تولید و بررسی برخی ویژگیهای نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره برگ زیتون

مهناز منافی دیزج یکان[۱]، محمد حسین حداد خداپرست[۲*]، صدیف ازاد مرد دمیرچی[۳]، هادی ولیزاده[۴] و فریده طباطبایی یزدی[۵]

۱- دانشجوی دکترای علوم و صنایع غذایی واحد بین الملل دانشگاه فردوسی مشهد و عضو هیات علمی دانشگاه آزاد اسلامی واحد خوی
۲- استاد گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد
۳- استاد گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه تبریز
٤- استاد دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تبریز
۵- استاد گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد

(تاریخ دریافت: ۹٤/۰۵/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۵/۰۲/۲۷)

چکیده

عصاره برگ زیتون یک منبع غنی از ترکیبات فنولی به شمار می‌رود که دارای خواص آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی است. با این حال ترکیباتفنلی مانند بسیاری از ترکیبات زیست فعال به تدریج غیر فعال می گردند و معمولا پس طعم تلخی را در مواد غذایی ایجاد می‌کنند. ریزپوشانی یکی راهکارهای موثر برای افزایش پایداری و کاهش پس طعم تلخ ترکیبات زیست فعال محسوب می شود. هدف از این پژوهش کپسوله کردن ترکیبات فنلی عصاره برگ زیتون به شکل نانولیپوزوم بود. نانولیپوزوم‌ها با استفاده از فسفاتیدیل کولین، کلسترول و عصاره برگ زیتون و با بکارگیری روش تزریق اتانول تهیه و از لحاظ اندازه ذرات، پتانسیل زتا و کارایی انکپسولاسیون مورد بررسی قرار گرفتند. متوسط قطر حجمی ذرات لیپوزوم در محدوده ۵۰-۱۰۰nm بود. تمامی فرمولاسیون‌های لیپوزومی دارای بار منفی بودند و الحاق ترکیبات پلی فنولی تا نسبت ۱:۵ فسفولیپید/پلی‌فنول موجب افزایش بار منفی وزیکول‌ها گردید اما افزایش بیشتر در غلظت عصاره موجب کاهش بار منفی ذرات گردید.کارایی انکپسولاسیون نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره در محدوده ۷۸-۷٤٪ بود، اگرچه در نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره با نسبت فسفاتیدیل کولین /عصاره (۱:۱) میزان آن کاهش یافت و به ۵۷٪ رسید. بررسی طیف فروسرخ نمونه‌ها حاکی از عدم تشکیل برهمکنش‌های شیمیایی واتصال پلی‌فنول‌های برگ زیتون به ساختار نانولیپوزوم از طریق برهمکنش‌های فیزیکی بود. در نهایت نتیجه گیری گردید که میتوان ترکیبات فنولی عصاره برگ زیتون را با اندازه و کارایی مناسب به شکل نانولیپوزوم جهت کاربرد در مواد غذایی ریزپوشانی کرد.

کلید واژگان: برگ زیتون، نانولیپوزوم، پتانسیل زتا، نانوتکنولوژی.

* مسئول مکاتبات: khodaparast@um.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-24]

۱- مقدمه

امروزه کاربرد آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی علی رغم موثر بودن، قیمت پایین و پایداری در شرایط معمول فراوری و نگهداری روغن‌ها، به دلیل اثرات سمیت احتمالی آن‌ها محدود شده و به همین دلیل کاربرد آنتی اکسیدان‌های طبیعی رو به افزایش است. بدین منظور تحقیقات گسترده‌ای بر روی ترکیبات آنتی اکسیدان حاصل از برگ و میوه درخت زیتون، سایر میوه‌ها و سبزیجات و نیز ادویه جات و گیاهان آروماتیک متمرکز شده است. برگ درخت زیتون منبع غنی از ترکیبات فنولی همچون اولئوروپین، ورباسکوزید، لیگستروزید، تیروزول و هیدروکسی تیروزول می باشد که دارای ویژگی‌های آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی هستند. از این میان اولئوروپین، بی فنول عمده در برگ و میوه زیتون است[۱]. در این راستا مطالعاتی در زمینه افزودن ترکیبات فنول برگ زیتون به روغن‌های خوراکی انجام گرفته است. به طور مثال، سالتا و همکاران (۲۰۰۷) بهبود ظرفیت آنتی اکسیدانی و پایداری اکسیداتیو روغن زیتون، آفتابگردان، پالم و شورتنینگ گیاهی را از طریق غنی سازی این روغن‌ها با پلی‌فنول‌ها از طریق افزودن عصاره برگ زیتون گزارش کردند [۲]. همچنین مشاهده شده است که غلظت ٤٠٠ppm فنول‌های آزاد استخراج شده از برگ زیتون، ظرفیت آنتی اکسیدانی بالاتری نسبت به BHT در به تاخیر انداختن تندی اکسیداتیو روغن زیتون داشت [۳]. در مطالعه دیگری افزایش پایداری اکسیداتیو لیپیدهای غذایی نظیر کره، لارد و روغن کبد ماهی کاد با استفاده از عصاره فنولی با هیدروکسی تیروزول بالای به دست آمده از برگ زیتون گزارش شد [٤].

با وجود این، غلظت موثر پلی‌فنول‌ها در شرایط آزمایشگاهی اغلب بیشتر از مقادیر اندازه گیری شده در محیط بدن است. علاوه بر این پلی‌فنول‌ها پایداری و حلالیت محدود و طعم‌های نامطلوب نظیر طعم گس از خود نشان می‌دهند که بایستی قبل از افزودن به فراورده‌های غذایی اصلاح گردند [۵]. همچنین ترکیبات فنولی می‌توانند با اجزای غذایی نظیر پروتئین‌ها متصل شده که در نهایت می‌تواند موجب توده‌ای شدن، رسوب و نیز افت در مقدار یا عملکرد پلی‌فنول‌ها شود [٦]. در رابطه با ترکیبات پلی‌فنولی چای سبز مشاهده شده است که این ترکیبات به سختی می‌توانند در فراورده‌های غذایی با فعالیت مناسب حفظ گردند. علاوه بر این حساسیت اغلب کاتچین‌های چای سبز در مقادیر مختلف pHدر طول دوران نگهداری ماده غذایی [۷] و نیز شرایط هضم در دستگاه گوارش [۸] و نیز دسترسی زیستی پایین [۹] استفاده از آن‌ها را به عنوان افزودنی در مواد غذایی محدود کرده است. بدین ترتیب انکپسولاسیون ترکیبات پلی‌فنولی می‌تواند راهکاری برای برطرف کردن این معایب بوده و امکان افزایش غلظت آنتی‌اکسیدان‌های انکپسوله را در مواد غذایی فراهم ساخته [۱۰] و ویژگی‌های آنتی اکسیدانی و مدت ماندگاری مواد غذایی را بهبود بخشد. انکپسولاسیون ترکیبات فنولی در ساختار نانولیپوزوم‌ها می‌تواند یک استراتژی موثر برای انکپسولاسیون و آزادسازی کنترل شده ترکیبات فنولی در ماتریکس‌های غذایی باشد.

لیپوزوم‌ها (وزیکول‌های لیپیدی) توده‌های تشکیل شده از دیسپرسیون‌های آبی مولکول‌های دوگانه دوست نظیر لیپیدهای قطبی هستند که تمایل به تشکیل ساختارهای دولایه دارند. با توجه به نتایج مطالعات لیپوزومی در تحقیقات و کاربردهای دارویی و پزشکی (نظیر حمل دارو، تیمار سرطان، ژن تراپی و ...) و نیز به دلایل مزایای سلامتی مربوط به فسفولیپیدها، استفاده از لیپوزوم‌ها در صنعت غذا برای حمل کنترل شده ترکیبات عملگرا نظیر پپتیدها، آنزیم‌ها، ویتامین‌ها و مواد عطر و طعمی، حفاظت ترکیبات حساس، افزایش کارایی افزودنی‌های غذایی و محدود ساختن عطر و طعم نامطلوب در کاربردهای غذایی بسیاری مورد بررسی قرار گرفته است [۱۱].

لیپوزوم‌ها همپنین برای انکپسولاسیون پلی فنول‌ها و یا عصاره‌های پلی فنولی به کار گرفته شده‌اند. به طور مثال، تاکاهاشی و همکاران [۱۲] افزایش میزان جذب گوارشی کورکامین انکپسوله شده در لیپوزوم‌ها نسبت به دیگر فرم‌های آن را گزارش کردند. ایسایلوویچ و همکاران [۱۳] گزارش کردند که الحاق رسوراتول به لیپوزوم‌ها سمیت سلولی آن‌ها را در مقایسه با اثرات مخرب محلول رسوراتول با غلظت مشابه کاهش داد.

با توجه به اهمیت تغذیه ای ترکیبات فنلی و به منظور افزایش پایداری و جلوگیری از ایجاد پس طعم این ترکیات در محصولات غذایی، هدف از این پژوهش انکپسولاسیون ترکیبات فنلی عصاره برگ زیتون در نانولیپوزوم‌ها جهت کاربرد در مواد غذایی بود.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-24]

۲- مواد و روش ها

۲-۱- مواد

فسفاتیدیل کولین (خلوص ۹۹٪<) از شرکت Lipoid(آلمان) تهیه گردید. کلسترول، اتانول و سایر مواد شیمیایی از شرکت مواد شیمیایی مرک (آلمان) تهیه شدند. عصاره برگ زیتون (با میزان فنل کل mg ۲ /۲۰۱ در g عصاره) از شرکت آدونیس گل دارو تهیه گردید.

۲-۲- تهیه لیپوزوم‌ها

لیپوزوم‌ها با استفاده از روش تزریق اتانول تهیه شدند. بدین منظور فسفاتیدیل کولین درغلظت ۱۵μmol/ml، کلسترول (با نسبت مولی ٤: ۱ فسفاتیدیل کولین: کلسترول) و عصاره برگ زیتون (در غلظت‌های مختلف مطابق جدول ۱) در اتانول حل شدند. سپس ۱۰ml محلول اتانولی به آرامی داخل ۷۰ml آب مقطر تحت فرایند هموژنیزاسیون با سرعت ۲۰۰۰۰rpm تزریق شد. سوسپانسیون لیپوزومی تهیه شده برای آنالیز بعدی در دمای ٤°C نگهداری شد (١٤).

Table 1 Produced nanoliposomes with different formulations

Empty Liposome	F1
SPC/Extract (10:1)	F2
SPC/Extract (7.5:1)	F3
SPC/Extract (5:1)	F4
SPC/Extract (2.5:1)	F5
SPC/Extract (1:1)	F6

۲-۳- اندازه ذرات و پتانسیل زتا

اندازه ذرات و پتانسیل زتا با استفاده از دستگاه پراکنش نور دینامیک (DLS) (مدل Nanotrac Wave شرکت Microtrac ، آلمان) اندازه گیری شد (۱۵).

۲-٤-کارایی انکپسولاسیون

برای تعیین کارایی انکپسولاسیون ابتدا ترکیبات فنلی کپسوله نشده در سوسپانسیون لیپوزومی با استفاده از سانتریفوژ با دور ۳۰۰۰rpm به مدت ۱۵ دقیقه از بخش کپسوله شده جداسازی شد. سپس به فاز کپسوله مقداری متانول اضافه شد تا غشاء لیپوزومی حل شده و ترکیبات فنلی کپسوله آزاد گردند. در نهایت میزان جذب در هر دو بخش با استفاده از اسپکتروفتومتر ماوراء بنفش-مرئی در طول موج ۷۲۵nm تعیین گردید. برای تعیین غلظت فنل کل، منحنی استاندارد جذب-غلظت اسید کافئیک رسم شد و با استفاده از قرار دادن شدت جذب خوانده شده در منحنی استاندارد غلظت فنل کل هر بخش محاسبه گردید. سپس کارایی انکپسولاسیون با استفاده از فرمول ذیل محاسبه شد (١٦):

$$\text{٪ کارایی کپسولاسیون} = C_{\text{کل}} - C_{\text{آزاد}} / C_{\text{کل}} \times 100$$

در این فرمول $C_{\text{کل}}$ غلظت فنل کل در سوسپانسیون لیپوزومی و $C_{\text{آزاد}}$ غلظت فنل کل در بخش غیرکپسوله است.

۲-۵- طیف سنجی فروسرخ (ATR-FTIR[1])

طیف فروسرخ فسفاتیدیل کولین، کلسترول، عصاره برگ زیتون، مخلوط فیزیکی ترکیبات، نانولیپوزوم فاقد عصاره و نانولیپوزوم حاوی عصاره (F_5) با استفاده از اسپکتروفتومتر ATR-FTIR(Bruker, Tensor 27) ثبت گردید. مراحل آماده سازی نمونه شامل مخلوط کردن نمونه با برومید پتاسیم (KBr) در نسبت ۱: ۱۰ (نمونه: برومید پتاسیم) و فشرده سازی نمونه‌ها به شکل قرص تحت فشار ۱٦۰ KPa بود. دامنه روبش بین ۵۰۰ تا $٤٠٠٠cm^{-1}$ بود (۱۷).

۲-٦- تجزیه و تحلیل آماری

آزمون‌ها در سه تکرار در قالب طرح کاملا تصادفی انجام شدند. تحلیل و ارزیابی (ANOVA) با استفاده از نرم افزار SPSS (در سطح احتمال $P < ۰/۰۵$) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای تایید وجود اختلاف بین میانگین‌ها انجام گرفت.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- اندازه ذرات

نتایج مربوط به قطر متوسط اندازه ذرات در نسبت‌های مختلف فسفاتیدیل کولین به عصاره در جدول ۱ نشان داده شده است. در تمامی موارد متوسط قطر حجمی ذرات در محدوده ۵۰-۱۰۰nm بود. نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره برگ زیتون تا نسبت فسفاتیدیل کولین /عصاره (۱:۲,۵) اندازه ذرات کوچک‌تری نسبت به وزیکول‌های خالی داشتند. با افزودن عصاره برگ زیتون در نانولیپوزوم‌ها، ابتدا کاهش در اندازه ذرات تا نسبت فسفاتیدیل

1. Attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-24]

کولین /عصاره (۱:۵) مشاهده شد و سپس با افزایش بیشتر در غلظت عصاره اندازه ذرات نانولیپوزوم‌ها افزایش پیدا کرد.در رابطه با اندازه ذرات نانولیپوزوم‌های حاوی ترکیبات پلی‌فنولی زو و همکارن [۱٤] نیز اندازه ذرات ٦٦/٨nm را برای نانولیپوزوم‌های حاوی پلی‌فنول‌های چای سبز با نسبت جرمی فسفولیپید: پلی فنول (۱:۸) تهیه شده به روش تزریق اتانول در ترکیب با میکروفلویدیزاسیون فشار بالا گزارش کردند.همچنین گولسرن و کوردیگ [۱۷] نانولیپوزوم‌های حاوی پلی‌فنول‌های چای سبز با اندازه ذرات ۹۰nm ~ (pH=۷) را با استفاده از فسفاتیدیل کولین سویا و با بکارگیری روش هموژنیزاسیون فشار بالا تهیه کردند.

اندازه کوچکتر نانولیپوزوم‌های حاوی ترکیبات پلی فنولی عصاره برگ زیتون در مقایسه با لیپوزوم‌های فاقد ترکیبات پلی‌فنولی نشان دهنده به هم پیوستگی بیشتر زنجیره‌های غیرقطبی غشای وزیکولی می‌باشد. در تایید این مطلب مشاهده می‌شود که با افزایش غلظت عصاره از نسبت ۱:۱۰ تا ۱:۵ فسفولیپید: پلی‌فنول نیز اندازه ذرات کاهش می‌یابد. گرچه با افزایش بیشتر غلظت ترکیبات فنولی اندازه ذرات رو به افزایش می‌گذارد. این رفتار برای لیپوزوم‌های حاوی ترکیبات لیپوفیل و روغن‌های اسانسی نیز مشاهده شده است [۱۸ و ۱۹].

همچنین قطر متوسط نانوذرات لیپوزومی بعد از یک هفته نگهداری در دمای $٤^{o}C$ مورد بررسی قرار گرفت (جدول ۲).در طول زمان نگهداری اندازه نانولیپوزوم‌های فاقد عصاره بدون تغییر ماند در حالی که اندازه نانولیپوزومهای حاوی عصاره افزایش یافت. گرچه در مورد نمونه‌های حاوی عصاره با نسبت ۱:۱ فسفولیپید به عصاره اندازه ذرات بعد از یک هفته نگهداری کاهش نشان داد.

Table 2 Particle sizes of different nanoliposomes

Formulation	Treatment	Day1	Day 7
F1	Empty Liposome	73^{b}	73^{b}
F2	SPC/Extract (10:1)	54.80^{d}	60.50c
F3	SPC/Extract (7.5:1)	50^{e}	59.60^{c}
F4	SPC/Extract (5:1)	47.40^{f}	50^{d}
F5	SPC/Extract (2.5:1)	63^{c}	81.50^{a}
F6	SPC/Extract (1:1)	97.90^{a}	81^{a}

Data are expressed as mean ± standard deviation for triplicate tests. Mean with different superscripts differ significantly (P<0.05).

۳-۲- پتانسیل زتا

پتانسیل زتا شاخصی برای میزان برهم کنش دافعه بین ذرات کلوئیدی است و برای ارزیابی پایداری سوسپانسیون‌های وزیکولی استفاده می‌شود. در ذرات با پتانسیل زتای پایین تنها نیروی دافعه اندکی وجود دارد و ذرات در نهایت به هم پیوسته و موجب ناپایداری سیستم خواهند شد. عموما اگر پتانسیل زتای کل سیستم کلوئیدی بالاتر از ±۳۰mV باشد ذرات از نظر نیروهای دافعه الکترواستاتیکی پایدار خواهد بود [۲۰]. گرچه برخی مطالعات نشان داده‌اند که حتی در مقادیر پایین پتانسیل زتا (نزدیک به صفر) نیز لیپوزوم‌ها ممکن است پایدار بمانند [۱٤].

نتایج مربوط به پتانسیل زتا برای نانولیپوزوم‌های حاوی ترکیبات پلی‌فنولی و نیز فاقد این ترکیبات در جدول ۲ نشان داده شده است. مطابق جدول ۳ تمامی فرمولاسیون‌های لیپوزومی دارای بار منفی بودند. الحاق ترکیبات پلی فنولی تا نسبت ۱:۵ فسفولیپید: پلی‌فنول موجب افزایش بار منفی وزیکول‌ها گردید. اما افزایش بیشتر در غلظت عصاره موجب کاهش بار منفی ذرات گردید.افزایش بار منفی سیستم به دنبال الحاق ترکیبات پلی فنولی می‌تواند به دلیل بار منفی پلی‌فنول‌های برگ زیتون (۱۲ mV-) به دنبال یونیزه شدن نسبی آن‌ها تحت pHسیستم باشد. علاوه بر این بررسی‌ها نشان داده است که ترکیبات فنولی نه تنها می‌توانند در داخل لیپوزوم‌ها قرار بگیرند بلکه می‌توانند به سطح غشای لیپوزومی نیز جذب یا ملحق شوند [۲۱]. لذا به نظر می‌رسد کاهش بار منفی سیستم با افزایش بیشتر غلظت عصاره (نسبت ۲/۵ :۱ و ۱:۱ فسفولیپید: پلی‌فنول) می‌تواند ناشی از پوشش هرچه بیشتر سطح لیپوزوم‌ها و در نتیجه کاهش بار سطحی باشد.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-24]

در مطالعات دیگر انجام شده بر روی لیپوزوم‌های حاوی ترکیبات فنولی، مقادیر پتانسیل زتای ٦٧/٢mV – توسط لو و همکاران [۲۰۱۱]، ٦/١٦ mV– توسط زو و همکاران[١٤] و ١٢ mV– توسط گولسرن و کوردیگ[۲۲] برای نانولیپوزوم‌های حاوی ترکیبات پلی‌فنولی عصاره چای سبز گزارش شده است. این مقادیر متفاوت می‌تواند به دنبال تفاوت در ویژگی‌های فسفولیپیدها باشد. پتانسیل زتا همچنین به دما و قدرت یونی محیط وابسته است. نشان داده شده است که سر قطبی لیپید حساس به قدرت یونی و دمای محیط است. در قدرت یونی پایین، گروه‌های فسفاتیدیل در قسمت بیرونی سر قطبی لیپید قرار می‌گیرند و بار سیستم منفی می‌شود. در دمای ثابت با افزایش قدرت یونی گروه کولین به قسمت بیرونی سطح دولایه نزدیک می‌شود در حالی که گروه فسفاتیدیل در پشت سطح پنهان می‌شود [۲۳].

Table 3 Zeta Potential of different nanoliposomes

Formulation	Treatment	Day1
F1	Empty Liposome	-23c
F2	SPC/Extract (10:1)	-25^{d}
F3	SPC/Extract (7.5:1)	-28^{e}
F4	SPC/Extract (5:1)	-33.5^{f}
F5	SPC/Extract (2.5:1)	-0.6^{a}
F6	SPC/Extract (1:1)	-5.4^{b}

Data are expressed as mean ± standard deviation for triplicate tests. Mean with different superscripts differ significantly (P<0.05).

۳-۳- کارایی انکپسولاسیون

نتایج مربوط به تاثیر نسبت‌های مختلف فسفاتیدیل کولین به عصاره بر روی کارایی انکپسولاسیون عصاره برگ زیتون در شکل ۱ نشان داده شده است. نتایج آزمون دانکن تفاوت معنی داری را بین نمونه‌های F_2، F_3، F_4 و F_5 با افزایش غلظت عصاره در سطح ۵٪ نشان نمی‌دهد. کارایی انکپسولاسیون برای این نمونه‌ها ۷۸-۷٤٪ بود. گرچه در نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره برگ زیتون با نسبت فسفاتیدیل کولین /عصاره (۱:۱) کاهش معنی داری در کارایی انکپسولاسیون مشاهده شد و میزان آن به ۵۷٪ رسید. همچنین نگهداری سیستم‌های نانولیپوزومی حاوی عصاره به مدت یک هفته در دمای ٤°C موجب تفاوت معنی داری را در کارایی انکپسولاسیون نمونه‌ها نشد (شکل ۱). به طور مشابهی، گولسرن و کوردیگ[۲۰۱۳] نیز با افزایش غلظت پلی فنول‌های چای سبز در سیستم لیپوزومی کاهش کارایی انکپسولاسیون از ٦٠٪ به کمتر از ٤٠٪ را گزارش کردند. ناکایاما و همکاران [٢٤] نشان دادند که اپی گالوکاتکین گالات در غلظت‌های پایین مانع نشت کلسئین از لیپوزوم می‌شود در حالی که در غلظت‌های بالا پلی فنول‌ها ممکن است باعث از هم گسستن غشای لیپوزومی شوند.

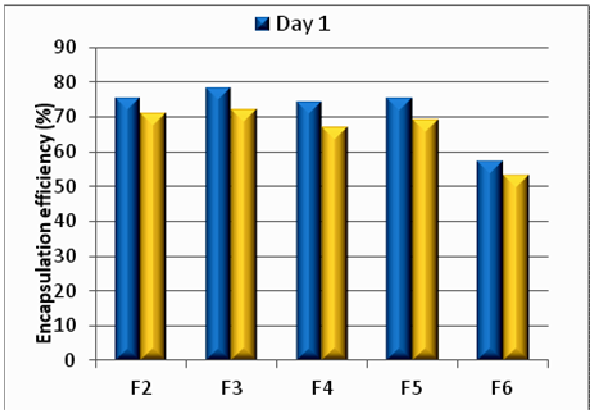

Fig 1 Encapsulation efficiency of liposomal formulations

در مطالعه دیگر انجام گرفته در رابطه با انکپسولاسیون عصاره‌های پلی فنولی در سیستم‌های لیپوزومی، تاکاهاشی و همکاران [۱۲] کارایی انکپسولاسیون ٦٨,٠٪ را برای لیپوزوم‌های حاوی کورکامین تهیه شده با استفاده از میکروفلودایزر گزارش کردند. گیبیس و همکاران [۲۱] با انکپسوله کردن عصاره دانه انگور در لیپوزوم‌ها گزارش کردند که بیش از ۸۰٪ ترکیبات پلی فنولی موجود در عصاره به جای اینکه به داخل غشای لیپوزومی منتقل شوند به سطح غشای لیپوزومی متصل شدند. ایسایلوویچ و همکاران [۱۳] کارایی انکپسولاسیون ۹۰٪ را در مقابل کارایی ۵۰٪ برای نانولیپوزوم‌های حاوی رسوراتول تهیه شده به ترتیب با روش اکستروژن و سونیکاسیون گزارش کردند. در مطالعه دیگری رشیدی‌نژاد و همکاران [٦] کارایی انکپسولاسیون ۷۰٪ < را برای لیپوزوم‌های حاوی کاتچین و اپی‌گالوکاتچین چای سبز نشان دادند. همچنین زو و همکاران [١٤] کارایی انکپسولاسیون ٧٨,٥٪ نانولیپوزوم‌های حاوی پلی‌فنول‌های چای سبز تهیه شده با روش تزریق اتانول-میکروفلویدیزاسیون فشار بالا را گزارش کردند که با نتایج به دست آمده در این بررسی مطابقت داشت. کوساراجو و همکاران [۲۵] نیز از طریق انکپسولاسیون عصاره برگ زیتون در پوشش‌های کیتوزان به روش خشک کردن پاششی، تنها میزان

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-24]

۲۷٪ترکیبات پلی فنولی بارگیری شده راگزارش کردند که بسیار کمتر از مقادیر به دست آمده در این بررسی بود. لذا به نظر می‌رسد که به دام اندازی عصاره برگ زیتون در سیستم‌های لیپوزومی می‌تواند روشی موثر برای انکپسولاسیون ترکیبات فنولی موجود در آن باشد.

۳-٤- طیف سنجی فروسرخ

آنالیز طیف سنجی فروسرخ اطلاعاتی را در زمینه گروه‌های عاملی، تغییر ساختار کریستالی و برهمکنش احتمالی ترکیبات فراهم می‌آورد. درشکل۲، طیف فروسرخ مربوط به نمونه‌های فسفاتیدیل کولین، کلسترول، عصاره برگ زیتون، مخلوط فیزیکی فسفاتیدیل کولین-کلسترول-عصاره، نمونه نانولیپوزوم فاقد عصاره (F_1) و نمونه نانولیپوزوم حاوی عصاره (F_5) نشان داده شده است. پیک‌های مربوط به لیپوزوم خالی در اعداد موج ۲۹۷۹، ۲۹۱۰، ۱۰۸٦، ۱۰٤٤وcm^{-1} ۸۷٦نزدیک به فسفاتیدیل کولین و در اعداد موج ۲۹۷۹، ۱۰٤٤ وcm^{-1}۸۷٦نزدیک به کلسترول بود که نشان دهنده این است که لیپوزوم حاوی فسفاتیدیل کولین و کلسترول است.

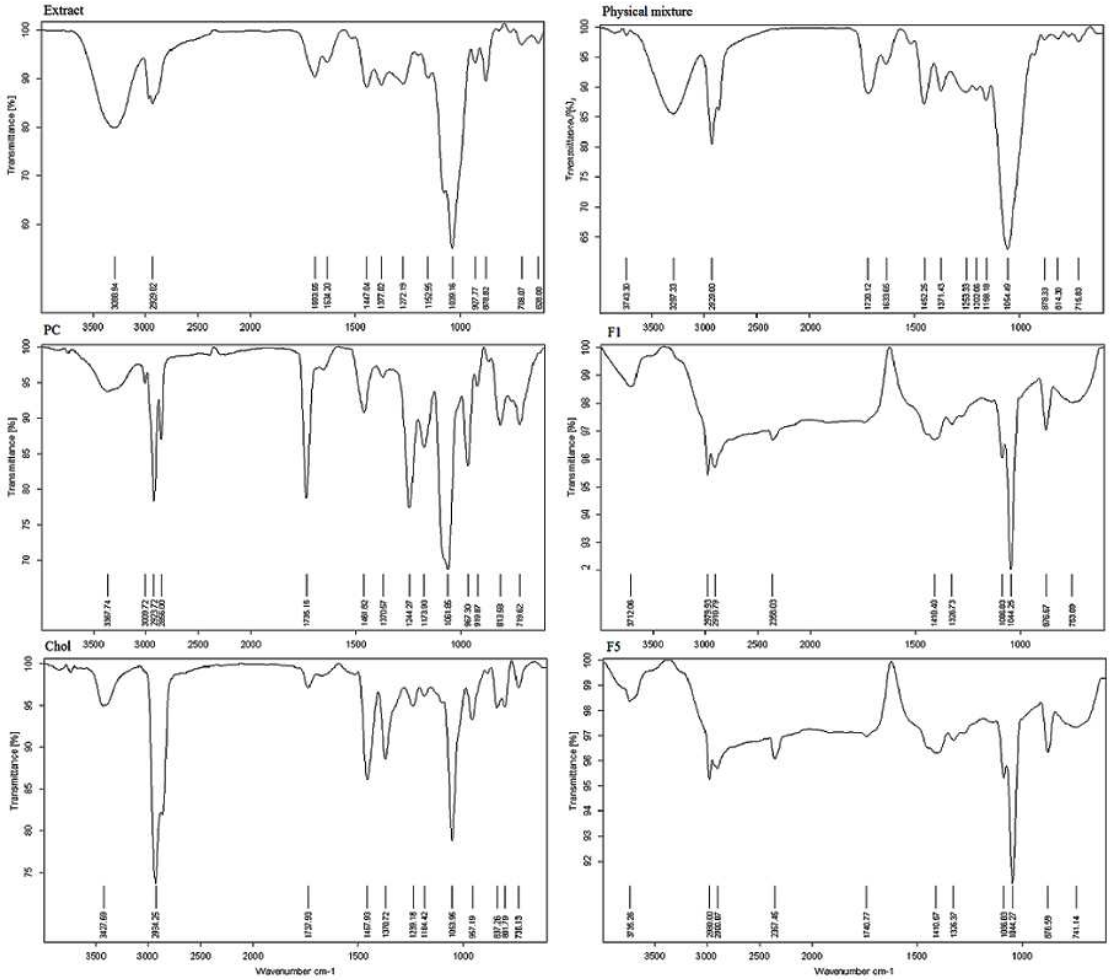

Fig 3 Infrared spectrum of lecithin, cholesterol, olive leaf extract, physical mixture of lecithin-cholesterol-extract, empty liposome (F1) and extract containing liposome (F5)

مقایسه پیک‌های مربوط به فسفاتیدیل کولین، کلسترول، عصاره برگ زیتون و مخلوط فیزیکی آن‌ها با هم تفاوتی را در مکان باندهای جذبی در مخلوط فیزیکی نشان نمی‌دهدکه بیانگر عدم برهمکنش بین ترکیبات فنلی عصاره با حامل‌ها در یک فرایند مخلوط کردن ساده است. وجود چندین پیک اصلی پلی‌فنل‌های برگ زیتون (اعداد موج ۲۹۲۹، ۱٦۹۳، ۱٤٤۷، ۱۳۷۷، ۱۰٦۹ و $^{-1}$ ۸۷۸cm) در اسپکتروم IR نانولیپوزوم حاوی عصاره تایید کننده وجود پلی‌فنول‌های برگ زیتون در ساختار نانولیپوزوم‌ها است.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-24]

علاوه بر این مقادیر پیک‌ها برای نانولیپوزوم حاوی عصاره برگ زیتون در اعداد موج ۳۷۳۵، ۲۹۸۰، ۲۹۰۰، ۲۳۵۸، ۱٤۱۰، ۱۳۲٦، ۱۰۸٦، ۱۰٤٤، ۸۷٦ و $۷٤۱cm^{-۱}$ مشابه نانولیپوزوم فاقد عصاره است. لذا عدم وجود پیک‌های مشخص در طیف فروسرخ نانولیپوزوم حاوی عصاره در مقایسه با نانولیپوزوم فاقد عصاره بیانگر عدم تشکیل برهمکنش‌های شیمیایی و در نتیجه اتصال پلی‌فنول‌های برگ زیتون به ساختار نانولیپوزوم از طریق برهمکنش‌های فیزیکی است.در این راستا لو و همکاران [۲۰] نیز الحاق فیزیکی پلی‌فنول‌های چای به لیپوزوم‌ها را از طریق بررسی طیف فروسرخ ترکیبات مربوطه نشان دادند.

٤- نتیجه‌گیری

نتایج این تحقیق نشان داد که میتوان عصاره برگ زیتون را به شکل لیپوزوم با اندازه ذرات نانو (nm ۱۰۰-۵۰) و کارایی بالا (٪۷۸-۷٤) و با ثبات با پتانسیل زتای مناسب (تا ۳٦/۵-) ریزپوشانی کرد و از این تکنیک می توان به عنوان یک راهکار مناسب برای استفاده از ترکیبات فنولی عصاره برگ زیتون در محصولات غذایی بهره برد بدون اینکه مشکلاتی مانند ناپایداری و پس طعم تلخ معمول در ترکیبات زیست فعال بوجود آید.

۵- منابع

[1] Kiritsakis, K., Kontominas, M. G., Kontogiorgis, C., Hadjipavlou-Litina, D., Moustakas, A., and Kiritsakis, A. (2010). Composition and antioxidant activity of olive leaf extracts from Greek olive cultivars. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, *87*(4), 369-376.

[2] Salta, F. N., Mylona, A., Chiou, A., Boskou, G., and Andrikopoulos, N. K. (2007). Oxidative stability of edible vegetable oils enriched in polyphenols with olive leaf extract. *Food Science and Technology International*, *13*(6), 413-421.

[3] Farag, R. S., El,Baroty, G. S., and Basuny, A. M. (2003). The influence of phenolic extracts obtained from the olive plant (cvs. Picual and Kronakii), on the stability of sunflower oil. International Journal of Food science & Technology, *38*(1), 81-87.

[4] De Leonardis, A., Aretini, A., Alfano, G., Macciola, V., and Ranalli, G. (2008). Isolation of a hydroxytyrosol-rich extract from olive leaves (Olea europaea L.) and evaluation of its antioxidant properties and bioactivity. *European Food Research and Technology*, *226*(4), 653-659.

[5] Fang, Z., and Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols–a review. *Trends in Food Science & Technology*, *21*(10), 510-523.

[6] Rashidinejad, A., Birch, E. J., Sun-Waterhouse, D., and Everett, D. W. (2014). Delivery of green tea catechin and epigallocatechin gallate in liposomes incorporated into low-fat hard cheese. *Food chemistry*, *156*, 176-183.

[7] Friedman, M., Levin, C. E., Lee, S. U., and Kozukue, N. (2009). Stability of green tea catechins in commercial tea leaves during storage for 6 months. *Journal of food science*, *74*(2), H47-H51.

[8] Nakagawa, K., and Miyazawa, T. (1997). Absorption and Distribution of Tea Catechin (-)-Epigallocatechin-3-Gallate, in the Rat. *Journal of nutritional science and vitaminology*, *43*(6), 679-684.

[9] Mukhtar, H., and Ahmad, N. (2000). Tea polyphenols: prevention of cancer and optimizing health. *The American journal of clinical nutrition*, *71*(6), 1698s-1702s.

[10] Sun-Waterhouse, D., Wadhwa, S. S., and Waterhouse, G. I. (2013). Spray-drying microencapsulation of polyphenol bioactives: a comparative study using different natural fibre polymers as encapsulants. *Food and Bioprocess Technology*, *6*(9), 2376-2388.

[11] Mozafari, M., Johnson, C., Hatziantoniou, S., and Demetzos, C. (2008). Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. *Journal of liposome research*, *18*(4), 309-327.

[12] Takahashi, M., Uechi, S., Takara, K., Asikin, Y., & Wada, K. (2009). Evaluation of an oral carrier system in rats: bioavailability and antioxidant properties of liposome-encapsulated curcumin. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *57*(19), 9141-9146.

[13] Isailović, B. D., Kostić, I. T., Zvonar, A., Đorđević, V. B., Gašperlin, M., Nedović, V. A., and Bugarski, B. M. (2013). Resveratrol loaded liposomes produced by different

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-24]

techniques. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, *19*, 181-189.

[14] Zou, L. Q., Liu, W., Liu, W. L., Liang, R. H., Li, T., Liu, C. M., and ... & Liu, Z. (2014). Characterization and bioavailability of tea polyphenol nanoliposome prepared by combining an ethanol injection method with dynamic high-pressure microfluidization. *Journal of agricultural and food chemistry*, *62*(4), 934-941.

[15] Fatouros, D. G., and Antimisiaris, S. G. (2002). Effect of amphiphilic drugs on the stability and zeta-potential of their liposome formulations: a study with prednisolone, diazepam, and griseofulvin. *Journal of colloid and interface science*, *251*(2), 271-277.

[16] Sorgi, F. L., and Huang, L. (1996). Large scale production of DC-Chol cationic liposomes by microfluidization. *International journal of pharmaceutics*, *144*(2), 131-139.

[17] Liu, W., Ye, A., Liu, C., Liu, W., and Singh, H. (2012). Structure and integrity of liposomes prepared from milk-or soybean-derived phospholipids during in vitro digestion. *Food Research International*, *48*(2), 499-506.

[18] Sinico, C., De Logu, A., Lai, F., Valenti, D., Manconi, M., Loy, G., and Fadda, A. M. (2005). Liposomal incorporation of Artemisia arborescens L. essential oil and in vitro antiviral activity. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, *59*(1), 161-168.

[19] Valenti, D., De Logu, A., Loy, G., Sinico, C., Bonsignore, L., Cottiglia, F., and & Fadda, A. M. (2001). Liposome-incorporated Santolina insularis essential oil: preparation, characterization and in vitro antiviral activity. *Journal of liposome research*, *11*(1), 73-90.

[20] Lu, Q., Li, D. C., and Jiang, J. G. (2011). Preparation of a tea polyphenol nanoliposome system and its physicochemical properties. *Journal of agricultural and food chemistry*, *59*(24), 13004-13011.

[21] Gibis, M., Vogt, E., and Weiss, J. (2012). Encapsulation of polyphenolic grape seed extract in polymer-coated liposomes. *Food & function*, *3*(3), 246-254.

[22] Gülseren, I., and Corredig, M. (2013). Storage stability and physical characteristics of tea-polyphenol-bearing nanoliposomes prepared with milk fat globule membrane phospholipids. *Journal of agricultural and* food chemistry, 61(13), 3242-3251.

[23] Makino, K., Yamada, T., Kimura, M., Oka, T., Ohshima, H., and & Kondo, T. (1991). Temperature-and ionic strength-induced conformational changes in the lipid head group region of liposomes as suggested by zeta potential data. Biophysical chemistry, 41(2), 175-183.

[24] Nakayama, T., Hashimoto, T., Kajiya, K., and Kumazawa, S. (2000). Affinity of polyphenols for lipid bilayers. Biofactors, 13(1‐4), 147-151.

[25] Kosaraju, S. L., D'ath, L., and Lawrence, A. (2006). Preparation and characterisation of chitosan microspheres for antioxidant delivery. *Carbohydrate Polymers*, *64*(2), 163-167.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-24]

Preparation and some characteristics of Nano liposomes containing olive leaf extract

Manafi Dizajyekan, M.[1], Hadad Khodaparast, M. H. [2*], Azadmard-Damirchi, S. [3], Valizadeh, H.[4] and Tabatabaei Yazdi, F. [5]

1. Ph.D. Student, Department of Food Science and Technology, International Branch of Ferdowsi University of Mashhad and member of scientific board of Islamic Azad University, Khoy Branch
2. Professors, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad
3. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz
4. Professors, Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
5. Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad

(Received: 2015/08/18 Accepted: 2016/05/16)

Olive leaf extract is a rich source of phenolic compounds that has antioxidant and antimicrobial effects. Phenolic compounds have been inactive gradually like other bioactive compounds and make a bitter taste in foods. Microencapsulation has been introduced as an effective technique for improve stability and prevention of bitter taste of bioactive compounds. The aim of this study was to capsulate of phenolic compounds of olive leaves extract as Nano liposomes. Nano liposomes are prepared using of phosphatidil Colin, cholesterol and olive Leaf extract by ethanol injection method and analyzed for particle size, Zeta potential and encapsulation efficiency. The mean volumetric diameters of liposomes were at the range of 50-100nm. All liposomes formulations had negative charged which increased with addition of extract up to phosphatidil Colin/extract ratio of 5/1, but higher concentration of extract led to decrease in negative charges of liposomes. Overall encapsulation efficiency of nano liposomes were 74-78 % but decreased to 57 % in phosphatidil Colin/extract ratio of 1/1. Infra-red Spectroscopy assay of samples showed there were not any chemical and physical interaction between polyphenolic compounds of olive leaves and liposomes structure. The results indicated the possibility of encapsulation of phenolic compound of olive leaves as Nano liposomes with desired properties and efficiency.

Key words: Olive leave, Nano liposomes, Zeta Potential, Nano Technology.

*Corresponding Author Email Address: khodaparast@um.ac.ir

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-04-24]