



تولید نانوحامل حاوی عصاره زغال اخته (*Cornus mas L.*) و ارزیابی رهایش ترکیبات زیست فعال ریز پوشانی شده در شرایط شبیه سازی شده گوارشی

زرین رادبه^۱، نارملا آصفی^{۲*}، حامد همیشه کار^۳، لیلا روفه گری نژاد^۴، اکرم پزشکی^۴

۱- دانشجوی دکتری مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران

۲- استادیار گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز، تبریز، ایران

۳- استاد مرکز تحقیقات علوم کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

۴- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران

اطلاعات مقاله

چکیده

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۹۸/۰۹/۰۹

تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۱/۲۳

کلمات کلیدی:

آنتی اکسیدان،

نانو کیوبوزوم،

ترکیبات زیست فعال،

زغال اخته،

پلی فنل ها،

برون تنی

ترکیبات زیست فعال میوه زغال اخته به عنوان آنتی اکسیدان های قدرتمند شناخته شده اند. پایداری این ترکیبات و سایر عصاره های آنتوسیانینی بسیار حایز اهمیت بوده و درون پوشانی روشی مناسب برای افزایش پایداری این ترکیبات می باشد بطوریکه باعث افزایش کاربرد ترکیبات زیست فعال در زمینه های غذایی، دارویی و آرایشی می گردد. در این تحقیق، فعالیت آنتی اکسیدانی ترکیبات زیست فعال محصور شده عصاره استخراجی زغال اخته توسط نانو کیوبوزوم های پوشش داده شده با روکش روده ای و رهایش آن در شرایط شبیه سازی شده محیط های گوارشی بررسی شد. عصاره استخراجی به دو شکل، درون پوشانی شده در نانو کیوبوزوم هایی با روکش روده ای و عصاره آزاد، برای تعیین اثر حفاظتی درون پوشانی بر روی ثبات ترکیبات فنولی و آنتی اکسیدان ها مورد مطالعه قرار گرفت. بر اساس نتایج به دست آمده میانگین اندازه ذرات و مقدار زتا پتانسیل نانو کیوبوزوم ها به ترتیب $49/3 \pm 5$ نانومتر و 16 ± 5 میلی ولت بود. همچنین نتایج FTIR نشان داد که هیچگونه برهمکنشی بین عصاره زغال اخته و نانو کیوبوزوم ها صورت نگرفته است عصاره فقط بصورت فیزیکی درون آنها قرار گرفته است.

DOI: 10.29252/fsct.18.01.13

* مسئول مکاتبات:

n.asefi@iaut.ac.ir

۱- مقدمه

با گسترش بیماری‌ها و کاهش سن ابتلا به آنها در سال‌های اخیر، علاقه‌مندی مصرف‌کنندگان و تولیدکنندگان برای توسعه غذاهای فراسودمند حاوی مواد غذا-دارو و زیست فعال افزایش یافته است. همچنین در سال‌های اخیر فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات زیست فعال گیاهی و عملکرد آنها در درمان بیماری‌ها و جلوگیری از اکسیداسیون محصولات غذایی مورد توجه قرار گرفته است [۱]. ترکیبات زیست فعال میوه زغال اخته (*Cornus mas L.*) از جمله این ترکیبات گیاهی هستند، که شامل ویتامین‌ها و ترکیبات فنولی می‌باشند [۲]. عمده‌ترین ترکیبات فنولی میوه زغال اخته آنتوسیانین‌ها مانند سیانیدین ۳-او-گالاکتوزید، یلارگونیدین ۳-او-گالاکتوزید و دلفینیدین ۳-او-گالاکتوزید و مرستین ۳-آرابینوز، کوئرستین ۳-گالاکتوزید و اسید گالیک می‌باشند [۳، ۴]. ترکیبات فنولی توانایی بالایی در مهار رادیکال‌های آزاد داشته و در غلظت‌های پایین مانع اکسیداسیون لیپیدها و کاهش فعالیت آنزیم‌های کبد شده و دارای خواص ضد سرطانی، ضد التهابی نیز می‌باشند [۵]. همچنین این ترکیبات با تحریک جزایر لانگر هانس پانکراس، منجر به تولید بیشتر انسولین بعد از مصرف مواد غذایی شده و باعث کاهش قابل توجه قند خون می‌شوند [۶]. ولی مشکل اصلی مصرف ترکیبات فنولی پایین بودن پایداری و زیست فراهمی این ترکیبات می‌باشد [۷]. درون پوشانی یکی از روش‌های پایدارکننده است، که در آن یک ماده زیست فعال مانند مواد مغذی، طعمی، دارویی و غذا-دارو توسط یک ماده دیگر (از جنس بیو پلیمر، پلیمر سنتزی یا ترکیبات لیپیدی) پوشش داده می‌شود. درون پوشانی بر حسب اندازه ذرات تولید شده، به دو نوع میکرو و نانو تقسیم بندی می‌شود [۸]. از مهم‌ترین نانوحامل‌های بر پایه‌ی لیپید، می‌توان به نانوامولسیون، نانولیپوزوم، نانوکپوزوم، نانو ذرات چربی (SLN) و حامل لیپیدی نانو ساختار (NLC) اشاره کرد [۹]. ساختار نانوکپوزوم‌ها از مواد لیپوتروپیک تشکیل شده و در واقع کریستال‌های مایع مکعبی شکل هستند و برخلاف مایعات، ساختار منظم خود را حفظ می‌کنند [۱۰]. نتایج حاصل از مطالعاتی که از نانوکپوزوم‌ها برای درون پوشانی ترکیبات زیست فعال

استفاده شده نشان داد، که این نانوحامل‌ها، حامل‌های مناسبی برای درون پوشانی ترکیبات حساس بوده و باعث افزایش پایداری آنها در برابر شرایط نامساعد می‌شوند [۱۱]. در سال‌های اخیر در زمینه پایداری ترکیبات زیست فعال عصاره زغال اخته و سایر عصاره‌های آنتوسیانینی مطالعات متعددی انجام گرفته و از انواع روش‌ها و حامل‌ها برای درون پوشانی این ترکیب استفاده شده است و درون پوشانی را روشی مناسب برای افزایش پایداری این ترکیبات گزارش کرده‌اند که باعث افزایش کاربرد ترکیبات زیست فعال در زمینه‌های غذایی، دارویی و آرایشی می‌گردد [۱۲]. مطالعاتی نیز در زمینه پوشش‌دهی نانوحامل‌ها با روکش روده‌ای انجام شده و این نوع پوشش را گزینه‌ای مناسب برای افزایش پایداری نانوحامل‌ها در شرایط نامساعد و بهبود جذب روده‌ای داروهای بارگیری شده گزارش کرده‌اند [۱۳].

هدف از مطالعه حاضر امکان‌سنجی درون پوشانی ترکیبات زیست فعال عصاره‌ی زغال اخته با نانوکپوزوم‌ها و پوشش دهی آن با روکش روده‌ای، و بررسی پایداری خاصیت آنتی‌اکسیدانی و پروفایل رهایش کنترل شده‌ی آن‌ها در محیط‌های گوارشی شبیه‌سازی شده می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد اولیه

زغال اخته واریته گلابی شکل (*Cornus-mas-Macrocarpa*)، از جنگل‌های ارسباران منطقه کلیر استان آذربایجان شرقی تهیه شد. گلیسرین مونو اولئات از شرکت گات فوز فرانسه، ادرایت S100 (*Eudragit*) و سورفاکتانت غیریونی پلوکسامر ۴۰۷ و نمک‌های صفرای از شرکت سیگما آلداریچ آلمان، ۴ - ۶ دی متیل سولفوکساید (DMSO, 99/9%)، سدیم هیدروکسید، پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات، سدیم کلرید و هیدروکلرید اسید ۳۷ درصد و آنزیم پپسین، پانکراتین از شرکت مرک آلمان و همه مواد مورد استفاده گرید آزمایشگاهی با خلوص بالا بودند.

۲-۲- استخراج عصاره

میوه زغال اخته پس از شستشو با آب ولرم در فریزر تحت دمای ۲۰- درجه سانتیگراد تا فرا رسیدن زمان مصرف منجمد شد. قسمت دم و پوست به صورت نازک جدا گردید و بعد از آن با رنده ریز خرد شد. زغال اخته خرد شده به نسبت ۱ به ۱۰ (وزنی/حجمی) با آب مخلوط و در دستگاه حمام فراصوت مدل (Ultrasonic Bath Sonorex Super, Bandelin, Germany) به مدت ۳۰ دقیقه در معرض امواج فراصوت با شدت ثابت قرار گرفت. سپس با استفاده از سانتریفیوژ مدل (Sigma 2-16KL, Germany) با ۹۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه عصاره استخراج شده از مواد جامد میوه جدا شد. در آخرین مرحله جهت نگهداری عصاره استخراج شده با استفاده از خشک کن انجمادی مدل (Christ Alpha 1-4, Germany) خشک شد و تا فرا رسیدن زمان استفاده درون فریزر ۲۰- نگهداری شد [۱۴].

۲-۳- تهیه نانویوبوزوم حاوی عصاره خشک شده زغال اخته

نانویوبوزوم‌ها به روش ترکیبی هموژنیزاسیون داغ با نیروی برشی بالا (Heidoiph ساخت آلمان) و سونیکاسیون تهیه شد. برای این منظور ابتدا گلیسرول مونوآلثات به عنوان فاز چربی و پلوکسامر ۴۰۷ به عنوان سورفکتانت فاز آبی در حمام آب گرم با دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد [۱۵] به طور جداگانه ذوب شد. ۱۰ میلی گرم از عصاره خشک شده میوه زغال اخته در ۱۰۰ میکرو لیتر دی متیل سولفوکساید حل شد. مخلوط بدست آمده به گلیسرول مونوآلثات اضافه شد سپس مخلوط بمدت یک دقیقه با سرعت

۷/۵، ۴۰۷، ۱۰ میلی لیتر پلوکسامر rpm ۱۰k هموژنیزه شد و ۱۰ میلی لیتر پلوکسامر ۴۰۷، ۷/۵، ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر محلول با همان دمای مخلوط لیپید قطره قطره به فاز لیپید اضافه و به مدت ۲۰ دقیقه با سرعت k rpm ۲۰ هموژنیزاسیون انجام شد. در نهایت جهت کاهش اندازه ذرات در مقیاس نانو، سونیکاسیون توسط سونیکاتور پروب (۱۰ سیکل ۱ دقیقه ای و ۱ دقیقه استراحت ما بین هر سیکل) بر روی نمونه‌های کیوبوزومی انجام شد و بعد از ۲۴ ساعت نگهداری در دمای محیط، نانویوبوزوم‌ها در مقیاس نانومتری حاصل شد. به-

علت استفاده از دمای بالا در تهیه فرمولاسیون، لیپید لیوتروپیک به صورت امولسیون قطرات لیپیدی محصور شده با لایه سورفکتانت در محیط آبی تولید شده و سپس با خنک شدن سیستم در دمای اتاق، نانوقطره‌های حاوی لیپید به شکل کریستال‌های مکعبی شکل لیپیدی متبلور گشته و نانویوبوزوم تولید شد [۱۶].

۲-۴- پوشش دهی نانو کیوبوزوم‌های حاوی ترکیبات زیست فعال زغال اخته با پوشش روده‌ای

پوشش دهی نانویوبوزوم‌های حاوی ترکیبات زیست فعال زغال اخته با محلول ادراژیت به روش dip coating انجام شد. به همین منظور، محلول ۵٪/۱۰۰ ادراژیت S۱۰۰ با حل کردن پودر آن در استون و الکل ایزوپروپیل (۱:۱) آماده و نانو کیوبوزوم آماده شد. سپس نانویوبوزوم‌ها قطره قطره به محلول روکش اضافه شدند [۱۷].

۲-۵- تعیین اندازه، پتانسیل زتا و مورفولوژی نانو کیوبوزوم‌ها

برای تعیین اندازه ذرات و شاخص چندپخشی و پتانسیل زتا از دستگاه اندازه‌گیری ذرات بر اساس پراکنش نور لیزر (Zeta Sizer Pro, Instruments Ltd, UK.) استفاده شد. نمونه‌ها قبل از قرارگیری در دستگاه ده برابر بوسیله آب دیونیزه رقیق شده و میانگین اندازه ذرات، بر مبنای قطر حجمی بیان شد [۱۸]. اندازه‌گیری در pH=۷/۴، دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و توان ۱۴۹ وات انجام شد [۱۹].

۲-۶- تعیین کارایی درون پوشانی

کارایی درون پوشانی^۱ و میزان بارگیری نانو ذرات^۲ از عصاره زغال اخته با استفاده از رابطه‌های ۱ و ۲ به ترتیب محاسبه می‌شود. برای اندازه گیری مقدار عصاره کپسوله نشده ۲ میلی لیتر از نانوفرمولاسیون آماده شده بوسیله فیلتر آمیکون (MWCO 30 kDa, Millipore, USA) به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت rpm ۴۰۰۰ فیلتر شد. میزان عصاره بارگزاری نشده با استفاده از

1. Encapsulation Efficiency
2. Loading Capacity

۹-۲- بررسی میزان رهائش ترکیبات زیست فعال

در محیط‌های شبیه‌سازی شده معده و روده

برای بررسی رهائش ترکیبات زیست فعال در محیط‌های شبیه‌سازی شده‌ی گوارشی، ابتدا دو محیط شبیه‌سازی شده‌ی معده (SGM) با pH=۲/۱ و روده (SIM) با pH=۷/۴ تهیه شد. محیط معده متشکل از سدیم کلرید (۲ گرم بر لیتر)، هیدروکلرید اسید ۳۷ درصد (۰/۰۰۸ لیتر بر لیتر) و آنزیم پپسین (۲/۳ گرم بر لیتر) بوده و محیط روده نیز حاوی سدیم هیدروکسید (۰/۸۹۶ گرم بر لیتر)، پتاسیم دی‌هیدروژن فسفات (۸/۶ گرم بر لیتر)، پانکراتین (۴/۷۶ گرم بر لیتر) و نمک صغراوی (۱۶/۵ گرم بر لیتر) تهیه شد. برای اندازه‌گیری میزان رهائش عصاره زغال اخته از فرمولاسیون نانوکیوبوزوم از روش دیالیز استفاده شد. ۴ میلی لیتر عصاره آزاد و عصاره درون‌پوشانی شده در ساختار نانوکیوبوزوم بطور جداگانه یکی یکی با ۴ میلی لیتر PBS با pH=۷/۴ رقیق شد و در کیسه‌های دیالیز (kDa ۲۰ MWCO) جداگانه قرار داده شدند و در داخل ۵۰ میلی لیتر PBS (محیط‌های شبیه‌سازی شده معده و روده) غوطه‌ور شدند. دمای رهائش عصاره در سیستم شبیه‌سازی شده *in vitro* ۳۷ درجه سانتیگراد و سرعت هم زدن ۳۰۰ rpm بود. در طی انجام آزمایش در زمانهای مختلف ۰، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰ و ۸۰ ساعت، ۱ میلی لیتر از نمونه‌ها با محیط تازه جایگزین شدند. میزان رهائش عصاره از کیسه دیالیز با اسپکتروفتومتری UV-VIS مدل Shimadzu, Japan در طول موج ۵۶۷ نانومتر اندازه‌گیری شدند [۲۲].

۱۰-۲- بررسی با اسپکتروسکوپ FT-IR

برای شناسایی نوع گروه‌های عاملی و پیوندهای موجود در مولکول‌های یک نمونه از طیف سنجی مادون قرمز FT-IR (Olympus, Japan) استفاده شد. برای این منظور با پودر حاصله از خشک‌کن انجمادی، نانو ذره قرص پتاسیم بروماید به نسبت ۱ به ۱۰۰ با ضخامت ۱ میلی‌متر ساخته شد و

روش اسپکتروفتومتری UV-VIS (Ultrospec 2000, Scintec, UK) در طول ۵۶۷ نانومتر اندازه‌گیری شد.

رابطه (۱)

= کارایی درون پوشانی (درصد)

$100 \times \frac{\text{میزان ترکیبات زیست فعال درون پوشانی شده}}{\text{میزان ترکیبات زیست فعال کل}}$

رابطه (۲)

= میزان ترکیب زیست‌فعال بارگذاری شده (درصد)

$100 \times \frac{\text{میزان ترکیب زیست‌فعال بارگذاری شده}}{\text{وزن کل نانو ذرات}}$

۷-۲- مطالعه ریزساختار بامیکروسکوپ الکترونی

رویشی (SEM)

به منظور مطالعه ریزساختار و مورفولوژی نمونه‌های کیوبوزومی، از دستگاه میکروسکوپ الکترونی رویشی مدل (Germany, Philips XL30) استفاده شد [۲۰].

۸-۲- تعیین پایداری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی

ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های عصاره آزاد و درون پوشانی شده با استفاده از روش اندازه‌گیری آنتی‌اکسیدان DPPH و مطابق با روش AOAC ارزیابی شد. برای اندازه‌گیری فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آزاد و درون‌پوشانی شده در روزهای ۱، ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ به هر یک از نمونه‌ها، ۱ میلی لیتر از محلول DPPH افزوده و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سانتیگراد قرار داده شد و سپس تغییرات جذب بعد از نگهداری در تاریکی در طول موج ۵۱۷ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر نور مرئی خوانده شده و با قرار دادن مقادیر بدست آمده در رابطه (۳) درصد بازدارندگی DPPH به دست آمد [۲۱].

رابطه (۳)

= درصد بازدارندگی رادیکال DPPH

$100 \times \frac{\text{جذب کنترل} - \text{جذب نمونه}}{\text{جذب کنترل}}$

جذب کنترل

3. Simulated Gastric Media

4. Simulated Intestinal Media

5. Fourier Transform Infrared Spectroscopy

طیف FTIR نمونه‌ها، با استفاده از یک طیف‌سنج مادون قرمز در محدوده 4000 تا 400 cm^{-1} مورد ارزیابی قرار گرفت [۲۰].

۲-۱۱- تجزیه و تحلیل آماری

در این تحقیق، آزمون‌ها با سه تکرار انجام شد. نتایج بدست آمده بر حسب میانگین با انحراف از معیار ($\pm SD$) بیان شد. برای تحلیل داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس یک طرفه و دوطرفه ANOVA و آزمون مقایسه میانگین چندگانه دانت در سطح 5% استفاده شد (Prism, version 8.0, GraphPad software, INC نرم افزار آماری Prism در تحلیل داده‌ها و جهت رسم نمودارها مورد استفاده قرار گرفت).

۳- نتایج و بحث

۳-۱- ویژگی‌های نانو کیوبوزوم‌های بارگزاری

شده با عصاره زغال اخته

روش هموژنیزاسیون یکی از روش‌های پراثری در تولید نانوامولسیون و حامل‌های لیپیدی نانوساختار است. فرایند هموژنیزاسیون انرژی لازم برای پخش کردن بهتر مخلوط لیپیدی و تولید ذرات کوچک (در مقیاس نانومتری) را فراهم می‌سازد. با افزایش دما اندازه ذره به علت کاهش ویسکوزیته فاز داخلی کاهش می‌یابد و در واقع خود هموژنیزاسیون هم سبب افزایش دمای نمونه می‌شود [۲۳]. همچنانکه در شکل شماره ۱ مشاهده می‌شود در آنالیز ویژگی‌های نانو ذرات میانگین اندازه ذرات نانو کیوبوزوم‌ها شکل ۳a-۱ و پتانسیل زتا آنها شکل ۳b-۱ به ترتیب $49.37 \pm 4\text{ nm}$ و $-16 \pm 5\text{ mV}$ بود و شاخص پراکندگی ذرات PDI را که نمایانگر توزیع اندازه باریک و یکنواختی سیستم است کوچکتر از 0.3 می‌باشد. مرفولوژی سطحی نانو کیوبوزوم‌ها با میکروسکوپ الکترونی روبشی ارزیابی شد. مشاهدات SEM نشان داد که ذرات نانو کیوبوزوم حاوی عصاره زغال اخته با سطحی صاف بوده و گزارش‌های اندازه ذرات 49.37 و ضریب پراکندگی ذرات بوسیله PDI را تأیید و

نشان می‌دهد که $PDI < 0.3$ با توزیع باریک اندازه و ذرات هموزن آنها تولید شده است. در تحقیقی که سالم و همکاران [۲۴] دانایی و همکاران [۲۵] بر روی تأثیر اندازه ذره و PDI آن بر روی کاربرد کلینیکی سیستم‌های نانو حامل لیپیدی مطرح کردند که PDI کوچکتر یا مساوی 0.3 در کاربردهای رسانش دارویی این نانو حامل‌ها اندازه قابل قبولی است و مبین هموزن بودن ذرات است. PDI (که بیانگر توزیع اندازه ذرات در یک نمونه است) بلحاظ عددی در گستره $0-1$ بیان می‌شود که صفر نمایانگر یک نمونه عالی از ذرات کاملاً یونیفرم و یک اندازه است و ۱ برای نمونه پلی دیسپرس است [۲۶].

در مطالعاتی که بوسیله ادیب و همکارانش بر روی تأثیر اندازه نانوذرات در جابجایی آنها در لایه‌های مختلف پوست انجام گرفت، گزارش شده است که ذرات در گستره زیر 100 نانومتر نفوذ بهتری به سلول دارند [۲۷]. مطابق یافته‌های گیل و همکاران در تحقیقی بر روی تأثیر بار سطحی نانوذرات در نفوذ آنها به پوست، گزارش کرده اند که بار سطحی نانوذرات یک فاکتور کلیدی است که پایداری نانوذرات را تحت تأثیر قرار می‌دهد. نانوذرات با اندازه کوچکتر دارای زتا پتانسیل بالاتری بوده و پایداری بیشتری هستند [۲۸]. زتا پتانسیل یکی از شاخص‌های اصلی برای پایداری نانوذرات است و هر چقدر بالا باشد بیانگر پایداری بیشتر است بطور معمول نمونه‌های با زتا پتانسیل بالا به دلیل دفع الکتریکی انبوه نمی‌شوند. علیرغم مزایای بار منفی سطح ذرات، کاهش بیشتر میزان پتانسیل زتا و بیشتر منفی شدن باعث افزایش واکنش با سطوح بیولوژیکی خواهد شد. شاخص‌های کارایی درون پوشانی و ظرفیت بارگیری عصاره در فرمولاسیون نانو کیوبوزوم‌ها به ترتیب $12.31 \pm 95.14\%$ و $23.1 \pm 9.51\%$ بود. ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نانوحامل‌های لیپیدی تأثیر مهمی در جذب سلولی و زیست فراهمی ترکیبات درمانی کپسوله شده دارد. اندازه ذره در نانوحامل‌های لیپیدی بسیار مهم بوده و بر روی پایداری، کارایی و پروفایل رهایش توزیع زیستی و جذب سلولی اثر دارد. ذرات کوچکتر برای مدت طولانی‌تری در بدن منتشر می‌گردند بدون اینکه توسط سلول‌های فاگوسیتوز حذف

اندوسیتوز اثر می‌گذارد. میزان جذب بوسیله سلول‌های سیستم ایمنی با افزایش سایز نانو حامل‌های لیپیدی افزایش می‌یابد و اندازه ذره همینطور بر روی رسانش سیستمیک هم اثر دارد و ذرات با اندازه مساوی یا کوچکتر از ۱۵۰ نانومتر می‌توانند وارد محیط میکروی تومورها شوند [۲۶].

شوند و این زمان طولانی‌تر به جذب بهتر و افزایش کارایی عصاره نانوفرموله شده منجر می‌شود. شایان ذکر است که ذرات زیستی بسیار کوچک در مقیاس ۱۰ نانومتر قبل از لیز شدن توسط آنزیم‌های هضم کننده به درون جریان خون نفوذ کرده و مواد انکپسوله شده را به محل هدف می‌رسانند [۲۹]. اندازه نانو ذرات و PDI سیستم‌های نانو حامل بر روی جذب سلولی از طریق

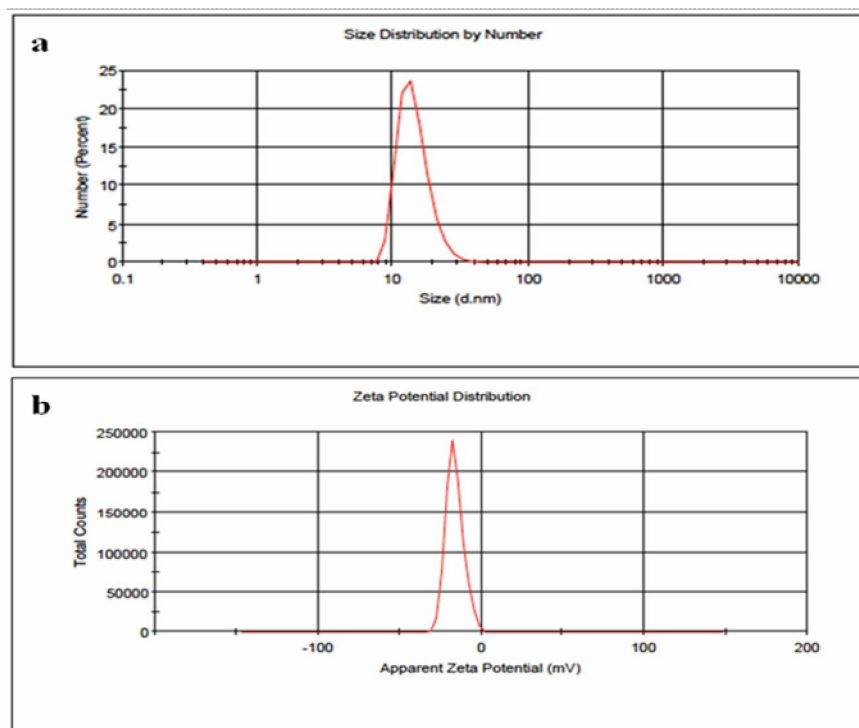


Fig 1 Showing a) size analysis, b) zeta potential analysis of *Cornus mas* extract-Nano Cubosomes

آنتوسیانین‌ها تا نقطه مورد هدف که روده است، جلوگیری می‌کند.

برای تعیین میزان فنول تام عصاره آزاد زغال اخته و عصاره نانوفرموله شده آن از روش فولین سیو کالتو استفاده شد سپس برای بررسی بیشتر فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره کپسوله نشده و عصاره نانو کپسوله شده با سنجش توانایی آنها در خشتی کردن رادیکال آزاد DPPH در طی ۶۰ روز نگهداری اندازه گیری شد. نتایج حاصله بیانگر توانایی خشتی کردن وابسته به زمان رادیکال‌های آزاد بوده و میزان خشتی سازی رادیکال‌های آزاد برای عصاره آزاد و عصاره نانوکپسوله شده در روش DPPH روز اول آماده

۲-۳- پایداری خاصیت آنتی-اکسیدانی نانو

ذرات

بعد از مصرف خوراکی، زیست فراهمی آنتوسیانین‌ها به توانایی عبور آنها از سطح اپیتلیال گاسترو اینتستینال و ظاهر شدن آنها در جریان خون بستگی دارد در طی عبور، فاکتورهای زیادی ممکن است آنتوسیانین‌ها را تحت تأثیر قرار داده و باعث تجزیه آنها شوند [۳۰]. بنابراین به دلیل تجزیه شدن، آنتوسیانین‌ها نمی‌توانند اثرات بیولوژیکی شان از جمله خاصیت آنتی اکسیدانی شان را بخوبی نشان دهند. انکپسوله کردن عصاره زغال اخته با نانوکپسوزوم‌های پوشش داده شده با ادرائیت S۱۰۰ از تجزیه

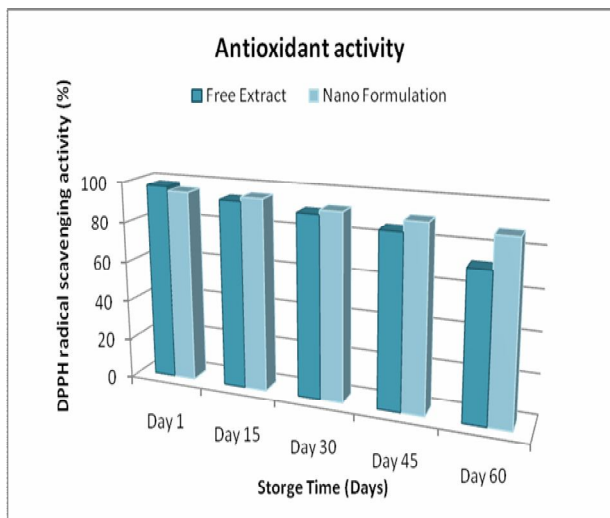


Fig 2 Represents DPPH antioxidant stability of free *Cornus mas* extract and *Cornus mas* extract-Nano Cubosomes.

۳-۳- بررسی میزان رهایش ترکیبات زیست فعال

در محیط‌های شبیه‌سازی شده معده و روده ای

همچنانکه در شکل ۳ مشاهده می‌شود رهایش ترکیبات زیست فعال نانو فرموله شده به درون محیط‌های شبیه سازی شده روده و معده در طول زمان تدریجی بوده و میزان رهایش ترکیبات زیست فعال نانو فرموله شده به درون محیط شبیه سازی شده روده در مقایسه با محیط شبیه سازی شده معده بیشتر بود. رهایش عصاره از نانوکیوبوزوم در محیط اسیدی ($pH=1/2$) در محیط شبیه معده) بعد از ۵ ساعت حدود ۵٪ بود و در محیط شبیه روده با $pH=7/4$ رهایش عصاره آزاد در ۵ ساعت حدود ۲۲٪ بود. بعلاوه رهایش عصاره از نانو کیوبوزوم‌ها بعد از ۳۰ ساعت در $pH=7/4$ ۶۱٪ و در $pH=1/2$ ۳۸٪ بود. طبق نتایج حاصله میزان رهایش عصاره زغال اخته از نانو کیوبوزوم‌ها در محیط شبیه روده حدود ۲۳٪ بیشتر از محیط شبیه سازی شده معده بود و بنابر این پوشش دادن نانو کیوبوزوم‌ها با روکش روده ای ادرائیت S_{100} که هر دو حساس به pH روده (۷/۴) هستند، باعث افزایش رهایش ترکیبات زیست فعال در محیط روده و کاهش رهایش آن در محیط معده شده است.

سازی بترتیب ۹۷/۸۲٪ و ۹۵/۵۵٪ بودند. بعد از ۶۰ روز خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره نانو فرموله شده ۷/۹۹٪ کاهش داشته در حالیکه عصاره آزاد زغال اخته ۲۵٪ کاهش نشان دادند. با درون‌پوشانی ترکیبات فنولی و آنتی‌اکسیدانی عصاره زغال اخته و محبوس شدن آن در ساختار نانوکیوبوزوم از تخریب آنها در برابر شرایط محیطی مانند اکسیژن و اشعه UV جلوگیری می‌شود. همینطور بررسی میزان پایداری ترکیبات فنولی نمونه‌ها نشان دادند که درون‌پوشانی می‌تواند از تخریب حدود ۳۹٪ ترکیبات فنولی در مقایسه با عصاره آزاد جلوگیری کند نتایج حاصل از ارزیابی پایداری ترکیبات فنولی نتایج پایداری خاصیت آنتی‌اکسیدانی را تأیید می‌کند. بین میزان آنتوسیانین و ظرفیت بالای آنتی اکسیدانی ارتباط مستقیمی وجود دارد. نتایج به دست آمده از اندازه گیری پایداری فنولی، نتایج حاصل از پایداری آنتی اکسیدان را تایید می‌کند. همچنین این یافته‌ها با نتایج به دست آمده از مطالعات هوموکی^۶ و همکاران [۳۱] که بر روی خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره آلبالو کار کردند همخوانی دارد. آنها گزارش دادند که بین محتوای آنتوسیانین‌ها و ظرفیت آنتی‌اکسیدان ارتباط وجود دارد شکل ۲ حاکی از تأثیر حفاظت قوی درون‌پوشانی عصاره زغال اخته در سیستم نانوحامل بر روی خاصیت آنتی اکسیدانی آن می‌باشد. این نتایج بر تأثیر حامل و مزایای انکپسوله کردن عصاره زغال اخته با نانوکیوبوزوم‌های پوشش داده شده با ادرائیت S_{100} تأکید دارد. پول^۷ و همکاران [۳۲] و هریس^۸ و همکاران [۳۳] نشان دادند که کپسوله کردن ترکیبات فعال زیستی می‌تواند از فعالیت آنتی اکسیدان‌های آنها محافظت کند. عبدالله و همکاران [۳۴] گزارش دادند که کپسوله کردن کوئرستین و کاتچین می‌تواند مانع از بین رفتن فعالیت آنتی اکسیدانی آنها شود. همچنین هریس و همکاران [۳۳] بیان کردند که کپسوله کردن آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی استخراج شده از پاراگوارینسنس می‌تواند فعالیت آنتی اکسیدانی پلی فنول‌ها را حفظ کند.

6. Homoki

7. Pool

8. Haris

بیانگر اینست که هیچگونه برهمکنش بین مولکولی بین عصاره زغال اخته و نانوکیوبوزوم اعم از پیوند آمیدی، آمینی و سایر پیوندهای پلیمری مشاهده نگردید. در هر دو نمودار پیکها در طول موج گستره ۲۵۰۰-۳۳۰۰ که نشان دهنده پیوند کششی O-H در طول موج گستره ۱۷۳۵-۱۷۵۰ نشان دهنده پیوند خمشی C=O در طول موج گستره ۱۱۵۰-۱۰۸۵ نشان دهنده پیوند کششی C-O و در طول موج گستره ۹۶۰-۹۸۰ نشان دهنده پیوند کششی C=C می باشد. عدم حضور پیکهای جدید در نانو کیوبوزوم، نشانگر برهمکنشهای فیزیکی ضعیف مانند پیوندهای لحظه‌ای، هیدروژنی و واندروالسی بین اجزا با عصاره فنولی است و هیچ برهمکنش شیمیایی بین آنها رخ نداده است؛ بنابراین می توان نتیجه گرفت عصاره زغال اخته در ساختار نانوکیوبوزوم درون پوشانی شده است و ترکیب فعال با دیگر اجزاء موجود در فرمولاسیون برای تولید فرمولاسیونی پایدار سازگار است. توکلی پور و همکاران در سال (۲۰۱۹) نتایج مشابهی را که بر روی نانو ریز پوشانی روغن دانه انار گزارش کرده اند که در نمودارهای طیف سنجی FTIR هیچگونه پیوند کووالانسی بین روغن و پروتئین درون پوشانی کننده تشکیل نشده است و روغن صرفاً بطور فیزیکی در درون پروتئین به دام افتاده و درون پوشانی شده است. ساختار و عملکرد روغن در طول فرایند درون پوشانی دستخوش هیچگونه تغییری نبوده و خاصیت آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی آن حفظ شده است [۳۶]. بولیستی^۹ و همکاران در سال (۲۰۱۳) در پژوهشی که بر روی فرمولاسیون و بررسی رهایش مستمر داروی ضد دیابت نوع دو کپسوله شده در کیوبوزوم انجام داده اند با مطالعه بر روی برهمکنش بین دارو و کیوبوزوم با طیف سنجی FTIR مطرح کرده اند که در این طیف سنجی پیکها مشابه هم بودند و پیک جذبی بیانگر برهمکنش بین دارو و کیوبوزوم دیده نشد و نتیجه گرفته اند که کیوبوزومها با رهایش کنترل شده دارو می توانند بعنوان سیستم جدید رسانش دارو مطرح شوند [۳۷].

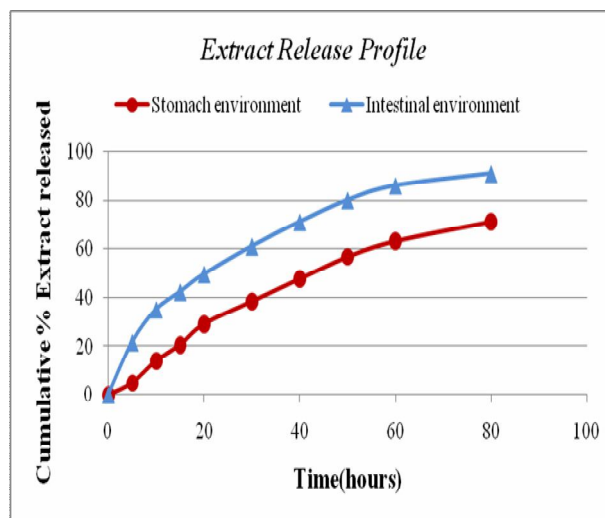


Fig 3 Comparative *in vitro* *Cornus mas* extract release profile (%) in pH 1.2 (simulated gastric media) and in pH 7.4 (simulated intestinal media)

۳-۴- بررسی نتایج حاصل از طیف سنجی مادون

قرمز (FTIR)

در این پژوهش آنالیز طیف سنجی مادون قرمز به منظور شناسایی گروههای شیمیایی و همچنین برهمکنشهای احتمالی ایجاد شده بین مواد موجود در نانوفرمولاسیون مورد ارزیابی قرار گرفت. یکی از مهم ترین آزمون ها در ارتباط با تشخیص برهمکنشهای موجود میان اجزا نانو حامل، آزمون FTIR است که آزمون کیفی مؤثر برای شناسایی ترکیبات آلی مواد تشکیل دهنده کمپلکس و محصولات ترکیبی و همچنین گروههای عاملی موجود در ساختار آنها و نمایش تغییرات ساختاری در آنها است. اسپکتروسکوپی مادون قرمز پرتو مربوط به فرکانس را در گستره 4000 cm^{-1} - 400 cm^{-1} جذب میکند این جذب شامل ارتعاش کششی و خمشی برای پیوند کووالان مولکول هاست [۳۵]. پیکهای حاصل از این آزمون در شکل ۴ نشان داده شده است. با توجه به نتایج حاصل از اسپکتروسکوپی مادون قرمز (شکل ۴a و b) به ترتیب برای نانوکیوبوزوم blank و نانوکیوبوزوم حاوی عصاره زغال اخته را نشان می دهد. شباهت بین سیگنال های هر دو نمونه

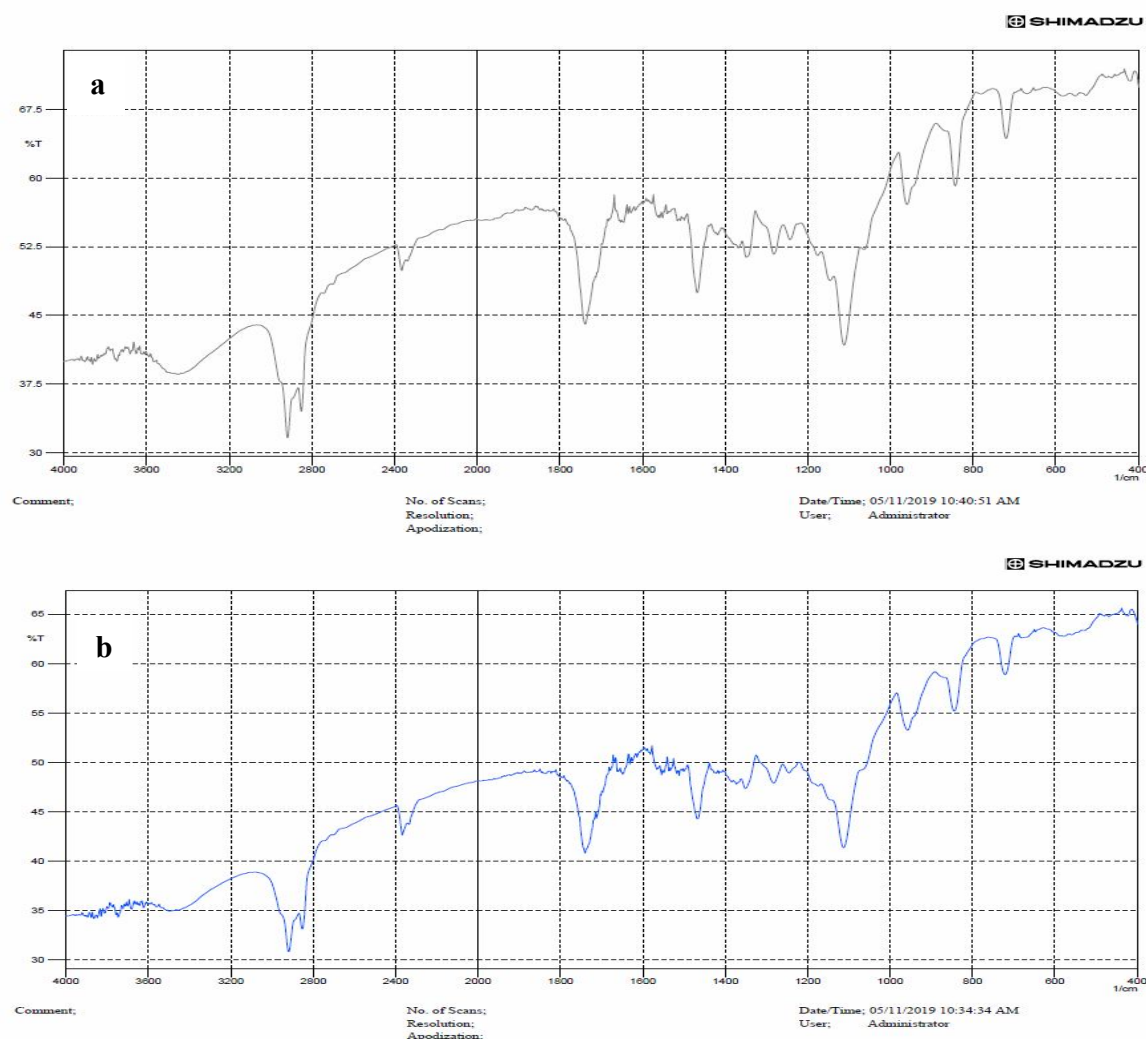


Fig 4 FTIR Spectrum a)blank nanocubosomes b)nanocubosomes + *Cornus mas* extract

۵- منابع

- [1] Guldiken, B., Gibis, M., Boyacioglu, D., Capanoglu, E., Weiss, J. 2018. Physical and chemical stability of anthocyanin-rich black carrot extract-loaded liposomes during storage. *Food Research International*. 108: 491–497.
- [2] De Moura, S.C.S.R., Berling, C.L., Germer, S.P.M., Alvim, I.D., Hubinger, M.D. 2018. Encapsulating anthocyanins from *Hibiscus sabdariffa* L. calyces by ionic gelation: Pigment stability during storage of microparticles. *Food Chemistry*. 241: 317–327.
- [3] Hsieh, T., Juan, G., Darzynkiewicz, Z., Wu, J.M. 1999. Resveratrol increases nitric oxide synthase, induces accumulation of p53 and p21

۴- نتیجه گیری کلی

این مطالعه نشان داد که عصاره بلحاظ فیزیکی در درون نانو حامل‌های کیوبوزومی قرار گرفته و هیچگونه برهمکنشی بین عصاره زغال اخته و نانوکیوبوزوم رخ نداده است. بنابراین ساختار ترکیبات زیست فعال تغییر نکرده و خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره حفظ شده است. پس سیستم رسانش نانوکیوبوزومی می‌تواند بطور مؤثری از خاصیت آنتی اکسیدانی عصاره زغال اخته محافظت نماید و می‌توان آن را بعنوان یک ترکیب جدید برای غذاهای فراسودمند پیشنهاد داد.

- antihyperlipidaemic activity. *Saudi Pharmaceutical Journal*. 26: 224–231.
- [12] Wang, W., Jung, J., Zhao, Y. 2017. Chitosan-cellulose nanocrystal microencapsulation to improve encapsulation efficiency and stability of entrapped fruit anthocyanins. *Carbohydrate Polymers*. 157: 1246–1253.
- [13] Nielsen, L.H., Rades, T., Boyd, B., Boisen, A. 2017, Microcontainers as an oral delivery system for spray dried cubosomes containing ovalbumin. *Eur J Pharm Biopharm*. Sep;118:13-20. doi: 10.1016/j.ejpb.2016.12.008.
- [14] Wintola, O.A. and Afolayan, A.J. 2011. Phytochemical constituents and antioxidant activities of the whole leaf extract of *Aloe ferox* Mill. *Pharmacogn Mag*. 7.28:325-33.
- [15] Saber, M. M. , Al-mahallawi, A. M. , Nassar, N. N. , Stork, B. and Shouman, S. A. 2018. Targeting colorectal cancer cell metabolism through development of cisplatin and metformin nano-cubosomes. *BMC Cancer*. 18: 822
- [16] Ahirrao, M., Shrotriya, S. 2017. In vitro and in vivo evaluation of cubosomal in situ nasal gel containing resveratrol for brain targeting. *Drug Development and Industrial Pharmacy*. 43: 1686–1693.
- [17] Mehta, R. , Chawla, A., Sharma, P. and Pawar, P. 2013. Formulation and in vitro evaluation of Eudragit S-100 coated naproxen matrix tablets for colon-targeted drug delivery system. *J Adv Pharm Technol Res*. 4(1): 31–41.
- [18] Conchillo, A., Ansorena, D. and Astiasaran, I. 2005. Intensity of lipid oxidation and formation of cholesterol oxidation products during frozen storage of raw and cooked chicken. *J Sci Food Agric* 85:141– 146
- [19] Ghorbanzade, T., Jafari, S.M., Akhavan, S., Hadavi, R. 2017. Nano-encapsulation of fish oil in nano-liposomes and its application in fortification of yogurt. *Food Chemistry*. 216: 146–152.
- [20] Babazadeh, A., Ghanbarzadeh, B., Hamishehkar, H. 2017. Phosphatidylcholine-rutin complex as a potential nanocarrier for food applications. *Journal of Functional Foods*. 33: 134–141.
- [21] Mishra, K., Ojha, H., Chaudhury, N.K. 2012. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH - assay: A critical (WAF1/CIP1) and suppresses cultured bovine pulmonary artery endothelial cell proliferation by perturbing progression through S and G 2 . *Cancer Res*. , 59, 2596–2601.
- [4] Tao, Y., Wang, P., Wang, J., Wu, Y., Han, Y., Zhou, J., 2017. Combining various wall materials for encapsulation of blueberry anthocyanin extracts: Optimization by artificial neural network and genetic algorithm and a comprehensive analysis of anthocyanin powder properties. *Powder Technology* 311, 77–87.
- [5] De Biaggi, M., Donno, D., Mellano, M.G., Riondato, I., Rakotoniaina, E.N., Beccaro, G.L. 2018. *Cornus mas* (L.) Fruit as a Potential Source of Natural Health-Promoting Compounds: Physico-Chemical Characterisation of Bioactive Components. *Plant Foods for Human Nutrition*. 73: 89–94.
- [6] Flores, F.P., Singh, R.K., Kerr, W.L., Phillips, D.R., Kong, F. 2015. In vitro release properties of encapsulated blueberry (*Vaccinium ashei*) extracts. *Food Chemistry*. 168: 225–232.
- [7] Babaloo, F., Jamei, R. 2018. Anthocyanin pigment stability of *Cornus mas*-*Macrocarpa* under treatment with pH and some organic acids. *Food Science and Nutrition*. 6: 168–173.
- [8] Kotla, N.G., Chandrasekar, B., Rooney, P., Sivaraman, G., Larrañaga, A., Krishna, K.V., Pandit, A., Rochev, Y. 2017. Biomimetic Lipid-Based Nanosystems for Enhanced Dermal Delivery of Drugs and Bioactive Agents. *ACS Biomaterials Science and Engineering*. 3: 1262–1272.
- [9] Kwon, S.H., Ahn, I.S., Kim, S.O., Kong, C.S., Chung, H.Y., Do, M.S., Park, K.Y. 2007. Anti-obesity and hypolipidemic effects of black soybean anthocyanins. *Journal of Medicinal Food*. 10:552-556 .
- [10] Muhammad, F., Nguyen, T.D.T., Raza, A., Akhtar, B., Aryal, S. 2017. A review on nanoparticle-based technologies for biodegradation. *Drug and Chemical Toxicology*. 40: 489–497. Pedreschi, F., Claudia, C., Moyano, P., & Troncoso, E. 2008. Oil distribution in potato slices during frying. *Journal of Food Engineering*, 87, 200-212.
- [11] Matloub, A.A., AbouSamra, M.M., Salama, A.H., Rizk, M.Z., Aly, H.F., Fouad, G.I. 2018. Cubic liquid crystalline nanoparticles containing a polysaccharide from *Ulva fasciata* with potent

- degradation in human saliva. *Food Chem.* 135:738–47
- [29] Lila MA, Ribnicky DM, Rojo LE, Rojas-Silva P, Oren A, et al. 2012. Complementary approaches to gauge the bioavailability and distribution of ingested berry polyphenolics. *J. Agric. Food Chem.* 60:5763–71
- [30] Homoki, W., Zhu Y, Li C. 2016. Effect of blueberry anthocyanins malvidin and glycosides on the antioxidant properties in endothelial cells. *Oxidative Med Cell Longev.* <https://doi.org/10.1155/2016/1591803>
- [31] Pool H., Quintanar D., J. de Dios Figueroa, C.M. Mano, J.E.H. Bechara, L.A. Godínez, S.J.J.o.n. Mendoza, 2012. Antioxidant effects of quercetin and catechin encapsulated into PLGA nanoparticles, 86. 135:738–47
- [32] Harris R., Lecumberri E., Mateos-Aparicio I., Mengibar M., Heras A.J.C.P., 2011. Chitosan nanoparticles and microspheres for the encapsulation of natural antioxidants extracted from *Ilex paraguariensis*, 84 803-806.
- [33] Abdullah, S., Zainal Abidin, S. A., Murad, N. A., Makpol, S., Ngah W.Z. W., Yusof, Y. A. M. 2010. Ginger extract (*Zingiber officinale*) triggers apoptosis and G0/G1 cells arrest in HCT 116 and HT 29 colon cancer cell lines. *African Journal of Biochemistry Research* Vol. 4(4), pp. 134-142
- [34] Sarabandi K., Mahoonak A.S., Akbari M.J.J.o.F.P.E. 2019. Physicochemical properties and antioxidant stability of microencapsulated marjoram extract prepared by co-crystallization method, 42 e12949.
- [35] 36 Tavakolipour H., Mokhtarian M., (2016). Nano-encapsulation of Pomegranate Seed Oil by Liquid-liquid Dispersion Method and Oil Releasing in Gastric Simulated Conditions. *Iranian journal of nutrition sciences and food technology.* 11(2)75-84. (in farsi)
- [37] Bolisetti S. S., Reddy M.S. 2013. Formulation and In-vitro Evaluation of Gastro retentive In-situ Floating gels of Repaglinide Cubosomes /JPR:BioMedRx: An International Journal, 1(8), 787-797
- review and results. *Food Chemistry.* 130: 1036–1043.
- [22] Zhao, L., Temelli, F., Chen, L. 2017. Encapsulation of anthocyanin in liposomes using supercritical carbon dioxide: Effects of anthocyanin and sterol concentrations. *Journal of Functional Foods.* 34: 159–167.
- [23] Liu, C.-H., Wu, C.-T. 2010. Optimization of nanostructured lipid carriers for lutein delivery. *Colloids and Surfaces A Physicochemical and Engineering Aspects* 353(2-3):149-156 · DOI: 10.1016/j.colsurfa.2009.11.006
- [24] Salem. D.S., Sliem M.A., El-Sesy M., Shouman S.A., Badr Y.J.J.o.P. 2018. Improved chemo-photothermal therapy of hepatocellular carcinoma using chitosan-coated gold nanoparticles, *P.B. Biology*, 182 92-99.
- [25] Danaei, E. A., Elias, R. J. McClements, D. J., 2018. Oxidation in foods and beverages and antioxidant applications Volume 1: Understanding mechanisms of oxidation and antioxidant activity. Woodhead Publishing Limited, pp 345.
- [26] Mozafari, M. R., Flanagan, J., Matia-Merino, L., Awati, A., Omri, A. Suntes, Z. E. and Singh, H. 2018. Recent trends in the lipid-based nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods Review. *J Sci Food Agric* (in press)
- [27] Adib Z.M., Ghanbarzadeh S., Kouhsoltani M, Khosroshahi A.Y., Hamishehkar H.J.A.p.b., 2016. The effect of particle size on the deposition of solid lipid nanoparticles in different skin layers: A histological study, 6. 31.
- [28] Gillet A., Compère P., Lecomte F., Hubert P., Ducat E., Evrard B., Piel G.J.I.j.o.p., 2011. Liposome surface charge influence on skin penetration behaviour, 411 223-231 Fernandes FAN and Rodrigue S, 2008. Application of ultrasound and ultrasound-assisted osmotic dehydration in drying of fruits. *Drying Technology*, 26, 1509-1516.
- [29] Kamonpatana K, Giusti MM, Chitchumroonchokchai C, Moreno Cruz M, Riedl KM, et al. 2012. Susceptibility of anthocyanins to ex vivo



Scientific Research

Production of *Cornus mas* extract nano carrier and release evaluation of nano encapsulated ' bioactive compounds in semi digestive condition

Radbeh, Z. ¹, Asefi, N. ^{2*}, Hamishehkar, H. ³, Rofegarinejad, L. ², Pezeshki, A. ⁴

1. Department of Food Sci. & Tech., Tabriz Branch, Islamic Azad University, Tabriz, Iran
2. Department of Food Engineering, Islamic Azad University, Tabriz Branch, Tabriz, Iran
3. Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
4. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz-Iran.

ARTICLE INFO	ABSTRACT
Article History: Received 30 November 2019 Accepted 11 April 2020 Keywords: Bioactive compounds, Antioxidant, <i>Cornus mas</i>, Nano-cubosomes, polyphenols, <i>Invitro</i> DOI: 10.29252/fsct.18.01.13 *Corresponding Author E-Mail: n.asefi@iaut.ac.ir	The bioactive compounds of <i>Cornus mas</i> are known as powerful antioxidants. The stability of polyphenols extract is very important and encapsulating is a good technique to increase their stability by increasing the use of bioactive compounds in food and medicine. In this research the antioxidant activity of encapsulated bioactive compounds of <i>cornus mas</i> extract with enteric coated nanocubosomes and their release under semi-digestion conditions were evaluated. In order to determine the effect of encapsulation on the stability of phenolic compounds and their antioxidant activity, encapsulated extract into enteric coated nano-cubosomes and free extract were investigated. Characterization analysis of the mean particle size and zeta potential value of the nanocubosomes were reported to be 49.3 nm and -16 mV, respectively. The results of release studies showed that after 30 hours the secretion of <i>Cornus mas</i> extract at pH 1.2 (simulated gastric media) and pH 7.4 (simulated intestinal media) were about 38% and 61%, respectively. The FTIR results showed no interaction between the extract and cubosomes. Therefore <i>Cornus mas</i> extract retained its antioxidant activity.