

Development of a Novel Niosomal System (Phyto-niosome) for Encapsulation of Grape Stem Extract

SHIVA BEILANKOUHI^{1*}, BABAK GHANBARZADEH², AMIR POURFARZAD³, HAMED HAMISHEKAR⁴, MOUSA RASOULI⁵

1. Environmental Science Department, Research Institute for Grapes and Raisin (RIGR), Hamedan, Iran.
2. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
3. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agricultural Sciences, University of Guilan, Rasht, Iran.
4. Drug Applied Research Center, University of Medical Sciences, Tabriz, Iran.
5. Horticulture and Landscape Engineering Department, Faculty of Agriculture, Malayer University, Hamedan, Iran.

(Received: Nov. 3, 2019- Revised: Dec. 21, 2019- Accepted: Dec. 31, 2019)

ABSTRACT

Herbal compounds, so-called phyto-constituents, illustrate poor stability and absorption. Niosomes, which are made of nonionic surfactants, create better chemical and stability conditions, higher absorption rate and bioavailability besides lipid vesicles. This study covers the preparation and characterization of phyto-niosomes of grape stem extract by modified thin film hydration technique. The developed formulations were statistically optimized using response surface methodology, The applied Box–Behnken design had three factors with three levels for each factor. Hydrophilic-lipophilic balance (HLB), phytosterol percent and extract amount were selected as the formulation variables. The results showed that extract concentration was the most important parameter affecting the encapsulation efficiency and poly dispersity index. Also HLB had the most important effects on the particle size. The optimized phyto-niosomes showed vesicle size, entrapment efficiency and poly dispersity index (PDI) of 173nm, 72% and 0.32 respectively. Before the encapsulation process, extracts of dried stems were prepared by Green extraction method and phenolic composition was identified with LC-MS/MS. Indeed, it was found that phyto-niosomes could be represented as an inexpensive and efficient nano vesicular carrier for nutraceuticals delivery in food industry.

Key words: niosome, LC-MS/MS, Grape stem, Response surface methodology, Green extraction

تولید فیتونیوزوم به عنوان سیستم لپیدی جدید برای ریزپوشانی عصاره ساقه انگور

شیوا بیلانکوهی^{۱*}، بابک قنبرزاده^۲، امیرپورفرزاد^۳، حامد همیشه کار^۴، موسی رسولی^۵

۱. گروه پژوهشی تبدیل و نگهداری، پژوهشکده انگور و کشمش، همدان، ایران.

۲. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران

۳. گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم کشاورزی، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

۴. گروه فارماسیوتیکس، مرکز تحقیقات علوم کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران

۵. گروه مهندسی باغبانی و فضای سبز، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ملایر، همدان، ایران

(تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۸/۱۲ - تاریخ بازنگری: ۱۳۹۸/۹/۳۰ - تاریخ تصویب: ۱۳۹۸/۱۰/۱۰)

چکیده

عصاره‌های گیاهی حاوی مواد غذا- دارو و ترکیبات فنلی بوده اما پایداری پایین و جذب اندکی دارند. نیوزوم‌ها از سورفاکتانت‌های غیریونی تشکیل شده و دارای پایداری شیمیایی و دسترسی زیستی و جذب سلولی بالاتر در بین بقیه حامل‌های لپیدی می‌باشند. در این پژوهش به تولید و شناسایی خصوصیات فیتونیوزوم‌های حاوی عصاره ساقه انگور به روش هیدراسیون لایه نازک با کمی اصلاح، پرداخته شده است. از روش سطح پاسخ و طرح باکس-بنکن با سه متغیر مستقل در سه سطح برای بهینه سازی تولید نیوزوم‌ها و بررسی سه متغیر وابسته، استفاده شد. تعادل آب‌دوستی- چربی- دوستی (HLB) در محدوده ۱۰-۶، نسبت فیتواسترول به سورفاکتانت‌ها بین ۱۰ تا ۲۰ درصد و مقدار عصاره به میزان ۵ میلی‌گرم تا ۱۵ میلی‌گرم، به عنوان متغیرهای فرمولاسیون انتخاب شدند. بر اساس یافته‌های تحقیق، غلظت عصاره مهمترین پارامتر موثر بر درصد ریزپوشانی و شاخص پراکندگی بوده و HLB مهمترین فاکتور در اندازه ذرات می‌باشد. فرمولاسیون بهینه فیتونیوزوم اندازه ذرات ۱۷۳ نانومتر، کارایی درون پوشانی ۷۲ درصد و شاخص پراکندگی ۰/۳۲ را نشان داد. قبل از درون پوشانی، ساقه‌های انگور خشک شده به روش استخراج سبز عصاره گیری شده و ترکیبات مهم پلی فنولی آن توسط دستگاه LC-MS/MS شناسایی شد. نتایج نشان داد که، فیتونیوزوم می‌تواند به عنوان نانوحاملی جدید و ارزان قیمت برای انکپسولاسیون ترکیبات زیست فعال در صنعت غذا مورد استفاده قرار بگیرد.

واژه‌های کلیدی: نیوزوم، ساقه انگور، استخراج سبز، LC-MS/MS، روش سطح پاسخ

مقدمه

در سال‌های اخیر به منظور دستیابی به منابع ارزان قیمت ترکیبات ارزشمند طبیعی و حفظ سلامت مصرف کنندگان، توجه ویژه‌ای به جداسازی این مواد از ضایعات محصولات کشاورزی و پسماند کارخانجات غذایی شده است (Natércia et al., 2018). صنایع تولید فرآورده های انگور سالانه تولید میلیون‌ها تن محصولات جانبی از جمله تفاله، هسته، ساقه و برگ انگور می- نماید که به عنوان منبعی غنی از عناصر مختلف مغذی از جمله ویتامین‌ها، مواد معدنی، فیبرهای خوراکی و ترکیبات فنلی به شمار می‌روند. از این میان، تحقیقات اندکی درمورد ترکیبات ساقه انگور انجام شده است که حدوداً ۲۰ درصد وزن انگور برداشت شده را تشکیل می‌دهد و علاوه بر ایجاد آلودگی بر محیط زیست،

تاکنون تنها استفاده آن به عنوان کمپوست، غذای حیوانات، فیبر رژیمی و تولید الکل بوده است (Maria et al., 2012). پلی فنول‌ها گروهی از متابولیت های ثانویه با ساختارهای شیمیایی متنوعی هستند که به علت شرکت در بسیاری از فعالیت های بیولوژیکی و ویژگی ضدسرطانی، ضدالتهابی، پیشگیری از بیماری‌های قلبی عروقی، و کاهش سرعت استرس اکسیداتیو و افزایش ماندگاری مواد غذایی با خواص ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی آن‌ها حائز اهمیت هستند (Carla et al., 2018). به طور عمده پلی فنول‌های مهم و انحصاری عصاره ساقه انگور را، فنولیک اسیدها، فلاونوئیدها، پروآنتوسیانیدین‌ها و استیلبن‌ها تشکیل می‌دهند که اثرات سلامت‌زایی هرکدام از آنها به اثبات رسیده است (Vazquez et al., 2017). استفاده از خواص سودمند عصاره‌های

نیوزوم تولید شده از عصاره برگ گیاه سنتلا آسیاتیکا (*Centella asiatica*) با دیواره اصلاح شده با هیالورونیک اسید با هدف افزایش جذب پوستی، اشاره نمود (Panikchar et al., 2019). با توجه به اینکه تاکنون مطالعه ای مبنی بر تولید نانو نیوزوم از پسماند کارخانجات غذایی و کاربرد آن در صنعت غذا با هدف غنی سازی و افزایش ماندگاری مواد غذایی به عنوان جایگزین نگهدارنده های شیمیایی با صرف حداقل هزینه، انجام نشده است. در این مقاله به استخراج عصاره ساقه انگور به روش سبز^۳ و تولید فیتونیوزوم-های حامل عصاره به طریق هیدراسیون لایه نازک با استفاده از اسپن ۶۰، توپین ۸۰ و فیتواسترول و در نهایت بررسی خصوصیات فیزیکی و شیمیایی آن ها پرداخته شده است.

مواد و روش ها

مواد

خوشه های انگور زرد بیدانه (*Vitis vinifera L.*) از تاکستان های شهر ملایر در تابستان ۹۷ جمع آوری و پس از جداسازی سایر قسمت های انگور، قسمت چوبی در هوای آزاد خشک شد. سپس توسط آسیاب آزمایشگاهی پودر و الک و تا زمان استخراج در دمای اتاق در ظروف سر بسته نگهداری شد. اسپن ۶۰ (سوربیتان مونو استراتات) و اتانول خالص ۹۹ درصد از شرکت سیگما آلدریج آمریکا، توپین ۸۰ (پلی سوربات) از شرکت سامچون کره، پلی-اتیلن گلیکول از شرکت مرک آلمان و فیتواسترول از شرکت Rice Tsuno Chemicals ژاپن خریداری شدند. تمامی حلال های LC-Mass و استانداردهای HPLC، از شرکت های مرک آلمان و سیگما آلدریج تهیه شدند.

استخراج عصاره

برای استخراج به روش سبز عصاره ساقه انگور، مقدار مشخصی از پودر ساقه با آب دیونیزه و پلی اتیلن گلیکول (نسبت پودر به حلال ۱ به ۱۰) مخلوط شده و داخل ظروف شیشه ای درب دار ریخته و با آرگون هواگیری نموده و ماسیراسیون به مدت ۷۲ ساعت با سرعت ۱۳۰ دور بر دقیقه انجام شد. سپس به مدت ۲۵ دقیقه در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد در حمام اولتراسوند با قدرت ۱۲۰ وات قرار داده شد و بعد از خنک شدن در ماکروویو ۱۸۰ وات به مدت ۲ دقیقه گذاشته شد. مراحل ذکر شده برای بار دوم تکرار شد و بعد از صاف کردن با کاغذ صافی با سانترفیوژ ۸۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۲۰ دقیقه ذرات جامد آن جداسازی شده و صاف شدن نهایی با کاغذ واتمن انجام شد. عصاره ها با خشک کن انجمادی خشک شده و در

گیاهی در مواد غذایی به دلیل اکسیداسیون سریع ترکیبات زیست فعال گیاهی و در نتیجه بدطعمی و بدرنگی ماده غذایی، عدم حلالیت ترکیبات فنلی هیدروفوب در محیط های آبی، عدم عبور پلی فنول های هیدروفیل از غشا سلولی بدن و کاهش جذب و دسترسی زیستی به علت وزن مولکولی بالا و غیر محلول بودن اکثر آنها در لیپید و به طور کلی حساسیت بالا و تخریب پلی فنل ها در اثر نور، اکسیژن، دما، اسید، فلزات سنگین، آنزیم ها و شرایط فرآوری، موجب محدودیت هایی در کاربرد آن ها شده است (Gunes et al., 2017). درون پوشانی^۱ ترکیبات غذا-دارو^۲ در نانوحامل ها، یکی از راه حل های فائق آمدن بر این مشکل می باشد. نیوزوم ها نمونه ای از حامل های لیپیدی کروی با اندازه وسیع ۱۰ نانومتر تا ۱۰ میکرومتر می باشند که از تجمع خودبه خودی سورفاکتانت های غیر یونی آمفی فلیک و پایدارکننده هایی مانند کلاسترول، با غشای دو یا چند لایه بعد از هیدراسیون تشکیل می شوند و قادر به انکپسولاسیون ترکیبات چربی دوست و آب دوست هستند (Imran et al., 2016). نانو نیوزوم ها به دلیل سمیت پایین، قابلیت تولید در مقادیر انبوه، پایداری بالاتر، تحمل استریلیزاسیون، تولید سریع، مواد اولیه ارزان تر، زیست سازگاری بیشتر و کنترل رهایش مواد، برای استفاده گسترده در صنعت غذا در مقایسه با دیگر نانوحامل ها دارای ارجحیت می باشد (Ojeda et al., 2016). نیوزوم ها از نظر ساختار مشابه لیپوزوم هستند با این تفاوت که جنس دیواره در لیپوزوم فسفولیپید و در نیوزوم انواع سورفاکتانت های غیر یونی می باشد که قابلیت درون پوشانی انواع مولکول ها با محدوده حلالیت متفاوت به دلیل زیرساخت منحصربه فردشان، دارند و به عنوان حاملی برای درون پوشانی ترکیبات گیاهی و افزایش دسترسی بیولوژیکی و محافظت آن ها می توانند استفاده شوند (Vrunal et al., 2018). تحقیقات اندکی در مورد انکپسولاسیون عصاره گیاهان داخل نیوزوم ها انجام شده است که از آن جمله می توان به تولید فیتونیوزوم حاوی عصاره گیاه ماریگلد (*Marigold*) با هدف افزایش فعالیت بیولوژیکی (Rabia et al., 2015)، تهیه فیتونیوزوم از عصاره گیاه مرتل (*Myrtle*) با کارایی ۹۱ درصد برای افزایش زمان فعالیت آنتی-اکسیدانی، آنتی میکروبی و پایداری پلی فنول ها (Raeiszadeh et al., 2018) تولید نیوزوم از عصاره برگ جینکو (*Ginkgo biloba*) برای استفاده خوراکی (Ye Jin et al., 2013)، ساخت نیوزوم دارای عصاره بوته جیمینما (*Gymnema sylvestre*) و ارزیابی ویژگی های بیولوژیکی آن (Kamble et al., 2013) و

ظروف با درپوش محکم نگهداری شد (Jakpa et al., 2018).

تعیین ترکیبات تام فنلی عصاره^۱

از اسید گالیک بعنوان استاندارد برای رسم منحنی کالیبراسیون استفاده شد. ۱۰۰ میکرولیتر عصاره، ۷ میلی لیتر آب دیونیزه و ۰/۵ میلی لیتر معرف فولین مخلوط شده و به مدت ۸ دقیقه در دمای اتاق نگه داشته شد. سپس ۱/۵ میلی لیتر کربنات سدیم (۲ درصد حجمی/وزنی) و ۰/۹ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد. پس از مخلوط کردن به مدت ۲ ساعت در دمای اتاق قرار داده و جذب آن در ۷۶۵ نانومتر توسط اسپکتروفتومتر خوانده شد. اعداد جذب در فرمول حاصل از کالیبراسیون قرار داده شده و به صورت میلی- گرم اسید گالیک در هر گرم عصاره گزارش گردید. (Dorman et al., 2003).

شناسایی ترکیبات فنلی موجود در عصاره

توسط دستگاه کروماتوگرافی مایع کوپل شده با دکتور جرمی (LC-MS/MS) به عنوان یکی از قوی ترین تکنیک ها برای اندازه گیری جرم مولکولی، شناسایی ساختار مولکولی و تعیین غلظت اجزای نمونه انجام شد. شناسایی ترکیبات ناشناخته سیستم از طریق جداسازی یون های مثبت و منفی توسط الکترواسپری یونیزاسیون بود. در این پژوهش جداسازی و شناسایی توسط سه دستگاه Alliance separation module 2695 ساخت آمریکا که شامل سیستم دریافت حلال، جداکننده هوا، اتو سمپلر و ستون گرم کننده متصل به دستگاه Quattro Micro APL Triple Quadrupole LC ساخت منچستر انگلیس و جداسازی کروماتوگرافی توسط دستگاه Agilent ZORBAX SB-C₁₈ انگلیس انجام شد که فاز محرک در آن شامل استونیتریل، ۵ درصد متانول و ۰/۱ درصد فرمیک اسید در آب بود. حجم تزریق نمونه ۵۰ میکرولیتر بوده و دمای آنالیز در ۴۰ درجه سانتیگراد تنظیم شد. شناسایی ترکیبات ناشناخته سیستم از طریق جداسازی یون های مثبت و منفی توسط الکترواسپری یونیزاسیون بود. نرم افزار Mass Lynx version 4.1 به عنوان ابزار کنترل و آنالیز داده ها به کار برده شد.

آماده سازی نیوزوم

از روش هیدراسیون لایه نازک با اندکی اصلاح برای تهیه فیتونیوزوم ها استفاده شد. بدین ترتیب که طبق جدول ۱، مقادیر توئین ۸۰، اسپن ۶۰ و فیتواسترول با در نظر گرفتن محدوده HLB مناسب تشکیل وزیکول (۱۰-۶)، در ۱۰ میلی لیتر اتانول مخلوط شده و بعد از اندکی حرارت به بالن ته گرد ۲۵۰ میلی

لیتری انتقال یافت. حلال آلی به کمک روتاری اوپراتور خلأ در دمای ۶۰ درجه سلسیوس حذف شد تا فیلم نازکی روی دیواره بالن تشکیل شود. حلال باقیمانده به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق تبخیر شد. در این مرحله ۱۰ میلی لیتر آب دیونیزه حاوی نسبت های متفاوت عصاره به لایه اضافه و در دمای ۶۵ درجه سانتیگراد و چرخش ملایم به مدت یک ساعت هیدراته شد. در این مرحله نیوزوم های مولتی لاملار میکرومتری تولید شدند. محلول نیوزوم در سرعت ۱۵۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه هموژنیزه شده و در ۱۰ سیکل با فواصل استراحت یک دقیقه ای داخل حمام یخ و پروب سونیکاتور با ۴۵ درصد amp و قدرت ۵۰۰ وات کاهش سایز داده شد. سوسپانسیون فیتونیوزوم بدست آمده در شیشه های قهوه ای رنگ داخل یخچال برای آنالیزهای بعدی نگهداری شد (Pando et al., 2015; Shuo et al., 2019).

جدول ۱- مقادیر توئین و اسپن مورد استفاده جهت تنظیم HLB

HLB	Span60 HLB (۴/۷)	Tween80 HLB (۱۵)
۶	۸۲/۳۷	۱۲/۶۲
۸	۶۷/۹۶	۳۲/۰۳
۱۰	۴۸/۵۴	۵۱/۴۵

تعیین درصد کارایی درون پوشانی^۲

برای این منظور ابتدا توسط اسپکتروفتومتر ماورای بنفش -مرئی مدل Ultrospec 2000 ساخت کشور انگلیس، شدت جذب حداکثر عصاره در محدوده طول موج ۴۰۰-۱۰۰۰ نانومتر برابر ۲۷۸ نانومتر تعیین شد. سپس امولسیون آبی عصاره در رقت های مختلف تهیه و نمودار استاندارد تغییرات غلظت عصاره در برابر تغییرات جذبی آن توسط اسپکتروفتومتر، در طول موج ۲۷۸ نانومتر رسم شد. ۳ میلی لیتر از محلول نیوزومی با ۳ میلی لیتر محلول آب مقطر مخلوط شده و داخل فیلتر آمیکون ریخته شد. سپس فیلتر آمیکون در دستگاه سانتیفریوژ با دور ۵۰۰۰ دور بر دقیقه و به مدت ۵ دقیقه قرار گرفت. این کار به منظور جداسازی عصاره آزاد از کپسوله شده صورت گرفت. مایع بالای فیلتر آمیکون حاوی عصاره درون پوشانی شده و مایع پایینی عصاره آزاد می باشد. در پایان با استفاده از نمودار استاندارد (شکل ۱) و رابطه زیر راندمان درون پوشانی و ظرفیت بارگیری فیتونیوزوم ها محاسبه شد (Shuo et al., 2019).

$$\text{درصد درون پوشانی} = \frac{\text{مقدار عصاره انکپسوله شده در نیوزوم}}{\text{مقدار کل عصاره اضافه شده}} \times 100$$

$$Span = \frac{D(90\%) - D(10\%)}{D(50\%)} \quad (\text{رابطه ۲})$$

تجزیه و تحلیل آماری

در این پژوهش بمنظور مطالعه فرایند تولید فرمولاسیون‌های مختلف، از طرح باکس بنکن^۱ برای بررسی دامنه تغییرات HLB در محدوده ۱۰-۶، درصد فیتواسترول در سطوح ۲۰-۱۰ درصد وزنی سورفاکتانت و غلظت عصاره در سطوح ۵ تا ۱۵ میلی گرم بر ویژگی متغیرهای وابسته، استفاده شد. سطوح بالا و پائین متغیرها بر اساس پیش تیمارهای انجام شده و بررسی منابع موجود انتخاب گردید (جدول ۲). این طرح شامل سه متغیر مستقل در سه سطح و نقطه مرکزی دارای سه تکرار بود. اثرات تغییر پذیری غیرقابل توجه در پاسخ‌ها، به علت عوامل خارجی به وسیله تصادفی کردن ترتیب آزمایش‌ها کاهش داده شد. پاسخ‌های به دست آمده با استفاده از نرم افزار Design expert (version 10) تحلیل شد. معادله چند جمله‌ای درجه دوم استفاده شده در تجزیه و تحلیل به صورت زیر است:

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{\substack{i=1 \\ i < j}}^{k-1} \sum_{j=2}^k \beta_{ij} X_i X_j$$

جدول ۲- نمایش متغیرهای مستقل و وابسته فرایند و مقادیر آن‌ها

متغیرهای مستقل (فاکتور)	واحد	سطح حداقل	سطح متوسط	سطح حداکثر
HLB	-	۶	۸	۱۰
نسبت فیتواسترول به سورفاکتانت	درصد	۱۰	۱۵	۲۰
غلظت عصاره	میلی گرم	۵	۱۰	۱۵

متغیرهای وابسته (پاسخ)

سایز	نانومتر	حداقل
کارایی درون پوشانی	درصد	حداکثر
Span		حداقل

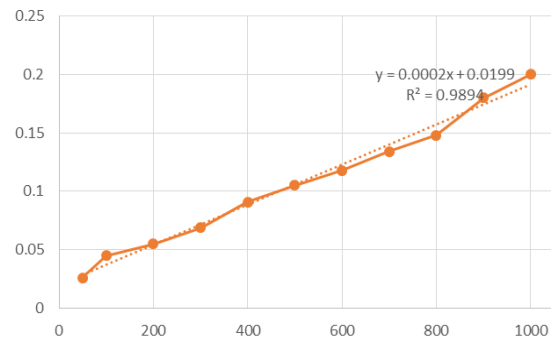
(2012) میزان فنل کل در عصاره ساقه انگور سفید، ۴۵۱ میلی گرم اسید گالیک در یک گرم نمونه به دست آمد. تفاوت در این مقادیر می تواند ناشی از تفاوت در روش تولید، فصل برداشت و منابع جغرافیایی باشد.

پروفایل پلی فنل‌های موجود در عصاره

در این پژوهش همان طور که در روش استخراج توضیح داده شد، از ترکیب سه روش ماسیراسیون- ماکروویو- اولتراسوند برای کمک به شکستگی بیشتر سلول‌های گیاه در اثر کاویتاسیون و

تعیین اندازه ذرات

قطر حجمی و زیکول‌های تولید شده توسط دستگاه SHIMADO مدل SALD 2101 ساخت ژاپن تعیین گردید. این دستگاه بر اساس پراکنش نور لیزر عمل می‌کند. اندازه ذرات پس از ۲۴ ساعت نگهداری در دمای یخچال اندازه‌گیری شد (Hamishehkar et al., 2009).



شکل ۱: منحنی استاندارد بدست آمده توسط اسپکتروفوتومتر از غلظت‌های مختلف عصاره

توزیع اندازه ذرات

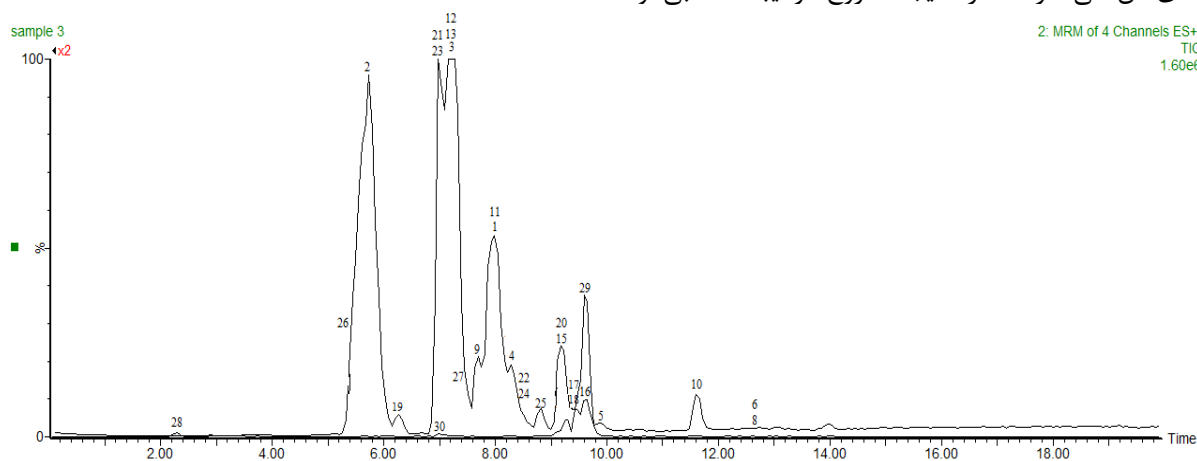
توزیع اندازه ذرات توسط دستگاه (SHIMADO) اندازه‌گیری و با استفاده از معادله زیر محاسبه شد (Tantra et al., 2010).

نتایج و بحث

نتایج تعیین ترکیبات تام فنلی

گروه‌های هیدروکسیل ترکیبات فنلی نقش مهمی در فعالیت ضد اکسیدانی و ضد میکروبی عصاره‌های گیاهی دارند. میزان ترکیبات تام فنلی به روش اسپکتروفوتومتری با استفاده از واکنش- گر فولین سیوکالته و اسید گالیک به عنوان استاندارد تعیین شد. ترکیبات فنلی کل در این اسانس ۵۷۴ میلی گرم اسید گالیک در یک گرم نمونه به دست آمد. در مطالعه‌ای توسط Maria et al.

غیرقطبی از گیاه به حلال از طریق ایجاد منافذ در دیواره سلول ها و انتقال جرم تسهیل و تسریع شده و باعث افزایش بازده استخراج در دماهای پایین می‌گردد (Sharmila, 2016). عصاره‌های بدست آمده جهت شناسایی پلی‌فنل‌های موجود با دستگاه LC/MS/MS آنالیز شدند. با کمک الگوی شکستگی و تطبیق با اطلاعات ذخیره شده، به طور عمده ۲۹ نوع پلی‌فنول شامل فنولیک اسیدها (اسید کوماریک، گالیک اسید، کافئیک اسید، فرولیک اسید، کوتاریک اسید، کافئول تارتاریک اسید، کافتاریک اسید)، فلاونوئیدها (کامپفرول، کوئرستین، روتین، میرستین، لوتئولین، آستیلین، آنتوسیانین‌ها)، پروآنتوسیانیدین‌ها (کاتچین، اپی‌کاتچین‌گالات، پروسیانیدین‌ها) و استیلین‌ها (رزوراترول، وینیفیرین) در عصاره شناسایی شد. برخی از این مواد گرانتیمنت مانند رزوراترول، وینیفیرین، پروآنتوسیانیدین و آستیلین از ترکیبات انحصاری انگور تلقی می‌شوند (شکل ۲).



شکل ۲- کروماتوگرام شناسایی $ESI \pm$ ترکیبات عصاره ساقه انگور

coumaric acid, 2. Gallic acid, 3. Caffeic acid, 4. Ferulic acid, 5. trans-Resveratrol, 6. Kaempferol 3-galactoside, 7. Luteolin, 8. Kaempferol 3-glucuronide, 9. Catechin, 10. Quercetin, 11. Coumaric acid, 12. caffeoyl tartaric acid, 13. Catechin, 14. Myricetin, 15. Epicatechin gallate, 16. Luteolin-7-glycoside, 17. Astilbin, 18. Astilbin-rhamnoside, 19. Quercetin-3-O-glucoside, 20. Quercetin-3-O-glucuronide, 21. Procyanidin B₁, 22. Procyanidin B₁ 3-O-gallate, 23. Procyanidin B₂, 24. Procyanidin B₂ 3-O-gallate, 25. Rutin, 26. ProcyanidinC₁, 27. ProcyanidinC₁3-O-gallate, 28. ϵ -viniferin, 29. cyanidin 3-monoglucoside, 30. cyanidin 3-sambubioside.

مرتبط، مقادیر ۱۰ تا ۲۰ درصد وزنی سورفاکتانت‌ها جهت تولید نیوزوم‌ها استفاده شد. فاکتور مستقل آخر تاثیر سه غلظت مختلف عصاره بر ویژگی‌های نانوحامل بود. نتایج آزمایش‌های مرحله بهینه سازی در (جدول ۳) آورده شده است.

تاثیر تغییرات فاکتورهای مستقل بر میزان درون‌پوشانی
درصد درون‌پوشانی میزان داروی محصور شده داخل نانوحامل‌ها را نشان می‌دهد. با توجه به جدول ۳ مقدار آن بین ۵۳/۳۳ تا ۸۹ تغییر داشت. نتایج آنالیز واریانس توسط ANOVA در جدول ۴ نشانگر تاثیر خطی HLB و غلظت عصاره، اثر متقابل این دو و اثر درجه دوم غلظت روی درصد انکپسولایون نیوزوم‌ها معنی‌دار بود

میدان مغناطیسی و آزادسازی پلی‌فنول‌های آبدوست و چربی-دوست با وجود عدم استفاده از حلال غیرقطبی و سمی و افزایش راندمان و کاهش زمان استخراج پلی‌فنول‌های ساقه انگور مخلوط آب و پلی‌اتیلن گلیکول به عنوان حلال سبز جهت استخراج استفاده شد. مکانیزم اثر و افزایش بازده روش استخراج به کمک ماکروویو به این صورت است که دیواره سلولی مواد گیاهی انرژی مایکروویو را جذب کرده و رطوبت آن شروع به تبخیر می‌کند. تبخیر آب موجب ایجاد فشار در دیواره سلولی شده که در نهایت موجب پارگی سلول می‌گردد و ترکیب‌های فعال به درون حلال وارد می‌شوند (Pineiro *et al.*, 2017). مکانیسم استخراج با امواج فراصوت با پدیده کاویتاسیون^۱ صورت می‌گیرد. بدین ترتیب که امواج (۱۰۰-۲۰۰ KHz)، ایجاد حباب‌های کاویتاسیون در مایع نموده و با بزرگ شدن و متلاشی شدن حباب‌ها، نیروی برشی بر سطوح جامد وارد می‌شود. فشار در لحظه‌ی ترکیدن بالا رفته و با ایجاد شوک در بافت گیاه باعث افزایش نفوذپذیری و تخریب سلول‌های آن می‌گردد. در نتیجه خروج ترکیبات قطبی و

نتایج بهینه سازی فیتونیوزوم‌های حاوی عصاره به روش سطح پاسخ:

مقدار HLB در ایجاد و خصوصیات نیوزوم‌ها نقش اساسی دارد و در دامنه بین ۶ تا ۱۰ به تشکیل وزیکول منجر می‌شود (Marianecci *et al.*, 2013). بنابراین یکی از فاکتورهای باکس بنکن به تغییرات آن در سه سطح اختصاص داده شد. متغیر مستقل دیگر مقادیر مختلف فیتواسترول می‌باشد که به دلیل برهمکنش با سورفاکتانت‌های غیر یونی موجب تاثیر در ساختار و رفتار نیوزوم‌ها خواهد شد و در این آزمایش بعد از تهیه نمونه‌های مختلف نیوزوم با مقادیر مختلف فیتواسترول و انجام آزمون‌های

این است که با افزایش میزان اسانس تا حد معین، درصد ریزپوشانی افزایش می یابد به این دلیل که ماده فعال بیشتری می تواند درون لیپوزوم ها کپسوله شود. مدل کوادراتیک^۱ به عنوان متناسب ترین مدل برای ارزیابی تمامی پاسخها انتخاب شد و پس از رگرسیون درجه دوم، معادله زیر بر حسب مقادیر کد شده با حذف مقادیر غیرمعنی دار به دست آمد. عدد p برابر با ۰/۰۰۵ نشان دهنده معنی دار بودن مدل است.

$$2.39X_1 + 13.93X_3 + 3.26X_1X_3 - 4.15X_3^2 + \%EE = +75.62$$

که در بین آنها غلظت عصاره با ضریب مثبت ۱۳/۹۳ و ۰/۰۰۱ p بیشترین تأثیر را به طور مستقیم بر افزایش درصد ریزپوشانی ذرات داشت. شکل ۳-الف اثر تداخلی معنی دار متغیرهای X_1 و X_2 بر انکپسولاسیون عصاره داخل نیوزومها را نشان می دهد. با افزایش عصاره و HLB، مقدار درون پوشانی افزایش می یابد و در آزمایش شماره ۴، بالاترین میزان درصد درون پوشانی مشاهده می شود که نتایج مطالعه Marianecchi (2013) موید این مطلب است که در HLB برابر ۱۰ درصد کارایی درون پوشانی بالاتر می باشد. هم چنین نتایج تحقیق Fang *et al.* (2013) نشان دهنده

جدول ۳- سطوح متغیرهای مستقل و نتایج به دست آمده از انجام آزمایشها

شماره آزمایش	HLB	نسبت فیتواسترول (%)	غلظت عصاره (mg)	%EE (%)	سایز (nm)	Span
۱	۸	۱۰	۵	۵۸/۶۳	۲۸۸	۰/۴۷
۲	۶	۱۰	۱۰	۸۱/۳۹	۲۸۴	۰/۴۲
۳	۸	۲۰	۱۵	۸۶/۸۲	۳۰۰	۰/۵۰
۴	۱۰	۱۵	۱۵	۸۹	۱۷۵	۰/۳۴
۵	۱۰	۲۰	۱۰	۷۴/۵۹	۲۷۳	۰/۳۸
۶	۸	۱۵	۱۰	۷۶/۸۶	۱۸۵	۰/۳۵
۷	۸	۲۰	۵	۵۹/۸۰	۳۳۵	۰/۴۹
۸	۱۰	۱۰	۱۰	۷۱/۵۵	۲۱۰	۰/۳۹
۹	۸	۱۵	۱۰	۷۵/۱۲	۱۸۵	۰/۳۷
۱۰	۸	۱۵	۱۰	۷۴/۸۷	۱۷۹	۰/۳۶
۱۱	۶	۱۵	۵	۶۱/۳۴	۲۹۲	۰/۴۴
۱۲	۱۰	۱۵	۵	۵۳/۳۳	۲۱۴	۰/۳۲
۱۳	۶	۱۵	۱۵	۸۳/۹۸	۲۲۹	۰/۳۸
۱۴	۶	۲۰	۱۰	۸۰/۸۴	۳۲۸	۰/۴۸
۱۵	۸	۱۰	۱۵	۸۴/۷۲	۲۴۰	۰/۴۵

کاهش سایز با افزایش مقدار عصاره با نتایج تحقیق Lucia *et al.* (2015) مطابقت دارد. در حالی که با افزایش مقدار فیتواسترول سایز ذرات با اثر خطی مثبت، افزایش می یابد به طوری که در آزمایش شماره ۷ و ۱۴ در بالاترین درصد فیتواسترول، بزرگترین اندازه نیوزوم مشاهده می شود. استرولها در لایه سورفاکتانتها قرار گرفته و در ضمن افزایش سایز نانوحامل موجب افزایش تحرک و پایداری نیوزومها می گردند (Lucia *et al.*, 2015). این رابطه توسط معادله زیر ارائه شده است که ارزش F برابر ۳۴۰/۹۴ دلالت بر معنی دار بودن مدل دارد.

$$\text{Size} = +183.00 - 32.63X_1 + 26.75X_2 - 23.13X_3 + 4.75X_1X_2 + 6X_1X_3 + 13.75X_1^2 + 77X_2^2 + 30.75X_3^2$$

تأثیر تغییرات فاکتورهای مستقل بر اندازه ذرات

اندازه کوچک و زیکولیها مهمترین معیار به دلیل تأثیر آن در کنترل رهایش ماده زیست فعال درون نیوزومها است. سایز نیوزومها بین ۱۷۵ تا ۳۳۵ متغیر بود. هر سه فاکتور اثر بسیار معنی داری ($p < 0.0001$) بر تغییرات سایز ذرات دارند. شکل ۳-ب اثر تداخلی معنی دار HLB و درصد فیتواسترول و شکل ۳-ج اثر تداخلی معنی دار HLB و غلظت عصاره بر اندازه نیوزومها را نشان می دهد. متوسط اندازه ذرات با افزایش HLB تا ۱۰ و غلظت عصاره تا ۱۵ میلی گرم، تا ۱۷۵ نانومتر در نمونه ۴ کاهش می یابد که ضریب منفی آنها در معادله دوم نشانگر این روند معکوس می باشد. علت نیوزومهای با سایز کوچکتر در HLB برابر ۱۰ به علت تشکیل فرم وزیکولی به جای فرم میسلی در این محدوده بوده و

تاثیر تغییرات فاکتورهای مستقل بر توزیع اندازه ذرات

شاخص چند پخشی پارامتر مهمی است که از آن برای تعیین تنوع اندازه ذرات استفاده می شود که هر چه مقدار آن کمتر باشد مطلوب تر بوده، اندازه نیوزوم ها یکسان و سیستم پایدارتر خواهد بود. در تمامی نمونه ها مقدار آن کمتر از ۰/۵ بوده و بین ۰/۵ - ۰/۳۲ تغییر داشت. نمودار تغییرات معنی دار شاخص چند پخشی با اثر متقابل HLB و درصد فیتواسترول در شکل ۳- د نشان داده شده است. شاخص پلی دیسپرس با HLB رابطه معنی دار معکوس با ضریب بالا داشته و با کاهش آن افزایش می یابد که *Zaynab et al.* (2019) با تولید نیوزوم حاوی کوئرستین نیز همین نتایج را بدست آوردند. این شاخص با تغییرات فیتواسترول رابطه مستقیم داشته و با افزایش آن افزایش می یابد. با این توضیح که استرول ها با خاصیت آملی پاتیک، خود را در مابین دیواره سورفاکتانت جای می دهند بدین ترتیب که قسمت هیدروفیل خود را در سطح آبی و قسمت هیدروفوب را در زنجیره غیر قطبی داخل دیواره قرار

می دهند. با توجه به ماهیت چربی دوستی فیتواسترول، افزایش غلظت آن باعث افزایش آبگریزی دیواره وزیکول ها می گردد و کاربرد غلظت های مختلف فیتواسترول موجب به وجود آمدن ذرات با سایزهای مختلف می گردد که همین موجب افزایش پراکندگی ذرات می شود. همچنین فیتواسترول باعث افزایش استحکام دیواره و در نتیجه افزایش شکنندگی آن و ایجاد ذرات با اندازه مختلف می شود (Amirhossien, 2019). شکل ۳- ذ اثر متقابل HLB با غلظت عصاره را بر تغییرات شاخص چندپخشی نشان می دهد. همان طور که مشاهده می شود در بالاترین HLB و پایین ترین غلظت عصاره، کمترین پراکندگی بدست آمده است که آزمایش شماره ۱۲ در جدول ۳ نشانگر این مطلب است. معادله زیر بر مبنای تست ANOVA و مدل کوادریک بدست آمده است که ارزش F برابر ۴۵/۷۵ دلالت بر معنی دار بودن مدل دارد.

$$\text{Span} = +0.36 - 0.036X_1 + 0.017X_2 - 0.017X_1X_2 + 0.02X_1X_3 - 0.028X_1^2 + 0.085X_2^2 + 0.038X_3^2$$

جدول ۴- نتایج تجزیه واریانس تاثیر فاکتورهای مختلف معنی دار بر روی اندازه، ریزپوشانی و شاخص چند پخشی ذرات

Significant terms (p-value)	CV%	Lack of Fit	p-value value of quadratic model	Pred R-Squared R ²	Adjusted R ²	R ²	پاسخ
۰/۰۳۴۲< _۱ X							%EE
۰/۰۰۰۱< _۲ X							
۰/۰۳۸۴< _۲ X _۱ X	۳/۱۵	ns ۰/۱۲۶۶	۰/۰۰۰۵***	۰/۷۶۹۰	۰/۹۵۶۳	۰/۹۸۴۴	
۰/۰۱۸۹< _۲ X ^۲							
۰/۰۰۰۱< _۱ X							سایز
۰/۰۰۰۱< _۲ X							
۰/۰۰۰۱< _۳ X							
۰/۰۵۲۲< _۲ X _۱ X							
۰/۰۲۴۴< _۲ X _۱ X							
۰/۰۰۰۹< _۱ X ^۲	۱/۵۱	ns ۰/۴۶۵۸	۰/۰۰۰۱***	۰/۹۸۱۶	۰/۹۹۵۴	۰/۹۹۸۴	
۰/۰۰۰۱< _۲ X ^۲							
۰/۰۰۰۱< _۳ X ^۲							
۰/۰۰۰۳< _۱ X							Span
۰/۰۰۶۸< _۲ X							
۰/۰۲۵۹< _۲ X _۱ X							
۰/۰۱۵۹< _۲ X _۱ X							
۰/۰۰۵۲< _۱ X ^۲	۲/۷۲	ns ۰/۴۳۹۳	۰/۰۰۰۳***	۰/۸۶۰۸	۰/۹۶۶۴	۰/۹۸۸۰	
۰/۰۰۰۱< _۲ X ^۲							
۰/۰۰۱۳< _۳ X ^۲							

*** به معنای معنی دار بودن نتایج می باشد.

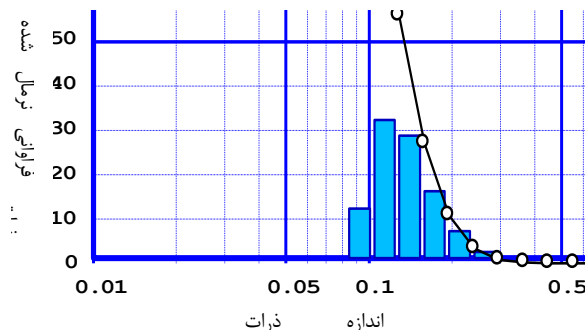
ns به معنای غیر معنی دار بودن نتایج می باشد.

شامل درصد ریزپوشانی ۷۰/۵۶ درصد، اندازه ذرات ۱۸۶ نانومتر و شاخص پراکندگی ۰/۳۶ بود که با نتایج پیشگویی شده مقایسه گردید و عدم وجود تفاوت معنی دار (p > ۰/۰۵) بین مدل ها و مشاهدات تجربی، کارایی مدل ها را به خوبی اثبات می کند.

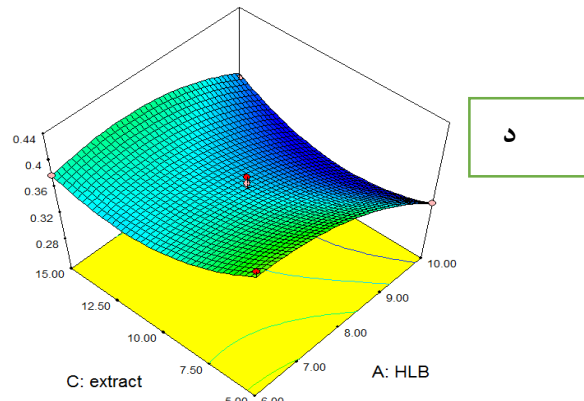
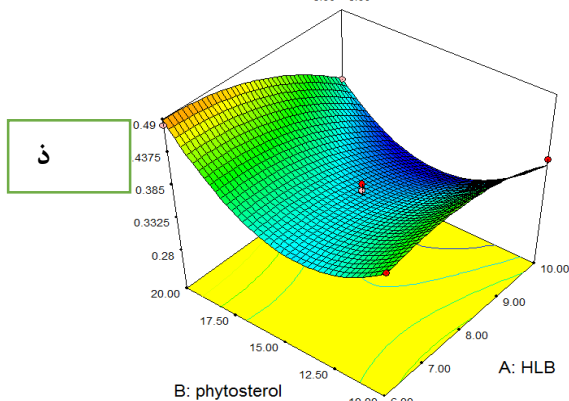
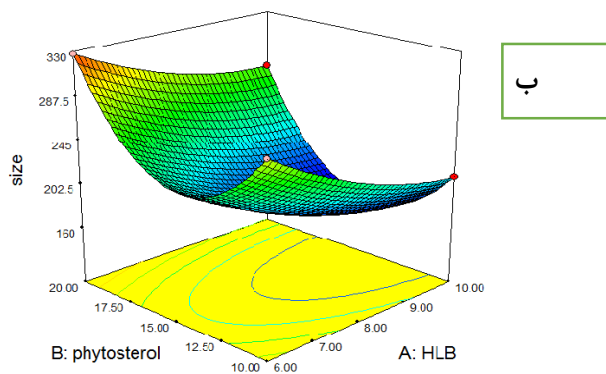
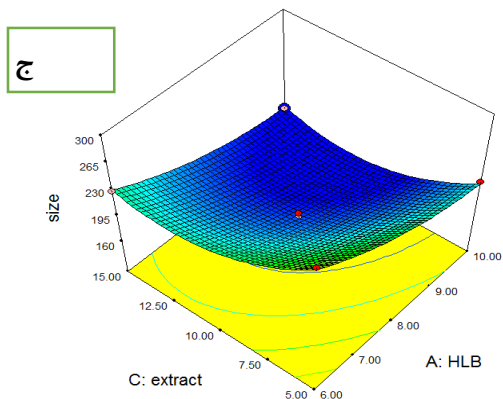
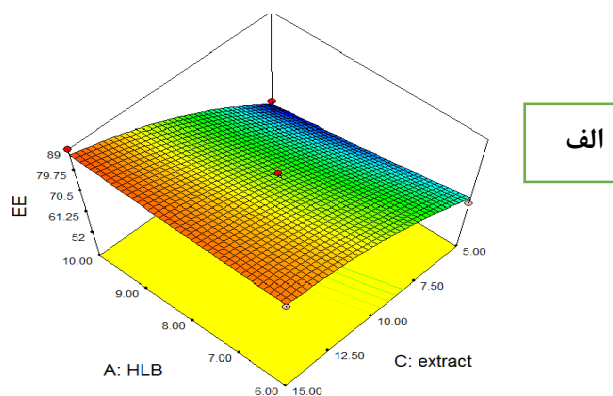
بهینه سازی توسط نرم افزار Design expert برای رسیدن به حداکثر خروجی انجام شد که مقادیر به دست آمده در جدول ۵ آورده شده است. به منظور بررسی تطابق نتایج آزمایش تأیید کننده در شرایط بهینه انجام شد. نتایج تجربی به دست آمده

جدول ۵- شرایط بهینه پیشنهاد شده توسط نرم افزار

مطلوبیت	Span	سایز (nm)	%EE	غلظت عصاره (mg)	نسبت فیتواسترول (%)	HLB
۰/۷۳۵	۰/۳۲۵	۱۷۳/۶۸	۷۲/۱۸	۹/۷۴	۱۲/۰۳	۱۰



شکل ۲: توزیع اندازه ذرات در نمونه بهینه



شکل ۳- نمودارهای سه بعدی (الف) اثر متقابل HLB و غلظت عصاره بر درصد کارایی ریزپوشانی (ب) اثر متقابل HLB و فیتواسترول بر سایز ذرات (ج) اثر متقابل HLB و غلظت عصاره بر شاخص چندپخشی (د) اثر متقابل HLB و غلظت عصاره بر شاخص چندپخشی نیوزومها

نتیجه گیری کلی

در این پژوهش از طرح باکس بنکن برای بهینه سازی فرمولاسیون نیوزوم‌های حاوی عصاره ساقه انگور استفاده شد. این مطالعه نشان داد که می‌توان خصوصیات نیوزوم را با تغییرات HLB، مقدار فیتواسترول و غلظت عصاره به صورت مطلوب بهینه‌سازی کرد. فرمولاسیون بهینه فیتونیوزوم حاصل نشان‌دهنده درصد درون-پوشانی ۷۲ درصد، اندازه ۱۷۳ نانومتر و شاخص پراکندگی ۰/۳۲ بود. آنالیز عصاره استخراج شده ثابت‌کننده حضور ۲۹ نوع پلی-فنول مهم شامل فنولیک اسیدها (اسید کوماریک، گالیک اسید،

کافئیک اسید، فرولیک اسید، کوتاریک اسید، کافئول تارتاریک اسید، کافتاریک اسید)، فلاونوئیدها (کامپفرول، کوئرستین، روتین، میرستین، لوتئولین گلیکوزید، آستیلین، آنتوسیانین‌ها)، پروآنتوسیانیدین‌ها (کاتچین، اپی کاتچین گالات، پروسیانیدین‌ها) و استیلین‌ها (رزوراترول، وینفرین) در عصاره بود. با این نتایج، سیستم نیوزومی حاصل می‌تواند به عنوان حاملی خوب برای ترکیبات زیست فعال گیاهی با هزینه تولید مناسب، جهت استفاده در صنعت غذا معرفی گردد.

REFERENCES

- Amirhossien Hakamivala. (2019). Modeling of the niosome nanovesicles using response surface methodology for delivery of insulin. *Biomedical Physics & Engineering Express*. AUTHOR SUBMITTED MANUSCRIPT.
- Carla M. Peixoto, Maria Inês Dias, Maria José Alves, Ricardo Calhela, (2018). Grape pomace as a source of phenolic compounds and diverse bioactive properties. *Food Chemistry*, 253, 132–138
- Dorman, HJD., Peltoketo, A., Hiltunen, R., Tikkanen, MJ. (2003). Characterisation of the antioxidant properties of deodorised aqueous extracts from selected Lamiaceae herbs. *J. Food Chem.* 83255-262.
- Fang, J., Guan, R., Ri, C., Liu, M., Ye, X., Jiang, J. (2013). Optimization of Fabrication Parameters to Prepare Tea Catechin-Loaded Liposomes using Response Surface Methodology. *Food Sci Technol.* 29-35, 5.
- Gunes A, Guler E, Un R N, Demir B, Barlas FB, Yavuz M, Coskunol H and Timur S. (2017). Niosomes of Nerium oleander extracts: In-vitro assessment of bioactive nanovesicular structures. *J. Drug Deliv. Sci. Technol* 37: 158-65.
- Hamishehkar H, Emami J, Rouholamini (2009). Effect of formulation variables on characteristics of insulin-loaded microspheres prepared by a single phase oil in oil solvent evaporation method. *Colloid Surface, B*, 74:340–349.
- Imran, M., Shah, M. R., Ullah, Ullah., Elhissi, M, Nawaz, Ali, I. (2016). Glycoside-based niosomal nanocarrier for enhanced in-vivo performance of Cefixime. *International Journal of Pharmaceutics*, 505, 122–132.
- Kamble Bhagyashree, Seema Talreja, Ankur Gupta & Basavan Duraiswamy. (2013). Development and biological evaluation of Gymnema sylvestre extract-loaded nonionic surfactant-based niosomes. *Nanomedicine*, 12, 162.
- Jakpa Wizi, Lu Wang, Xiuliang Hou, Yongying Tao. (2018). Ultrasound-microwave assisted extraction of natural colorants from sorghum husk with different solvents. *Industrial Crops & Products*, 120, 203–213.
- Maria Anastasiadi a, Harris Pratsinis b. (2012). Grape stem extracts: Polyphenolic content and assessment of their in vitro antioxidant properties. *Food Science and Technology*, 48, 316e322.
- Marianecchi, C., L. Di Marzio, F. Rinaldi, C. Celia, D. Paolino, F. Alhaique, S. Esposito and M. Carafa (2013). Niosomes from 80s to Present: The State of the Art. 1800, 23-54.
- Natércia Teixeira, Nuno Mateus, Victor de Freitas, Joana Oliveira. (2018). Wine industry by-product: Full polyphenolic characterization of grape stalks. *Food Chemistry*, 268, 110–117.
- Ojeda, E., Puras, G., Agirre, M., Zarate, J., Grijalvo, S. (2016). Influence of the polar head-group of synthetic cationic lipids on the transfection efficiency mediated by niosomes in rat retina. *Biomaterials*, 77, 267–279.
- Pando, D., Caddeo, C., Manconi, M., Fadda, A. M., & Pazos, C. (2015). Resveratrol entrapped niosomes as yoghurt additive. *Food Chemistry*, 170, 281–287.
- Panikchar Wichayapreechar, Songyot Anuchapreecha & Chadarat Ampasavate. (2019). Dermal targeting of Centella asiatica extract using hyaluronic acid surface modified niosomes. *Journal of Liposome Research*, 532-2394.
- Raeiszadeh Mahboobeh, Abbas Pardakhty, Fariba Sharififar and Mitra Mehrabani (2018). Phytoniosome: a Novel Drug Delivery for Myrtle Extract. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 17 (3): 804-817.
- Sharmila, V.S. Nikitha, S. Ilaiyarasi. (2016). Ultrasound assisted extraction of total phenolics from Cassia auriculata leaves and evaluation of its antioxidant activities. *Industrial Crops and Products*, 84, 13–21.
- Shuo Chen, Sara Hanning, James Falconer, Michelle Lock. (2019). Recent advances in non-ionic surfactant vesicles fabrication, characterization and cosmetic applications. *Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*.
- Tantra, R., Schulze, P., & Quincey, P. (2010). Effect of nanoparticle concentration on zeta-potential

- measurement results and reproducibility. *Particuology*, 8(3), 279-285.
- Vazquez-Armenta, Bernal-Mercado, Lizardi-Mendoza. (2017). Phenolic extracts from grape stems inhibit *Listeria monocytogenes* motility and adhesion to food contact surfaces. *Journal of Adhesion Science*. 293, 123–135
- Vrunal V. Morel¹, Ritu M. Gilhotra², Manoj M. Nitalikar³, Prajakta K. Khule¹. (2018). Niosomal Drug Delivery - A Comprehensive Review. *Asian Journal of Pharmaceutics*, 12 (4) S1159
- Zaynab Sadeghi Ghadi, Rassoul Dinarvan. (2019). Preparation, characterization of novel hyaluronan containing niosomes to encapsulate quercetin. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. Recently accepted.
- Z. Pineiro, A.Marrufo-Curtido, C.Vela, M.Palma. (2017). Microwave-assisted extraction of stilbenes from woody vine material. *Food and Bioproducts Processing*.