



تعیین اولئوروپین برگ زیتون با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا و بهینه- سازی تولید حامل‌های لیپیدی نانوساختار حاوی آن

منصوره سلیمانی فرد^{۱*}، علیرضا صادقی ماهونک^۲، روح الله حیدری^۳، اصغر سپه‌وند^۴ و سعیدفرهادی^۵

تاریخ دریافت: ۹۶/۱۱/۱۶ تاریخ پذیرش: ۹۷/۲/۱۸

^۱ دکتری علوم و صنایع غذایی، شیمی مواد غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان
^۲ دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان
^۳ دانشیار گروه شیمی تجزیه، مرکز تحقیقات داروهای گیاهی رازی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی لرستان، خرم آباد
^۴ دانشیار گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی لرستان، خرم آباد
^۵ دانشیار گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه لرستان، خرم آباد
*مسئول مکاتبه: Email: mansooresoleimani14@gmail.com

چکیده

زمینه مطالعه: اولئوروپین فراوان‌ترین نوع از ترکیبات فنولی برگ زیتون است و اثرات درمانی آن به عنوان یک آنتی اکسیدان قوی به خوبی شناخته شده است. استخراج اولئوروپین از برگ زیتون به عنوان یک منبع غنی از این ترکیب، بسیار ارزشمند است. از طرفی درون پوشانی این ترکیب روشی موثر جهت حفظ ویژگی‌های آن طی نگهداری است. **روش کار:** در مطالعه‌ای عصاره حاوی اولئوروپین، مستخرج از برگ‌های زیتون، به شکل نانوحامل‌های لیپیدی تهیه گردید. استخراج عصاره با ترکیب حلال‌های اتانول: آب (۷۰:۳۰) در حمام آب گرم (دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه) با استفاده از دستگاه HPLC انجام شد. با طراحی ۱۵ فرمول برای نانوحامل لیپیدی، اندازه ذرات و کارایی درون‌پوشانی به ترتیب توسط دستگاه زتاسایزر و اسپکتروفوتومتر تعیین شد. بعد از تشخیص فرمولاسیون بهینه، پتانسیل زتا نیز با استفاده از دستگاه زتاسایزر ارزیابی شد. **نتایج:** نتایج حاصل نشان داد که روش استخراج اولئوروپین از برگ زیتون با حلال‌های اتانول و آب (۷۰:۳۰) حاوی ۲۲۱/۳۷ میلی‌گرم بر گرم اولئوروپین با درصد خلوص اولئوروپین ۲۲/۱۳۷ می‌باشد. همچنین نتایج حاصل از آزمون پراکندگی دینامیکی نور نشان داد که فرمول بهینه دارای میانگین اندازه ذرات ۱۲۱/۹ نانومتر، شاخص پراکندگی ۰/۱۵۳، پتانسیل زتای ۴۳/۳- میلی‌ولت می‌باشد. همچنین نتایج حاصل از بازدهی درون‌پوشانی نشان داد نانوحامل دارای دارای ۸۲ درصد اولئوروپین درون‌پوشانی شده می‌باشد. در نهایت این که نانوحامل با کمترین پودر عصاره برگ زیتون، دارای بالاترین کارایی درون‌پوشانی اولئوروپین، کمترین شاخص پراکندگی و اندازه‌ذره‌ای مناسب بود.

واژگان کلیدی: حامل لیپیدی نانوساختار، اولئوروپین، کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا، کارایی درون‌پوشانی

مقدمه

پلی‌فنول‌ها ترکیباتی با ویژگی آنتی‌اکسیدانی بالا هستند که قادرند رادیکال‌های آزاد را جذب نمایند (کریس اترتون و همکاران ۲۰۱۱). فنول‌های زیتون گروهی از بیومولکول‌ها هستند که فعالیت‌های بیولوژیکی عمده‌ای از خود نشان می‌دهند (گویندا ۲۰۰۶). اولئوروپین؛ استر گلوکوزیدی النویک اسید و هیدروکسی تیروزول؛ جزء اصلی بیوفنول موجود در برگ زیتون است (بالدیولی ۱۹۹۶؛ پینلی و همکاران ۱۹۹۹؛ بنونت و همکاران ۲۰۰۰). این گلوکوزید به شدت تلخ بوده و عامل تلخی زیتون خام و فرآوری نشده می‌باشد (بالدیولی ۱۹۹۶). از جمله معایب این ترکیب تلخی، تجزیه تحت شرایط اسیدی، بازی، نور و دمای بالا و تبدیل به ترکیبات سازنده آن می‌باشد (یوآ و همکاران ۲۰۱۴، ۲۰۱۵) 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 درون‌پوشانی جهت حفاظت ترکیبات فعال و حساس به شرایط نامساعد محیطی و اکسیداسیون، همچنین ثبات دراز مدت بسیار بالا، کنترل بهتر رهایش ترکیبات محصور شده، افزایش زیست دسترسی، پوشش عطر و طعم نامطلوب موجود در مواد غذایی و دارویی به کار می‌رود (یوآ و همکاران ۲۰۱۴، ۲۰۱۵). در ذیل به بررسی برخی پژوهش‌های انجام شده در زمینه نانوذرات اشاره شده است.

چیا و همکاران (۱۳۹۲) با کاربرد نانوکمپلکس‌های ژلان-کازئینات به عنوان حامل اسیدهای چرب امگا سه گزارش کردند که با افزایش غلظت کازئینات از ۰/۱ به ۰/۵ و سپس به یک درصد، اندازه ذرات به صورت پیوسته افزایش یافتند. افزودن صمغ ژلان منجر به کاهش اندازه ذرات گردید. میر علایی و همکاران (۱۳۹۳) به منظور بررسی اثر صمغ عربی و مالتودکسترین بر درون-پوشانی روغن زنجبیل در عصاره چای سبز به روش خشک کن پاششی امولسیون‌هایی با صمغ عربی خالص، مالتودکسترین خالص و مخلوطی از دو ماده دیواره تهیه

نمودند. نتایج نشان داد که با کاهش نسبت صمغ عربی و افزایش مالتودکسترین اندازه امولسیون بزرگتر گردید. خلیل و همکاران (۲۰۱۲) با بررسی موفولوژی 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. 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. لیو و همکاران (۲۰۱۲) نانوحامل‌های لیپیدی (NLC) را به عنوان حامل‌های مناسب مواد مغذی نامحلول در آب، مانند کوآنزیم Q10 (CoQ10)، جهت بهبود زیست دسترسی آن، مورد استفاده قرار دادند. این نانوحامل‌ها به روش همگن‌سازی فشار بالا تهیه شدند. 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 نانوساختارهای لیپیدی (NLC) حاوی اولئوروپین گزارش نشده است، لذا این پژوهش با اهداف استخراج اولئوروپین موجود در عصاره برگ زیتون، بهینه‌سازی تولید حامل‌های لیپیدی نانوساختار حاوی اولئوروپین، و بررسی آزمون‌های فیزیکی این نانوساختارهای لیپیدی شکل گرفته است.

مواد و روش‌ها

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 گردید.

به 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، استونیتریل و آب مقطر) و نمونه استخراجی قبل از استفاده توسط سیستم نگهدارنده فیلتر غشایی ۰٫۴۵ میکرون (مدل Millipore) صاف شدند. شناسایی پیک اولئوروپین با استفاده از مقایسه زمان بازداری (tR) آن با نمونه استاندارد صورت گرفت. از دو حلال بافر استات فسفات ۰/۰۵ مولار (pH=۲/۸) و حلال ب: استونیتریل استفاده شد. سرعت جریان فاز متحرک ۱ میلی‌لیتر بر دقیقه بود، و طول موج آشکارساز ۲۵۴ نانومتر بود (هاشمی و همکاران ۱۳۸۷).

بهینه‌سازی تهیه‌ی نانو حامل‌های لیپیدی به روش همگن‌سازی در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد

پس از طراحی فرمول‌های نانوحامل و بررسی روش‌های مختلف به کار برده شده در مقالات و تغییر در پروتوکول‌های 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 (۶۰-۷۰ درجه سانتی‌گراد) حرارت داده شد. پودر عصاره یا اولئوروپین در آب پراکنده و سپس محلول آبی حاوی عصاره یا اولئوروپین به فاز لیپیدی ذوب شده (لیپید جامد ذوب شده و روغن به همراه امولسیفایر لسیتین) که تحت همزدن یا نیروی برشی زیاد (۵۰۰۰-۲۰۰۰ دور در دقیقه) قرار داشت، به مدت ۱-۱/۵ ساعت به صورت قطره قطره با فاصله زمانی ۱-۲ ثانیه با سمپلر (۱۰۰۰ لاندا) افزوده شد. اندازه ذرات در امولسیون نهایی ابتدا ۱۵ دقیقه در حمام فراصوت (دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد) و سپس ۱۵ دقیقه به وسیله دستگاه فراصوت پروب‌دار (در ۵ سیکل سه دقیقه‌ای با فاصله زمانی ۱ دقیقه، و همچنین بزرگی پاور ۶۰ و فرکانس ۱ هرتز) کاهش یافت (فتحی و همکاران ۲۰۱۳؛ محمدی و همکاران ۱۳۹۲). پس از مراحل مذکور جهت سانتی‌فیوژ نمودن، به هر لوله فالكون

سایر مواد شیمیایی: مواد شیمیایی از جمله اولئوروپین (درجه خلوص ۹۸ درصد)، لسیتین، گلیسرول مونواستئارات (Glycerol monostearate, E471)، 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 خرم آباد و روغن سویای بکر از سوپر مارکت بازار محلی گرگان خریداری شد.

استخراج عصاره از برگ‌های زیتون با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)، و

تعیین غلظت اولئوروپین حاصل از کروماتوگرام‌ها

آب دو بار تقطیر با استفاده از دستگاه Fisons تمام پیرکس تهیه شد. برای استخراج اولئوروپین 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 یکبار بر روی تفاله حاصل از جداسازی عصاره و تفاله، انجام گردید. سپس محلول با عصاره جدا شده در مرحله قبل مخلوط و خشک شد (عصاره در پلیت‌ها و در سایه و دمای آزمایشگاه خشک گردید). 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 تزریق به دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC)^۱ از میکروسرنگ ۲۵ میکرولیتری (شرکت SGE ساخت استرالیا مدل F-LC25) استفاده شد. برای جداسازی و اندازه‌گیری کمی اولئوروپین در نمونه‌های استخراجی از دستگاه HPLC با ستون C-8 مدل Shim-Pack clc-c8 (M) استفاده شد. این دستگاه مجهز

². Retention Time

¹. High-performance liquid chromatography

غلظت فاز لیپیدی به ۱ میلی‌گرم در میلی‌لیتر برسد. سپس اندازه ذرات و پتانسیل زتا به وسیله طیف‌سنجی همبستگی فوتونی با دستگاه آنالیز کننده اندازه ذرات در زاویه ۹۰ درجه و دمای محیط (۲۵ درجه سانتی‌گراد) اندازه‌گیری شد. همچنین بار الکتریکی نانوذرات نیز به وسیله این دستگاه تعیین شد. بعد از مشخص شدن نمونه بهینه، تست پتانسیل زتا برای نمونه بهینه انجام گردید. میانگین قطر حجمی (چاندا و همکاران، ۲۰۱۱):

$$\bar{D}[4,3] = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3}$$

n_i = تعداد ذرات
d_i = قطر میانگین ذرات

شاخص پراکندگی ذرات (همیشه‌کار و همکاران، ۲۰۰۹):

$$PDI = \frac{D(90\%) - D(10\%)}{D(50\%)}$$

D(90%) = قطری که حجم ذرات کوچکتر از آن، ۹۰ درصد حجم کل ذرات موجود در سیستم را تشکیل می‌دهد.

D(50%) = قطری که حجم ذرات کوچکتر از آن، ۵۰ درصد حجم کل ذرات موجود در سیستم را تشکیل می‌دهد.

D(10%) = قطری که حجم ذرات کوچکتر از آن، ۱۰ درصد حجم کل ذرات موجود در سیستم را تشکیل می‌دهد.

بازدهی درون‌پوشانی

با حل کردن ۱۰ میلی‌گرم از فرمول در ۱۰ میلی‌لیتر حلال استونیتریل، سپس بعد از فیلتر شدن با فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر، به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد در داخل حمام فراصوت قرار داده شد، تا ترکیب از فرمول جدا و وارد استونیتریل گردد. محلول حاصل با ۱۰ میلی‌لیتر استونیتریل رقیق شده و سپس به وسیله کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (طول موج ۲۵۴ نانومتر) آنالیز گردید. بعد از محاسبه مقدار حاصل،

(حاوی ۳۵ میلی‌لیتر سوسپانسیون) ۱ سی‌سی اسیدکلریدریک ۱ مولار جهت کمک به ترسیب نانوذرات افزوده شده، سپس طی دو مرحله (به ترتیب، ۳۰ دقیقه در دور ۷۰۰۰ rpm دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، ۱۵ دقیقه در دور ۱۵۰۰۰ rpm در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد) سانتریفوژ صورت گرفت. پس از عمل جداسازی در سانتریفوژ، رسوب که حاوی نانوذره حامل عصاره بود جداسازی شده و توسط خشک‌کن تصعیدی (دمای ۸۰- درجه سانتی‌گراد در فشار ۰/۰۰۱ میلی‌بار به مدت ۲۴ ساعت) خشک شد و پودر نانو حامل‌های لیپیدی حاصل گردید.

بهینه‌سازی غلظت و نسبت مواد در حامل‌های لیپیدی نانو ساختار به منظور تهیه نانوحامل‌های لیپیدی حاوی اولئوروپین، مقادیر مشخصی بر اساس روش one-at-time در نظر گرفته شد (ترکیبات اولئوروپین، گلیسرین مونواستئارات، روغن سویا، اسید لینولئیک، لسیتین و پودر عصاره برگ زیتون به عنوان متغیرهای مستقل در ۳ تا ۴ سطح مورد استفاده قرار گرفتند). 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 لسیتین و پودر عصاره برگ زیتون ۰/۰۷۵ درصد (وزنی/ وزنی) (۱۶/۶۰۲ میلی‌گرم اولئوروپین) در نظر گرفته شد. بعد از آزمون و خطا و اندازه‌گیری میانگین اندازه ذرات و کارایی درون‌پوشانی، فرمولاسیون بهینه نهایی حاصل و نهایتاً آزمون پتانسیل زتا برای فرمول مذکور مورد بررسی قرار گرفت.

تعیین اندازه ذرات، شاخص پراکندگی ذرات و پتانسیل زتا

به منظور تعیین اندازه ذرات نمونه‌ها از دستگاه اندازه‌گیری اندازه ذرات (مدل 30 HS, Nanoseries، ساخت آلمان) استفاده شد. نمونه‌های حامل‌های لیپیدی نانو ساختار بعد از یک شبانه روز نگهداری در دمای محیط، در بافر فسفات رقیق، تا غلظتی رقیق شدند که

نانومتر انتخاب شد. به منظور بهینه‌سازی تولید فرمولاسیون، از روش one-at-time استفاده شد. در جدول ۱ غلظت و نسبت مواد در حامل‌های لیپیدی نانوساختار درج شده است. نتایج اندازه‌گیری میانگین ذرات و شاخص پراکندگی ذرات به منظور رسیدن به فرمول بهینه در قالب ۱۵ فرمول طراحی و به همراه اندازه‌گیری پتانسیل زتای فرمول بهینه یک بار انجام شد. انتخاب بهترین نمونه بر اساس کمترین اندازه‌ی ذره‌ای و کمترین شاخص پراکندگی (در محدوده‌ی $PDI \leq 0.2$) و بیشترین کارایی درون‌پوشانی انجام گردید. جهت تحلیل داده‌های مربوط به بازدهی درون‌پوشانی تیمارها از نرم افزار SPSS 16 و آنالیز واریانس و آزمون مقایسه میانگین‌های دانکن در سطح ۵ درصد انجام شد و رسم نمودار نتایج حاصل با نرم افزار اکسل (۲۰۱۰) انجام شد.

مقدار بازدهی درون‌پوشانی از طریق فرمول ذیل حاصل شد. بازدهی درون‌پوشانی کردن نسبت ماده درون-پوشانی شده درون نانوذرات به کل ماده اضافه شده به فاز لیپیدی است (ورشوساز و همکاران، ۲۰۱۰) در فرمول ذیل، EE کارایی درون‌پوشانی، Wt مقدار اولئوروپین به کار برده شده در نانوحامل اولیه، Wf مقدار اولئوروپین آزاد شده از نانوحامل می‌باشد (سلیمانی فرد و همکاران ۲۰۱۹).

$$EE = \frac{(Wt - Wf)}{Wt} * 100$$

تجزیه و تحلیل آماری

نتایج کروماتوگرام‌های بهینه‌سازی استخراج عصاره برگ زیتون با ۲۵ بار تزریق انجام گردید و بهترین نمونه بر اساس بیشترین غلظت اولئوروپین در طول موج ۲۵۴

جدول ۱- بهینه‌سازی مقدار و نوع ترکیبات موجود در حامل‌های لیپیدی نانوساختار

Table 1- Optimization of the amount and type of compounds in the nanostructured lipid carrier

Formulation Code*	Water	Glycerol monostearate	Linoleic acid	Soybean oil	Lecithin	Olive leaf extracts powder	Oleuropein** (mg)
1	50	1.33	0.1	0.1	0.1	0.1	22.127
2	60	1.33	0.1	0.1	0.1	0.1	22.127
3	120	1.33	0.1	0.1	0.1	0.1	22.127
4	120	0.93	0.2	0.2	0.1	0.1	22.127
5	120	1.00	0.166	0.166	0.1	0.1	22.127
6	120	1.06	0.13	0.13	0.1	0.1	22.127
7	120	1.33	0.1	0.1	0.1	0.1	22.127
8	120	0.93	0.2	0.2	0.02	0.1	22.127
9	120	0.93	0.2	0.2	0.05	0.1	22.127
10	120	0.93	0.2	0.2	0.2	0.1	22.127
11	120	0.93	0.2	0.2	0.3	0.1	22.127
12	120	0.93	0.2	0.2	0.3	0.05	11.0685
13	120	0.93	0.2	0.2	0.3	0.2	44.274
14	120	0.93	0.2	0.2	0.3	0.4	88.548
15	120	0.93	0.2	0.2	0.3	0.5	110.685

* For all formulation 2 percent tween 80 were added

** In this table, the values of oleuropein (mg) are equivalent to the amounts of powdered olive leaf extract (gram) used in each formula (to understand the amount of oleuropein present in the extract of leaf extract).

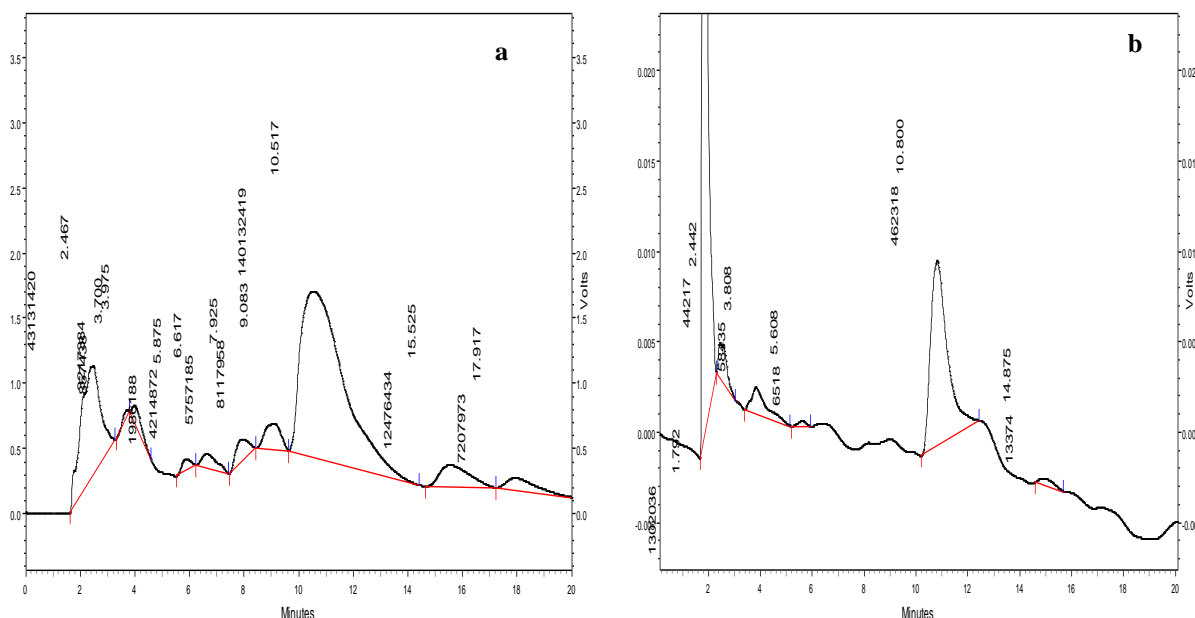
سیستم‌های چند حلالی جهت بهینه‌سازی استخراج و حصول ترکیبات فنولیک از ماتریکس گیاهان استفاده می‌شود. اتانول به عنوان یک ماده سالم (GRAS) طبقه‌بندی شده و به عنوان حلال موثری جهت استخراج ترکیبات

نتایج و بحث

استخراج و تعیین غلظت اولئوروپین حاصل از کروماتوگرام‌ها

در این تحقیق پس از بررسی میزان غلظت حلال‌های اتانول و آب در دماهای مختلف مشخص شد که عصاره مستخرج با حلال‌های اتانول- آب به ترتیب از چپ به راست با نسبت‌های ۷۰:۳۰ بیشترین میزان جذب را در لاندا مکس مختص به اولئوروپین (۲۵۴ نانومتر) داشتند. پس از بررسی کروماتوگرام‌های حاصل از بررسی عصاره‌های حاصل، کروماتوگرام بهینه (شکل ۱) حاصل شد.

فنولیک گزارش شده است، بنابراین برای حصول و بهبود این گروه‌های فیتوشیمیایی، به ویژه زمانی که این ترکیبات برای تولید محصولات نوتراسوتیکال (غذا- دارو) کاربرد دارند، از اتانول استفاده می‌شود (نازک و شهیدی ۲۰۰۶). برخی پژوهشگران موثر بودن حصول استخراج ترکیبات پلی فنولیک از طریق استخراج حلال اتانولی با افزودن نسبت‌های متفاوت آب به این حلال، را گزارش نمودند (آلونسو و همکاران ۱۹۹۱؛ یلماز و تولدو ۲۰۰۶).



شکل ۱- کروماتوگرام‌های حاصل از بررسی اولئوروپین خالص (a) و نمونه استخراج شده با ترکیب حلال‌های اتانول و آب (b)
 Figure 1- Chromatograms obtained from pure oleuropein (a) and extracted sample with ethanol and water solvents (b)

شد و در ادامه نتایج حاصل از کروماتوگرام‌ها و گراف و معادله استاندارد (جدول ۲) ارایه شده است. معادله شماره ۱

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 و به دست آوردن منحنی استاندارد معادله خط (معادله ۱) حاصل

$$Y = 63.9905X + 448993$$

$$R^2 = 0.9987$$

جدول ۲- نتایج حاصل از آنالیز اولئوروپین در برگ زیتون واریته خرم‌آبادی
 Table 2- Results of analysis of oleuropein in olive leaf of Khorramabad variety

Sample	Sub-Courier Integral	Oleuropein (mg/g)	Degree of purity	Purity (%)
Ethanol- water	140132419	221.370	0.221370	22.137

ذرات را دارا بودند. با توجه به بررسی میانگین قطر ذرات، و شاخص پراکندگی ذرات و میزان گسستگی، فرمول با کد ۱۲ (۱۲۱/۹) از نقطه نظر پایداری و ویژگی‌های ظاهری بهترین فرمول در نظر گرفته شد. به طور معقول این فرمول دارای میانگین قطر ذرات مناسب (۱۲۱/۹ نانومتر) بوده و PDI مربوطه (۰/۱۵۳) با توجه به میانگین قطر ذرات سایر فرمول‌ها، در محدوده مناسبی قرار داشت. به طور طبیعی این فرمول به دلیل تفاوت کمتر در اندازه ذرات، یکنواختی بیشتر را دارا بود. همچنین نمودار عریض و پهنی نیز برخوردار بوده و گسستگی آن در مقادیر بالا رخ می‌دهد (مقدار Intercept). همچنین بین نمونه‌های حاضر فرمول با کد ۱۴ (۱۲۰/۹) نانومتر) تشابه زیادی با فرمول با کد ۱۲ (۱۲۱/۹) نانومتر) دارد با این وجود در مقایسه با سایر نمونه‌ها از نظر میانگین قطر ذرات، PDI، پهنای و گسستگی تفاوت قابل ملاحظه‌ای دارد. در رابطه با شاخص پراکندگی ذرات در نانوحامل‌های لیپیدی، احتمال می‌رود افزایش اندازه ذرات به دلیل به کار بردن مقدار بیشتر ذرات بزرگ پودر عصاره برگ زیتون در فرمول و یا تجمع ذرات نانوحامل چرب به دلیل تمایل ذرات چربی به تشکیل زنجیره باشد.

بررسی تاثیر مواد بر اندازه ذرات و شاخص

پراکندگی

الف-تاثیر نسبت مقادیر لیپید جامد و مایع: همانطور که در جدول ۳ ذکر شده است با افزایش نسبت فاز جامد لیپیدی نسبت به فاز مایع، اندازه ذرات و شاخص پراکندگی ذرات افزایش یافت و از بین مقادیر انتخاب شده فرمول با کد ۴ با مقدار ۰/۹۳ گرم گلیسرول مونو استئارات و ۰/۴ فاز مایع (۰/۲ روغن سویا و ۰/۲ اسید لینولئیک) به دلیل ایجاد اندازه ذرات در مقیاس نانو با اندازه کمتر (۱۰۸/۸) و شاخص پراکندگی کمتر (۱۳۶/۶) به عنوان درصد بهینه انتخاب شد. استفاده از گلیسرول مونو استئارات به عنوان لیپید جامد در مقادیر بالاتر نسبت به فاز مایع پس از خنک شدن، به سرعت کریستاله شده و موجب به هم پیوستن ذرات بلوری و ژله‌ای شدن

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 (سایتا و همکاران ۲۰۰۲؛ آمیوت و همکاران ۱۹۸۶؛ آمیوت و همکاران ۱۹۸۹؛ مالیک و بردفورد ۲۰۰۶، جایمند و همکاران ۱۳۸۵؛ هاشمی و همکاران ۱۳۸۷). همانطور که در نتایج مشخص شد کروماتوگرام پودر عصاره برگ زیتون حاصل از مخلوط حلال‌های اتانول-آب میزان اولئوروپین بالایی را دارا بود. همچنین استاموفولوس و همکاران (۲۰۱۴) با بررسی نسبت‌های متفاوت از اتانول و آب (۲۰، ۴۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰) گزارش نمودند 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، که با نتایج حاصل در این پژوهش کاملاً همخوانی و مطابقت داشت. بنابراین این روش به دلیل حضور اولئوروپین بالا و ایمن بودن حلال-های کاربردی در صنعت غذا و دارو، جهت ادامه تحقیق به کار گرفته شد.

آزمون پراکندگی دینامیکی نور

تعیین اندازه ذرات و شاخص پراکندگی ذرات

اندازه‌گیری اندازه ذرات یکی از مهم‌ترین تکنیک‌های مشخصه‌ای جهت تعیین و تأیید تولید نانوذرات می‌باشد. دستگاه DLS اندازه ذرات مواد نانو ساختار لیپیدی و قطر هیدرودینامیکی و همچنین اندیس پراکندگی ذرات (PDI) که نمایانگر میزان توزیع و پراکندگی اندازه ذرات را نشان می‌دهد، را اندازه‌گیری می‌کند (بنونت و همکاران ۲۰۰۰؛ شه و همکاران ۲۰۱۴). PDI کیفیت توزیع ذرات را در محدوده ۰-۱ نمایش می‌دهد. مقدار $DPI \leq 0.1$ باشد نمایانگر بالاترین کیفیت توزیع می‌باشد؛ اغلب محققین $DPI \leq 0.3$ را به عنوان مقدار اپتیمم و بهینه PDI تشخیص می‌دهند و مقدار کمتر از ۰.۵ $PDI \leq 0.5$ مقدار قابل قبول می‌باشد (شه و همکاران ۲۰۱۴). همانطور که در شکل ۲ مشاهده شد فرمول ۶ (۳/۴۱۶) نانومتر) و ۱۳ (۵۷۶۷ نانومتر) به ترتیب بالاترین و کمترین مقدار میانگین اندازه

گرم، میانگین اندازه ذرات روندی نامنظم و کاهشی داشت، شاخص پراکندگی نانوحامل‌های مذکور در محدوده مناسب قرار داشته (به جز غلظت ۰/۱ گرم لسیتین) و با افزایش مقدار لسیتین (۰/۰۲، ۰/۰۵، ۰/۲، ۰/۳) شاخص پراکندگی مناسبی حاصل شد (جدول ۳). همچنین با بررسی میزان کارایی درون‌پوشانی مقادیر مذکور مشخص شد کارایی درون‌پوشانی اولئوروپین در نانوحامل‌ها با افزایش غلظت لسیتین به ۰/۳ گرم افزایش می‌یابد (شکل ۲). بر اساس مجموع نتایج دو مبحث آزمون پراکندگی ذرات و کارایی درون‌پوشانی، غلظت ۰/۳ گرم لسیتین به عنوان مقدار بهینه لسیتین انتخاب شد. در یک بررسی مشخص شد با افزایش غلظت امولسیفایر اندازه‌ی ذرات به دلیل کاهش سطحی کاهش می‌یابد تا به پایین‌ترین حد خود برسد و غلظت‌های امولسیفایر بیشتر از حد بهینه (مذکور) اندازه‌ی ذرات بزرگتری را ایجاد می‌کند (هجری و همکاران، ۲۰۱۳)، که با نتایج حاضر در این پژوهش مطابقت داشت. همچنین 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.

ج- بررسی تأثیر مقدار اولئوروپین: با افزایش مقدار پودر عصاره برگ زیتون، اندازه ذرات و شاخص پراکندگی اندازه ذرات افزایش یافت که این امری طبیعی بوده و ناشی از اندازه بزرگ پودر می‌باشد. همچنین در این پژوهش با بررسی مقادیر کارایی درون‌پوشانی مشخص شد با افزایش مقدار پودر (ماده‌ی هسته‌ای) مقدار ماده درون‌پوشانی و محصور شده کاهش می‌یابد. احتمالاً این کاهش درون‌پوشانی به دلیل کاهش نسبت مواد دیواره‌ای و امولسیفایر نسبت به مقدار ماده هسته‌ای می‌باشد. با بررسی و تغییر مقدار ماده هسته‌ای و ثابت نگهداشتن مقادیر بهینه مواد (دیواره‌ای و امولسیفایر)، فرمول با کد ۱۲ با کم‌ترین مقدار پودر (۱۱/۰۶۸۵ میلی‌گرم اولئوروپین یا ۰/۰۵ پودر عصاره

در فرمولاسیون و ایجاد بافتی ویسکوز و سفت در تمام سیستم شد و طی ۲۴ ساعت کل فرمول سفت و یکپارچه شد که نشانگر تجمع ذرات و تشکیل کریستال‌های منظم می‌باشد. اما با افزایش نسبت فاز مایع (اسید لینولئیک و روغن سویا) نسبت به فاز جامد (گلیسرول مونو استئارات) به دلیل حضور و تنوع اسیدهای چرب تولید کریستال‌های α و β و β' شد که نسبت به کریستال‌های بتا اندازه ذرات کم‌تری داشتند. کریستال‌های کامل‌تر و بزرگ‌تر اولاً منجر به ایجاد اندازه ذرات بزرگ‌تر و تجمع کریستال‌ها و ناپایدار شدن سیستم می‌گردد و ثانیاً منجر به رهایش و رانش ماده‌ی فعال از سیستم حین فرآیند سرمایش می‌شود (زنگ و همکاران، ۲۰۱۱). فتحی و همکاران (۲۰۱۳) در تولید نانوحامل‌ها و نانوذرات حاوی هسپرتین نشان دادند که از میان سه لیپید جامد استفاده شده (گلیسرول مونو استئارات، اسید استئاریک، و گلیسرول بهینات) نمونه‌های حاوی گلیسرول مونو استئارات اندازه‌ی ذرات کوچک‌تر و توزیع اندازه‌ی ذره-ای باریک‌تری داشتند.

ب- بررسی تأثیر مقدار امولسیفایر: نوع و میزان امولسیفایر تأثیر قابل توجهی در پایداری فیزیکی نانوحامل تولید شده داشت. تشکیل و پایداری امولسیون اولیه با حضور امولسیفایر مناسب موجب کاهش کشش سطحی بین لیپید و آب شده و این امر موجب افزایش سطح قطرات لیپید-حلال شده و شکل‌گیری قطرات کوچک‌تر می‌گردد. در امولسیون اولیه، امولسیفایرها بایستی سریعاً قطرات لیپیدی ایجاد شده را پس از خروج از هم‌وزنایز پایدار کنند تا از هم آمیختگی آنها ممانعت به عمل آید. در سیستم‌های امولسیونی، نوع و غلظت امولسیفایرها مصرفی بر اندازه نهایی قطرات و پایداری دیسپرسیون (با ایجاد نیروهای دافعه‌ی کافی که مانع از تجمع و درهم آمیختگی ذرات می‌شود) موثر است (تروتا و همکاران، ۲۰۰۳). بررسی تغییر غلظت لسیتین در حامل‌های لیپیدی نانساختار حاوی پودر عصاره برگ زیتون نشان داد که با افزایش مقدار لسیتین از ۰/۱ تا ۰/۳

وی و همکاران (۲۰۱۶)، در یک پژوهش، تولید و رهایش نانوذرات لیپیدی حاوی دینسان ۱۱۴ را در روده مورد بررسی قرار داده و گزارش نمودند هر چقدر مقدار مواد شرکت کننده در تهیه فرمول بیشتر باشد کارایی درون پوشانی کاهش و هر چقدر هموژنیزاسیون مواد بهتر و آرام‌تر انجام گیرد کارایی درون پوشانی بیشتر می‌شود که با نتایج این پژوهش همخوانی و مطابقت داشت. اسرینیواس و پریتی (۲۰۱۷) در بررسی و تولید نانوذرات لیپیدی حاوی هیدروکلریدجمسیتابین^۱ به این نتیجه رسیدند که افزایش مقدار لیپید تاثیر در میزان کارایی درون پوشانی دارو در ماتریکس نانوذرات ندارد. شیلی و همکاران (۲۰۱۴) پس از بهینه‌سازی تولید نانوحامل‌های لیپیدی کوئرستین، کارایی درون پوشانی را اندازه‌گیری نموده و مقدار $۰/۳۵ \pm ۹۳/۵$ درصد را گزارش نمودند، که با توجه به این شاخص نانوحامل‌های کوئرستین ثبات فیزیکی مناسبی در شرایط دمایی محیط داشتند. فتحی و همکاران (۲۰۱۳) در بررسی حامل‌های لیپیدی نانوساختار حاوی هسپرتین گزارش کردند که کارایی درون پوشانی نانوحامل‌های تولید شده در محدوده ۳۹/۹۰ تا ۶۳/۰۸ درصد می‌باشد. میناردس و همکاران (۲۰۰۶) در بررسی آنالیز حرارتی نانوذرات کوانتل پلی لاکتید-کو-گلایکولید^۲ گزارش کردند که هر چقدر اندازه ذرات ریزتر باشد میزان کارایی درون پوشانی بیشتر خواهد بود. هاشمی‌زاده و همکاران (۱۳۹۵) با بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی و ویژگی‌های فیزیکی حامل‌های لیپیدی نانوساختار حاوی عصاره آویشن شیرازی گزارش نمودند کارایی درون پوشانی نانوحامل‌ها ۷۱ درصد می‌باشند. حسن زاده و همکاران (۱۳۹۶) با انکپسوله کردن اسانس سیر گزارش نمودند درون پوشانی نانوامولسیون حاوی سیر با افزایش پودر سیر از ۵ به ۲۵ درصد، از ۹۲ به ۷۷ درصد رسید.

برگ زیتون) کمترین اندازه ذرات و شاخص پراکنندگی ذرات و بالاترین میزان درون پوشانی را دارا بود که این نتایج با نتایج گزارش شده توسط لیو و همکاران (۲۰۰۰) و قنبرزاده و همکاران (۱۳۹۵) مطابقت داشت.

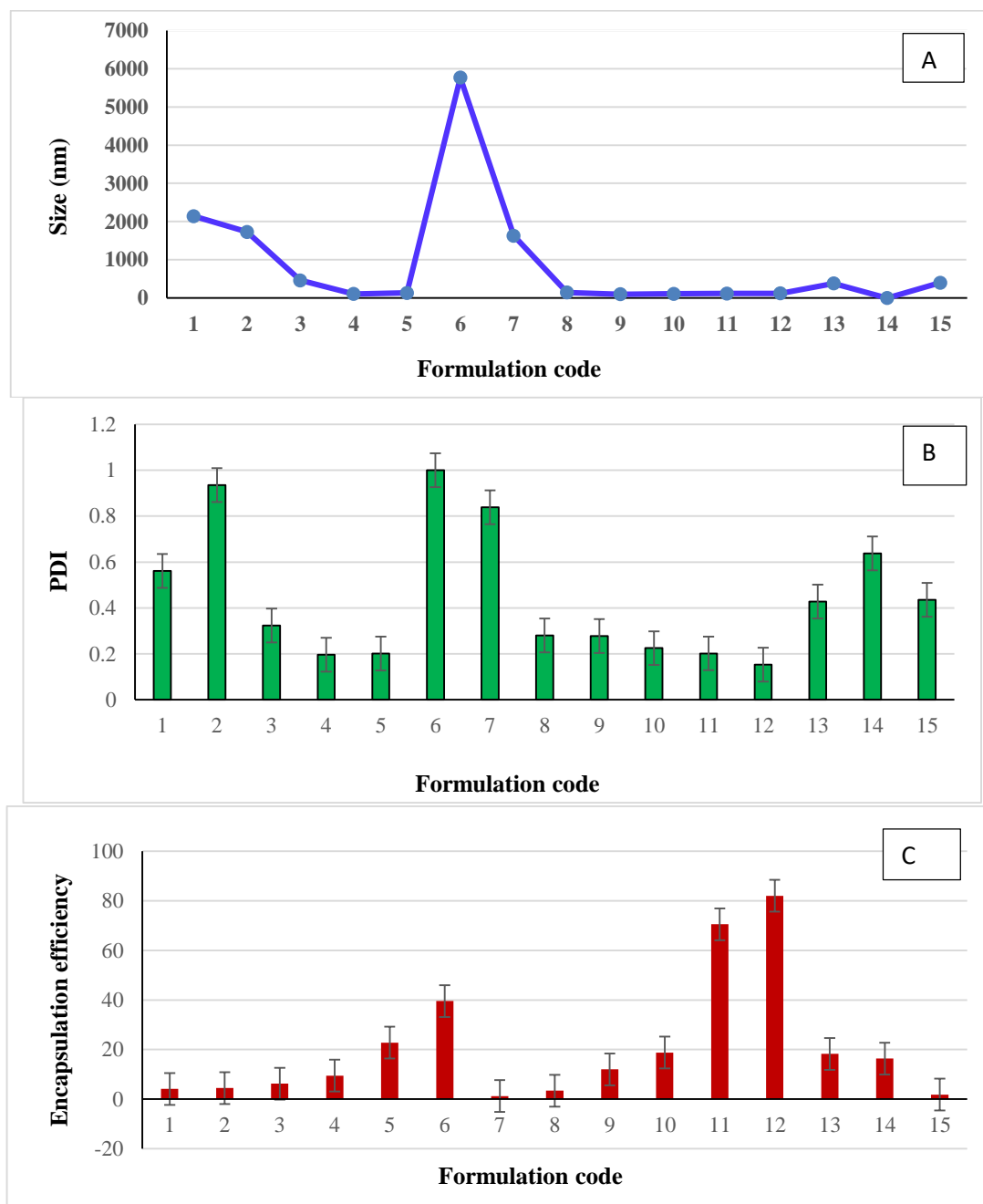
کارایی درون پوشانی

کارایی درون پوشانی به پتانسیل مواد دیواره‌ای در حفظ یا به دام انداختن مواد هسته‌ای درون ریزکپسول‌ها اشاره دارد. کارایی درون پوشانی همچنین مرتبط با عمر ماندگاری ماده محصور شده درون دیواره می‌باشد. کارایی درون پوشانی کردن عصاره برگ زیتون در فرمول‌های طراحی شده در شکل ۲ ارایه شده است.

درون پوشانی به پتانسیل مواد دیواره‌ای در حفظ یا به دام انداختن مواد هسته‌ای درون ریزکپسول‌ها اشاره دارد. کارایی درون پوشانی همچنین مرتبط با عمر ماندگاری ماده محصور شده درون دیواره می‌باشد. نتایج داده‌های کارایی نشان داد که کارایی درون پوشانی وابسته به ترکیب و مقدار مواد دیواره‌ای، امولسیفایر، مقدار ماده‌ی هسته‌ای و اندازه ذرات نانو دارد. هر چقدر اندازه ذرات ریزتر، و مقدار ماده هسته‌ای کم‌تر، و اختلاط مواد کندتر باشد، کارایی درون پوشانی بیشتر می‌شود. بر اساس جدول ۵ فرمول با کد ۱۲ (ترکیبات "وزنی-وزنی": گلیسرول مونواستئارات: ۰/۹۳، لسیتین: ۰/۳، پودر عصاره: ۰/۰۵ (۱۱/۰۶۸۵ میلی‌گرم اولئوروپین)، روغن سویا: ۰/۲، اسیدلینولئیک: ۰/۲) بالاترین میزان درون پوشانی (۸۲ درصد) و فرمول با کد ۷ (ترکیبات "وزنی-وزنی": گلیسرول مونواستئارات: ۱/۳، لسیتین: ۰/۱، پودر عصاره: ۰/۱ (۲۲/۱۳۷ میلی‌گرم اولئوروپین)، روغن سویا: ۰/۱، اسیدلینولئیک: ۰/۱) کمترین میزان درون پوشانی (۱/۲۷) را دارا بود.

². Poly-lactide-co-glycolide

¹. Gemcitabine hydrochloride.



شکل ۲- میانگین سایز (a)، شاخص پراکندگی (b)، و کارایی ریزپوشانی کردن نانوحامل حاوی اولئوروپئین (c).
 Figure 2- Average values of size (a), PDI (b) and encapsulation efficiency (c) of oleuropein-loaded NLC

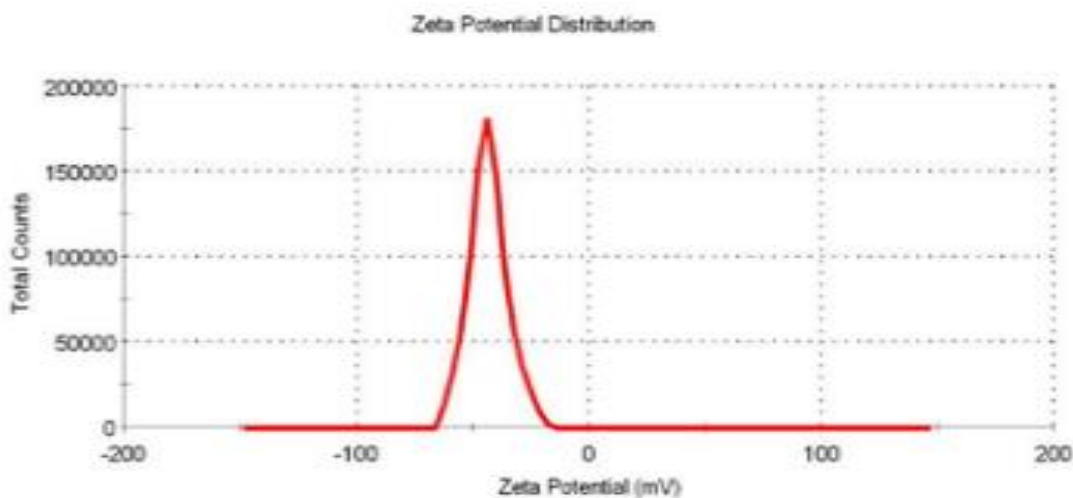
تعیین پتانسیل زتا

بزرگی پتانسیل زتا تاثیر مهمی بر پایداری فیزیکی حامل- های لیپیدی نانوساختار دارد. معمولاً، تجمع یا تراکم ذرات، به دلیل بارهای الکتریکی یکسان و در نتیجه دافعه الکترواستاتیکی، کم تر رخ می دهد. همانطور که در شکل ۳ ارایه شده است پتانسیل زتا برای نانوحامل بهینه ۴۳/۳- میلی ولت می باشد. بارهای منفی موجود در سطح

نانوحاملها، اساساً به دلیل حضور سورفاکتانت‌های لیپوفیلی با بار منفی (لسیتین) و اسیدهای چرب آزاد (اسیدلینولئیک و اسید لینولنیک، اسید اولئیک، و اسیدهای چرب آزاد موجود در روغن سویا) می باشد (تمجیدی و همکاران، ۲۰۱۴). بر اساس مکانیسم و پژوهش‌های دیگر محققین (در زمینه دلیل حضور بار منفی بر سطح حامل- های لیپیدی نانوساختار حاوی عصاره برگ زیتون)؛

ذرات و نهایتاً پایداری این ذرات می‌شود. شیلی و همکاران (۲۰۱۴) به منظور بهینه‌سازی تولید نانوحامل-های لیپیدی کوئرستین، متوسط اندازه ذرات و پتانسیل زتا را اندازه‌گیری نموده و گزارش کردند که مقادیر شاخص‌های مذکور، به ترتیب، $129 \pm 12/13$ نانومتر و $26 \pm$ میلی‌ولت می‌باشد.

احتمال می‌رود گروه هیدروکسیل موجود در اولئوروپین با گروه کولین موجود در سر قطبی فسفاتیدیل کولین پیوند هیدروژنی برقرار می‌کند و گروه کولین با بار مثبت به داخل کشیده می‌شود و گروه فسفاتیدیل که دارای بار منفی است به سطح غشا رانده می‌شود و بنابراین بار منفی نانوحامل‌ها افزایش و باعث دفع الکترواستاتیک



شکل ۳- دیاگرام پتانسیل زتا نانوحامل بهینه

Figure 3- Zeta-potential diagram of optimal nanocarrier

اولتراسونیک، نوع دستگاه فراصوت (حمام یا پروب)، و همچنین مقدار ماده هسته‌ای افزوده شده به فرمولاسیون، نوع پلیمر، از جمله عوامل موثر در اندازه ذرات، میزان بارگیری ماده هسته‌ای و ساختار کریستالی منظم در نانو ذرات می‌باشد. در نهایت می‌توان ذکر نمود با توجه به هزینه بسیار بالای اولئوروپین و آگاهی از فراوانی این ترکیب در برگ زیتون و خواص منحصر به فرد آن، می‌توان با بهینه‌سازی استخراج و اندازه‌گیری مقدار اولئوروپین با برنامه شویشی گرادیانی و روش‌های متفاوت، روشی راحت و سریع جهت استفاده از این ماده ارزشمند را ارایه نمود. همچنین این نانوحامل‌های لیپیدی را می‌توان به عنوان پوشش‌های محافظتی مواد غذایی خشک و یا جزیی از محصولات غذایی و دارویی مورد استفاده قرار داد و محصولاتی با ویژگی‌های مطلوب با عمر انبارداری بالا و ظاهری مناسب با خواص

نتیجه گیری کلی

در این پژوهش 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 فنول (اولئوروپین) را دارا بود. همچنین نتایج حاصل از پراکندگی نور ذرات نانو نشان داد که فرمول ۰/۰۵ پودر عصاره (۱۱/۰۶۸۵ میلی‌گرم اولئوروپین) دارای کمترین میانگین اندازه ذرات، کمترین میزان پراکندگی اندازه ذرات نسبت به سایر فرمول‌ها، و پتانسیل زتای مناسبی بود. با توجه به نتایج حاصل پتانسیل زتا مشخص شد که نانوحامل‌های حاصل دارای پایداری مناسبی طی نگهداری خواهند بود. همچنین در این پژوهش مشخص شد پارامترهای فرآیند از جمله سرعت (سرعت پروب هموژنایزر، سرعت ترکیب شدن مواد و ..)، ولتاژ، مدت زمان هموژنایزر، مدت زمان

نوتراسوتیکال تولید کرد و ضمن این که از ویژگی‌های منحصر به فرد تغذیه‌ای اولئوروپین به عنوان یک ترکیب فراسودمند نیز بهره‌مند شد.

سپاسگزاری

نویسندگان و پژوهشگران این پژوهش مراتب قدردانی و تشکر را از دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی خرم-آباد، لرستان و آزمایشگاه مرکزی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی استان کرمانشاه دارند.

منابع مورد استفاده

- جایمند ک، رضایی م ب، آبروش ز، گلی پور م و شریفی م، ۱۳۸۵. استخراج و تعیین میزان ترکیب اولئوروپین در ۹ رقم زیتون کشت شده در ایستگاه فدک (دزفول)، فصلنامه تحقیقات گیاهان دارویی و معطر ایران، ۲۲، ۷۴-۷۸.
- حسن زاده اوچتپه ح، علیزاده خالد آباد م، و رضازاد باری م، ۱۳۹۶. تولید و بررسی ویژگی‌های فیزیکی-شیمیایی و راندمان درون پوشانی نانو امولسیون حاوی اسانس سیر، پژوهش‌های صنایع غذایی، ۴، ۱۷۰-۱۵۹.
- قنبرزاده ب، پزشکی ا، همیشه کار ح و مقدم م، ۱۳۹۵. اثر غلظت‌های مختلف لستین-کلیسترول بر خصوصیات اندازه ذرات، پتانسیل زتا، کارایی و پایداری درون پوشانی نانولیپوزوم‌های حامل ویتامین A پالمیتات، نشریه پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران، ۱۲، ۲۷۵-۲۶۱.
- محمدی م، قنبرزاده ب، همیشه کار ح، رضایی مکر م 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، ۴، ۱۷۴-۱۸۸.
- میرعلایی مطلق م، آریان فر آ و شهیدی نوقابی م، ۱۳۹۳. اثر صمغ عربی و مالتودکسترین بر درون پوشانی روغن زنجبیل در عصاره چای سبز به روش خشک کردن پاششی، سومین همایش ملی علوم و صنایع غذایی.
- هاشمی س پ، دلفان ب، گیاثوندع ر، رئیسی ف و البرزی م، ۱۳۸۷. بررسی میزان اولئوروپین در برگ درختان زیتون کشت داده شده در شهرستان خرم آباد، یافته، ۴، ۹۸-۱۰۶.
- هاشمی زاده ص، قنبرزاده ب، و همیشه کار ح. ۱۳۹۵. بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی و ویژگی‌های فیزیکی حامل‌های لیپیدی نانو ساختار حاوی عصاره آویشن شیرازی. فصلنامه فناوری‌های نوین غذایی، ۴، ۱۴۹-۱۴۱.
- 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.
- Amiot MJ, Fleuriet A and Macheix JJ, 1986. Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *Journal Agriculture Food Chemistry* 34: 823-26.
- Amiot MJ, Fleuriet A and Macheix JJ, 1989. Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation, *Phytochemistry. Journal Agriculture Food Chemistry* 28: 67-73.
- 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.
- Benavent O, Castillo J and Korente L, 2000. Antioxidant activity of phenolics from *Olea europaea* L. leaves. *Journal Food Chemistry* 68: 457-462.
- Chanda H, Das P, Chakraborty H and Ghosh A, 2011. Development and evaluation of liposomes of fluconazole. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences* 5: 2230-7885.
- Chiou A, Kalogeropoulos N, Efstathiou P, Papoutsis M and Andrikopoulos, NK. 2013. French Fries oleuropein content during the successive deep frying in oils enriched with an olive leaf extract. *International journal of Food Science and Technology* 48 (6): 1165-1171.

- Fathi M, Varshosaz J, Mohebbi M and Shahidi F, 2013. Hesperetin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructure Lipid Carriers for Food Fortification: Preparation, Characterization, and Modeling. *Food and Bioprocess Technology* 6: 1464-1475.
- Guinda Á, 2006. Use of solid residue from the olive industry. *Grasas Y Aceites* 57: 107-115.
- Hamishehkar H, Emami J, Rouholamini Najafabadi A, Gilani K, Minaiyan M, Mahdavi H and Nokhodchi A. 2009. The effect of formulation variables on the characteristics of insulin-loaded poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres prepared by a single phase oil in oil solvent evaporation method. *Colloid Surface B* 74: 340-349.
- Hejri A, Khosravi A, Gharanjig K and Hejazi M, 2013. Optimisation of the Formulation of β -Carotene Loaded Nanostructured Lipid Carriers Prepared by Solvent Diffusion Method. *Food Chemistry* 141: 117-123.
- Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM, Binkoski AE, Hilpert KF, Griel AE, Kuo YC and Chung JF, 2011. Physicochemical properties of nevirapine-loaded solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers. *Colloids and Surface B: Biointerfaces* 83: 299-306.
- Liu D, Liu Z, Wang L, Zhang C and Zhang N, 2012. Nanostructured lipid carriers as novel for parenteral delivery of docetaxel. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 85: 262-269.
- Liu DZ, Chen WY, Tasi LM and Yang SP, 2000. Microcalorimetric and shear studies on the effects of cholesterol on the physical stability of lipid vesicles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering* 172: 57-67.
- Mainardes RM, Palmira-Daflon-Gremião M and Evangelista RC, 2006. Thermoanalytical study of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 42: 523-530.
- Malik NSA and Bradford JM, 2006. Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in 'Arbequina' olives, *Scientia Horticultural* 110: 274-78.
- Naczka M and Shahidi F, 2006. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 41: 1523-1542.
- Pinelli P, Romani A, Vincieri F and Mullinacci N, 1999. *Journal Agriculture Food Chemistry* 47: 964-967.
- 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.
- Shah PR, 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.
- Shilei N, Sun R, Zhao G and Xia Q, 2015. Quercetin Loaded Nanostructured Lipid Carrier for Food Fortification: Preparation, Characterization and in vitro Study. *Journal of Food Process Engineering* 38: 93-106.
- Soleimanifard M, Sadeghi Mahoonak AR, Sepahvand A, Heydari R and Farhadi S, 2019. Spanish olive leaf extract-loaded nanostructured lipid carriers: Production and physicochemical characterization by Zetasizer, FT-IR, DTA/TGA, FE-SEM and XRD. *Food Processing and Preservation* 1-13.
- Srinivas P and Preeti S, 2017. Formulation and evaluation of gemcitabine hydrochloride loaded solid lipid nanoparticles. *Journal of Global Trends in Pharmaceutical Science* 5: 2017-2023.
- Stamatopoulos k, Chatzilazarou A and 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.
- Tamjidi F, Shahedi M, Varshosaz J and Nasirpour A. 2014. Design and characterization of astaxanthin-loaded nanostructured lipid carriers. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 26: 366-374.
- Trotta M, Debernardi F and Caputo O, 2003. Preparation of solid lipid nanoparticles by a solvent emulsification-diffusion technique. *International Journal of Pharmaceutics* 257: 153-160.
- Wei L, Yang Y, Shi K, Wu J, Zhao W and Mo J, 2016. Preparation and Characterization of Loperamide-Loaded Dynasan 114 Solid Lipid Nanoparticles for Increased Oral Absorption in the Treatment of Diarrhea. *Frontiers in pharmacology* 7: 59-75.
- Yao M, McClements DJ and Xiao H, 2015. Improving oral bioavailability of nutraceuticals by engineered nanoparticle-based delivery systems. *Current Opinion in Food Science* 2: 14-19.

- Yao M, Xia, H and McClements DJ, 2014. Delivery of lipophilic bioactives: assembly, and reassembly of lipid nanoparticles. *Annual Review of Food Science and Technology* 5: 53-81.
- Yilmaz Y and Toledo RT, 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.
- Zheng M, Falkeborg M, Zheng Y, Yang T and Xu X, 2011. Formulation and characterization of nanostructured lipid carriers containing a mixed lipids core. *Colloids and Surfaces A: Physicochemistry Engineering Aspects* 430: 76-84.

Determination of oleuropein of olive leaf using high performance liquid chromatography and optimizing the production of nano-structure lipid carriers containing it

M Soleimani Fard^{*1}, A Sadeghi Mahoonk¹, R Heidari², A Sepahvand³ and SFarhadi⁴

Received: February 5, 2018 Accepted: May 8, 2018

¹PhD, Faculty of Food Science, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

²Associate Professor, Research Center for Razi Herbal Medicines, Lorestan University of Medical Sciences and Health Services, Khorramabad, Iran

³Associate Professor, Faculty of Parasitology, Lorestan University of Medical Sciences and Health Services, Khorramabad, Iran

⁴Associate Professor, Faculty of Chemistry, Faculty of Basic Sciences, Lorestan University, Khorramabad, Iran

Introduction: As the demands for functional foods are on the rise, manufacturers have been seeking methods to use compound ingredients that make health promotion feasible. Nanoscience and nanotechnology have gained popularity in the 21st century. Scientists believe that nanotechnology can be used to handle matter at nano-dimensions. Nano powders, having a wide range of applications, were developed following the introduction of nanotechnology (Ananthu & Renjanadevi, 2016). It is believed that one of the ways to save bioactive food ingredients from environmental damage and disguise their displeasure attributes is through encapsulation. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructure lipid carriers (NLC) are the novel types of nanostructures; researchers argue that they are the novel colloidal sensitive carriers that can be used for scientific and industrial applications (Pardeike, Hommoss, & Muller, 2009). Traditionally, the Mediterranean diet has been consisted of olive tree (*Olea europaea*) products that led to decreased risk of chronic diseases such as cardiovascular diseases and several cancers. Phenolic acids, phenolic alcohols, flavonoids, and secoiridoids are the usual phenolic compounds found in olives. Olives are rich in oleuropein, demethyloleuropein, and ligstroside (Yoon, 2018). Several pharmacological features have been reported in oleuropein such as antioxidant (Visioli, Poli, & Galli, 2002), anti-inflammatory (Visioli, Bellosta, & Galli, 1998), anti-atherogenic (Carluccio et al., 2003), anti-cancer (Owen et al., 2000), antimicrobial (Tripoli et al., 2005), and antiviral ones (Fredrickson & Group, 2000); hence, it has been used commercially as food supplement in Mediterranean countries. Besides, research shows that oleuropein exerts cardio-protective effect against acute adriamycin cardiotoxicity (Andreadou et al., 2007); it was also reported that they are involved in anti-ischemic and hypolipidemic activities (Andreadou et al., 2006). Oleuropein is the most abundant type of phenolic compounds in olive leaf and its therapeutic effects are well known as a potent antioxidant. Extraction of oleuropein from olive leaves as a rich source of this compound is very valuable. On the other hand, the encapsulation efficiency of this compound is an effective way to maintain its characteristics during storage. The present research tried to investigate the synthesis method, characterization, and physical stability of nanostructured lipid carrier containing of olive leaf extract. Various methods including high mechanical shear, high-pressure melt-homogenization method can be applied to synthesize the novel nanoencapsulation system (NLC). Since data on the effects of formulation compound on physicochemical properties of oleuropein-loaded NLC is scarce, the present research attempted to study the effect of concentrations of solid and liquid lipid, surfactant and olive leaf extract powder on physical and chemical characteristics of oleuropein-NLC by the application of one-at-time method.

Materials and methods: Initial component concentrations were chosen by the Design Expert Software (version 7.0.0) and one-factor-at-a-time method/one-variable-at-a-time method at various levels. In a study an extract containing oleuropein, was extracted from olive leaves, was prepared in the form of lipid nanocarriers. Extraction was performed by combining solvents ethanol: water (70:30) in a warm bath (40 °C for 30 minutes) using an HPLC apparatus. By designing 15 formulas for the nano-structured lipid carrier, the particle size and encapsulation efficiency were determined by a zeta sizer and HPLC, respectively. After determining the optimal formulation, zeta potential was also evaluated using a zeta sizer.

Results and discussion: The results showed that the extraction method of oleuropein from olive leaf with ethanol and water (70:30) contained 221.37 mg/g of oleuropein with a purity of oleuropein 137.22. The large amount of olive leaf extract in extraction with ethanol could be due to the better solubility of the active compounds (polyphenols) in organic solvents, such as ethanol. Result is showed the average particle size for all freshly produced oleuropein-loaded NLC formulations with diameters of $\sim 0.10 \pm 0.00$ and 5767 ± 640.15 nm. Also, the results of the dynamic light scattering test showed that the optimal formulation had a mean particle size of 12.19 nm, a scattering index of 0.153, a zeta potential of -43.3-millivolt. The negative loads on the surface of nano-carriers were probably due to the presence of lipophilic surfactants with negative load (lecithin) and free fatty acids (linoleic acid and linolenic acid, oleic acid, and free fatty acids in soybean oil). Probably the hydroxyl group in the encapsulant (oleuropein) has a hydrogen bond with a choline group in the polar head of the phosphatidylcholine and the choline group with the positive load is pulled inside and the phosphatidyl group with negative load is driven to the membrane surface. Therefore, the negative load of the nano-carriers is increased, which leads to electrostatic disposal of particles and, finally, stability of these particles. Microencapsulation values of nano-carriers varied from 1.27 ± 0.10 to 82 ± 0.41 and the formula with code 12 had the highest efficiency of microencapsulation. Adding liquid lipid to the lipid mixture and increasing the liquid part to solid part ratio resulted in the formation of a more amorphous state and less crystalline state of the nano-carriers and, finally, led to the defective and increased encapsulation material in nano-carriers (increased efficiency of microencapsulation). This could be probably due to more solubility of the encapsulation material in the liquid part of the lipid. Finally, the results of the encapsulation efficiency showed that the nano-carrier had 82% of the overlapping oleuropein.

Conclusion: One of the aims of the application of nanocarriers in the food industry is to improve bioavailability, cover the undesirable odor, flavor, color, and improve solubility of some materials. Results of this work depicted that adding nanocarriers containing olive leaf extract powder as the source rich of oleuropein to the food, such as sauce, could improve the undesirable appearance, color, odor and flavor of the extract powder (polyphenols such as oleuropein) and also enjoy high durability of antioxidant properties of the polyphenols existing in the nanocarrier. A practical opinion/idea is that encapsulation of olive leaf extract powder as nutraceutical component can be applied to nutritive and pharmaceutical industries as well as production high quality products with whiteness, uniformity/homogeneity, appropriate flowability and flavor properties. Finally, the nano carrier with the lowest olive leaf extract powder, had the highest encapsulation efficiency, the lowest dispersity index and particle size.

Keywords: Nanostructured lipid carriers, Oleuropein, High performance liquid chromatography, Encapsulation efficiency