

بهینه‌سازی استخراج عصاره برگ زیتون وارسته خرم‌آبادی و بررسی ویژگی‌های فیزیکی نانوحامل‌های لیپیدی حاوی آن

منصوره سلیمانی فرد¹، علیرضا صادقی ماهونک²، محمد قربانی³، خسرو عزیزی³، اصغر سپهوند⁴

- 1- دانش‌آموخته دکتری علوم و صنایع غذایی، دانشکده علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران
- 2- نویسنده مسئول: دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران
پست الکترونیکی: sadeghiaz@yahoo.com
- 3- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، ایران
- 4- دانشیار گروه زراعت اکولوژی کشاورزی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه لرستان، ایران
- 5- دانشیار گروه انگل شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی استان لرستان

تاریخ پذیرش: 96/7/4

تاریخ دریافت: 96/3/17

چکیده

سابقه و هدف: نانوذرات لیپیدی امروزه به دلیل داشتن پتانسیل دارورسانی توجه زیادی به خود جلب کرده است. هدف از این پژوهش، بهینه‌سازی استخراج عصاره برگ زیتون، روش تهیه آن و فرمولاسیون نانوذره حاوی عصاره و بررسی ساختار حاصل می‌باشد.

مواد و روش‌ها: بهینه‌سازی استخراج عصاره برگ زیتون با حلال‌های اتانول: آب (70:30) با روش گرم با استفاده از دستگاه HPLC، همچنین بهینه‌سازی فرمولاسیون (اندازه ذرات و کارایی ریزپوشانی) با استفاده از روش سطح پاسخ توسط دستگاه‌های DLS و HPLC و در نهایت جهت تشخیص ساختار کریستالی و آمورف و میزان کریستالینیتی از دستگاه X-RD استفاده شد. در این پژوهش جهت تجزیه و تحلیل نتایج از روش آنالیز واریانس، با استفاده از نرم افزار SPSS استفاده گردید.

یافته‌ها: نتایج حاصل از کروماتوگرام‌ها نشان داد که روش بهینه جهت استخراج عصاره برگ زیتون حلال‌های اتانول و آب (70:30)، در حمام بخار آب با دمای 40 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 دقیقه می‌باشد. همچنین نتایج حاصل از دستگاه‌های DLS و HPLC نشان داد که فرمول حاوی 0/05 عصاره، بالاترین میزان ریزپوشانی، کمترین اندازه ذرات و کمترین شاخص پراکندگی را دارا بود. همچنین نتایج حاصل از دستگاه X-RD نشان داد که نانوذره حاصل ساختار کریستالی داشته و میزان کریستالینیتی 48 درصد بود.

نتیجه‌گیری: این پژوهش نشان داد در تهیه نانوذرات، هر چه مقدار ماده هسته‌ای و سرعت افزودن فاز آبی حاوی عصاره به فاز لیپیدی کمتر و همچنین هر چه سرعت پروپ هموژنایزر بیشتر باشد، اندازه نانوذرات حاصل کوچک‌تر و ساختار کریستالی منظم و بهتری حاصل خواهد شد.

واژگان کلیدی: بهینه‌سازی، ریزپوشانی، نانوذرات لیپیدی، عصاره برگ زیتون

• مقدمه

پلی‌فنول‌ها ترکیباتی با ویژگی آنتی‌اکسیدانی بالا هستند که قادرند رادیکال‌های آزاد را جذب نمایند. همچنین در محافظت از بافت بدن در برابر استرس‌های اکسیداتیو، جلوگیری از اکسیداسیون لیپوپروتئین‌ها با دانسیته پایین (LDL)، سرطان‌ها مانند پروستات، سینه، پوست و روده بزرگ تأثیر گذار هستند. با توجه به فوایدی که پلی‌فنل‌ها در سلامتی انسان دارند، تولید مواد غذایی غنی از پلی‌فنل‌ها می‌تواند در افزایش سلامت بشر تأثیرگذار باشد (1).

فنول‌های زیتون گروهی از بیومولکول‌ها هستند که فعالیت‌های بیولوژیکی عمده‌ای از خود نشان می‌دهند (2). اولئوروپئین؛ استر گلوکوزیدی النوئیک اسید و هیدروکسی تیروزول؛ با فرمول بسته $C_{25}H_{32}O_{13}$ و جرم مولکولی 540/514 (گرم بر مول)، جزء اصلی بیوفنول موجود در برگ و میوه زیتون فرآوری نشده است و اکثر پلی‌فنول‌های روغن زیتون و پساب زیتون محصول هیدرولیز شده آن می‌باشند (4). (3). این گلوکوزید به شدت تلخ بوده و عامل تلخی زیتون خام و فرآوری نشده می‌باشد (3). از جمله ترکیبات مهم حاصل از

(Particles)، و حامل‌های لیپیدی نانوساختار (Nanostructured Lipid Carriers) اشاره کرد. هر کدام از آنها بسته به شرایط مورد استفاده، دارای مزایا و معایب خاص خود می‌باشند. با توجه به این که ترکیبات لیپیدی زیست فعال از حلالیت بسیار پایین و در نتیجه زیست دسترس پذیری اندکی در سیستم‌های آبی برخوردارند، لذا نانوحامل‌های روغن در آب جهت ریزپوشانی و به حداقل رساندن این مشکلات استفاده می‌شوند (9-12).

با توجه به پژوهش‌های انجام شده در این زمینه، به نظر می‌رسد تاکنون هیچ پژوهشی بر پایه نانوساختارهای لیپیدی (NLC) عصاره برگ زیتون گزارش نشده است. لذا این پژوهش با اهداف بهینه‌سازی استخراج عصاره برگ زیتون، بهینه‌سازی تولید نانوذرات حاوی عصاره و بررسی ویژگی‌های فیزیکی این نانوذرات لیپیدی شکل گرفته است.

• مواد و روش‌ها

مواد

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

مواد شیمیایی: مواد شیمیایی از جمله اولئوروپئین (درجه خلوص 98 درصد)، لیستین، گلیسرول مونواسترات، اسید کلریدریک، کلروفرم، استونیتریل (درجه خلوص HPLC)، نمک فسفات دی هیدروژن پتاسیم، و متانول (درجه خلوص HPLC، ساخت شرکت Sigma Aldrich، از شرکت نگین طب خرم‌آباد و روغن سویای بکر از سوپر مارکت بازار محلی گرگان خریداری شد.

روش‌ها

بهینه‌سازی استخراج عصاره از برگ‌های زیتون با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی مایع با کارایی بالا (HPLC) انجام شد. جهت استخراج برگ زیتون با روش گرم از حلال‌های اتانول - آب با نسبت 70:30 (به ترتیب از چپ به راست، اتانول و آب) با ده گرم برگ زیتون آسیاب شده (نسبت حلال به برگ 10 به 1 می‌باشد)، در حمام آب گرم 40 درجه سانتی‌گراد استفاده شد. آب دو بار تقطیر با استفاده از دستگاه Fisons تمام پیرکس تهیه شد. برای استخراج اولئوروپئین از برگ‌های زیتون، برگ‌های خشک شده توسط آسیاب الکتریکی (Sunny مدل SG-80) پودر شد و سپس دقیقاً 1 گرم از پودر حاصل به بطری شیشه‌ای درب دار منتقل و 10 میلی‌لیتر حلال

تجزیه الئوروپئین، هیدروکسی تیروزول است که ظرفیت جذب رادیکال اکسیژن در آن، 10 برابر جای سبز است و یک ماده با ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی (پیشگیری از بیماری‌های قلبی - عروقی، تجمع پلاکت‌های خون) و آنتی‌میکروبی قوی، به شمار می‌رود (2). از جمله معایب اولئوروپئین که امکان استفاده از آن را به عنوان یک جزء افزودنی در فرمولاسیون‌های غذایی مختلف، با چالش مواجه ساخته است، تلخی زیاد این ترکیب و همچنین شرکت آن در واکنش‌های قهوه‌ای شدن آنزیمی است که دلیل آن، ساختار فنلی اولئوروپئین می‌باشد.

در این راستا، انواع سیستم‌های ریزپوشانی (نظیر نانوحامل‌ها) جهت حفاظت ترکیبات زیست فعال بهبوددهنده سلامتی، حساس به شرایط نامساعد محیطی و اکسیداسیون، همچنین ثبات دراز مدت بسیار بالا، کنترل بهتر سینتیک رهایش ترکیبات محصور شده، افزایش زیست تخریب‌پذیری، امکان تولید در مقیاس بزرگ و پوشش عطر و طعم نامطلوب موجود در مواد غذایی و دارویی به کار می‌رود (5, 6).

Salminen و همکاران (2016) تأثیر خواص فیزیکی شیمیایی ترکیبات و لیپیدهای عملگر ریزپوشانی شده از جمله ویتامین A، β -کاروتن و ω_3 روغن ماهی را در آرایش ساختاری نانوحامل‌های لیپیدی مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که مهم‌ترین عوامل مؤثر بر آرایش ساختاری و ثبات شیمیایی لیپیدهای عملگر در دیسپرسیون‌های لیپیدی، انحلال آنها در فاز آبی و دمای تبلور آنها در رابطه با چربی حامل بود (7). Liu و همکاران (2012) نانوحامل‌های لیپیدی (NLC) به عنوان حامل‌های مناسب مواد مغذی نامحلول در آب، مانند کوآنزیم Q₁₀ (CoQ₁₀)، جهت بهبود زیست دسترس‌پذیری آن را مورد استفاده قرار دادند. این نانوحامل‌ها به روش همگن‌سازی فشار بالا تهیه شدند. نانوحامل‌های حاوی کوآنزیم Q₁₀، مورفولوژی بیضوی شکلی در دستگاه میکروسکوپ اتمی (Atomic force microscope) AFM را نشان دادند و میانگین کارایی ریزپوشانی آنها حدوداً $98/4 \pm 0/3$ درصد بود. پایداری شیمیایی و فیزیکی مناسب به ترتیب توسط طیف‌سنجی همبستگی فوتون و کروماتوگرافی با کارایی بالا مشاهده شد. طی 3 ماه نگهداری نانوحامل‌ها (غلظت نانوحامل‌های حاوی Q₁₀ در $8/5 \pm 1/5$ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) اندازه ذرات 190 ± 30 نانومتر، با شاخص پراکندگی PDI (Polydispersity Index) کمتر از 0/1 بود (8).

از مهم‌ترین سیستم‌های ریز پوشانی لیپیدی می‌توان به میکرو و نانوامولسیون‌ها (Nanoemulsion)، نانولیپوزوم‌ها (Nanoliposome)، نانوذرات لیپیدی جامد (Solid Nano)

میزان راندمان عصاره خشک شده حاصل از برگ زیتون آسیاب شده (معادله 1)

$$\text{درصد راندمان} = \frac{10 \text{ گرم پودر برگ} - 10 \text{ گرم پودر عصاره برگ}}{10 \text{ گرم پودر برگ}} \times 100$$

بهینه‌سازی روش تهیه‌ی نانو حامل‌های لیپیدی به روش همگن‌سازی در دمای 40 درجه سانتی‌گراد: ابتدا با مقادیر فرضی مواد با استفاده از نرم‌افزار Design Expert و بررسی پژوهش‌های مشابه در این زمینه، فرمول‌های نانوحامل طراحی شد. سپس با بررسی روش‌های مختلف به کار برده شده در مقالات و تغییر در فرمول‌های طراحی شده‌ی موجود و آزمون و خطاهای متفاوت، روش بهینه و مناسب حاصل شد. در این روش مخلوط لیپیدی در دمای 5 تا 10 درجه بالاتر از نقطه ذوب لیپید جامد (60-70) حرارت داده شد. ابتدا پودر عصاره یا اولئوروپین در آب حل یا پراکنده شد. سپس محلول آبی حاوی عصاره یا اولئوروپین به فاز لیپیدی مذاب (چربی ذوب شده و روغن به همراه امولسیفایر لسی‌تین) که تحت همزدن با نیروی برشی زیاد (2000-5000 دور در دقیقه) قرار داشت، به مدت 1-1/5 ساعت به صورت قطره قطره با فاصله زمانی 2-1 ثانیه با سمپلر (1000 لاند) افزوده شد. اندازه ذرات در امولسیون نهایی ابتدا 15 دقیقه در حمام اولتراسونیک (دمای 40 درجه سانتی‌گراد) و سپس 15 دقیقه به وسیله اولتراسونیک پروب‌دار (در 5 سیکل سه دقیقه‌ای با فاصله زمانی 1 دقیقه و همچنین بزرگی پاور 60 و فرکانس 1 هرتز) کاهش یافت. پس از مراحل مذکور جهت سانتی‌فیوژ نمودن، به هر لوله فالكون (حاوی 35 میلی‌لیتر سوسپانسیون) 1 سی‌سی اسیدکلریدریک 1 مولار جهت کمک به ترسیب نانوذرات افزوده شد. سپس طی دو مرحله (به ترتیب، 30 دقیقه در دور 7000 rpm دمای 25 درجه سانتی‌گراد، 15 دقیقه در دور 15000 rpm در دمای 20 درجه سانتی‌گراد) سانتی‌فیوژ صورت گرفت. پس از عمل جداسازی در سانتی‌فیوژ، رسوب که حاوی نانوذره حاصل عصاره بود جداسازی شده و توسط خشک‌کن تصعیدی (دمای 80- درجه سانتی‌گراد در فشار 0/001 میلی‌بار به مدت 24 ساعت) خشک شد و پودر نانو حامل‌های لیپیدی حاصل گردید.

استخراج اتانول-آب (70:30) به آن اضافه شد. سپس بطری به مدت 30 دقیقه در دمای 40 درجه سانتی‌گراد در حمام آب گرم و به مدت 15 دقیقه در حمام فرا صوت قرار داده شد. به منظور اطمینان از استخراج کامل همین عملیات استخراج یکبار بر روی تفاله حاصل از جداسازی عصاره و تفاله، انجام گردید. سپس محلول با عصاره جدا شده در مرحله قبل مخلوط و خشک شد. نمونه خشک شده قبل از تزریق با حلال مورد استفاده در استخراج به صورت محلول در آمده و پس از صاف شدن از فیلتر 0.45 میکرون مورد استفاده قرار گرفت.

به منظور کشیدن نمونه و تزریق به دستگاه HPLC از میکروسرنج 25 میکرولیتری (شرکت SGE ساخت استرالیا مدل F-LC25) استفاده شد. برای جداسازی و اندازه‌گیری کمی اولئوروپین در نمونه‌های استخراجی از دستگاه HPLC با ستون C-8 مدل Shim-Pack clc-c8 (M) به طول 25 سانتی‌متر، قطر 4.6 میلی‌متر و اندازه ذرات پر کننده 5 میکرومتر و ستون محافظ به طول 1 سانتی‌متر استفاده شد. این دستگاه مجهز به دو پمپ رفت و برگشتی، یک آون، یک گاز زدای پیوسته، یک لوپ نمونه به اندازه 20 میکرولیتر و یک آشکار ساز UV/Visible مدل SPD-10 AVP مجهز به سل کوارتز با حجم 8 میکرولیتر بود. نرم افزار مورد استفاده Class-vp v.R 6.1 بود. حلال‌های HPLC (بافر فسفات، استونیتریل و آب مقطر) و نمونه استخراجی قبل از استفاده توسط سیستم نگهدارنده فیلتر غشایی 0.45 میکرون (مدل Millipore) صاف شدند.

شناسایی پیک اولئوروپین با استفاده از مقایسه زمان بازداری (Retention Time) tR آن با نمونه استاندارد صورت گرفت. برای اطمینان بیشتر، مقداری از استاندارد اولئوروپین به نمونه افزوده شد و مجدداً تزریق گردید. مطابق انتظار ارتفاع پیک شناسایی شده به عنوان اولئوروپین افزایش یافت. برای اندازه‌گیری کمی اولئوروپین از رسم منحنی کالیبراسیون توسط نمونه استاندارد بر اساس سطح زیر پیک استفاده شد. برای جداسازی گونه‌ها در روی ستون HPLC از یک برنامه شویشی گرادینتی (0.2، 0.4، 0.6، 0.8، 1 میلی‌لیتر بر دقیقه) با استفاده از دو حلال الف: بافر استات فسفات 0.05 مولار (pH=2.8) و حلال ب: استونیتریل استفاده شد. سرعت جریان فاز متحرک 1 میلی‌لیتر بر دقیقه بود.

جدول 1. بهینه‌سازی مقدار و نوع ترکیبات موجود در ساختار نانوذرات

کد فرمولاسیون	آب (سی‌سی)	گلیسرول مونواستئارات (گرم)	اسید لینولئیک (گرم)	روغن سویا (گرم)	لسیتین (گرم)	پودر عصاره برگ زیتون (گرم)	اولئوروپئین (میلی‌گرم)
1	120	0/70	0/15	0/15	0/3	0/05	11.0685
2	120	0/70	0/15	0/15	0/3	0/1	22.137
3	120	0/70	0/15	0/15	0/3	0/2	44.274
4	120	0/70	0/15	0/15	0/3	0/4	88.548
5	120	0/70	0/15	0/15	0/3	0/5	110.685

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

آزمون تعیین فازها و ساختار مواد کریستالی فرمول

بهینه: این تکنیک با استفاده از مکانیسم تفرق پراش اشعه X و توسط دستگاه پراش اشعه X (X-ray Powder Diffraction) انجام می‌شود. به منظور تشخیص ساختار کریستالی و یا آمورف نانوذرات، الگوهای X-RD توسط دستگاه پراش اشعه X مشخص می‌شوند و جمع‌آوری اطلاعات با استفاده از آنود مس و ولتاژ مونوکروماتور 40 کیلو ولت انجام می‌شود. الگوهای انکسار در دامنه $20 \leq 2\theta \leq 800$ با استفاده از اسکن مداوم انجام می‌گیرد (14).

نحوه تجزیه و تحلیل اطلاعات و روش‌های آماری مورد استفاده: پس از جمع‌آوری داده‌ها و وارد کردن آنها در نرم افزار آماری SPSS 21 پس از محاسبه شاخص‌های مرکزی و پراکندگی مناسب، جهت تحلیل داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس (با کروسکال والیس) استفاده شد.

• یافته‌ها

میزان راندمان عصاره خشک شده حاصل از برگ زیتون آسیاب شده روش بهینه استخراج: از 10 گرم پودر برگ زیتون، 1 گرم پودر عصاره حاصل شد.

$$\%90 = \frac{1 \text{ گرم پودر عصاره} - 10 \text{ گرم پودر برگ}}{10 \text{ گرم پودر برگ}} \times 100$$

= درصد راندمان

بهینه‌سازی استخراج: پس از بررسی میزان غلظت حلال‌های اتانول، استون و آب در دماهای مختلف مشخص شد که عصاره مستخرج با حلال‌های اتانول - آب به ترتیب از چپ به راست با نسبت‌های 70:30 بیشترین میزان جذب را در لانداس مگس مختص به اولئوروپئین (254 نانومتر) داشتند. پس از بررسی کروماتوگرام‌های حاصل از بررسی عصاره‌های حاصل، کروماتوگرام بهینه (شکل 1) حاصل شد.

بعد از تهیه پودر برگ زیتون و استخراج با حلال‌ها، حدود 1 گرم پودر عصاره برگ از 10 گرم پودر برگ زیتون حاصل

بهینه‌سازی غلظت و نسبت مواد در نانوذرات حامل

عصاره: به منظور تهیه نانوحامل‌های لیپیدی حاوی اولئوروپئین، ابتدا با استفاده از نرم‌افزار Design Expert و پژوهش‌های مشابه در این زمینه، به صورت فرضی مقادیری در نظر گرفته شد. در این مورد محتوای فاز لیپیدی، 1 درصد در نظر گرفته می‌شود که از این مقدار 85 درصد فاز چربی (گلیسرول مونواستئارات) و 15 درصد فاز روغن (اسید لینولئیک، روغن سویا) و مقادیر لسیتین و اولئوروپئین 0/075 درصد (وزنی/وزنی) در نظر گرفته شد. بعد از آزمون و خطا و اندازه‌گیری میانگین اندازه ذرات و HPLC، در نهایت مقادیر در 4 ضرب و سپس بر عدد سه تقسیم شد. سپس با بررسی و تغییر دادن مقادیر اولئوروپئین و ثابت نگه داشتن مقادیر دیگر، فرمولاسیون‌های متفاوت (جدول 1) تهیه و اثر تغییرات ماده هسته‌ای مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به فرمول نهایی نانوحامل‌ها و دستیابی به فرمولاسیون بهینه نهایی، آزمون‌های مربوط به نانوحامل بهینه مورد بررسی قرار گرفت.

آزمون پراکندگی دینامیکی نور (DLS Dynamic Light Scattering): به منظور مطالعه اندازه ذرات نمونه‌ها از دستگاه سنجش اندازه ذرات (Particle Sizer) استفاده گردید. اندازه ذرات نمونه‌های تهیه شده بعد از یک شبانه روز نگهداری در دمای محیط، توسط دستگاه آنالیزکننده تفرق نوری لیزری انجام گرفت. متوسط اندازه ذرات بر اساس میانگین قطر حجمی تعیین شد (13).

بازدهی ریزپوشانی: بازدهی ریزپوشانی کردن نسبت ماده ریزپوشانی شده درون نانوذرات به کل ماده اضافه شده به فاز لیپیدی است. مقدار ترکیب زیست فعال ریزپوشانی نشده یا تخریب شده پس از فرآیند بایستی بعد از جداسازی فاز پیوسته با سانتریفوژ با دور بالا محاسبه و کم شود (معادله 2).

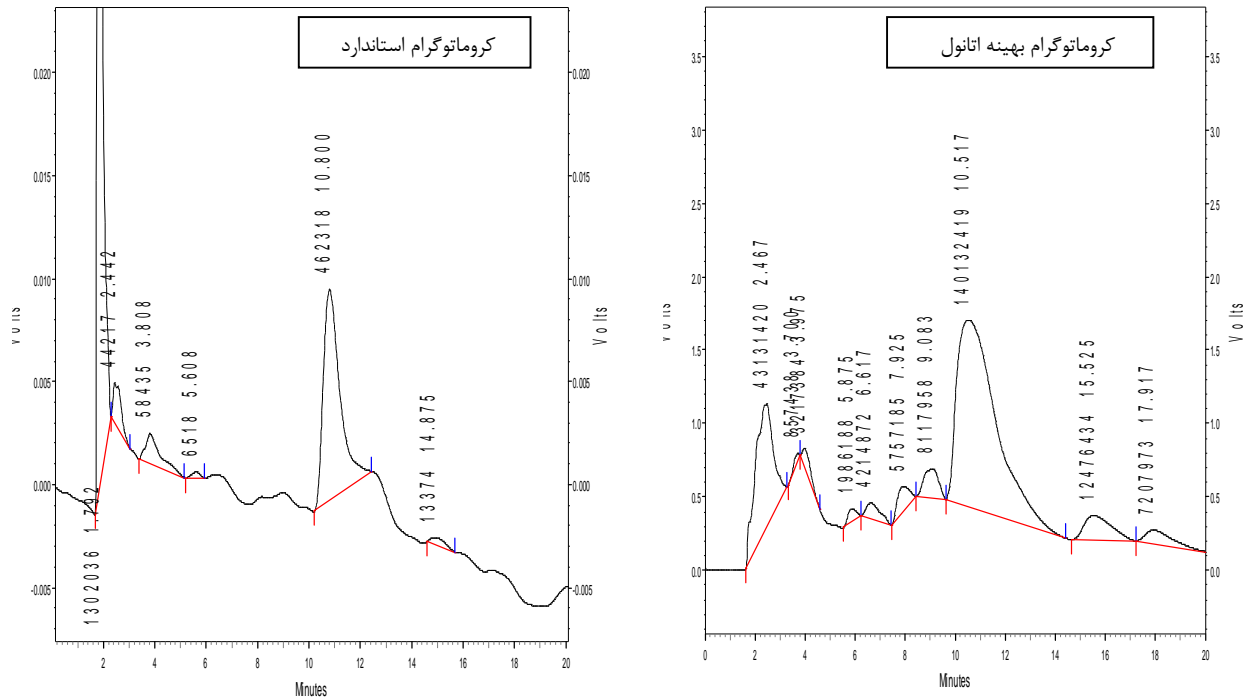
معادله 2

$$\text{بازدهی نانوحامل} = \frac{\text{ماده هسته‌ای ریزپوشانی درون نانو حامل}}{\text{ماده هسته‌ای اولیه}}$$

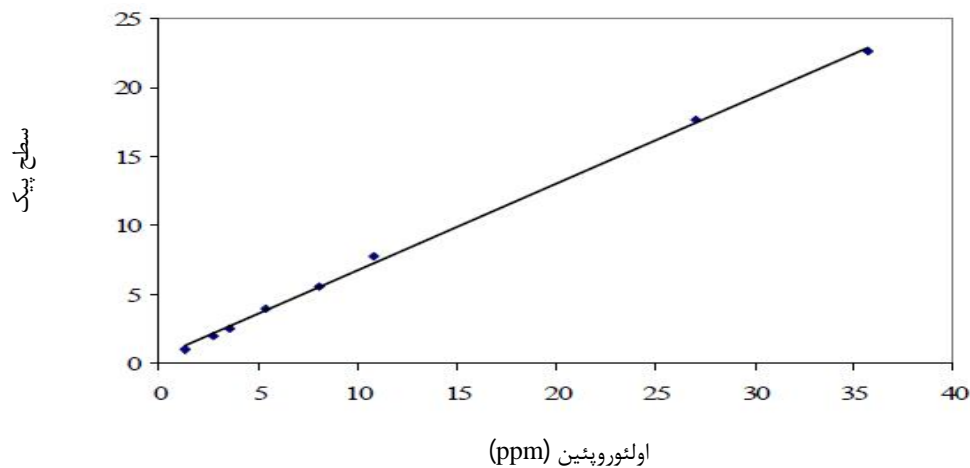
$$Y = 630995x + 448993$$

$$R^2 = 0.9987$$

شد. بعد از رسم گراف استاندارد (شکل 2) و به دست آوردن منحنی استاندارد معادله خط (معادله 1) حاصل شد و در ادامه نتایج حاصل از کروماتوگرام‌ها و گراف و معادله استاندارد (جدول 2) ارایه شده است.



شکل 1. کروماتوگرام‌های حاصل از بررسی اولئوروپتین خالص (نمونه استاندارد) و عصاره برگ استخراج شده با حلال‌های اتانول و آب (70:30)



شکل 2. منحنی کالیبراسیون برای اندازه‌گیری کمی اولئوروپتین توسط دستگاه HPLC

جدول 2. نتایج حاصل از آنالیز اولئوروپتین در برگ زیتون واریته خرم‌آبادی

نام نمونه	انتگرال سطح زیر پیک	اولئوروپتین (میلی‌گرم بر گرم)	درجه خلوص	درصد خلوص
اتانول:آب	140132419	221.370	0.221370	22.1370

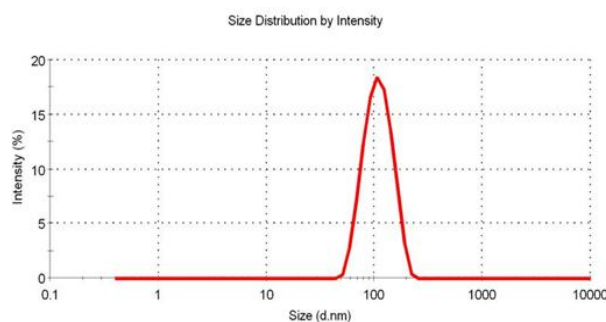
اندیس پراکندگی ذرات و همچنین نامناسب بودن اندازه ذرات، فرمول با کد 1 با میانگین قطر ذرات 120 نانومتر و اندیس شاخص پراکندگی 0/153 به عنوان مناسب‌ترین فرمول انتخاب گردید.

فرمول با کد 1 به طور معقول به دلیل تفاوت کمتر در اندازه ذرات، دارای یکنواختی بیشتر و سطوحی نرم‌تر بود. همچنین از نمودار عریض و پهنی نیز برخوردار بوده و گسستگی آن در مقادیر بالا رخ می‌دهد (Intercept) همچنین بین نمونه‌ها، فرمول با کد 2 تشابه زیادی با فرمول با کد 1 داشت با این وجود تفاوت معنی‌داری مشاهده گردید.

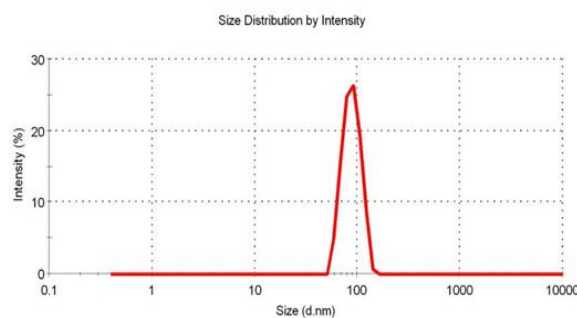
همان طور که در نتایج مشخص شد در این پژوهش کروماتوگرام پودر عصاره برگ زیتون حاصل از مخلوط حلال‌های اتانول-آب میزان اولتروپئین بالایی را دارا بود.

آزمون پراکندگی دینامیکی نور: اندازه‌گیری اندازه ذرات یکی از مهم‌ترین تکنیک‌های مشخصه‌ای جهت تعیین و تأیید تولید نانوذرات می‌باشد. در جدول 2 ویژگی‌های سیستم و حلال و شرایط آزمون و در جدول 3، میانگین قطر ذرات، PDI، پهنای، میزان گسستگی و قطع شدن منحنی (شکل 2) نمایش داده شده است. همان‌طور که در جدول 3 مشاهده می‌شود فرمول با کد 5 و 4 به ترتیب دارای بیشترین و کمترین میانگین قطر ذرات هستند؛ با این وجود به دلیل نامعقول بودن

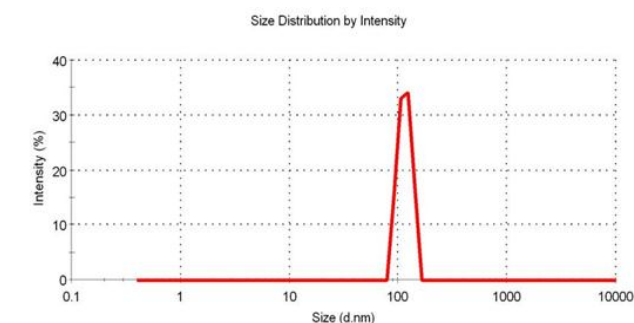
(1)



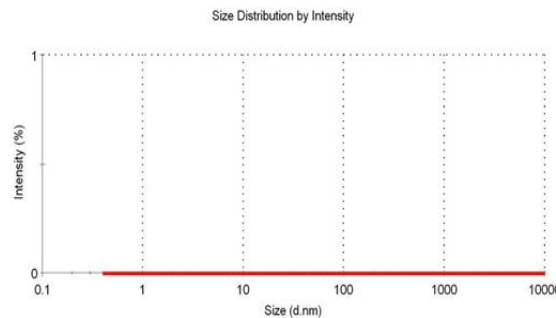
(2)



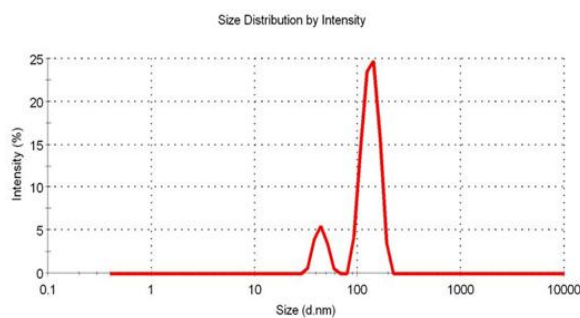
(3)



(4)



(5)



شکل 3. منحنی بررسی اندازه ذرات و بررسی پراکندگی ذرات نانوذرات

جدول 3. ویژگی‌های سیستم جهت اندازه‌گیری میانگین ذرات و شاخص پراکندگی فرمول بهینه نانوذره

RI مواد	جذب مواد	ویسکوزیته (سانتی پواز)	طول زمان آزمایش (ثانیه)	شرایط اندازه‌گیری (میلی‌متر)	تضعیف کننده	پخش RI	نرخ شمارش (کیلو سانتی پواز)	دما (درجه سانتی‌گراد)	ویژگی‌ها فرمول
1/59	0/01	0/8872	60	4/65	6	1/330	322/5	25	کد 1
1/59	0/01	0/8872	60	4/65	5	1/330	262/4	25	کد 2
1/59	0/01	0/8872	90	4/65	7	1/330	495	25	کد 3
1/59	0/01	0/8872	80	4/65	7	1/330	303/1	25	کد 4
1/59	0/01	0/8872	70	4/65	7	1/330	128/2	25	کد 5

آزمون، هدف بررسی کریستالی بودن و آمورف بودن نانوذرات بود. همان‌طور که در شکل 4 مشاهده می‌شود، ذرات نانوحامل لیپیدی دارای ساختار کریستالی منظم می‌باشند.

آزمون بررسی تعیین میزان کریستالینیتی نانو ذرات حاوی عصاره برگ زیتون: همچنین پس از تشخیص کریستالی بودن نانو ذره مشخص شد که میزان کریستالینیتی نانوذرات لیپیدی 48 درصد می‌باشد.

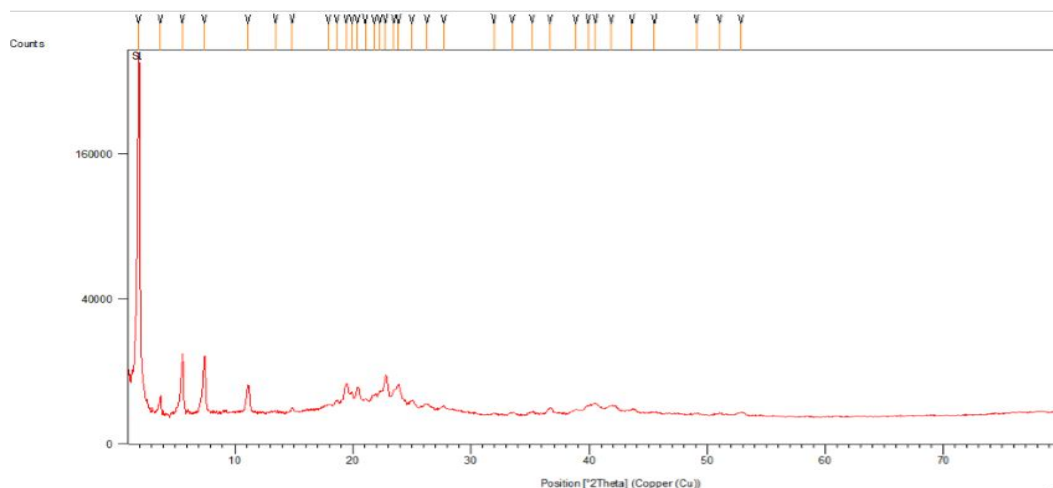
کارایی انکپسولاسیون: راندمان ریزپوشانی به پتانسیل مواد دیواره‌ای در حفظ یا به دام انداختن مواد هسته‌ای درون ریزکپسول‌ها اشاره دارد. راندمان ریزپوشانی همچنین مرتبط با عمر ماندگاری ماده محصور شده درون دیواره می‌باشد. کارایی ریزپوشانی عصاره برگ زیتون در فرمول‌های طراحی شده به این شرح می‌باشد: کد 1: $82 \pm 8/41$ ، کد 2: $12/04 \pm 0/91$ ، کد 3: $18/27 \pm 0/30$ ، کد 4: $16/36 \pm 0/48$ ، و کد 5: $1/84 \pm 0/32$.

آزمون فازها و ساختار مواد کریستالی: از جمله روش‌های آنالیز و شناسایی مواد، پراش اشعه ایکس می‌باشد. در این

جدول 4. جدول مقادیر ویژگی‌های فیزیکی مهم در تعیین بهترین نوع فرمولاسیون

شدت Intensity (درصد)	پهنا (نانومتر)	Intercept	PDI	قطر ذرات غالب ذرات (نانو)	میانگین قطر ذرات (نانو)	کد فرمولاسیون
a*100±14	a32/36±2/47	b0/919±0/13	0/202±0/07	c111/5±18/52	a912/0±21/6	کد 1
a100±24/50	c17/53±0/44	b0/0922±0/016	d0/153±0/04	d88/72±17/42	d121/9±20/53	کد 2
a100±24/51	d16/08±1/44	c0/848±0/017	b0/428±0/07	b115/3±12/34	c382/6±42/18	کد 3
0/00	0	a1/77±0/046	a0/638±0/05	0.00	e3/416±	کد 4
b85.8±15/36	b23/95±0/53	b0/915±0/21	b0/435±0/08	a134/1±15/12	b400/4±60/46	کد 5

* حروف غیر یکسان در هر ستون، نشان دهنده اختلاف آماری در سطح 0/05 است.



شکل 4. منحنی بررسی ساختار بلوری نانوذرات با دستگاه XR

• بحث

مقدار قابل قبول می‌باشد (25). همان‌طور که در مبحث یافته‌ها شکل 3 مشاهده شد فرمول با کد 1 با میانگین قطر ذرات 120 نانومتر و اندیس شاخص پراکندگی 0/153 به عنوان مناسب‌ترین فرمول انتخاب گردید. با آزمون و خطا در این پژوهش مشخص شد پارامترهای فرآیند از جمله سرعت (سرعت پروب هموژنایزر، سرعت ترکیب شدن مواد و ...)، ولتاژ، مدت زمان هموژنایزر، مدت زمان اولتراسونیک، نوع اولتراسونیک (حمام یا پروب) و همچنین مقدار ماده هسته‌ای افزوده شده به فرمولاسیون، نوع پلیمر، از جمله عوامل مؤثر در اندازه ذرات، میزان بارگیری ماده هسته‌ای و ساختار کریستالی منظم در نانو ذرات می‌باشد.

Shah و همکاران (2014) گزارش نمودند که هر چقدر میزان امولسیفایر بیشتر باشد اندازه ذرات و شاخص پراکندگی ذرات نیز کمتر خواهد بود و میزان لیپید تأثیری در اندازه ذرات ندارد. این با نتایج پژوهش حاضر مطابقت داشت (25) در حالی که عدم تأثیر لیپید مطالعه فوق بر اندازه ذرات با نتایج حاصل در این پژوهش مغایرت نشان داد. Mainardes و همکاران (2006) در بررسی آنالیز حرارتی نانوذرات کوانتل پلی لاکتید-کو-گلایکولید (Poly-lactide-co-glycolide) گزارش کردند که هر چقدر اندازه ذرات ریزتر باشد میزان کارایی ریزپوشانی بیشتر خواهد بود (26) که با نتایج حاصل در این پژوهش همخوانی داشت. اسرینیواس و پریتی (2017) در بررسی و تولید نانوذرات لیپیدی حاوی هیدروکلرید جمسیتابین (Gemcitabine hydrochloride) گزارش کردند که زمان و نوع دستگاه در اندازه ذرات پتانسیل زتا مؤثر می‌باشد. در این پژوهش اندازه ذرات حاصل از اولتراسونیک نسبت به ذرات حاصل از هموژنایزر کوچک‌تر بودند و هر چقدر مدت زمان سونیکه کردن بیشتر باشد اندازه ذرات کمتر خواهد بود طوری که مشابه با نتایج حاصل در پژوهش فوق بود.

در رابطه با شاخص پراکندگی ذرات در نانوحامل‌های لیپیدی، احتمال می‌رود افزایش اندازه ذرات به دلیل به کار بردن مقدار بیشتر ذرات بزرگ پودر عصاره برگ زیتون در فرمول و یا تجمع ذرات نانوحامل چرب به دلیل تمایل ذرات چربی به تشکیل زنجیره باشد.

همان‌طور که در نتایج بیان شد، فرمول‌های نانوحامل با کد 1 و کد 5 به ترتیب دارای بیشترین و کمترین مقدار ماده

سیستم‌های چند حلالی جهت بهینه‌سازی استخراج و حصول ترکیبات فنولیک از ماتریکس گیاهان استفاده می‌شود. اتانول به عنوان یک ماده سالم (GRAS) طبقه‌بندی شده و به عنوان حلال مؤثری جهت استخراج ترکیبات فنولیک گزارش شده است. بنابراین برای حصول و احیاء این گروه‌های فیتوشیمیایی، به ویژه زمانی که این ترکیبات برای تولید محصولات نوتراسوتیکال (Nutraceutical) (غذا-دارو) کاربرد دارند، از اتانول استفاده می‌شود (15). برخی پژوهشگران مؤثر بودن حصول و استخراج ترکیبات پلی‌فنولیک از طریق استخراج حلال اتانولی با افزودن نسبت‌های متفاوت آب به این حلال را گزارش کردند (16، 17). همان‌طور که در نتایج مشخص شد در این پژوهش، کروماتوگرام پودر عصاره برگ زیتون حاصل از مخلوط حلال‌های اتانول - آب بالاترین میزان اولئوروپئین را دارا بود. همچنین استاموفولوس و همکاران (2014) با بررسی نسبت‌های متفاوت از اتانول و آب (20، 40، 60، 70، 80) گزارش کردند که بیشترین ترکیبات فنولی حاصل از استخراج حلال اتانول - آب زمانی حاصل می‌شود که نسبت اتانول به آب به ترتیب 70 به 30 (70:30) باشد (18) که با نتایج حاصل در این پژوهش همخوانی و مطابقت داشت. در این بخش از تحقیق، روشی ساده و نسبتاً سریع جهت استخراج اولئوروپئین ارائه گردید. با استفاده از برنامه گردادیان شویشی به کار رفته و رقیق‌سازی نمونه جداسازی مناسبی برای آنالیز حاصل شد. این نتایج با مشاهدات سایر محققین همخوانی داشت (19-24).

بنابراین این روش به دلیل حضور اولئوروپئین بالا و ایمن بودن حلال‌های کاربردی در صنعت غذا و دارو جهت ادامه پژوهش به کار گرفته شد.

اندازه‌گیری اندازه ذرات یکی از مهم‌ترین تکنیک‌های مشخصه‌ای جهت تعیین و تأیید تولید نانوذرات می‌باشد. دستگاه DLS، اندازه ذرات نانو ساختارهای لیپیدی، قطر هیدرودینامیکی و همچنین اندیس پراکندگی ذرات (PDI) که نمایانگر میزان توزیع و پراکندگی اندازه ذرات است را نشان می‌دهد (25، 4).

PDI کیفیت توزیع ذرات را در محدوده 0-1 نشان داد. اگر مقدار $DPI \leq 0/1$ باشد نمایانگر بالاترین کیفیت توزیع می‌باشد؛ اغلب محققین $DPI \leq 0/3$ را به عنوان مقدار اپتیمم و بهینه PDI تشخیص می‌دهند، طوری که مقدار کمتر از $DPI \leq 0/5$

کریستالی به ویژگی‌های پلیمری (وزن مولکولی) (31) پارامترهای فرآیند (ولتاژ و سرعت به کار برده شده) و حلال (سرعت تبخیر حلال و واکنش حلال - پلیمر) (31) و احتمالاً زمان ترکیب کردن مواد با یکدیگر بستگی دارد. شکل 3 نشان می‌دهد که نانوحامل‌ها با ساختار لیپیدی دارای پیک‌های فراوانی می‌باشد که 9 پیک کریستالی نشان داده شده در شکل 3 در زاویه 2θ، نشان دهنده تشکیل پیوندهای قوی و محکم درون و بین مولکولی هیدروژنی (32، 33) می‌باشد.

Kurd و همکاران (2017) نتایج مشابهی را در ساختار کریستالی نانوفیبرهای (حاوی موسیلاژ دانه‌ای باسیل به عنوان ماده جدید هیدروکلئیدی و پلی‌وینیل الکل به عنوان کمک‌کننده) گزارش دادند (34) طوری که با نتایج حاضر در این پژوهش مطابقت داشت.

نتایج حاصل از کروماتوگرام‌های HPLC نشان داد عصاره حاصل از مخلوط اتانول و آب (70:30)، در دمای کمتر از 40 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 دقیقه بالاترین میزان پلی‌فنل (اولئوروپئین) را دارا بود. همچنین نتایج حاصل از پراکندگی نور ذرات نانو نشان داد که فرمول 0/05 پودر عصاره دارای کمترین میانگین اندازه ذرات و کمترین میزان پراکندگی اندازه ذرات نسبت به سایر فرمول‌ها بود. با توجه به نتایج حاصل از آزمون دستگاهی X-RD مشخص شد نانوذره حاصل دارای ویژگی کریستالی بوده که نمایانگر پایداری فیزیکی نانوذره حاصل طی انبارداری می‌باشد. همچنین از نتایج X-RD مشخص شد که میزان کریستالینیتی نانوذره حاصل 48 درصد می‌باشد.

سیاسگزاری

پژوهشگران و نویسندگان این پژوهش از جناب آقای دکتر روح الله حیدری (هیئت علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی خرم آباد، لرستان) و جناب آقای مهندس کمیل جوادی (کارشناس آزمایشگاه مرکزی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات درمانی استان کرمانشاه) و سرکار خانم مهندس نظری (کارشناس آزمایشگاه X-RD، دانشگاه صنعت شریف) مراتب قدردانی و تشکر خود را اعلام می‌دارند.

محبوس شده بودند. از جمله عوامل مؤثر بر میزان کارایی ریزپوشانی مقدار ماده هسته‌ای و سرعت ترکیب شدن مواد و دور پروب هموزنایزر می‌باشد به طور که هر چقدر مقدار ماده‌ی هسته‌ای کمتر، سرعت افزودن ماده هسته‌ای به فاز لیپیدی (مخلوط چربی و روغن) کمتر و سرعت هموزنایزر بیشتر باشد میزان محبوس شدن و به دام افتادن ماده هسته‌ای بیشتر خواهد شد. با توجه به این که شرایط آزمون برای فرمول‌ها یکسان در نظر گرفته شد، فرمول با کد 1 با کمترین مقدار ماده هسته‌ای دارای بیشترین میزان محبوس شدن یا به عبارتی بیشترین کارایی انکپسولاسیون بود

Preeti و Srinivas (2017) در بررسی و تولید نانوذرات لیپیدی حاوی هیدروکلرید جمسیتابین به این نتیجه رسیدند که افزایش مقدار لیپید تأثیری در میزان کارایی ریزپوشانی دارو در ماتریکس نانوذرات ندارد (27) که با نتایج حاصل در این پژوهش مطابقت نداشت. Wei و همکاران (2016)، در پژوهشی تولید و رهایش نانوذرات لیپیدی حاوی دینسان 114 در روده را مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که هر چقدر مقدار مواد شرکت‌کننده در تهیه فرمول بیشتر باشد راندمان ریزپوشانی کاهش و هر چقدر هموزنایزاسیون مواد با سرعت کمتری انجام شود، راندمان ریزپوشانی بیشتر می‌شود که با نتایج این پژوهش همخوانی و مطابقت داشت (28). Shilei و همکاران (2014) پس از بهینه‌سازی تولید نانوحامل‌های لیپیدی کوئرستین، کارایی ریزپوشانی را اندازه‌گیری و مقدار آن را $93/5 \pm 0/35$ درصد گزارش کردند. همچنین شاخص نانوحامل‌های کوئرستین ثبات فیزیکی مناسبی در شرایط دمایی محیط داشتند (29) که با نتایج حاصل همخوانی و مطابقت داشت. فتحی و همکاران (2013) در بررسی نانوذرات لیپیدی جامد و حامل‌های لیپیدی نانوساختار حاوی هسپریدین گزارش کردند که کارایی ریزپوشانی نانوحامل‌های تولید شده در محدوده 39/90 تا 63/08 درصد قرار داشت (30).

شکل 3، دیفراکتوگرام دستگاه پراش اشعه ایکس، ساختار کریستالی را در نانو حامل‌های لیپیدی نشان می‌دهد. ساختار

• References

- Kris-Etherton PM, Hecker KD, Bonanome A, Coval SM, Binkoski AE, Hilpert KF, Griel AE, Kuo YC, Chung J. F. Physicochemical properties of nevirapine-loaded solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers. *Colloids and Surface B: Biointerfaces* 2011; 83: 299-306.
- Guinda Á. Use of solid residue from the olive industry. *Grasas Y Aceites* 2006; 57: 107-115.
- Baldioli M, Servili G, Perretti G, Montedoro F. Antioxidant activity of tocopherols and phenolic compounds of virgin olive oil. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 1996; 73: 1589-1593.
- Benavent O, Castillo J, Korente L. Antioxidant activity of phenolics from *Olea europaea* L. leaves. *Journal Food Chemistry* 2000; 68: 457- 462.
- Cavalli R, Gasco MR, Chetoni P, Burgalassi S. Solid lipid nanoparticles (SLN) as ocular delivery system for tobramycin. *International Journal Pharmn* 2002; 238: 241- 245.
- Ramteke KH, Joshi SA, Dhole SN. Solid Lipid Nanoparticle. *Journal of Pharmacy* 2012; 2: 34-44.
- Salminen, H., Gömmel, Ch., Leuenerberger, B., Weiss, J. Influence of encapsulated functional lipids on crystal structure and chemical stability in solid lipid nanoparticles: Towards bioactive-based design of delivery systems. *Food Chemistry* 2016; 190: 928-937.
- Liu D, Liu Z, Wang L, Zhang C, Zhang N. Nanostructured lipid carriers as novel for parenteral delivery of docetaxel. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 2011; 85: 262-269.
- Walker R, Decker EA, McClements DJ. Development of food-grade nanoemulsions and emulsions for delivery of omega-3 fatty acid: opportunities and obstacles in food industry. *Food & Function* 2015, 6: 41-54.
- Yao M, Xia H, McClements DJ. Delivery of lipophilic bioactivities: assembly, and reassembly of lipid nanoparticles. *Annual Review of Food Science and Technology* 2014; 5: 53-81.
- Yao M, McClements, DJ, Xiao H. Improving oral bioavailability of nutraceuticals by engineered nanoparticle-based delivery systems. *Current Opinion in Food Science* 2015; 2: 14-19.
- Norton JE, Espinosa YG, Watson RL, Spyropoulos F, Norton IT. Functional food microstructures for macronutrient release and delivery. *Food and Function* 2015; 3: 663-678.
- Sze S, Erickson D, Ren L, Li D. Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current-time relationship in electroosmotic flow. *Journal of Colloid and Interface Science* 2003; 261: 402-410.
- Shendi P, Yavada S, Patil P. Development and Characterization of Chitosan Nanoparticles Containing Erthromycin Estolate. *International Journal of Pharmaceutical Applications* 2014; 5: 1-7.
- Naczka M, Shahidi F. Phenolics in cereals, fruits and vegetables: Occurrence, extraction and analysis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*. 2006, 41: 1523-1542.
- Alonso E, Bourzeix M, Revilla E. Suitability of water-ethanol mixtures for the extraction of catechins and proanthocyanidins from *Vitis vinifera* seeds contained in a winery by-product. *seed-science-and-technology*, 1991, 19: 545-552.
- Yilmaz Y, Toledo RT. Oxygen radical absorbance capacities of grape/wine industry byproducts and effect of solvent type on extraction of grape seed polyphenols. *Journal of Food Composition and analysis*, 2006, 19: 41-48.
- Stamatopoulos k, Chatzilazarou A, and Katsoyannos E. 2014. Optimization of Multistage Extraction of Olive Leaves for Recovery of Phenolic Compounds at Moderated Temperatures and Short Extraction Times. *Foods*, 3: 66-81.
- Jaimand K, Rezaee MB, Abravesh Z, Golipour M, Sharifi M. Extraction and determination of the amount of oleuropein in 9 olive cultivars cultivated at Fadak station (Dezful). *Quarterly journal of medicinal plants and aromatic herbs of Iran* 2006; 22: 74-78 [in Persian].
- Hashemi SP, Delfan B, Ghiasvand ER, Raeesi F. Evaluation of oleuropein in leaf of cultivated olive trees in Khorramabad city. *Yafteh* 2008; 12: 98-106 [in Persian].
- Amiot MJ, Fleuriet A, Macheix JJ. Importance and evolution of phenolic compounds in olive during growth and maturation. *Journal Agriculture Food Chemistry* 1986; 34: 823-26.
- Amiot MJ, Fleuriet A, Macheix JJ. Accumulation of oleuropein derivatives during olive maturation, *Phytochemistry. Journal Agriculture Food Chemistry* 1989; 28: 67-73.
- Malik NSA, Bradford JM. Changes in oleuropein levels during differentiation and development of floral buds in 'Arbequina' olives. *Scienta Horticultural* 2006: 110: 274-78.
- Saitta M, Lo Curto S, Salvo F, Di Bella, G, Dugo G. Gas chromatographic-tandem mass spectrometric identification of phenolic compounds in Sicilian olive oils. *Analytica Chimica Acta* 2002: 466: 335-44.
- Shah PR, Eldridge D, Palombo E, Harding L. Optimisation and Stability Assessment of Solid Lipid Nanoparticles using Particle Size and Zeta. *Journal of Physical Science* 2014; 25: 59-75.
- Mainardes RM, Palmira Daflon Gremião M, Evangelista RC. Thermoanalytical study of praziquantel-loaded PLGA nanoparticles. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 2006; 42: 523-530.
- Srinivas P, Preeti S. Formulation and evaluation of gemcitabine hydrochloride loaded solid lipid nanoparticles. *Journal of Global Trends in Pharmaceutical Science*, 2017, 5(4): 2017-2023.

28. Wei L, Yang Y, Shi K, Wu J, Zhao W, Mo J. Preparation and Characterization of Loperamide-Loaded Dynasan 114 Solid Lipid Nanoparticles for Increased Oral Absorption In the Treatment of Diarrhea. *Frontiers in pharmacology* 2016, 7: 59-75.
29. Shilei N, Sun R, Zhao G, Xia Q. Quercetin Loaded Nanostructured Lipid Carrier for Food Fortification: Preparation, Characterization and in vitro Study. *Journal of Food Process Engineering*, 2015, 38: 93-106.
30. Fathi M, Varshosaz J, Mohebbi M, Shahidi F. Hesperetin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructure Lipid Carriers for Food Fortification: Preparation, Characterization, and Modeling. *Food and Bioprocess Technology*, 2013, 6: 1464-1475.
31. Islam MS, Rahaman MS, Yeum JH. Electrospun novel super-absorbent based on polysaccharide-polyvinyl alcohol-montmorillonite clay nanocomposites, *Carbohydrate Polymer*, 2015, 115: 69-77.
32. de Oliveira Mori CL, dos Passos NA, Oliveira JE, Mattoso LHC, Mori FA, Carvalho AG, de Souza Fonseca A, Tonoli GHD. Electrospinning of zein/tannin bio-nanofibers. *Industrial Crops and Products*, 2014, 52: 298-304.
33. Park JH, Lee HW, Chae DK, Oh W, Yun JD, Deng Y, Yeum JH. Electrospinning and characterization of poly (vinyl alcohol)/chitosan oligosaccharide/clay nanocomposite nanofibers in aqueous solutions. *Colloid and Polymer Science*, 2009, 287: 943-950.
34. Kurd F, Fathi M, Shekarchizadeh H. Basil seed mucilage as a new source for electrospinning: Production and physicochemical characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*, 2017, 95: 689-695.

Optimization of Khorramabad Olive Leaf Extract Extraction and Investigating the Physical Properties of Nano-Structured Lipid Carriers Containing it

Soleimanifard M¹, Sadeghi Mahoonak AR.*², Ghorbani M³, Azizi KH⁴, Sepahvand A⁵

- 1- Ph.D in Food Science & Technology, Faculty of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Science & Natural Resources, Gorgan, Iran.
- 2- *Corresponding Author: Associate Prof, Dept. of Food Science & Technology, Faculty of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Science & Natural Resources, Gorgan, Iran. Email: sadeghiaz@yahoo.com
- 3- Associate Prof, Dept. of Food Science & Technology, Faculty of Food Science & Technology, Gorgan University of Agricultural Science & Natural Resources, Gorgan, Iran
- 4- Associate Prof, Dept. of Agricultural Ecology, Faculty of Agriculture, Lorestan University, Khoramabad, Iran
- 5- Associate Prof, Dept. of Parasitology, Faculty of Medicine, Lorestan University of Medical Sciences, Khoramabad, Iran

Received 7 Jun, 2017

Accepted 26 Sept, 2017

Background and Objectives: Today, lipid nanoparticles have attracted a lot of attention due to their drug potential. The aim of this study was to optimize the extraction of olive leaf extract, its method of preparation, and formulation of the nanoparticles and investigate the resulting structure.

Materials and Methods: The extraction of olive leaf extract was optimized of with the solvents of ethanol:water (70:30) with the steam bath methods. Also formulations (encapsulation efficiency and particle size) were optimized with applying response surface methodology and using DLS and HPLC instruments. Finally, crystalline and amorphous structures, as well as the crystallinity were detected using the XRD device. In this study, analysis of variance was employed for data analysis using SPSS software.

Results: The results of the chromatograms showed that the optimal method for extraction of olive leaf extract is the solvent of ethanol:water (70:30) in a steam bath at 40°C for 30 minutes. The results of DLS and HPLC instruments showed that the encapsulated formulation containing extract 0.05 had the highest and lowest particle size and particle distribution index, respectively. The results showed that the nanoparticles obtained from the X-RD have crystal structure with the crystallinity of 48 %.

Conclusion: The current study showed that in preparation nanostructured lipid carrier, the more is the nuclear material and the less is the speed of adding aqueous phase containing the extract to the lipid phase, and also the more is the speed of probe homogenizer, the smaller will be the size of nanoparticles and the better will be the crystal structure.

Keywords: Encapsulation, Optimizing, Olive leaf extract, Nano-structured lipid carrier