵- تعیین پتانسیل زتا و شاخص بس پاشیدگی فرمول بهینه نانوذره

فرمول	ویژگی‌ها	پتانسیل زتا (میلی‌ولت)	انحراف زتا (میلی‌ولت)	قابلیت هدایت/ رسانایی (mS/cm)	ویسکوزیته (سانتی پواز)	سطح (درصد)	پهنا (میلی‌ولت)
فرمول ۰.۰۵ درصد		-۴۳/۳	۸/۳۴	۰/۰۶۴۷	۰/۸۸۷۲	۱۰۰	۸/۳۴

در این بخش از تحقیق با آزمون و خطا مشخص شد پارامترهای فرآیند از جمله سرعت (سرعت پروب هموژنایزر، سرعت ترکیب شدن مواد و ..)، ولتاژ دستگاه، مدت زمان هموژنایزر، مدت زمان اولتراسونیک، نوع اولتراسونیک (حمام یا پروب)، و همچنین مقدار ماده هسته-ای افزوده شده به فرمولاسیون نانوحامل و نوع پلیمرهای به کار رفته در فرمول، از جمله عوامل موثر در اندازه ذرات نانوحامل‌ها، و همچنین میزان بارگیری یا محصور شدن ماده هسته‌ای در نانو حامل‌ها می‌باشد.

### ۳-۳- آزمون فازها و ساختار مواد کریستالی

از جمله روش‌های آنالیز و شناسایی مواد پراش اشعه ایکس می‌باشد. دستگاه XRD جهت شناسایی ساختمان داخلی بلورها استفاده می‌شود و اساس کار آن پراش پودر ماده مورد نظر است. وجود تعداد زیادی از بلورهای ماده در پودر آن باعث می‌شود که صفحات مختلف کریستالی به طور تصادفی در زوایای متفاوت تحت تاثیر اشعه قرار گرفته

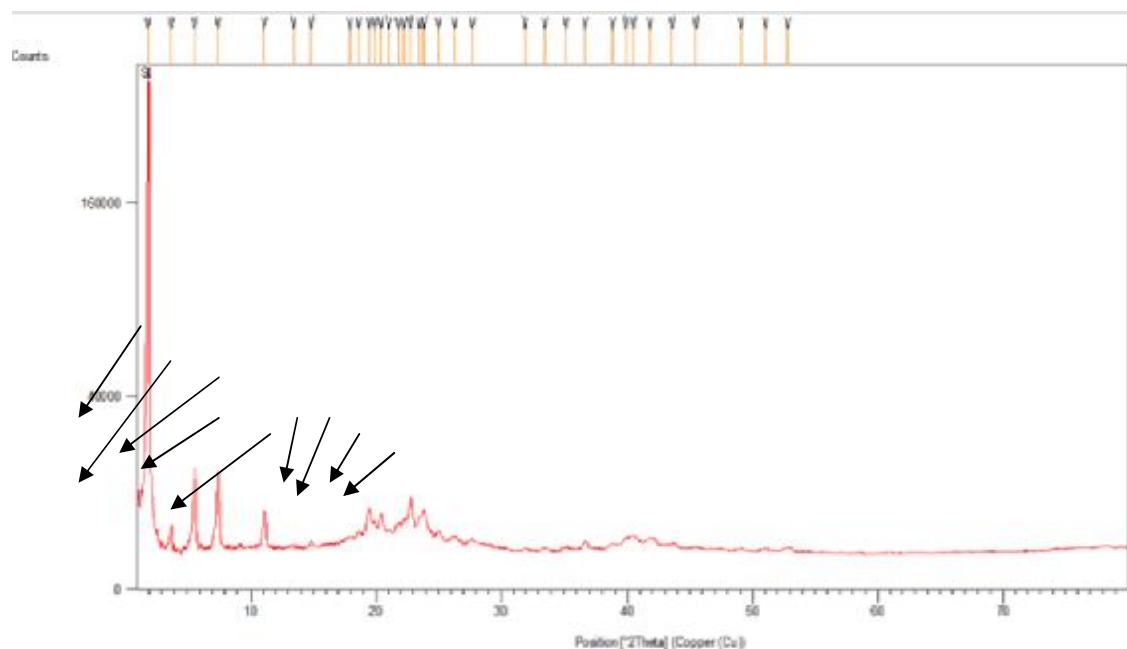
و شدت پراش آنها اندازه‌گیری شود. در این تست، هدف بررسی و تشخیص ساختار کریستالی و یا آمورف بودن نانوذرات بود. دیفرکتوگرام دستگاه پراش اشعه ایکس ساختار کریستالی را در نانو حامل‌های لیپیدی نشان می‌دهد (شکل ۳). ساختار کریستالی به ویژگی‌های پلیمری (وزن مولکولی) (۱۴) پارامترهای فرآیند (ولتاژ و سرعت به کار برده شده)، و حلال (سرعت تبخیر حلال و واکنش حلال-پلیمر) (۱۴)، و احتمالاً زمان ترکیب کردن مواد با یکدیگر بستگی دارد (۱۴). کورد و همکاران (۲۰۱۷) نتایج مشابهی را در ساختار کریستالی نانو فیبرهای (حاوی موسیلاژ دانه‌ای باسیل به عنوان ماده جدید هیدروکلوئیدی و پلی وینیل الکل به عنوان ماده کمک کننده) گزارش دادند (۱۹)، که با نتایج حاضر در این پژوهش مطابقت داشت. همانطور که در منحنی پراش اشعه ایکس نانوحامل (شکل ۳) مشاهده می‌شود نانوحامل‌ها با ساختار لیپیدی دارای پیک‌های فراوان با ارتفاع و طول متفاوتی می‌باشند که ۹ پیک کریستالی نشان

حضور ترکیبات متنوع موجود در ساختار نانوحامل (اسید لینولئیک، روغن سویا، گلیسرول مونو استئارات و لیستین) می باشد. از ابتدا تا انتهای منحنی، میزان کریستالیزاسیون کاهش پیدا کرده است. این پدیده ممکن است به سبب تلفیق ترکیب فعال زیستی (ترکیبات فنولی) در میان بخش-هایی از شبکه بلوری چربی باشد، که منجر به نقص بیشتر در ساختار کریستالی شده و در ساخت آن احتمال بیشتری وجود دارد که اجزاء فعال طی نگهداری محبوس باقی بمانند (۲۶). کورد و همکاران (۲۰۱۷) نتایج مشابهی را در ساختار کریستالی نانو فیبرهای (حاوی موسیلاژ دانه ای باسیل به عنوان ماده جدید هیدروکلئیدی و پلی وینیل الکل به عنوان ماده کمک کننده) گزارش دادند (۱۹)؛ که با نتایج حاضر در این پژوهش مطابقت داشت.

### ۳-۴-آزمون بررسی تعیین میزان کریستالینیتی نانو ذرات حاوی عصاره برگ زیتون

همچنین پس از تشخیص کریستالی بودن نانو ذره مشخص شد که میزان کریستالینیتی حامل های لیپیدی نانو ساختار ۵۲ درصد می باشد (شکل ۳) که نشان از کیفیت بالای شرایط تهیه نانوحامل و انتخاب مناسب مواد تشکیل دهنده نانوحامل می باشد.

داده شده در شکل ۳ در زاویه  $2\theta$ ، نشان دهنده تشکیل پیوندهای قوی و محکم درون و بین مولکولی هیدروژنی و ساختار کریستالی منظم می باشد. در این منحنی بازتاب هایی در  $21.82$  و  $23.49$  فاصله های کوتاه زنجیره های اسیدهای چرب را به ترتیب در  $0.43$  و  $0.30$  نشان می دهد که نوعی ساختار پلی مورف متا استیل اورترومبیک  $\beta'$  می باشند (۱۶، ۳۵). همچنین پیک های ظریف و کوتاه مشابهی در طول منحنی نانوحامل وجود دارد که برخی از این پیک ها در فاصله کوتاه  $3.2$  تا  $4.9$  می باشد (۱۷، ۳۵) که بر اساس نتایج ویس و همکاران (۲۰۰۸) نمایانگر پلی مورف  $\beta'$  می باشد. به طور کلی مقادیر فواصل کوتاه (یا به عبارتی پیک) در انتهای منحنی کاهش می یابد و با گذشت زمان، شدت انعکاس پیک ها (طول یا ارتفاع) کاهش می یابد (۳۵). پیک های عریض تر و پهن تر در نتیجه ساختار کریستالی منظم کم تر، و نقص در کریستال می باشد (۱۶)، و شدت کم تر نشان می دهد که کریستالینیتی کاهش یافته است (۲۱). همچنین در منحنی پیک هایی در  $19.452$  و  $19.903$  درجه یافت شد که به ترتیب مسئول فواصل کوتاه  $0.44$  و  $0.21$  نانومتر می باشند که نمایانگر تشکیل جزئی ساختار پلی مورف تری کلینیک اورترومبیک  $\beta_i$  می باشد (۱۵). تفاوت در نوع پلی مورف و کریستالی در نانوحامل به



شکل ۳- منحنی بررسی ساختار بلوری نانوذرات با دستگاه XRD

ای، پایینی بوده که نشان از کریستالینیتی مناسب و تبلور قوی می‌باشد. همچنین زنجیره‌های لیپیدی دارای ساختاری چسبنده، جداره سالم، کروی، یکنواخت و بدون شکاف، و بدون چروکیدگی در جداره می‌باشد که این خصوصیات بیان‌کننده ویژگی مناسب پودرهای تهیه شده به روش خشک کردن تصعیدی، کاربرد مناسب این روش برای تحقیقات در سطح نانو؛ و همچنین کارایی بالای این غلظت در نانوحامل‌های لیپیدی با خواص فیزیکوشیمیایی مطلوب و جریان‌پذیری مناسب می‌باشد. کروی بودن ذرات لیپیدی در ساختار زنجیره مانند حامل‌های لیپیدی باعث می‌شود این ذرات بیشترین توانایی را جهت آزادسازی کنترل شده و محافظت از ماده هسته‌ای محبوس شده داشته باشند زیرا اشکال کروی دارای طولانی‌ترین مسیر جهت حرکت هسته در نانو ذره و کمترین سطح تماس با محیط آبی فاز پراکنده نسبت به سایر اشکال نانوذرات می‌باشد (۴، ۱۳) با توجه به تصویر نانوحامل شاهد و عصاره برگ زیتون، به راحتی می‌توان حضور عصاره برگ زیتون محصور شده در نانوحامل حاوی عصاره برگ زیتون مشاهده نمود. در رابطه با اندازه-گیری اندازه ذرات با دستگاه FE-SEM همانطور که ملاحظه می‌شود به طور تصادفی چند نانوحامل انتخاب و

### ۳-۵-آزمون بررسی ساختار سطحی با میکروسکوپ

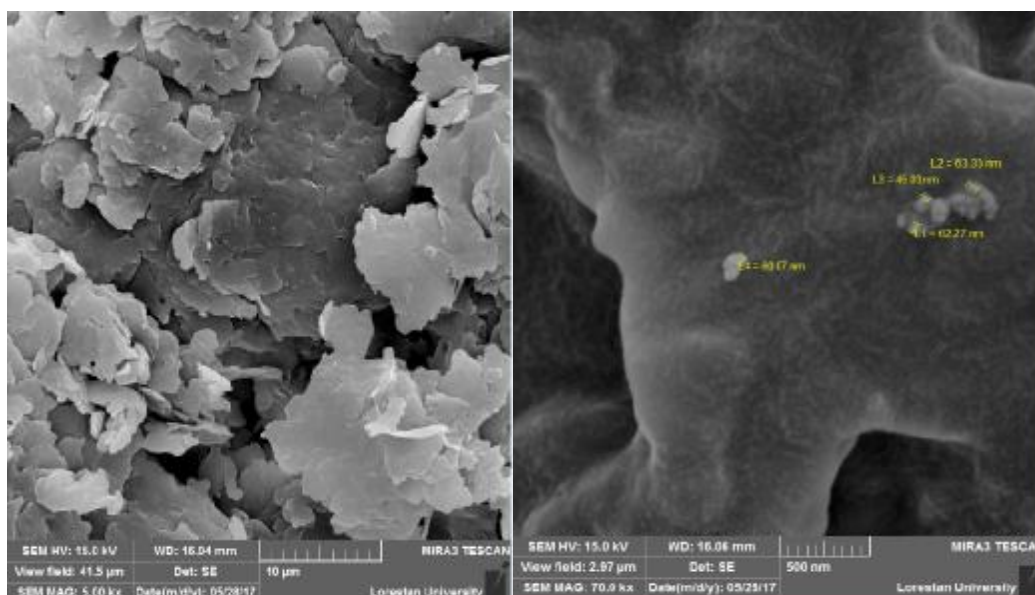
#### الکترونی روبشی گسیل میدانی<sup>۶</sup>

از جمله روش‌های آنالیز و شناسایی مواد استفاده از FE-SEM می‌باشد. مورفولوژی نانوحامل‌های لیپیدی با دستگاه FE-SEM انجام شد. در این تست، هدف بررسی ساختار نانوحامل‌ها و بررسی اندازه ذرات با استفاده از این دستگاه بود. همانطور که در اشکال ۴، ۵ و ۶ مشاهده می‌شود تصاویر نانوحامل شاهد، عصاره برگ زیتون و نانوحامل حاوی عصاره برگ زیتون با دو بزرگنمایی ۱۰ میکرون و ۵۰۰ نانومتر درج شده است. با توجه به اشکال ارائه شده می‌توان مشاهده نمود که ذرات حامل‌های لیپیدی نانوساختار دارای ساختار صفحه‌ای و یا پولکی بسیار منظم و زیبایی می‌باشند. همانطور که مشاهده می‌شود ابعاد ذرات نشان داده شده در اشکال میکروسکوپ الکترونی ذیل بسیار بزرگ‌تر از اندازه واقعی و طبیعی نانو با چشم غیر مسلح می‌باشند. در این تصاویر مشخص شد حامل‌های لیپیدی نانوساختار حاصل، دارای ساختار هموزن با زنجیره‌های منظم و پیوسته از ذرات کروی با درصد حفرگی بین ذره-

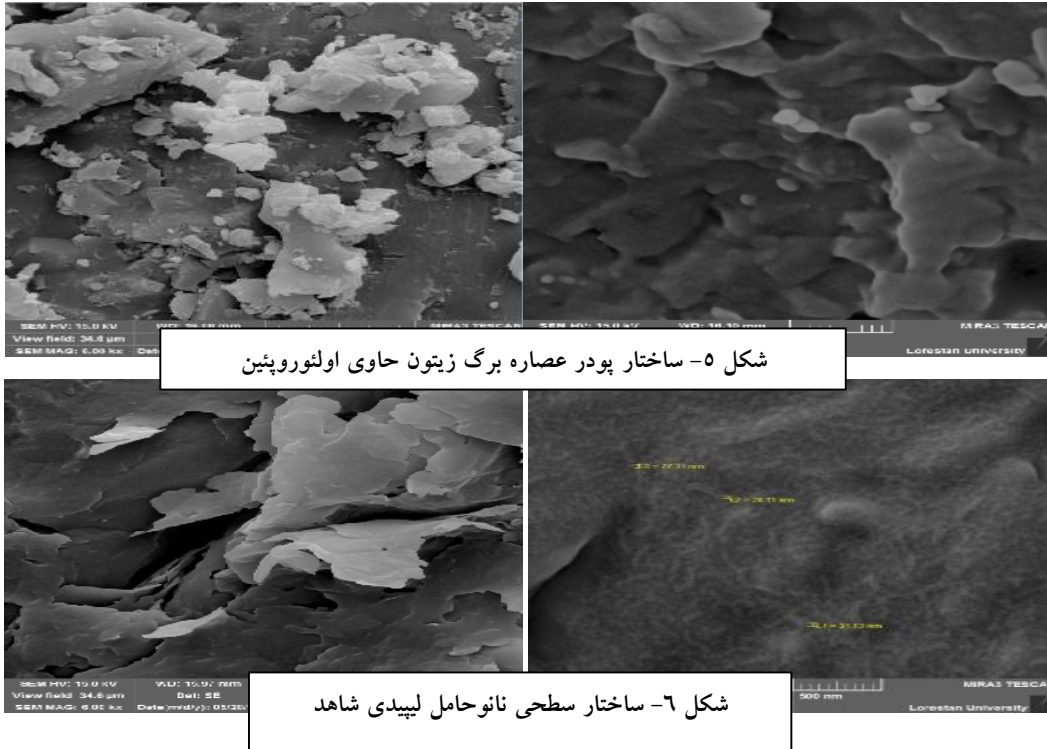
<sup>6</sup>. Field emission scanning electron microscopy (FE\_SEM)

(۱۳۹۲) با تولید نانولیپوزوم‌های ویتامین D و بررسی مورفولوژی آنها گزارش نمودند که نانوذرات، دارای ساختار متخلخل و بهم چسبیده‌ای هستند که در اثر قرارگیری سریع اجزاء تشکیل دهنده در اثر فرایند خشک کردن انجمادی ایجاد شدند، و اندازه ذرات به دلیل به هم چسبیدگی قابل اندازه‌گیری نبودند. هم چنین گزارش نمودند که حضور نقطه‌های سفید در نانوذرات تأییدی بر حضور ویتامین D می‌باشد (۳). پزشکی و همکاران (۱۳۹۳) با بررسی مورفولوژی نانوحامل‌های لیپیدی حاوی ویتامین A پالمیتات، گزارش نمودند که ذرات نانوحامل تقریباً کروی تا بیضوی با اندازه نانو بودند که تأییدی بر اندازه ذرات با استفاده از دستگاه DLS بود (۱). همچنین لاکاتوسا و همکاران (۲۰۱۲) در تصاویر حاصل از حامل‌های لیپیدی حاوی بتاکاروتن با استفاده از میکروسکوپ الکترونی، نانوذراتی با اشکال کروی و متوسط اندازه کم‌تر از ۱۰۰ نانومتر با مناطق کریستالی نامنظم سوزنی شکل مشاهده و گزارش نمودند که این مناطق سوزنی شکل نشان از کریستال‌های بتا بود، که با تشکیل این فرم از کریستال‌ها مقدار بیشتری از ترکیب فعال در ساختار ماتریکس لیپیدی باقی می‌ماند (۲۰).

اندازه قطر ذرات اندازه‌گیری شد. در این تحقیق و بررسی مشخص شد نانوحامل شاهد دارای اندازه‌های ۶۰.۰۷، ۴۵.۰۳، ۶۳.۳۳ و ۶۲.۲۷ نانومتر در حالی که نانو حامل حاوی عصاره دارای اندازه ۲۷.۳۱، ۲۸.۱۱ و ۳۱.۱۳ می‌باشد. خلیل و همکاران (۲۰۱۲) با بررسی مورفولوژی نانوذرات نقره حاوی عصاره برگ زیتون گزارش نمودند که نانوذرات با ماهیت کریستالی دارای توزیع باریکی از اندازه ذرات هستند به عبارتی دارای شاخص پراکندگی ذرات پایینی می‌باشند به طوری که اندازه ذرات آنها از ۲۰ تا ۵۰ نانومتر متغیر می‌باشد که با نتایج حاصل در این پژوهش همخوانی داشت. همچنین خلیل و همکاران در این تحقیق مشخص کردند نانوذرات حاصل درای ساختار منظمی می‌باشند که در برخی نقاط به دلیل تبلور ضعیف یا کریستالینیتی پایین، حضور سنگدانه در شکل نانوذرات مشاهده می‌شود (۱۸). همچنین هاشمی زاده و همکاران (۱۳۹۵) با بررسی ساختار نانوحامل‌های حاوی آویشن شیرازی گزارش نمودند که ذرات حاصل دارای ساختار کروی منظمی هستند و در برخی نقاط که درای ساختار تودره‌ای است ممکن است با گذشت زمان اندازه ذرات با حذف این تجمع ذرات کاهش یابد (۵). محمدی و همکاران



شکل ۴- ساختار نانوحامل‌های لیپیدی بهینه حاوی اولئوروپتین



شکل ۵- ساختار پودر عصاره برگ زیتون حاوی اولئوروپتین

شکل ۶- ساختار سطحی نانوحامل لیپیدی شاهد

#### ۴- نتیجه گیری

نتایج حاصل از کروماتوگرام‌های HPLC نشان داد عصاره حاصل از مخلوط اتانول و آب (۷۰:۳۰)، در دمای کمتر از ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه بالاترین میزان پلی فنل (اولئوروپتین) را دارا می‌باشد. همچنین نتایج حاصل از پراکندگی نور ذرات نانو نشان داد که فرمول ۰.۰۵ پودر عصاره دارای کمترین میانگین اندازه ذرات، کمترین میزان پراکندگی اندازه ذرات نسبت به سایر فرمول‌ها، و پتانسیل زتای مناسبی می‌باشد. با توجه به نتایج حاصل از آزمون دستگاهی X-RD مشخص شد نانوذره حاصل دارای ویژگی کریستالی بوده که نمایانگر پایداری فیزیکی نانوذره حاصل طی انبارداری می‌باشد. همچنین از نتایج X-RD مشخص شد که میزان کریستالینیتی نانوذره حاصل ۵۲ درصد می‌باشد. نتایج حاصل از آزمون دستگاهی FE-SEM نشان داد نانوساختار حاصل دارای ساختار پولک مانند بوده و با وجود ریزپوشانی کردن عصاره، نسبت به نانو حامل شاهد تغییر محسوسی مشاهده نشد.

#### ۵- سپاسگزاری

نویسندگان و پژوهشگران این پژوهش مراتب قدردانی و تشکر را از محمد امیدنژاد، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی خرم‌آباد، لرستان، سرکار خانم مهندس شاهکرمی (آزمایشگاه مرکزی دانشگاه لرستان)، جناب آقای مهندس کامیل جوادی (کارشناس آزمایشگاه مرکزی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی استان کرمانشاه) و سرکار خانم مهندس نظری (کارشناس آزمایشگاه X-RD، دانشگاه صنعت شریف) دارند.

#### ۶- منابع

۱. پزشکی، ا.، قنبرزاده، ب.، همیشه کار، ح.، مقدم، م.، و محمدی، م. ۱۳۹۳. حامل‌های لیپیدی نانوساختار (NLC) حاوی ویتامین A پالمیتات؛ عوامل موثر بر اندازه ذرات، کارایی درون پوشانی و پایداری. فصلنامه علوم و فناوری‌های نوین غذایی، جلد ۵، ۸۲-۶۷.

8. Alonso, E., Bourzeix, M., and Revilla, E. 1991. Suitability of water-ethanol mixtures for the extraction of catechins and proanthocyanidins from *Vitis vinifera* seeds contained in a winery by-product. *seed-science-and-technology*, 19: 545-552.
9. Amiot, M. J., Fleuriet, A., and Macheix, J. J. 1986. Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *Journal Agriculture Food Chemistry*. 34: 823-26.
10. Amiot, M. J., Fleuriet, A., and Macheix, J. J. 1989. Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation, *Phytochemistry. Journal Agriculture Food Chemistry*, 28: 67-73.
11. Baldioli. M., Servili. G., Perretti, G., and Montedoro, F. 1996. Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 73: 1589-1593.
12. Benavent.O., Castillo, J., and Korente, L. 2000. Antioxidant activity of phenolics from *Olea europaea* L. leaves. *Journal Food Chemistry*, 68: 457- 462.
13. Bunjes, H. 2005. Characterization of solid lipid nano-and microparticles. In: *Liposphere in drug targets and delivery*, Edited by Nastruzzi C, Florida, 41-66.
14. de Oliveira Mori, C. L., dos Passos, N. A., Oliveira, J. E., Mattoso, L. H. C., Mori, F. A., Carvalho, A. G., de Souza Fonseca, A., and Tonoli, G. H. D. 2014. Electrospinning of zein/tannin bio-nanofibers. *Industrial Crops and Products*, 52: 298-304.
15. Jabbar Alhamd, A. K. 2014. Improvement extraction of crude compounds from Iraqi olive leaves by applying water-base and alcoholic-base extraction and their biological application. *World journal of pharmacy and pharmaceutical sciences*, 4: 183-200.
16. Jennings, V., and Gohla, S. 2000. Comparison of wax and glyceride solid lipid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 196(2): 219-222.
۲. جایمند، ک.، رضایی، م. ب.، آبروش، ز.، گلی پور، م.، شریفی، م. ۱۳۸۵. استخراج و تعیین میزان ترکیب اولئوروپئین در ۹ رقم زیتون کشت شده در ایستگاه فدک (دزفول). فصلنامه تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، جلد ۲۲، ۷۴-۷۸.
۳. محمدی، م.، قنبرزاده، ب.، همیشه‌کار، ح.، رضایی مکر، ر.، و محمدی فر، م. ا. ۱۳۹۲. ارزیابی ویژگی‌های فیزیکی نانولیپوزوم‌های حامل ویتامین D3 تولید شده به روش هیدراسیون لایه نازک-سونیکاسیون. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، جلد ۴، ۱۷۴-۱۸۸.
۴. ناصری، م.، آروئی، ح.، گل محمدزاده، ش.، جعفری، م. ر.، و نعمتی، ح. ۱۳۹۴. تهیه و بررسی خصوصیات نانوذرات لیپیدی جامد حاوی اسانس آویشن شیرازی با روش هموژنیزاسیون با فشار کششی بالا و امواج فراصوت. فصلنامه گیاهان دارویی، ۱۴۱-۱۳۲.
۵. هاشمی زاده، ص.، قنبرزاده، ب.، و همیشه کار، ح. ۱۳۹۵. بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی و ویژگی‌های فیزیکی حامل‌های لیپیدی نانوساختار حاوی عصاره آویشن شیرازی. فصلنامه فناوری‌های نوین غذایی، جلد ۴، شماره ۱۴، ۱۴۹-۱۴۱.
۶. هاشمی، س. پ.، دلفان، ب.، غیاثوند، ع. ر.، رئیسی، ف.، البرزی، م. ۱۳۸۷. بررسی میزان اولئوروپئین در برگ درختان زیتون کشت داده شده در شهرستان خرم‌آباد. یافته، جلد ۱۲، شماره ۴، ۹۸-۱۰۶.
7. Acosta, N., Sánchez, E., Calderón, L., Córdoba-Díaz, M., Córdoba-Díaz, D., Dom, S., and Heras, A. 2015. Physical Stability Studies of Semi-Solid Formulations from Natural Compounds Loaded with Chitosan Microspheres. *Marine Drugs*, 13: 5901-5919.

26. Müller, R. H., Radtke, M., and Wissing, S. A. 2002. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 242(1-2): 121-128.
27. Naczki, M., and Shahidi, F. 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 41: 1523-1542.
28. Pinelli, P., Romani, A., Vincieri, F., and Mullinacci, N. 1999. *Journal of Agriculture Food Chemistry*, 47: 964-967.
29. Saitta, M., Lo Curto, S., Salvo, F., Di Bella, G., and Dugo, G. 2002. Gas chromatographic-tandem mass spectrometric identification of phenolic compounds in Sicilian olive oils. *Analytica Chimica Acta*, 466: 335-44.
30. Shah, P.R., Eldridge, D., Palombo, E., and Harding, L. 2014. Optimisation and Stability Assessment of Solid Lipid Nanoparticles using Particle Size and Zeta. *Journal of Physical Science*, 25: 59-75.
31. Shendi, P., Yavada, S., and Patil, P. 2014. Development and Characterization of Chitosan Nanoparticles Containing Erthromycin Estolate. *International Journal of Pharmaceutical Applications*, 5: 1-7.
32. Stamatopoulos, k., Chatzilazarou, A., Katsoyannos, E. 2014. Optimization of Multistage Extraction of Olive Leaves for Recovery of Phenolic Compounds at Moderated Temperatures and Short Extraction Times. *Foods*, 3: 66-81.
33. Sze, S., Erickson, D., Ren, L., and Li, D. 2003. Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current-time relationship in electroosmotic flow. *Journal of Colloid and Interface Science*, 261: 402-410.
34. Varshosaz, J., Hassanzadeh, F., Sadeghi, H., and Andalib, S. 2012. Synthesis of octadecylamine-retinoic acid conjugate for enhanced cytotoxic effects of 5-FU using LDL targeted nanostructured lipid carriers.
17. Jennings, V., Thünemann, A.F., and Gohla, S.H. 2000. Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids. *International Journal of Pharmaceutics*, 199(2): 167-177.
18. Khalil, M. H., Ismail, E. H., and El-Magdoub, F. 2012. Biosynthesis of Au nanoparticles using olive leaf extract. *Arabian Journal of Chemistry*, 5: 431-437.
19. Kurd, F., Fathi, M., Shekarchizadeh, H. 2017. Basil seed mucilage as a new source for electrospinning: Production and physicochemical characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 95: 689-695.
20. Lacatusu, I., Badea, N., Ovidiu, O., Bojin, D., and Meghea, A. 2012. Highly antioxidant carotene-lipid nanocarriers: synthesis and antibacterial activity. *Journal of Nanoparticle Research*, 14: 902-918.
21. Liu, C.H., and Wu, C. T. 2010. Optimization of nanostructured lipid carriers for lutein delivery. *Colloids and surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, 353: 149-156.
22. Liu, D., Liu, Z., Wang, L., Zhang, C., and Zhang, N. 2011. Nanostructured lipid carriers as novel for parenteral delivery of docetaxel. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 85: 262-269.
23. Mainardes, R.M., Palmira Daflon Gremião, M., and Evangelista, R.C. 2006. Thermoanalytical study of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 42: 523-530.
24. Malik, N.S.A., and Bradford, J.M. 2006. Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in 'Arbequina' olives. *Scientia Horticultural*, 110: 274-78.
25. Martins, S. et al. 2012. Multivariate design for the evaluation of lipid and surfactant composition effect for optimisation of lipid nanoparticles. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45: 613-623.

- European Journal of Medicinal Chemistr*, 54: 429-438.
35. Weiss, J., Decker, E. A., McClements, D. J., Kristbergsson, K., Helgason, T., and Awad, T. 2008. Solid lipid nanoparticles as delivery systems for bioactive food components. *Food Biophysics*, 3(2): 146–154.
  36. Yao, M., McClements, D.J., Xiao, H. 2015. Improving oral bioavailability of nutraceuticals by engineered nanoparticle-based delivery systems. *Current Opinion in Food Science*, 2: 14-19.
  37. Yao, M., Xia, H., and McClements, D.J. 2014. Delivery of lipophilic bioactivities: assembly, and reassembly of lipid nanoparticles. *Annual Review of Food Science and Technology*, 5: 53-81.
  38. Yilmaz, Y., and Toledo, R.T. 2006. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *Journal of Food Composition and analysis*, 19: 41–48.



(Original Research Paper)

## Designing and Study the Physical Properties of Nano-Structure Lipid-Bearing Carriers Containing Oleuropein

Mansooreh Soleimani Fard<sup>1</sup>, Alireza Sadeghi Mahoonak<sup>2\*</sup>, Mohammad Ghorbani<sup>2</sup>, Ruhollah Heydari<sup>3</sup>, Khosrow Azizi<sup>4</sup>, Asghar Sepahvand<sup>5</sup>, Seid Peyman Hashemi<sup>6</sup>

1-Ph.D Student of Food Science and Technology, Food Chemistry, Agricultural Sciences and Natural Resources University, Gorgan, Iran.

2- Associate Professor, Department of food science and Technology, Agricultural Sciences and Natural Resources University. Gorgan, Iran.

3-Associate Professor, Razi Herbal Medicines Research Center, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran.

4- Associate Professor, Department of Ecology, Agricultural Sciences and Natural Resources University, Khorramabad, Iran.

5- Associate Professor, Department of Parasitology, Razi Herbal Medicines Research Center, Lorestan University of Medical Sciences, Khorramabad, Iran.

6- Professor, Department of Chemistry, Faculty of Basic Sciences, Lorestan University, Khorramabad, Iran

Received:22/06/2017

Accepted: 12/11/2017

### Abstract

Oleuropein has antioxidant properties and is the most abundant phenolic compounds in olive leaves. Extracting and measuring the amount of oleuropein from the olive leaves as a rich source is very valuable. On the other hand, the encapsulation of this compound is an effective idea to maintain its unique characteristics during storage. In this study, nanostructured lipid carrier (NLC) materials were prepared with wall materials (glycerol monostearates, soybean oil, linoleic acid), emulsifiers (lecithin) and nuclei (oleuropein), and the physical properties of the nanostructured product were investigated. To optimize the extraction of oleuropein with ethanol solvents: water (70:30) by HPLC, determining the particle size, particle dispersion index, and the zeta potential of the nano-carrier by the zeta-sizer, to determine the crystalline and amorphous structure, as well as the crystallinity of the nano-carriers from the XR- D, and finally, FE-SEM was used to study the surface structure of nanostructures. The results of the chromatograms showed that the optimal method for extraction of oleuropein with ethanol and water (70:30) solvents was in a steam bath with a temperature of 40 ° C for 30 minutes containing 221.370 mg / g of oleuropein and a purity of 18.137 oleuropein. Also, the results of the light dynamic dispersion test showed that the optimal formula had an average particle size of 121.9 nm, a scattering index of 0.153, and a zeta potential of -43.3 mV. The results of the study of the structure and phases of the optimal nanocarriers lipid structure showed that the lipid nanocarriers has a general structure of the plate or polka like a microstructure consisting of spherical units. This nanostructure contains a crystalline structure with a crystallinity content of about 52%.

**Keywords:** Nanostructured Lipid Carriers, Encapsulation, HPLC, FE-SEM, XRD, DLS.

---

\*Corresponding Author: : [sadeghi.gau@gmail.com](mailto:sadeghi.gau@gmail.com)