

مدل سازی و بهینه سازی پارامترهای فرایندی در تهیه نانو کپسول از عصاره پلی فنلی حاصل از پسماند صنعتی سیب

شهره صفارزاده متین^{۱*}، مجید شهبازی^۲

۱ استادیار، صنایع شیمیایی آلی و دارویی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران

۲ دانشجوی کارشناسی ارشد نانو شیمی، پژوهشکده فناوری‌های شیمیایی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران

(تاریخ دریافت: ۹۵/۲/۱۳، تاریخ پذیرش: ۹۵/۳/۲۹)

چکیده

تحقیق حاضر در زمینه مدل سازی و بهینه سازی پارامترهای فرایندی با روش سطح پاسخ در نانو کپسوله کردن عصاره پلی فنلی حاصل از ضایعات صنعتی سیب با استفاده از مالتودکسترین است. از روش جایگزینی حلال برای نانو کپسول کردن استفاده شده است. متغیرهای مستقل نسبت هسته به پوسته، درصد وزنی سورفکتانت، زمان همگن سازی و متغیر وابسته (پاسخ) درصد مهار رادیکال‌های آزاد توسط پلی فنل باقی مانده، بیان شده بر حسب DPPH٪، هستند. نتایج تحلیل واریانس نشانگر تاثیرگذار بودن متغیرهای مستقل بر متغیر پاسخ در سطح اطمینان ۹۵٪، ($P < 0/05$) است. در بین متغیرهای تحت بررسی، نسبت هسته به پوسته و درصد وزنی سورفکتانت بیشترین تاثیر را در پاسخ داشته‌اند. ضریب همبستگی (۰/۹۲) و تطابق مناسب بین داده‌های تجربی با مقادیر پیش‌بینی شده توسط مدل نشانگر انتخاب مناسب متغیرهای مستقل و بازه‌های آن‌ها می‌باشد. شرایط بهینه عبارتند از: نسبت پوسته به هسته (۵/۵)، درصد سورفکتانت (۵ w/v٪)، و زمان همگن سازی (۲ min). در شرایط بهینه دامنه اندازه ذرات (اندازه‌گیری شده توسط DLS و SEM) در گستره ۵۰-۷۰ nm و میزان بارگیری پلی فنل‌ها حدود ۹۸٪ بود.

واژه‌های کلیدی: پرتو گاما، نانو کپسول کردن، بهینه سازی، عصاره پلی فنلی، ضایعات سیب، جایگزینی حلال، روش

سطح پاسخ.

* نویسنده مسئول: saffarzadeh@irost.ir

1- مقدمه

امروزه جداسازی و کاربرد ترکیبات طبیعی از جمله داروهای گیاهی برای درمان و پیشگیری بیماری‌های متداول زمینه ساز تحقیقات گسترده‌ای شده است. خصوصیات برجسته زیست‌فراهمی، زیست تجزیه پذیری، کاهش سمیت، سازگاری زیاد با محیط بدن موجودات زنده که در ترکیبات با منشأ گیاهی وجود دارند، نمونه‌هایی از دلایل بی‌شمار جهت‌گیری تحقیقات گسترده در این راستا می‌باشند. پلی‌فنل‌ها دسته‌ای از این ترکیبات طبیعی هستند که به وفور در میوه‌ها و ادویه‌جات موجود می‌باشند. به عنوان مثال ضایعات حاصل از فراوری سیب در صنایع آب‌میوه گیری، که به عنوان ماده اولیه در تحقیق حاضر مورد استفاده قرار گرفته است، غنی از پلی‌فنل‌ها که به‌صورت عمده عبارتند از اسیدهای فنلیک، فلاونوئیدها شامل فلاون‌ها، فلاوانون‌ها و فلاونول‌ها، انتوسیانین‌ها، تانن‌های غیرقابل هیدرولیز و ترکیبات استیلبنی، هستند [5-1].

پلی‌فنل‌ها دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بوده و علاوه بر این‌که ضد بیماری‌هایی مانند سرطان، آبله، دیابت، رماتیسم، بیماری‌های ویروسی، قلبی و ریوی هستند، باعث افزایش طول عمر و پایداری مواد غذایی و افزودنی‌ها و همچنین مواد آرایشی و بهداشتی می‌شوند [6-11]. از سوی دیگر پلی‌فنل‌ها طعم تلخی دارند و در مقابل عوامل محیطی مانند نور، رطوبت و اکسیژن به شدت حساس هستند. این ترکیبات علی‌رغم دارا بودن خصلت آبدوستی به‌دلیل حضور گروه‌های هیدروکسیل، حلالیت اندکی در حلال‌های قطبی از جمله آب به‌دلیل حضور گروه‌های آروماتیک و حلقه‌های گلیکوزیدی دارند. مجموعه این عوامل کاربرد این ترکیبات را در صنایع مختلف به عنوان پایدارکننده طبیعی و غیرسمی محدود می‌سازد. یکی از روش‌های غلبه بر این مشکلات، محافظت آن‌ها از طریق قرار دادن در یک پوشش پلیمری (کپسوله کردن) است. کپسوله کردن، پلی‌فنل‌ها را از تخریب، اثرات نامطلوب نور، رطوبت و اکسیژن از طریق کاهش واکنش با محیط خارج محافظت و در نتیجه به افزایش عمر مفید آن‌ها کمک می‌کند [12].

کپسوله کردن به کاهش بخار شدن هسته، رهايش کنترل شده هسته، رقيق کردن هسته (زمانی که فقط مقدار کمی پلی‌فنل با خاصیت آنتی‌اکسیدانی احتیاج داریم) و همچنین

افزایش نیمه عمر نیز منجر خواهد شد [13].

نانو کپسول کردن پلی‌فنل‌ها (به صورت کلی و یا در مقایسه با میکرو کپسول‌ها) به دلیل افزایش نسبت سطح به حجم و افزایش برهم‌کنش‌ها با محیط‌های زیستی در سطح مولکولی، دارای مزایای بیش‌تری از قبیل افزایش ماده موثر بارگیری شده، افزایش برهم‌کنش پوسته با محیط مورد استفاده (به عنوان مثال جهت دارورسانی هدفمند و کنترل شده) [14] و افزایش پایداری خواهند بود. از سوی دیگر بسته به نوع پوسته و یا لایه سورفکتانت احاطه‌کننده پوسته نهایی، به دلیل افزایش سطح به حجم و افزایش برهم‌کنش‌های بین مولکولی، حلالیت در محیط‌های مختلف (آب‌گریز و یا آب‌دوست) افزایش می‌یابد [15]. در منابع موجود، به صورت عمده اقدام به نانو کپسول کردن ترکیب پلی‌فنلی خالص شده است و دیواره‌های مورد استفاده اکثراً از نوع پلیمرهای سنتزی بوده‌اند. گزارشاتی در زمینه نانو کپسول کردن کورکومین [16-18]، کوئرستین [19-21]، پونی‌گالاچین [22]، الاجیک اسید [23] به تنهایی برای به‌کارگیری در کاربردهای خاص ارائه شده‌اند.

با توجه به مشخص شدن اثرات هم‌افزایی مجموعه ترکیبات پلی‌فنلی (با الهام و تقلید از طبیعت¹) [24] بر خواص آنتی‌اکسیدانی محصول نهایی، در مقاله حاضر اثرات عوامل موثر و برهم‌کنش‌های آن‌ها در نانو کپسول کردن مجموعه ترکیبات پلی‌فنلی استخراج شده از ضایعات صنعتی سیب مورد بررسی قرار گرفته‌اند. سیب یکی از محصولات باغی برجسته در دنیا با تولید حدود 68 میلیون تن است. میزان تولید سیب در ایران حدود سه میلیون تن [25] و مطابق آمار ارائه شده از سوی فائو ایران هفتمین تولیدکننده سیب در دنیا است [26]. براساس برآورد دفتر صنایع تبدیلی و تکمیلی کشاورزی وزارت جهاد کشاورزی، ضایعات سیب در مراحل مختلف تولید تا توزیع، 28 درصد است [27]. بخش قابل ملاحظه‌ای از ضایعات سیب مربوط به تفاله حاصل از فراوری سیب در کارخانجات آب‌میوه گیری است که به‌صورت عمده به عنوان خوراک دام مورد استفاده قرار می‌گیرد. استحصال و فراوری این ضایعات جهت تولید محصولات جدید با کاربردهای بالقوه در صنایع مختلف غذایی، بهداشتی و آرایشی، علاوه بر حفظ محیط زیست، دارای مزایای اقتصادی نیز خواهد بود.

1. biomimic

سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، اتانول صنعتی 96% از شرکت زکریای جهرم، فولین سیو کالتو (TPC) و گالیک اسید (GA) از شرکت مرک، 2 و 2 دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH)¹ از شرکت سیگما آلد ریچ، پلی وینیل الکل به عنوان سورفکتانت غیریونی Mw = 72000 با HLB=15-18 از شرکت مرک تهیه شدند. ضایعات صنعتی سیب (با 6٪ رطوبت کل) بلافاصله پس از عملیات آبگیری سیب توسط کارخانه سن ایچ، به محل آزمایشگاه منتقل شد، پس از اندازه گیری‌های مقدماتی در آون تحت خلاء (Precision Scientific Group, model: 3737) در دمای 40°C تا رسیدن به وزن ثابت خشک گردید.

2-1- روش اندازه گیری مقدار کل ترکیبات پلی فنل (TPC)²

برای اندازه گیری مقدار کل ترکیبات فنلی از واکنش گر فولین سیو کالتو (FC)³ استفاده شد. با استفاده از غلظت‌های مشخصی از گالیک اسید (GA) نمودار کالیبراسیون رسم گردید [29]. روش کار به این طریق است که 20 µl فولین سیو کالتو به 2 µl از نمونه استخراج شده که 1/58 ml آب مقطر به آن اضافه شده بود افزوده شد و بعد از 5 دقیقه 300 µl کربنات سدیم اشباع به مجموعه اضافه گردیده و خوب بهم زده شد، بعد از 2 ساعت جذب نمونه در طول موج 765 nm ثبت شد. از روی این جذب و با توجه به نمودار کالیبراسیون گالیک اسید مقدار کل ترکیبات فنلی موجود در نمونه محاسبه شد. TPC نمونه‌ها بر اساس mg GA/l بیان شده است. مقادیر گزارش شده نتیجه میانگین حداقل سه آزمون برای هر نمونه می‌باشد. برای اندازه گیری جذب از دستگاه اسپکتروفتومتری مرئی (MESU LAB UV/V model-3000) استفاده شد.

2-2- روش اندازه گیری درصد مهار رادیکال‌های آزاد

پلی فنل‌ها با استفاده از مهار رادیکال آزاد DPPH°

درصد مهار رادیکال‌های آزاد به عنوان معیاری از فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های استخراج شده با روش رادیکال آزاد DPPH° تعیین گردید. اساس این روش توانایی نمونه‌ها در کاهش رادیکال‌های آزاد می‌باشد [30]. رادیکال آلی

در این پژوهش از روش سطح پاسخ¹ با استفاده از نرم افزار Minitab 16 برای طراحی آزمایشات و مدل سازی استفاده شده است. این روش با کاهش تعداد آزمایشات، باعث تسهیل روند تحقیق، کاهش زمان و هزینه‌ها خواهد شد. نتایج حاصل از این روش علاوه بر معرفی بهترین مدل در فرایند تحت بررسی، بررسی تاثیرات متغیرهای مستقل بر متغیر پاسخ در گستره‌های انتخاب شده (به تنهایی و هم‌چنین برهم‌کنش‌های دوتایی آن‌ها) را به صورت پیوسته، امکان‌پذیر می‌سازد. در صورت معتبر بودن مدل با استفاده از نتایج آنالیز واریانس، بهینه‌سازی پارامترهای فرایندی نیز در این روش با دقت بسیار خوب قابل انجام خواهد بود [28].

در مقاله حاضر مالتودکسترتین (DE: 3-10) با خاصیت آب‌گریزی، به عنوان دیواره (پوسته) و پلی وینیل الکل به عنوان سورفکتانت غیریونی انتخاب شدند. برای تهیه نانو کپسول نیز از روش متداول جایگزینی حلال² استفاده شده است. متغیرهای مستقل انتخاب شده عبارتند از:

-نسبت پوسته به هسته

-درصد وزنی سورفکتانت مورد استفاده

-زمان همگن سازی با امواج اولتراسونیک

میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی محلول پس از جداسازی نانو کپسول‌ها (مقادیر کمتر مطلوب‌تر می‌باشند) نیز به عنوان پاسخ (متغیر وابسته) در نظر گرفته شده است. تاثیر متغیرهای مستقل و هم‌چنین برهم‌کنش‌های دوتایی آن‌ها بر متغیر وابسته مورد بررسی قرار گرفته‌اند. با توجه به انحلال مناسب مواد اولیه در حلال‌های انتخابی و جلوگیری از رشد زیاد و توده‌ای شدن نانو کپسول‌ها، فرایند تهیه نانو کپسول در بازه دمایی 25-40°C انجام شده است. شایان ذکر است که تاثیر پارامترهای مطرح شده در مقاله حاضر در فرایند تهیه نانو کپسول از پلی فنل‌های مخلوط سیب، بررسی برهم‌کنش‌های دوتایی و هم‌چنین بهینه‌سازی آن‌ها برای پاسخ ٪ DPPH برای اولین بار انجام شده است و قبلاً توسط گروه‌های تحقیقاتی دیگر گزارش نشده است.

2-مواد و روش‌ها

مالتودکسترتین (DE: 3-10) از گروه صنایع تبدیلی و غذایی

1. 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl

2. Total Phenolic Content

3. Folin-Ciocalteu

1. Response Surface Method (RSM)

2. Solvent displacement

(MISONIX, model: S-400,600W) و یا استفاده از حمام اولتراسونیک پیشنهاد می‌شود. برای تهیه فاز آبی، مقدار مشخصی پلی وینیل الکل، مطابق با $w/v\%$ مندرج در جدول (1)، را در 15 ml آب مقطر ریخته و در دمای 70°C به مدت 1 ساعت قرار داده تا کاملاً حل شد. فاز آلی با سرنگ به آرامی به فاز آبی) تحت هم خوردن سریع با همزن مغناطیسی (تزیق شد. در این مرحله کدورت نمونه‌ها مشاهده شد. سپس نمونه تحت پروب اولتراسونیک با توان 150 W در زمان مشخص، مطابق با جدول (1)، قرار گرفت. شکل (1) نمونه‌های کلوئیدی پایدار حاوی نانو کپسول تهیه شده در شرایط متفاوت را نشان می‌دهد.

پس از تهیه نانوکپسول عملیات رسوب دادن توسط دستگاه سانتریفوژ (Sigma, Laborzentrifugen GmbH, Model: 29318) با سرعت 13500 rpm برای مدت 45 min انجام شد. مقادیر DPPH، TPC برای محلول حاصل از سانتریفوژ (پس از جداسازی نانو ذرات) و در نهایت میزان کارایی نانو کپسول شدن¹ و بارگیری پلی‌فنل² به ترتیب طبق معادلات (2) و (3) اندازه‌گیری شد. رسوب نانوکپسول پس از جداسازی و دو بار شستشو با 5 ml مخلوط آب و اتانول (50٪) در آون دمای 40°C خشک و سپس وزن شد. محلول‌های شستشو برای آنالیز پلی‌فنل‌های باقی‌مانده بر سطح، تحت آنالیز TPC و DPPH قرار گرفتند که جواب در تمامی موارد منفی بود.

(2) = کارایی نانو کپسول شدن
 $100 \times (\text{غلظت اولیه هسته} / \text{غلظت هسته در نانو کپسول})$

(3) = درصد بارگیری هسته
 $100 \times (\text{مجموع وزن پوسته و هسته اولیه} / \text{وزن هسته در نانو کپسول})$

3- نتایج و بحث

به‌منظور ارزیابی تاثیر پارامترهای عملیاتی و مدل‌سازی فرایند، طراحی آزمایشات برای سه متغیر مستقل شامل نسبت پوسته به هسته، مقدار سورفکتانت (پلی وینیل الکل) و زمان اولتراسونیک با استفاده از طرح مرکب مرکزی³ در نرم افزار

DPPH[°]، که خیلی پایدار می‌باشد، رنگ بنفش تندی دارد که در اثر کاهیده شدن رنگ آن کاسته می‌شود.

برای به‌دست آوردن درصد مهار رادیکال‌های آزاد یک محلول DPPH[°] 0/039 mg/ml تهیه شد که در 517 nm جذب 1/000 نشان می‌داد. 1950 μl از محلول DPPH[°] و 50 μl از نمونه استخراج شده در ظرف نمونه مخلوط شدند. برای تهیه محلول کنترل به جای نمونه، حلال استخراج (اتانول) اضافه گردید. بعد از 80 دقیقه از گذشت زمان واکنش جذب نمونه و DPPH[°] در دمای اتاق و دور از نور ثبت شد و با استفاده از معادله (1) درصد مهار DPPH[°] توسط نمونه‌ها محاسبه گردید. مقادیر گزارش شده نتیجه میانگین حداقل سه آزمون برای هر نمونه می‌باشد.

$$\text{DPPH Scavenging } (\%) = \frac{(C - S) \times 100}{C} \quad (1)$$

C: کاهش در جذب محلول کنترل

S: کاهش در جذب نمونه

3-2- آنالیز نمونه پلی‌فنلی از ضایعات صنعتی سیب جهت نانو کپسول کردن

در این تحقیق از نمونه پلی‌فنلی (خالص سازی و خشک شده) حاصل از استخراج چند مرحله‌ای با جریان متقابل تولید شده از ضایعات صنعتی سیب استفاده شد [31]. جهت آنالیز نمونه، 10 mg از عصاره خشک پلی‌فنل سیب را در 25 میلی‌لیتر آب مقطر و الکل (با نسبت 1 به 1) حل کرده و مقادیر TPC و DPPH % اندازه‌گیری شد. مقدار پلی‌فنل کل 288 mg/l GA و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آن 98٪ بود.

4-2- روش تهیه نانو کپسول

در این روش برای تشکیل نانو کپسول، دو فاز آلی و آبی تهیه می‌شوند. برای تهیه فاز آلی، ابتدا مقدار مشخصی از مالتودکسترین (مطابق با نسبت مندرج در جدول (1) براساس روش RSM) در داخل 8 ml اتانول 85٪ ریخته شد و پس از 10 min هم خوردن توسط همزن مغناطیسی، 10 mg نمونه پلی‌فنل اضافه شد. در صورت مشاهده ذرات نامحلول، در این مرحله همگن‌سازی به مدت کوتاه توسط پروب اولتراسونیک

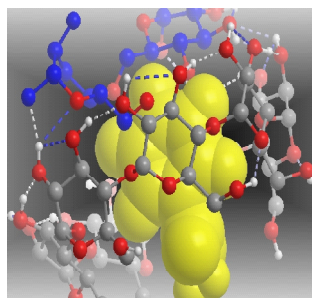
1. Nanoencapsulation Efficiency %

2. Polyphenol Loading content %

3. Central Composite Design (CCD)

جدول (1) محدوده پارامترها و سطوح مورد استفاده متغیرهای آزمایش

متغیر	محدوده ها و سطوح		
	-1	0	+1
نسبت پوسته به هسته X1	5	7/5	10
مقدار سورفکتانت X2 (w/v %)	2	3/5	5
زمان اولتراسونیک X3 (min)	2	4	6



شکل (1) سمت چپ شمایی از نانو کپسول با پوسته مالتودکسترین و سمت راست نمونه هایی از محلول های کلئیدی حاوی نانو کپسول

16 Minitab انجام شد. DPPH/ محلول (پس از جداسازی نانو کپسول ها) به عنوان پاسخ (متغیر وابسته) در نظر گرفته شد. 20 آزمایش توسط نرم افزار پیشنهاد شد. محدوده پارامترها و سطوح مورد استفاده در جدول (1) آورده شده است.

لیست آزمایشات طراحی شده، به همراه پاسخ های گرفته شده از آزمایشات را نشان می دهد که در آن میزان تاثیر متغیرهای مستقل به تنهایی و همچنین برهم کنش های آنها دو به دو بر پاسخ نهایی به صورت رابطه ای بیان شده است. بر اساس نتایج حاصل، رابطه درجه دوم زیر بین متغیر پاسخ و متغیرهای مستقل حاصل گردید Y متغیر پاسخ (DPPH/ و Xi ها سطوح آزمایشی متغیرها به شکل کد هستند. میزان تاثیر هر متغیر با قدر مطلق ضریب آن بدون توجه به علامت در این رابطه مشخص می شود. به عنوان مثال سهم متغیرهای نسبت هسته به پوسته و درصد وزنی سورفکتانت (به ترتیب با ضرایب 22/513 و 23/829 بیشترین تاثیر را در پاسخ داشته اند. جدول (2) نتایج تجربی و نتایج حاصل بر اساس معادله (4) را نشان می دهد.

(4)

$$Y = 123.570 - 22.513 X_1 - 23.829 X_2 + 1.763 X_3 + 1.014 X_1 X_1 + 1.424 X_2 X_2 - 0.688 X_3 X_3 + 1.757 X_1 X_2 + 0.534 X_1 X_3$$

از طرفی مقدار F به دست آمده از این روش یعنی نسبت میانگین مربع های مربوط به رگرسیون مدل و خطاها، برابر با 15/30 می باشد، بیانگر این مطلب است که فاکتورها به مقدار کافی تغییرات داده ها را از مقدار میانگین آنها نشان می دهند و تاثیرات فاکتورها که در مدل تخمین زده شده، صحیح و واقعی می باشند. به عبارت دیگر اختلاف در آزمایش ها به حد کافی بالا بوده و تاثیر خطاها خیلی پایین تر می باشد. در نتیجه بازه های انتخاب شده بسیار مناسب هستند. مقادیر P¹ برای مدل، تغییرات خطی، مربعات و هم چنین بر هم کنش های

1. P-Value

جدول (2) نتایج تجربی و نتایج مدل DPPH

ردیف	متغیرهای ورودی				%DPPH
	زمان اولتراسونیک (min)	سورفکتانت (w/v %)	نسبت پوسته به هسته	تجربی	مدل
1	4	3/5	7/5	1/21	6/47
2	6	3/5	7/5	1/15	1/15
3	4	3/5	10	12/45	15/84
4	6	2	5	12/02	14/74
5	4	3/5	7/5	4/40	6/47
6	2	3/5	7/5	2/94	0/04
7	6	5	10	20/18	13/02
8	6	2	10	13/58	12/29
9	2	2	10	1/05	4/57
10	4	3/5	7/5	3/18	6/67
11	4	3/5	7/5	4/52	6/47
12	4	2	7/5	10/85	9/94
13	4	3/5	5	9/82	10/45
14	2	5	10	18/50	16/01
15	4	3/5	7/5	3/52	6/67
16	2	2	5	17/97	9/37
17	6	5	5	0/73	2/55
18	2	5	5	1/25	2/78
19	4	5	7/5	5/18	6/56
20	4	3/5	7/5	4/05	6/47

آن‌ها، در گستره‌های انتخابی در حد اطمینان 95٪ می‌باشد. آزاد باقی مانده بر حسب نسبت پوسته به هسته و سورفکتانت

را در زمان اولتراسونیک 4 دقیقه نشان می‌دهد. همان‌طور که از شکل مشخص است کم‌ترین درصد مهار رادیکال‌های آزاد (شرایط مطلوب) مربوط به حالتی است که نسبت پوسته به هسته 5-8 و درصد وزنی سورفکتانت 3-5 می‌باشد. با توجه به مکانسیم واکنش زمانی که فاز آلی را قطره قطره به فاز آبی اضافه می‌کنیم به دلیل اختلاف در کشش سطحی دو سیستم حلال و هم‌چنین امتزاج پذیری آن‌ها با یکدیگر، حلال با کشش سطحی کمتر (تانول) توسط حلال با کشش سطحی بیش‌تر به خارج رانده شده و پلیمر تمایل به تجمع اطراف ماده موثره را یافته و هسته‌های اولیه برای تشکیل نانوکپسول ایجاد خواهند شد.

3-1- بررسی اثرات متقابل پارامترهای فرایندی بر متغیر

پاسخ و بهینه‌سازی فرایند

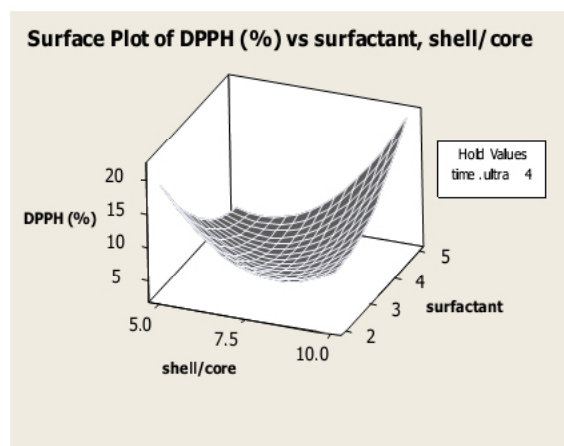
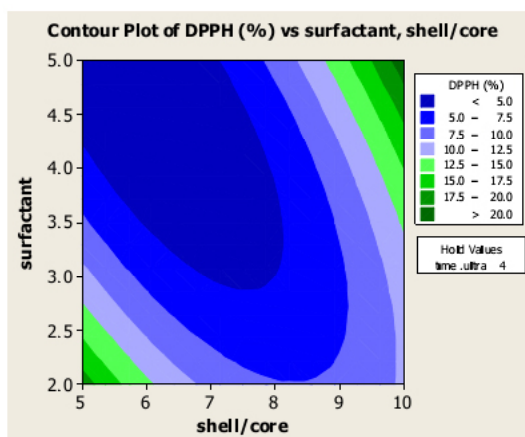
تأثیر متقابل پارامترهای فرایندی به صورت دو به دو بر مقدار متغیر وابسته DPPH٪ در شکل‌های (2) تا (4) نشان داده شده‌اند. روش کار به این صورت است که مقدار یکی از متغیرها در نقطه صفر ثابت در نظر گرفته می‌شود و تغییرات پیوسته متغیر پاسخ با تغییرات پیوسته متغیرهای مستقل به صورت نمودارهای دو و سه بعدی با در نظر گرفتن مدل پیشنهادی توسط نرم افزار رسم می‌گردند.

شکل (2) نمودار دو بعدی و سه بعدی درصد مهار رادیکال‌های

جدول (3) تحلیل واریانس پاسخ %DPPH

منبع	درجه آزادی	مجموع مربعات دنباله ای	میانگین مربعات	F	P	ضرایب
رگرسیون	8	732/48	91/56	15/30	0/000	
خطی	3	73/92	193/56	32/35	0/000	
X1	1	60/52	220/43	36/84	0/000	-22/51
X2	1	10/59	139/71	23/35	0/001	-23/83
X3	1	2/81	1/77	0/30	0/598	1/76
مربعات	3	254/31	84/77	14/17	0/000	
X12	1	218/38	110/48	18/46	0/001	1/01
X22	1	15/09	28/23	4/72	0/053	1/42
X32	1	20/85	20/85	3/48	0/089	-0/69
برهمکنش ها	2	404/25	202/13	33/78	0/000	
X1*X2	1	347/12	347/12	58/01	0/000	1/76
X1*X3	1	57/13	57/13	9/55	0/010	0/53
خطای باقی مانده	11	65/83	65/83			
عدم برازش	6	57/45	9/58	5/72	0/038	
خطای محض	5	8/37	1/68			
جمع	19	798/31				

R-Sq = 91.75% , R-Sq(adj) = 85.76%



شکل (2) نمودار دو بعدی و سه بعدی درصد DPPH بر حسب نسبت پوسته به هسته و درصد سورفکتانت

می‌دهد. در شرایطی که مقادیر بهینه (بهترین شرایط) در دو انتهای منحنی رویت می‌شوند برآورد دقیق و درستی از روند تغییرات متغیر پاسخ با متغیرهای مستقل وجود ندارند، در این شرایط بهترین منطقه که برآورد دقیقی از روند تغییرات متغیر وابسته با متغیرهای مستقل را فراهم می‌کند منطقه زین اسب^۱ است. با توجه به شکل بهترین شرایط در نسبت پوسته به هسته 6/5-7/5 و در زمان اولتراسونیک 4-2 دقیقه می‌باشد. با توجه به این که افزایش زمان اولتراسونیک موجب چسبیدن مجدد نانو کپسول‌ها و در نتیجه افزایش اندازه ذرات و گسترده شدن دامنه آن‌ها می‌شود و از طرفی امکان آسیب به نانو کپسول‌ها و رهایش پلی‌فنل‌ها نیز در زمان‌های طولانی‌تر موجود می‌باشد، همگن سازی با استفاده از امواج اولتراسونیک در زمان‌های کوتاه‌تر در صورت یکسان بودن نتایج ترجیح داده می‌شود.

شکل (4) نمودار دو بعدی و سه بعدی درصد مهار رادیکال‌های آزاد باقی مانده بر حسب درصد وزنی سورفکتانت و زمان اولتراسونیک در نسبت پوسته به هسته 7/5 را نشان می‌دهد. منحنی به صورت مشخص به صورت زین اسبی است. با توجه به شکل بهترین شرایط قابل استناد در درصد وزنی سورفکتانت 4-3/5 و زمان اولتراسونیک 4-2 دقیقه می‌باشد. دوباره به دلایلی که ذکر شد انجام عملیات در زمان‌های کوتاه‌تر در صورت یکسان بودن نتایج ترجیح داده می‌شود.

نتایج حاصل از تمامی نمودارها در زمینه محدوده بهینه غلظت سورفکتانت و نسبت پوسته به هسته و زمان اولتراسونیک بهینه با یکدیگر تطابق کامل دارند.

با توجه به معتبر بودن مدل پیشنهادی توسط نرم افزار در سطح اطمینان 95٪، بهینه‌سازی پاسخ با استفاده از نرم افزار به روش سطح پاسخ امکان پذیر می‌باشد. نمونه نانو کپسول در شرایط بهینه (کم‌ترین میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی) پیش بینی شده توسط مدل تهیه گردید، نتیجه آزمایشات (جدول 4) نشان داد که مطابقت خوبی بین مقدار تجربی و مقدار پیش بینی شده توسط مدل وجود دارد.

میزان کارایی نانو کپسول شدن و بارگیری پلی‌فنل نمونه نهایی (مطابق با شرایط بهینه) به ترتیب طبق معادلات 3-2 و 3-3 با استفاده از روش اندازه‌گیری TPC که در بخش‌های

1. Saddle polint

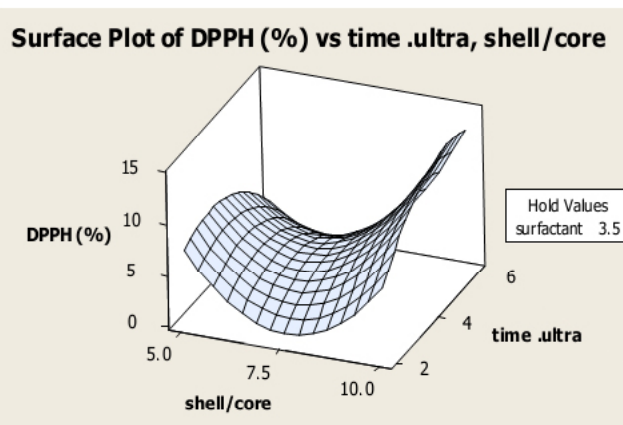
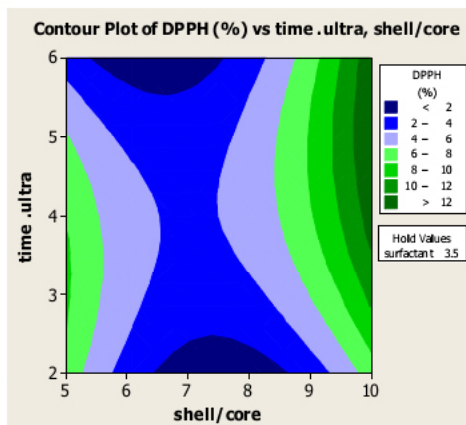
سورفکتانت که در فاز آبی حل شده علاوه بر کاهش کشش سطحی، سطح هر کره را پوشش می‌دهد و از تراکم و تجمع^۱ آن‌ها جلوگیری می‌کند. غلظت سورفکتانت به میزان پلیمر بستگی دارد در صورت ثابت بودن مقادیر فازهای آلی و آبی در مجموعه امولسیون تشکیل شده، افزایش مقدار سورفکتانت، افزایش در تعداد قطرات (میسرها) را به دنبال خواهد داشت این بدان معنی است که تعداد ذرات (نانو کپسول‌ها) در هر قطره کاهش یافته و به دنبال آن اندازه آن‌ها نیز کاهش و میزان بارگیری افزایش می‌یابد. با افزایش میزان بارگیری درصد مهار رادیکال‌های آزاد (DPPH٪) در محلول به دلیل خروج پلی‌فنل‌ها کاهش می‌یابد. در محدوده‌های بالاتر و پایین‌تر از منطقه بهینه پاسخ، میزان بارگیری پلی‌فنل‌ها کاهش می‌یابد که با افزایش در مقدار DPPH٪ مشخص شده است. در واقع با افزایش مقدار پلیمر غلظت فاز آلی افزایش یافته و در نتیجه در فرایند نفوذ فاز آلی به فاز آبی و رسوب همزمان پلیمر/پلی‌فنل (به صورت کپسول) اختلال ایجاد شده و نشسته به درون فاز آبی افزایش می‌یابد که منجر به کاهش میزان بارگیری خواهد شد. در این صورت حتی حضور سورفکتانت به عنوان عامل کاهش کشش سطحی بین دو فاز و تسهیل در فرایند نفوذ نیز تاثیری در افزایش میزان بارگیری نخواهد داشت. این پدیده در نتایج گزارش شده توسط سایر محققان نیز مشاهده شده است [32، 33]. در تهیه نانو کپسول از ترکیبات آب‌دوست (به عنوان هسته) به روش جایگزینی حلال، حضور سورفکتانت الزامی می‌باشد. سورفکتانت به دلیل افزایش غلظت فاز آبی و همچنین کاهش کشش سطحی در منطقه بین دو فاز آلی و آبی، رهایش هسته آب‌دوست به درون فاز آبی را کاهش داده و میزان بارگیری پلی‌فنل درون هسته آب‌گریز افزایش خواهد یافت. در نسبت‌های دیواره به هسته کم‌تر از مقدار بهینه نیز به دلیل کاهش مقدار پوسته، در جریان هم‌رسوبی دیواره/هسته، احاطه کامل هسته توسط پوسته به صورت کامل انجام نگرفته است و امکان نشسته به فاز آبی و کاهش میزان بارگیری وجود دارد [34، 35].

شکل (3) نمودار دو بعدی و سه بعدی درصد مهار رادیکال‌های آزاد باقی مانده بر حسب نسبت پوسته به هسته و زمان اولتراسونیک را در درصد وزنی سورفکتانت 3/5 نشان

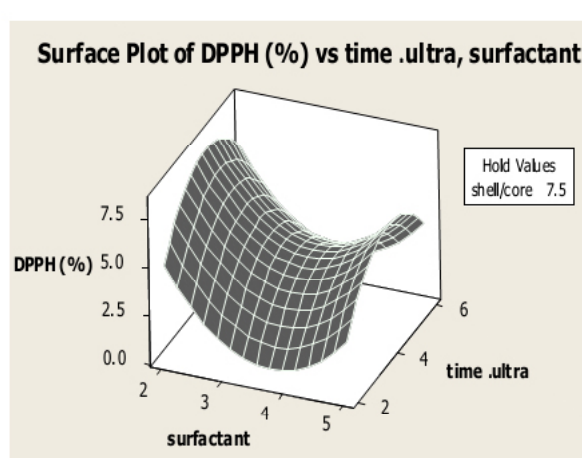
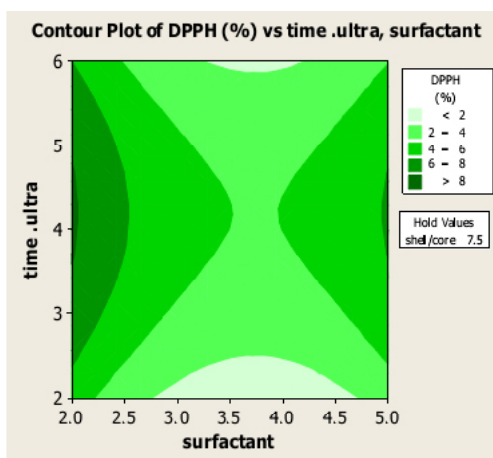
1. Agglomeration

جدول (4) شرایط بهینه پارامترهای عملیاتی برای %DPPH

نسبت پوسته به هسته	سورفکتانت (w/v %)	زمان اولتراسونیک (min)	DPPH مدل (%)	DPPH تجربی (%)
5/5	5	2	0	2



شکل (3) نمودار دو بعدی و سه بعدی %DPPH بر حسب نسبت پوسته به هسته و زمان اولتراسونیک



شکل (4) نمودار دو بعدی و سه بعدی %DPPH بر حسب درصد وزنی سورفکتانت و زمان اولتراسونیک

قبلی توضیح داده شد، محاسبه شد که به ترتیب عبارتند از 97/91٪ و 46/2 mg/g. با توجه به نتایج حاصل تقریباً 98٪ 100 نانومتر) نشان می‌دهند. مناسبی را در محدوده نانومتری با مورفولوژی کروی (کمتر از

پلی فنل‌های اولیه نانو کپسوله شده‌اند. شکل (6) در سمت راست نمودار شدت بر حسب سایز ذرات

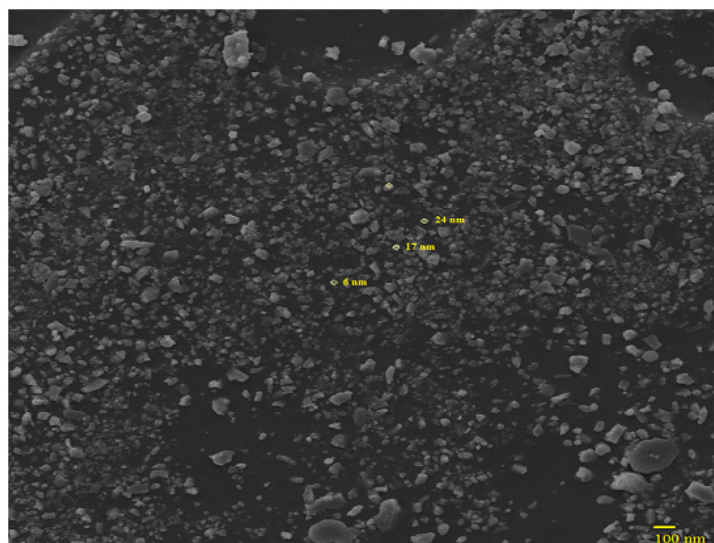
مورفولوژی نمونه تهیه شده و همچنین اندازه ذرات در شرایط بهینه توسط دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی

(TESCAN model WEGA-II) با عمل در ولتاژ 15 kV و همچنین با دستگاه اندازه‌گیری و پراکندگی دینامیکی نور¹ (Malvern, Dynamic light scattering & zetasizer Model : ZEN3b) (شکل 5) تعیین گردید.

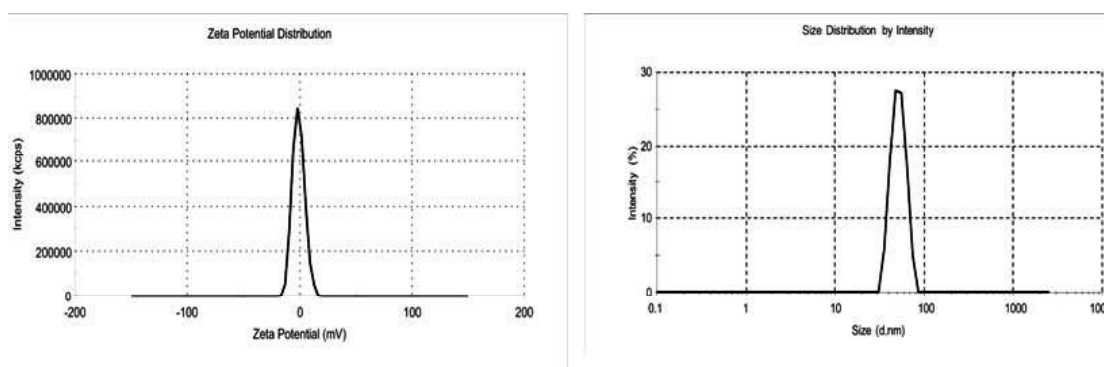
این نمودار بیان می‌کند تقریباً تمامی ذرات در حجم انتخابی، دارای اندازه میانگین حدود 68 نانومتر با پهنای پیک حدود 38 نانومتر می‌باشند.

شکل (6) در سمت چپ نمودار شدت بر حسب بار ذرات را

1. Dynamic light scattering (DLS)



شکل (۵) تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی از نانو کپسول‌های تهیه شده از پلی فنل‌های سیب



شکل (۶) DLS شدت بر حسب سایز ذرات (نمودار سمت راست) و منحنی پتانسیل زتای نانو کپسول (نمودار سمت چپ)

با هر یک از متغیرهای مستقل در این گستره با دقت بسیار خوب امکان پذیر گردید. نتایج آنالیز واریانس نشانگر تاثیر گذار بودن ($P < 0/05$) متغیرهای مستقل بر متغیر پاسخ در سطح اطمینان ۹۵٪، است. به علاوه ضریب همبستگی ($0/92$) و تطابق مناسب بین داده‌های تجربی با مقادیر پیش بینی شده توسط مدل نشانگر انتخاب مناسب متغیرهای مستقل و بازه‌های آن‌ها می‌باشد. با توجه به این که در بین متغیرهای تحت بررسی، نسبت هسته به پوسته و درصد وزنی سورفکتانت بیشترین تاثیر را در پاسخ داشته‌اند، امکان حذف مرحله همگن سازی اولتراسونیک و جایگزینی احتمالی با همزن‌های معمولی و تاثیر نهایی بر میزان بارگیری و اندازه ذرات، قابل بررسی در تحقیقات آینده در این زمینه می‌باشد. به دنبال نتایج رضایت بخش حاصل از مدل سازی و بهینه سازی پارامترهای فرایندی

نشان می‌دهد. زتا پتانسیل حد وسط این ذرات $1/37$ میلی‌ولت است. این مقدار نشانگر وجود بار منفی در سطح نانو ذرات و در نتیجه پایداری در اثر دافعه بین ذرات برادر می‌باشد.

۴- نتیجه گیری

در تحقیق حاضر پارامترهای فرایندی نانو کپسول کردن پلی‌فنل‌های استخراج شده از ضایعات صنعتی سیب (نسبت هسته به پوسته، درصد وزنی سورفکتانت و زمان همگن سازی) برای دست یابی به بالاترین مقدار بارگذاری (حداقل DPPH٪ در محلول باقی مانده) توسط RSM مدل سازی و بهینه سازی شده‌اند. تاثیر هر یک از عوامل، مربعات و هم‌چنین بر هم‌کنش‌های دو تایی آن‌ها در گستره انتخاب شده بر متغیر وابسته به خوبی مشخص گردید و در نتیجه پیش‌بینی تغییرات متغیر وابسته

در این تحقیق، تحقیقات تکمیلی زیر در این زمینه پیشنهاد می‌شوند:

- 1- پایدارسازی نانو کپسول تهیه شده با روش‌های شناخته شده و بررسی رهایش در شرایط متفاوت دمایی و pH،
- 2- به کارگیری روش‌های دیگر نانو کپسول کردن مناسب برای
- 3- بهینه سازی پارامترهای فرایندی در نانو کپسول کردن پلی فنل‌های حاصل از سایر منابع طبیعی.

منابع

- eration of H₂O₂ during interaction of phenolic compounds with cell culture media. *J. Agric. Food Chem.*, 50, 3156–3160.
- [9] Pearson, D., Tan, C., German, B., Davis, P., Gershwin, M. (1999). Apple juice inhibits human low density lipoprotein oxidation. *Life Sci.*, 64, 1913–1920.
- [10] Saito, T., Miyake, M., Toba, M., Okamatsu, H., Shimizu, S., Noda, M. (2002). Inhibition by apple polyphenols of ADP-ribotransferase activity of cholera toxin and toxin-induced fluid accumulation in mice. *Microbiol. Immunol.*, 46, 249–255.
- [11] Wolfe, K., Liu, R.H. (2003). Apple peels as a value-added food ingredient. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 1676–1683.
- [12] Mora-huertas, C.E., Fessi, H., Elaissari, A. (2010). Polymer-based nanocapsules for drug delivery. *Int. J. Pharm.*, 385, 113–142.
- [13] Fang, Z., Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols - A review. *Trends Food Sci. Technol.*, 21, 510–523.
- [14] Laroui, H., Wilson, D.S., Dalmasso, G., Salaita, K., Murthy, N., Sitaraman, S.V., Merlin, D. (2011). Nanomedicine in GI. *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.*, 300, G371–G383.
- [15] Fathi, M., Mozafari, M., Mohebbi, M. (2012). Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends Food Sci. Technol.*, 23(1), 13–27.
- [1] Boyer, J., Liu, R.H. (2004). Apple phytochemicals and their health benefits. *Nutr. J.*, 3(1), 1–15.
- [2] Dabrosca, B., Pacifico, S., Cefarelli, G., Mastellone, C., Fiorentino, A. (2007). “Limoncella” apple, an Italian apple cultivar: Phenolic and flavonoid contents and antioxidant activity. *Food Chem.*, 104(4), 1333–1337.
- [3] Diñeiro García, Y., Valles, B.S., Picinelli Lobo, A. (2009). Phenolic and antioxidant composition of by-products from the cider industry: Apple pomace. *Food Chem.*, 117(4), 731–738.
- [4] Drogoudi, P.D., Michailidis, Z., Pantelidis, G. (2008). Peel and flesh antioxidant content and harvest quality characteristics of seven apple cultivars. *Sci. Hort.*, 115(2), 149–153.
- [5] Eberhardt, M., Lee, C., Liu, R.H. (2000). Antioxidant activity of fresh apples. *Nature*, 405, 903–904.
- [6] Aprikian, O., Levrat-Verny, M., Besson, C., Busserolles, J., Remesy, C., Demigne, C. (2001). Apple favourably affects parameters of cholesterol metabolism and of anti-oxidative protection in cholesterol fed rats. *Food Chem.*, 75, 445–452.
- [7] O Aprikian, O., Busserolles, J., Manach, C., Mazur, A., Morand, C., Davicco, M., Demigne, C. (2002). Lyophilized apple counteracts the development of hypercholesterolemia, oxidative stress, and renal dysfunction in obese Zucker rats. *J. Nutr.*, 132, 1969–1976.
- [8] Lapidot, T., Walker, M., Kanner, J. (2002). Can apple antioxidants inhibit tumor cell proliferation? gen-

- nanoparticulate formulation containing antioxidant-ellagic acid as potential prophylaxis system for oral administration. *J. Drug Target.*, 14, 27–34.
- [24] Palafox-Carlos, H., Gil-Chávez, J., Sotelo-Mundo, R. (2012). Antioxidant interactions between major phenolic compounds found in 'Ataulfo' mango pulp: chlorogenic, gallic, protocatechuic and vanillic acids. *Molecules*, 17(11), 4, 12657–12666.
- [25] آمار محصولات باغی سال ۹۲. پورتال وزارت جهاد کشاورزی (معاونت برنامه ریزی و اقتصادی، مرکز فناوری اطلاعات و ارتباطات).
- URL <http://www.maj.ir/portal/Home/Default.aspx?CategoryID=20ad5e49-c727-4bc9-9254-de648a5f4d52>, Accessed, 6/9/2016
- [26] URL <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>, Accessed 6/9/2016
- [27] موسسه برنامه ریزی و اقتصاد کشاورزی، تولید 4/3 درصد سیب درختی جهان در ایران، 1394
- URL <http://www.farsnews.com/newstext.php?nn=13940409000303>, Accessed 6/9/2016
- [28] Leardi, R., (2009). Experimental design in chemistry: A tutorial. *Anal. Chim. Acta*, 652(1), 161–172.
- [29] Pinelo, M., Rubilar, M., Jerez, M., Sineiro, J., Núñez, M.J. (2005). Effect of Solvent, Temperature, and Solvent-to-Solid Ratio on the Total Phenolic Content and Antiradical Activity of Extracts from Different Components of Grape Pomace. *J. Agric. Food Chem.*, 53(6), 2111–2117.
- [30] Morelli, L.L.L., Prado, M.A. (2012). Extraction optimization for antioxidant phenolic compounds in red grape jam using ultrasound with a response surface methodology." *Ultrason. Sonochem.*, 19(6), 1144–1149.
- [31] ولی پور، م. (1395) استخراج تک مرحله ای و چند مرحله ای با جریان متقابل ترکیبات پلی فنلی از ضایعات صنعتی سیب و بهینه سازی فرایندها، پایان نامه کارشناسی
- [16] Altunbas, A., Lee, S.J., Rajasekaran, S.A., Schneider, J.P., Pochan, D.J. (2011). Encapsulation of curcumin in self-assembling peptide hydrogels as injectable drug delivery vehicles. *Biomaterials*, 32(25), 5906–5914.
- [17] Souguir, H., Salaün, F., Douillet, P., Vroman, I., Chatterjee, S. (2013). Nanoencapsulation of curcumin in polyurethane and polyurea shells by an emulsion diffusion method. *Chem. Eng. J.*, 221, 133–145.
- [18] Anand, P., Nair, H.B., Sung, B., Kunnumakara, A.B., Yadav, V.R., Tekmal, R.R., Aggarwal, B.B. (2010). Design of curcumin-loaded PLGA nanoparticles formulation with enhanced cellular uptake, and increased bioactivity in vitro and superior bioavailability in vivo. *Biochem. Pharmacol.*, 79(3), 330–338.
- [19] Pandey, S.K., Patel, D.K., Thakur, R., Mishra, D.P., Maiti, P., Halder, C. (2015). Anti-cancer evaluation of quercetin embedded PLA nanoparticles synthesized by emulsified nanoprecipitation. *Int. J. Biol. Macromolec.*, 75, 521–529.
- [20] Wu, T., Yen, F., Lin, L., Tsai, T., Lin, C., Cham, T. (2008). Preparation, physicochemical characterization, and antioxidant effects of quercetin nanoparticles. *Int. J. Pharm.*, 346, 160–168.
- [21] Barras, A., Mezzetti, A., Richard, A., Lazzaroni, S., Roux, S., Melnyk, P., Monfiliotte-Dupont, N. (2009). Formulation and characterization of polyphenol-loaded lipid nanocapsules. *Int. J. Biol. Macromolec.*, 379(2), 270–277.
- [22] Shirode, A.B., Bharali, D.J., Nallanthighal, S., Coon, J.K., Mousa, S.A., Reliene, R. (2015). Nanoencapsulation of pomegranate bioactive compounds for breast cancer chemoprevention. *Int. J. Nanomedicine*, 10, 475–484.
- [23] Bala, I., Bhardwaj, V., Hariharan, S., Kharade, S.V., Roy, N., Ravi Kumar, M.N.V. (2006). Sustained release

ارشد شیمی آلی، سازمان پژوهش های علمی و صنعتی ایران، پژوهشکده فناوری های شیمیایی.

[32] Poletto, F.S., Jäger, E., Cruz, L., Pohlmann, A.R., Guterres, S.S. (2008). The effect of polymeric wall on the permeability of drug-loaded nanocapsules. *Mater. Sci. Eng. C*, 28(4), 472–478.

[33] Mora-Huertas, C.E., Fessi, H., Elaissari, A. (2011) Influence of process and formulation parameters on the formation of submicron particles by solvent displacement and emulsification–diffusion methods: Critical comparison. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 163(2), 90–122.

[34] Miladi, K., Sfar, S., Fessi, H., Elaissari, A. (2015). Encapsulation of alendronate sodium by nanoprecipitation and double emulsion: From preparation to in vitro studies.” *Ind. Crops Prod.*, 72, 24–33.

[35] Bilat, U., Allémann, E., Doelker, E., (2005). Development of a nanoprecipitation method intended for the entrapment of hydrophilic drugs into nanoparticles. *Eur. J. Pharm. Sci.*, 24(1), 67–75.