Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 3:49 +0430 on Friday March 23rd 2018

Arak Medical University Journal (AMUJ)
2015; 18(98): 33-48

*Original Article*

# Production and Study of Antioxidant and Antibacterial Activities of Gelatin Nano-Capsules Containing Ferula assa-foetida Essential Oil

Somayeh Jahani[1], Masoud Salehi[1], Amin Shakiba[2*], Aliasghar Moradipur[3], Foruzan Foruzandeh[1]

1- Tropical and Infectious Diseases Research Center, Zahedan University of Medical Sciences, Zahedan, Iran.
2- Institute of Biotechnology, University of Shiraz, Shiraz, Iran.
3- University of Sistan va Baluchestan, Iran.

Received: 27 Jan 2015, Accepted: 15 Apr 2015

**Abstract**

***Background:*** Ferula assa-foetida is one of the common medicines that was used as antiseptic with a view to traditional uses, it can be used as a safe and effective drug to treat diseases particularly resistant bacterial infections. This study aims to product gelatin nano- capsules containing Ferula assa-foetida essential oil and investigate their antioxidant and antibacterial activities.

***Materials and Methods:*** This experimental study was performed on gelatin nano-capsules containing Ferula assa-foetida essential oil (FAO) (2, 4, 6 and 8% w/w), glycerol (25% w/w) as plasticizer and glutaraldehyde as cross-linker. The morphology, antioxidant and antibacterial activities and operation of the nano-capsules were assessed according to American Standards by Scanning Electron Microscopy, ABTS, and microbiological tests.

***Results:*** Gelatin nano-capsules exhibited low antioxidant and antibacterial activities while gelatin nano-capsules incorporated with FAO exhibited excellent antioxidant and antibacterial. The highest rates of these effects were seen merged with 8% of FAO.

***Conclusion:*** Gelatin nano-capsules merged with FAO have excellent physical form, as well as they are an appropriate antioxidant and antibacterial that have been considered to produce antoxidant and antibacterial drugs.

***Keywords:*** Antibacterial, Antioxidant, Electron microscopy, *Ferula assa-foetida*, Gelatin, Nano-capsules

*Corresponding Author:
Address: Institute of Biotechnology, University of Shiraz, Shiraz, Iran.
Email: amin_shakiba01@yahoo.com

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 3:49 +0430 on Friday March 23rd 2018

مقاله پژوهشی

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی اراک

سال ۱۸، شماره ۵ (شماره پیاپی ۹۸)، مرداد ۱۳۹۴، ۴۸-۳۳

# تولید و بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد باکتریایی نانوکپسول‌های ژلاتینی حاوی عصاره روغنی آنغوزه

**سمیه جهانی[۱]، مسعود صالحی[۲]، امین شکیبا[۳*] علی اصغر مرادی پور[۴]، فروزان فروزنده[۵]**

۱-کارشناسی ارشد میکروبیولوژی،مرکز تحقیقات بیماری های عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران.

۲- استادیار بیماری های عفونی و گرمسیری، مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران.

۳- کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی، پژوهشکده بیوتکنولوژی، دانشگاه شیراز، شیراز، ایران.

۴- کارشناسی ارشدنانوفیزیک، دانشگاه سیستان و بلوچستان، ایران.

۵- کارشناسی ارشد فیزیولوژی جانوری، مرکز تحقیقات بیماریهای عفونی و گرمسیری، دانشگاه علوم پزشکی زاهدان، زاهدان، ایران.

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۱/۷ تاریخ پذیرش: ۹۴/۱/۲۶

**چکیده**

**زمینه و هدف:** آنغوزه تلخ با نام علمی *Ferula assa*-foetida یکی از داروهای رایج است که به عنوان ضد عفونی کننده مورد استفاده قرار می‌گیرد. بر اساس مصارف سنتی، این دارو می‌تواند به عنوان یک داروی بی‌خطر و موثر علیه طیف وسیعی از بیماری‌ها به ویژه عفونت‌های باکتریایی مقاوم مورد استفاده قرار گیرد. هدف از این مطالعه تولید نانوکپسول‌های ژلاتینی حاوی عصاره روغنی آنغوزه تلخ و بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد باکتریایی آنها می‌باشد.

**مواد و روش‌ها:** این مطالعه تجربی بر روی نانوکپسول‌های ژلاتینی حاوی اسانس آنغوزه (۲، ۴ و ۶ درصد وزنی)، گلیسرول (۲۵ درصد وزنی) به عنوان پلاستیلایزر و گلوتارآلدئید به عنوان متصل کننده صورت گرفت. مورفولوژی، فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد باکتریایی و هم‌چنین عملکرد نانو کپسول‌ها با توجه به استاندارد کشور آمریکا بررسی شدند و به کمک اسکن با میکروسکوپ الکترونی، ABTS و آزمون میکروبیولوژیکی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

**یافته‌ها:** نانو کپسول‌های ژلاتینی فعالیت آنتی اکسیدانی و آنتی باکتریال ضعیفی داشتند، در حالی که نانوکپسول‌های ژلاتینی حاوی آنغوزه سطح بالایی از اثرات آنتی اکسیدان و آنتی باکتریال را نشان دادند. بیشترین میزان اثر نانوکپسول‌ها در ترکیب با غلظت (۸ درصد) آنغوزه مشاهده گردید.

**نتیجه‌گیری:** نانو کپسول‌های ژلاتینی ادغام شده با آنغوزه علاوه بر داشتن شکل فیزیکی بسیار مناسب، یک آنتی اکسیدان و آنتی باکتریال مناسب هستند که می‌توانند در تولید داروهای آنتی‌اکسیدان و آنتی باکتریال مورد توجه قرار گیرند.

**واژگان کلیدی:** آنتی باکتریال، آنتی اکسیدان، میکروسکوپ الکترونی، آنغوزه، ژلاتین، نانو کپسول

***نویسنده مسئول:** شیراز، دانشگاه شیراز، پژوهشکده بیوتکنولوژی

Email:amin_shakiba01@yahoo.com

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 3:49 +0430 on Friday March 23rd 2018

## مقدمه

ژلاتین یک پروتئین محلول است که ازهیدرولیز جزئی کلاژن تهیه می‌شود. کلاژن یک پروتئین رشته‌ای نامحلول است که از پروتئین‌های استخوان، غضروف و پوست به دست می‌آید(۱). ساختار منحصر به فرد کلاژن و ژلاتین در خواص فیزیکی آن مانند حلالیت، تورم، جذب آب، جذب رطوبت، تبخیرآب، شفافیت، رنگ، بو، استحکام و پایداری حرارتی بسیار موثر است(۲، ۳). بیشترین کاربرد ژلاتین در صنایع غذایی و دارویی است که از ژل، فیلم و خواص ویسکوالاستیک آن استفاده می‌شود. امروزه از ژلاتین به عنوان امولسی فایر، عوامل کف‌کننده، تثبیت کننده کلوئید، هیدروژل، مواد بسته‌بندی، پانسمان زخم و تولید میکرو کپسول استفاده می‌گردد(۸-۴). ژلاتین یکی از اولین موادی است که به عنوان حامل اجزای فعال به کار رفته است. امروزه، غنی‌سازی فیلم ژلاتین به وسیله عصاره‌های گیاهی به عنوان منابع طبیعی ضداکسیدانی و ضد میکروبی به مقدار زیاد گسترش یافته است(۱۳-۹). با توجه به اثرات ضداکسیدانی و ضدمیکروبی که اسانس‌های گیاهی دارند، به عنوان یک عاملی ایمن در صنایع بهداشتی شناخته می‌شوند(۱۴، ۱۵).

آنغوزه تلخ یکی از گیاهان شناخته شده از خانواده چتریان است که در طب سنتی برای معالجه بیماری‌های مختلف از جمله تنگی نفس (آسم)، صرع، درد معده، نفخ شکم، انگل روده، هضم ضعیف و آنفولانزا استفاده می‌شود(۱۶). در بیشتر موارد، صمغ و رزین این گیاه که منبع اصلی تولید اسانس هستند مورد استفاده قرار می‌گیرند(۱۷). با توجه به فرار بودن اسانس آنغوزه تلخ، این اسانس را در پلیمرهای ژلاتین محصور می‌کنیم. این کار باعث می‌شود اسانس آنغوزه تلخ به تدریج از فیلم ژلاتین آزاد شود و در مجاورت هوا اکسید نگردد. هدف از مطالعه حاضر، تولید نانوکپسول‌های ژلاتینی حاوی عصاره روغنی آنغوزه تلخ و بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی و ضد باکتریایی آن‌ها می‌باشد.

## مواد و روش ها

تهیه ژلاتین

ژلاتین مورد استفاده به صورت پودری سفید رنگ بود که از شرکت مرک آلمان خریداری شد. در هر تست ۱۰ گرم ژلاتین استفاده شد.

آنغوزه تلخ

صمغ گیاه آنغوزه تلخ از منطقه لارستان استان فارس با مختصات جغرافیایی طول شرقی"۴۰ '۲۷ ۵۴ درجه، عرض " ۷۸ ' ۲۵ ۲۷ درجه و ارتفاع۱۸۷۰متر از سطح دریا در بهار ۱۳۹۳ جمع‌آوری شد.

اسانس گیری صمغ آنغوزه تلخ

اسانس صمغ آنغوزه تلخ به روش تقطیر با آب و به کمک دستگاه اسانس‌گیری تیپ کلونجر استخراج گردید و پس از آب‌گیری از طریق سولفات سدیم بدون آب تا زمان آنالیز در ظرف شیشه‌ای تیره در دمای یخچال نگهداری شد.

آنالیز اسانس آنغوزه تلخ

برای جداسازی ترکیب‌ها از دستگاه گاز کروماتوگرافی مدل Agilent 7890 A با ستون HP-5 (به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر) مجهز به آشکار کننده FID استفاده گردید. حرارت اجاق از ۶۰ تا ۲۳۰ درجه سانتی‌گراد با گرادیان حرارتی ۳ درجه سانتی‌گراد در هر دقیقه با زمان چرخش ۶۱/۶۶۷ دقیقه برنامه‌ریزی شد. سایر شرایط آنالیز عبارت بود از:گاز حامل هلیوم با سرعت جریان (فلو) ۸۱/۳۴۴ میلی‌لیتر در دقیقه، دمای اتاق تزریق ۲۴۰ درجه سانتی‌گراد، دمای آشکار ساز ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد، نسبت اسپیلت ۱ به ۴۰ و حجم تزریق ۰/۱ میکرو لیتر. به منظور آنالیز، از دستگاه کروماتوگرافی گازی مدل Agilent 5975C متصل به طیف سنج جرمی مدل Agilent 5975C مجهز به ستون موئین PH-MS5 (به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه ۰/۲۵ میکرومتر) استفاده شد. شرایط آنالیز، مشابه شرایط آنالیز کروماتوگراف گازی و در دمای منبع یونیزاسیون ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد بود. درصد نسبی هر

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 3:49 +0430 on Friday March 23rd 2018

یک از ترکیبات با توجه به سطح زیر منحنی هر ترکیب در طیف کروماتوگراف گازی محاسبه گردید. شناسایی اجزا با یک پارامتر اندیس بازداری و طیف‌های جرمی و مقایسه آن‌ها با ترکیبات استاندارد صورت می گیرد.

تهیه محلول فیلم ژلاتین

برای تهیه محلول فیلم ژلاتین، ابتدا ۱۰ گرم پودر ژلاتین گاوی را در ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر در دمای محیط حل می‌کنیم. دمای محلول را به ۶۰ درجه سانتی‌گراد افزایش می‌دهیم. پس از خنک شدن تا دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد، اسانس انغوزه تلخ را که در غلظت‌های مختلف تهیه کرده‌ایم به همراه گلیسرول اضافه می‌کنیم. از دستگاه هموژنیزه کننده به منظور یک دست کردن محلول استفاده می‌کنیم و محلول را به مدت ۳۰ دقیقه در پمپ خلاء گذاشته تا هوای آن کاملاً خارج شود(۱۳).

تهیه فیلم ژلاتین

۱۰ میلی‌لیتر از محلول ژلاتین حاوی اسانس آنغوزه تلخ را بر روی پتری دیش منتقل کرده و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق قرار می‌دهیم. سپس آن را به مدت ۱۲ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۴۵درصد نگهداری کرده تا فیلم خشک شود. ضخامت فیلم با میکرومتر دیجیتال اندازه‌گیری می‌شود و به طور متوسط ۵±۱۲۵ میکرومتر در نظر گرفته می‌شود.

بررسی میزان تبخیر آب از ژل ژلاتینی

برای ارزیابی تبخیر آب از ژل‌های مرطوب ژلاتینی، ابتدا ژل مرطوب ژلاتینی حاوی غلظت‌های مختلف اسانس آنغوزه تلخ را به ابعادی به طول ۲۰ میلی‌متر و عرض ۲۰ میلی‌متر برش می‌دهیم و آن را وزن می‌کنیم (وزن اولیه). سپس ژل‌های برش خورده را در درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۳۵ درصد قرار می‌دهیم تا ژل به حالت تعادل برسد که این مرحله ۱۲۰ ساعت طول می‌کشد. بعد از این که ژل به حالت تعادل رسید، وزن ثابت ژل را اندازه‌گیری می‌کنیم (وزن نهایی). به منظور بررسی و ارزیابی دقیق، این آزمون سه مرتبه انجام شد(۱۳، ۱۸).

۱۰۰× ( وزن اولیه / وزن نهایی )= درصد وزن باقی مانده

۱۰۰×[وزن اولیه/(وزن نهایی – وزن اولیه)]=درصد وزن از دست رفته

بررسی خاصیت حل شدن فیلم ژلاتینی در آب

برای مشخص کردن حلالیت فیلم ژلاتینی حاوی غلظت‌های مختلف اسانس آنغوزه تلخ، ابتدا فیلم را به ابعادی با طول ۲۰ میلی‌متر، عرض۲۰ میلی‌متر و ضخامت ۰/۱۱ میلی‌متر برش می‌دهیم. فیلم‌های برش خورده را به مدت ۲۴ ساعت در فر با درجه حرارت ۱۰۴ درجه سانتی‌گراد قرار داده و وزن خشک اولیه آن را به دست می‌آوریم. فیلم‌های ژلاتینی خشک شده را در یک ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری که حاوی ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر است غوطه‌ور می‌کنیم و به مدت ۲۴ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد درون شیکر قرار می‌دهیم. سپس فیلم‌ها را از ارلن خارج کرده و به مدت ۲۴ ساعت در فر با درجه حرارت ۱۰۴ درجه سانتی‌گراد قرار می‌دهیم. در نهایت، وزن خشک نهایی آن‌ها را به دست می‌آوریم(۳، ۱۸).

۱۰۰×[وزن خشک اولیه/ (وزن خشک نهایی– وزن خشک اولیه)] = درصد حلالیت یا وزن از دست رفته

## بررسی تورم فیلم‌های ژلاتینی

فیلم‌های ژلاتینی حاوی غلظت‌های مختلف اسانس آنغوزه تلخ را به مدت ۲۴ ساعت درون فر با درجه حرارت ۱۰۴ درجه سانتی‌گراد قرار می‌دهیم. وزن قبل از انجام تست تورم (وزن اولیه) را به دست می‌آوریم. فیلم‌های ژلاتینی را به ابعادی با طول ۲۰ میلی‌متر، عرض ۲۰ میلی‌متر و ضخامت

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 3:49 +0430 on Friday March 23rd 2018

۰/۱۱ میلی‌متر برش می‌دهیم. فیلم‌های برش خورده را درون ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری که حاوی ۵۰ میلی‌لیتر آب مقطر است منتقل می‌کنیم تا متورم شوند و آب درون فیلم نفوذ کند. بعد از گذشت ۲۴ ساعت، نمونه‌های فیلم را از ارلن بیرون می‌آوریم و بر روی کاغذ صافی قرار می‌دهیم تا آب اضافی آن کامل گرفته شود و وزن نهایی فیلم ژلاتینی را محاسبه می‌کنیم. وزن اضافی که فیلم‌ها دریافت کرده‌اند یا درصد تورم فیلم‌های ژلاتینی را با استفاده از معادله درصد تورم به دست می‌آوریم(۳، ۱۸).

درصد تورم = [(وزن نهایی – وزن اولیه) / وزن اولیه]×۱۰۰

## بررسی جذب آب فیلم ژلاتینی

فیلم‌های ژلاتینی حاوی غلظت‌های مختلف اسانس آنغوزه تلخ را به ابعادی با طول ۲۰ میلی‌متر، عرض ۲۰ میلی‌متر و ضخامت ۰/۱۱ میلی‌متر برش داده و آن‌ها را به مدت ۳ روز در رطوبت نسبی صفر درصد نگهداری می‌کنیم تا وزنشان به حالت تعادل برسد (وزن اولیه). سپس این فیلم‌ها را به مدت یک هفته به دیسکاتور با رطوبت نسبی ۱۰۰ درصد و درجه حرارت ۳۷ درجه سانتی‌گراد منتقل می‌کنیم تا آب کاملا جذب فیلم ژلاتینی شود و وزن فیلم به حالت تعادل برسد. در این مرحله ( وزن نهایی) فیلم ژلاتینی حاوی غلظت‌های مختلف اسانس آنغوزه تلخ را اندازه‌گیری می‌کنیم(۳، ۱۸). افزایش وزن یا درصد جذب آب را از طریق معادله ذیل محاسبه می‌نماییم:

درصد جذب آب = [(وزن نهایی – وزن اولیه) / وزن اولیه]×۱۰۰

## بررسی نفوذپذیری بخار آب فیلم ژلاتینی (WVP)

ابتدا فیلم‌های ژلاتینی را به مدت ۲۴ ساعت در درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد با رطوبت نسبی ۷۵ درصد نگهداری می‌کنیم تا فیلم‌ها به حالت تعادل برسند. فیلم ژلاتینی حاوی غلظت‌های مختلف اسانس آنغوزه تلخ را بر روی جام‌های آلومینیومی که با ۲۰ گرم سیکاژل پر شده‌اند و دارای قطر ۵/۶ میلی‌متر و ارتفاع ۲/۱ میلی‌متر می‌باشند قرار می‌دهیم. هر یک از جام‌ها را در یک مکان خشک با رطوبت نسبی ۷۵ درصد و درجه حرارت ۲۵ درجه سانتی‌گراد نگهداری می‌کنیم. وزن هر یک از جام‌ها را هر سه ساعت یک بار در روز اندازه‌گیری می‌نماییم. با محاسبه افزایش وزن برحسب گرم به گذشت زمان بر حسب ساعت، شیب نمودار را به دست می‌آوریم. مقدار رطوبت عبوری ازسطح فیلم (m2) را می توان بر حسب گرم بر ساعت تعیین کرد(۳، ۱۸). تغییر جرم سلیکا ژل با گذشت زمان از فرمول زیر محاسبه می‌شود:

$$WVP\ (g.\ mm/m2.\ kPa.\ h) = [(WVTR \times T)] / \Delta P$$

WVTR= افزایش وزن بر حسب گرم بر ساعت ((slope(g/m2. h))

در این فرمول، T ضخامت فیلم بر حسب میلی‌متر و $\Delta P$ اختلاف جزئی فشار بخار آب بین دو طرف فیلم می‌باشد که برابر است با ۲/۲۴۴ کیلوپاسکال در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد:

$\Delta P$=۴/۲۴۴۹KPa

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 3:49 +0430 on Friday March 23rd 2018

### بررسی جذب نور فیلم‌های ژلاتینی

ابتدا فیلم‌های ژلاتینی حاوی غلظت‌های مختلف اسانس آنغوزه تلخ را به ابعادی با طول ۶ سانتی‌متر و عرض ۱ سانتی‌متر برش می‌دهیم. فیلم‌های برش خورده را به صورت مستقیم بر روی کوت‌های خالی اسپکتوفتومتر قرار می‌دهیم تا دو طرف کوت را کاملاً پوشش دهند. سپس جذب فیلم‌های ژلاتینی را به کمک دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۲۰۰ تا ۹۰۰ نانومتر بررسی می‌کنیم(۳، ۱۸).

### بررسی عبور نور از فیلم‌های ژلاتینی

ابتدا فیلم‌های ژلاتینی حاوی غلظت‌های مختلف اسانس آنغوزه تلخ را به ابعادی با طول ۶ سانتی‌متر و عرض ۱ سانتی‌متر برش می‌دهیم. فیلم‌های برش خورده را به صورت مستقیم بر روی کوت‌های خالی اسپکتوفتومتر قرار می‌دهیم تا دو طرف کوت را پوشش دهند. سپس میزان عبور نور از فیلم‌های ژلاتینی را به کمک دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۲۰۰ تا ۹۰۰ نانومتر بررسی می‌کنیم(۳، ۱۸).

تست میکروسکوپ الکترونی (SEM)

این تست در دانشگاه کرمان انجام شد.

### بررسی خواص مکانیکی فیلم ژلاتینی

خواص مکانیکی فیلم ژلاتینی با توجه به تست ASTM D 638-02a و آنالیز TA.XT Stable Micro System UK انجمن آمریکا مورد بررسی قرار می‌گیرد. هدف از این آزمون، مطالعه خواص مکانیکی نمونه فیلم‌های ژلاتین می‌باشد. ابتدا فیلم‌های ژلاتینی محتوی غلظت‌های مختلف اسانس آنغوزه تلخ را قبل از تست مکانیکی به مدت ۴۸ ساعت در یک ظرف در بسته با رطوبت نسبی ۶۵ درصد نگهداری می‌کنیم تا به حالت تعادل برسند.

بعد از انجام این مرحله فیلم‌های ژلاتینی را به ابعادی با طول ۶۰ میلی‌متر، عرض ۱۰ میلی‌متر و ضخامت ۰/۱۱ میلی‌متر برش می‌دهیم. به منظور ثابت نگه داشتن فیلم‌های ژلاتینی از گیره با اندازه‌ی تقریبی ۲۰ میلی‌متر استفاده می‌کنیم. تجزیه و تحلیل فیلم ژلاتینی بر اساس نیروی وزن وارده مورد ارزیابی قرار می‌گیرد که این نیرو معادل ۵ گرم (۰/۰۴۹ نیوتون ) می‌باشد. تست استحکام کششی فیلم را قبل از انجام تست مکانیکی انجام می‌دهیم. سرعت انجام آزمون به ترتیب ۱ و ۱۰ میلی‌متر بر ثانیه می‌باشد. نمودار تنش و کرنش را رسم می‌کنیم. کرنش، تغییر طول نمونه به ازای طول اولیه و تنش، نیرو به ازای سطح مقطع نمونه است(۳، ۱۸).

TS(N/m2) = (سطح مقطعی از نمونه / نیروی شکستن)

EAB = [(طول اولیه شکستن / افزایش طول در نقطه)]×۱۰۰ (درصد)

قسمتی از فیلم به اندازه‌ی تقریبی ۱×۶ سانتی‌متر مربع برای انجام تست مکانیکی استفاده می‌شود. با توجه به استفاده از گیره‌ها برای ثابت نگه داشتن فیلم ژلاتینی، حدود ۲ سانتی‌متر از فیلم ژلاتینی به کمک گیره پوشانده می‌شود که فقط حدود ۴ سانتی‌متر از فیلم مورد آزمون قرار می‌گیرد. آزمون حداقل با ۳ تست انجام می‌شود(۱۹).

### سرعت آزادسازی اسانس از فیلم ژلاتینی

سرعت آزادسازی اسانس آنغوزه از فیلم ژلاتینی حاوی غلظت‌های مختلف اسانس با استفاده از روش رنگ زدایی ABTS، یا ۲ و ۲َ- آزینو-دی(۳- اتیل بنز تیازولین-۶- سولفونات) سنجیده شد(۲۰). این روش برای بررسی آزاد شدن مداوم اسانس از فیلم‌ها طراحی شده است. فیلم‌های ژلاتینی حاوی غلظت‌های صفر، ۲، ۴، ۶ و ۸ درصد اسانس آنغوزه تلخ را به ابعادی با طول ۱۰ میلی‌متر، عرض ۱۰ میلی‌متر و قطر ۰/۱۱ میلی‌متر با وزن تقریبی ۲۰ میلی‌گرم برش می‌دهیم. فیلم‌های ژلاتینی برش خورده را به محلول ۲ میلی‌لیتری رقیق شده حاوی رادیکال‌های ABTS اضافه می‌کنیم. مقادیر جذب صفحات، هر ۳۰ ثانیه خوانده می‌شود تا جذب به صفر برسد.

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 3:49 +0430 on Friday March 23rd 2018

### بررسی خاصیت آنتی اکسیدانی فیلم ژلاتینی

فعالیت آنتی اکسیدانی فیلم ژلاتینی حاوی اسانس آنغوزه تلخ با استفاده از روش رنگ‌زدایی ABTS، یا ۲ و ´۲- آزینو-دی (۳-اتیل بنزیتازولین -۶- سولفونات) سنجیده شد(۲۰). این روش برای بررسی آزاد شدن مداوم آنتی اکسیدان از فیلم طراحی شده است. فیلم‌های ژلاتینی حاوی غلظت‌های صفر، ۲، ۴، ۶ و ۸ درصد اسانس آنغوزه تلخ را به ابعادی با طول ۱۰ میلی‌متر، عرض ۱۰ میلی‌متر و قطر ۰/۱۱ میلی‌متر با وزن تقریبی ۲۰ میلی‌گرم برش می‌دهیم. فیلم‌های ژلاتینی برش خورده را به محلول ۲ میلی‌لیتری رقیق شده حاوی رادیکال‌های ABTS اضافه می‌کنیم. از فیلم ژلاتینی بدون اسانس آنغوزه تلخ به عنوان استاندارد استفاده می‌شود. مقادیر جذب صفحات را بعد از گذشت ۳ دقیقه می‌خوانیم. میزان فعالیت آنتی اکسیدانی بر اساس میلی‌گرم اسید آسکوربیک معادل در هر گرم از فیلم بررسی می‌شود.

### بررسی فعالیت ضد میکروبی با استفاده از روش انتشار دیسک

باکتری‌های مورد بررسی از انستیتو پاستور ایران تهیه شدند. فیلم‌ها را به صورت جداگانه در معرض دو باکتری گرم منفی اشرشیاکلی PTCC۱۳۳۰ (ATCC۸۷۳۹) و سودوموناس آئروژینوزا PTCC۱۰۷۴ (ATCC۹۰۲۷) و دو باکتری گرم مثبت استافیلوکوکوس اورئوس PTCC۱۱۱۲ (ATCC۶۵۳۸) و باسیلوس سابتیلس PTCC۱۰۲۳ (ATCC۶۶۲۳) قرار می‌دهیم. برای بررسی فعالیت آنتی باکتریایی فیلم‌های ژلاتینی حاوی غلظت‌های مختلف اسانس آنغوزه تلخ از روش انتشار استفاده می‌کنیم. از هر یک از فیلم‌های ژلاتینی یک دیسک به قطر ۳۰ میلی‌متر و ضخامت ۰/۱۱ میلی‌متر تهیه می‌کنیم. فیلم‌های ژلاتینی برش خورده را به مدت ۳۰ دقیقه تحت درجه حرارت ۱۲۰ درجه سانتی‌گراد قرار می‌دهیم تا کاملا استریل شوند(۲۱).

غلظت سوسپانسیون باکتریایی را مطابق ۰/۵ مک فارلند در ۱۰۸ واحد تشکیل دهنده کلونی تهیه کرده و غلظت باکتری‌ها را با افزودن محیط کشت سوریا برتانی به ۱۰۵ واحد تشکیل دهنده کلونی می‌رسانیم. محلول تهیه شده را بر روی محیط کشت مغزی آگار پخش می‌کنیم. دیسک‌های تهیه شده را به صورت مستقیم بر روی پلیت آگار قرار می‌دهیم و پتری دیش‌ها را به صورت وارونه به مدت ۲۴ ساعت در انکوباتور ۳۷ درجه قرار می‌دهیم. از دیسک بدون اسانس آنغوزه تلخ به عنوان کنترل استفاده می‌کنیم. قطر هاله اطراف دیسک را با خط کش اندازه‌گیری می‌کنیم و از آن برای ارزیابی فعالیت ضد باکتریایی استفاده می‌نماییم.

تحلیل آماری

کلیه آزمایشات انجام شده در این مطالعه با سه بار تکرار انجام گرفت و داده‌های حاصل که بر پایه طرح آزمایشی کاملا تصادفی بودند با استفاده از نرم افزار نسخه ۱۶ تجزیه و تحلیل شدند. مقایسه میانگین با آنالیز واریانس انجام شد و گروه‌بندی تیمارها با آزمون دانکن در سطح معنی‌دار $p<۰/۰۵$ بررسی گردید.

## یافته‌ها

### آنالیز گیاه

تجزیه و تحلیل کروماتوگرافی گازی نشان داد که مهم ترین ترکیبات اسانس آنغوزه تلخ به شرح جدول ۱ می‌باشد.

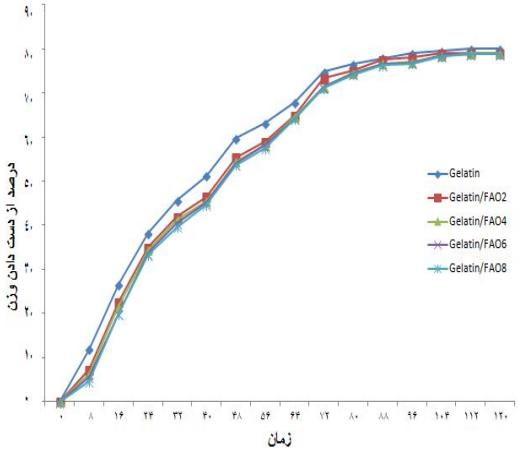
**جدول ۱. مهمترین ترکیبات اسانس آنغوزه تلخ**

| | |
|---|---|
| (Z)-1-propenyl sec-butyl disulfide | ۲۷/۷۷۱ درصد |
| (E)-1-propenyl sec-butyl disulfide | ۲۰/۲۸۹ درصد |
| a-Pinene | ۱۰/۷۷۵ درصد |
| b-Pinene | ۱۰/۲۳۸ درصد |
| (Z)-b-ocimene | ۷/۸۶۶ درصد |
| (E)-b-ocimene | ۲/۹۸۶ درصد |

### تبخیر آب از ژل

نتایج حاصل از تبخیر آب ژل‌های ژلاتین در شکل ۱ خلاصه شده است. ژل ژلاتین را هر ۸ ساعت وزن

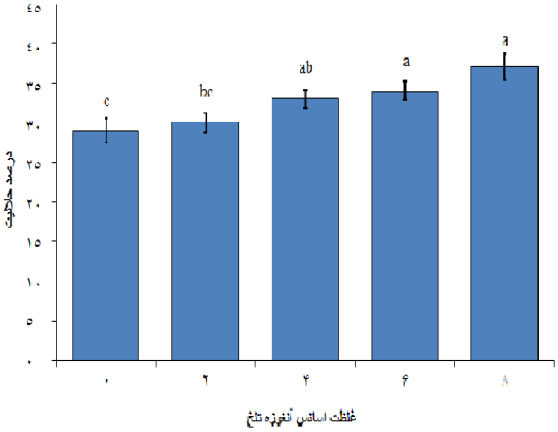
می‌کنیم. مشاهده می‌شود که ژل‌های ژلاتین بعد از گذشت ۸۰ ساعت به یک وزن ثابت می‌رسند و در طول ۱۲۰ ساعت وزن ژل‌های ژلاتین کاملا ثابت می‌گردد. ژل‌های ژلاتین ۸۰ درصد وزن خود را از دست می‌دهند و آب ژل تبخیر می‌شود و تنها ۲۰ درصد از وزن ژل باقی می‌ماند. پس از گذشت ۱۲۰ ساعت، وزن ژل‌های ژلاتین به حالت تعادل رسیده و ژل‌های ژلاتین به فیلم تبدیل می‌شوند.




**شکل ۱. میزان تبخیر آب از فیلم‌های ژلاتینی حاوی غلظت‌های مختلف اسانس آنغوزه تلخ**

## حلالیت فیلم ژلاتینی

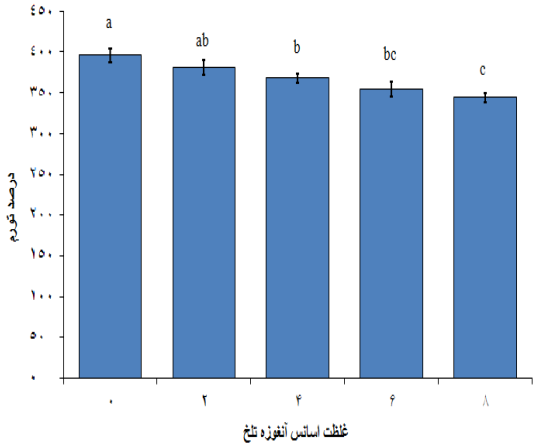
درصد حلالیت (از دست دادن وزن) فیلم‌های ژلاتین در شکل ۲ خلاصه شده است. درصد حلالیت فیلم‌های ژلاتین ۲۹ درصد می‌باشد. افزودن اسانس آنغوزه تلخ به محلول فیلم ژلاتینی باعث افزایش قابل توجه انحلال‌پذیری از ۳۰ درصد به ۳۷ درصد می‌شود که وابسته به غلظت آنغوزه است($p<۰/۵۰$).




**شکل ۲. درصد حلالیت فیلم‌های ژلاتین حاوی غلظت‌های مختلف اسانس آنغوزه تلخ**

## تورم فیلم ژلاتینی

نتایج حاصل از ظرفیت تورم فیلم‌های ژلاتین در شکل ۳ خلاصه شده است. درصد تورم فیلم‌های ژلاتینی برابر با ۳۹۶ درصد می‌باشد. افزودن اسانس آنغوزه تلخ باعث کاهش قابل توجه درصد تورم فیلم ژلاتین از ۳۸۱ به ۳۴۴ درصد می‌شود($p<۰/۰۵$).



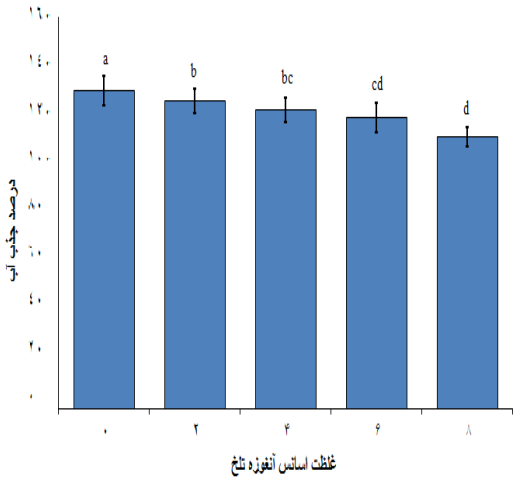

**شکل ۳. تورم فیلم‌های ژلاتینی حاوی غلظت‌های مختلف اسانس آنغوزه تلخ**

## جذب آب فیلم

نتایج حاصل از جذب آب فیلم‌های ژلاتین به طور خلاصه در شکل ۴ آمده است. درصد جذب آب فیلم‌های ژلاتینی برابر با ۱۳۰ درصد می‌باشد. افزودن اسانس آنغوزه تلخ باعث کاهش قابل توجه درصد جذب آب فیلم از ۱۳۰ درصد به ۱۱۱ درصد می‌شود($p<۰/۰۵$).

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 3:49 +0430 on Friday March 23rd 2018

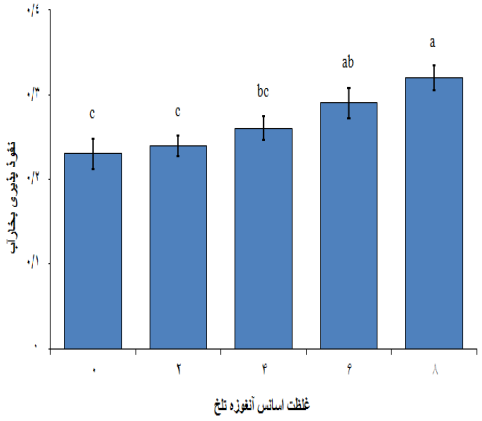
Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 3:49 +0430 on Friday March 23rd 2018




**شکل ۴. جذب آب از طریق فیلم‌های ژلاتینی حاوی غلظت‌های مختلف اسانس آنغوزه تلخ**

## نفوذپذیری فیلم ژلاتینی به بخار آب

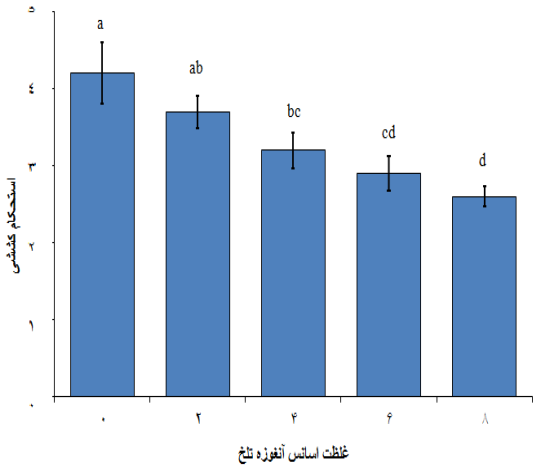
نتایج نفوذپذیری بخار آب فیلم‌های ژلاتین در شکل ۵ خلاصه شده است. نفوذپذیری بخار آب برای فیلم ژلاتین برابر با g.mm/KPa.m2h ۰/۲۳ گرم میلی متر بر کیلو پاسکال مجذور متر ساعت می‌باشد. افزودن اسانس آنغوزه تلخ به فیلم ژلاتین باعث افزایش قابل توجه نفوذپذیری بخار آب در فیلم ژلاتین می‌شود که این تغییر به غلظت افزوده شده آنغوزه تلخ به فیلم ژلاتین وابسته است.



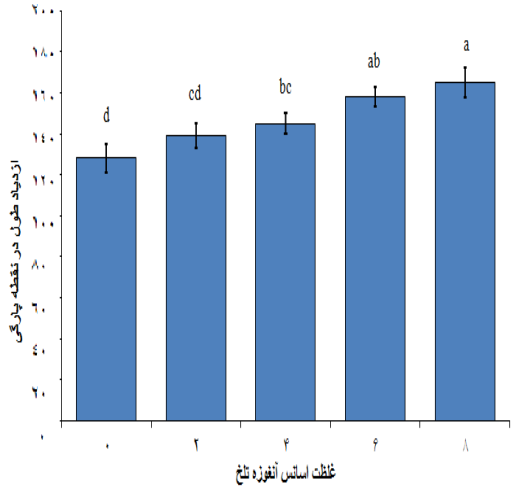

**شکل ۵. نفوذپذیری بخارآب فیلم‌های ژلاتینی حاوی غلظت‌های مختلف اسانس آنغوزه تلخ**

## خواص مکانیکی فیلم ژلاتینی

خواص مکانیکی فیلم‌های ژلاتینی در شکل‌های ۶ و ۷ نشان داده شده است. پارامترهای استحکام کششی و ازدیاد طول در نقطه پارگی فیلم ژلاتینی مستقیماً به ساختار شیمیایی آن‌ها مربوط است. استحکام کششی و ازدیاد طول در نقطه پارگی فیلم‌های ژلاتینی که دارای اتصالات عرضی هستند به ترتیب ۴/۲ مگا پاسکال و ۱۲۸ درصد می‌باشد. اضافه کردن اسانس آنغوزه تلخ با غلظت‌های مختلف به فیلم‌های ژلاتین باعث کاهش قابل توجهی در استحکام کشش فیلم از ۳/۷ به ۲/۶ مگا پاسکال و افزایش ازدیاد طول در نقطه پارگی از ۱۳۹ درصد به ۱۶۵ درصد می‌شود(۶).




**شکل ۶. استحکام کششی فیلم ژلاتین حاوی غلظت‌های مختلف اسانس آنغوزه تلخ**

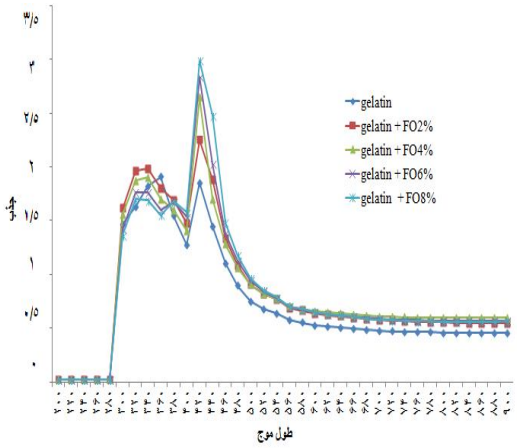



**شکل ۷. ازدیاد طول در نقطه پارگی فیلم ژلاتین حاوی غلظت‌های مختلف اسانس آنغوزه تلخ**

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 3:49 +0430 on Friday March 23rd 2018

## جذب نور فیلم‌های ژلاتینی

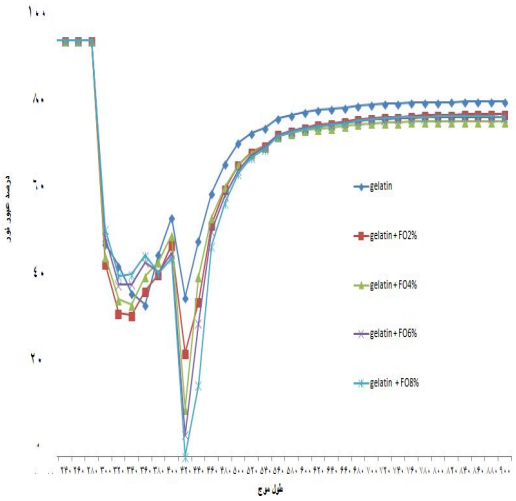
نتایج جذب نور فیلم‌های ژلاتینی حاوی غلظت‌های مختلف در شکل ۸ خلاصه شده است. جذب نور فیلم‌های ژلاتینی در طول موج ۲۸۰ تا ۴۸۰ نانومتر اتفاق می‌افتد که بیشترین مقدار جذب نور در طول موج ۴۲۰ نانومتر است. با توجه به نتایج به دست آمده، فیلم‌های ژلاتینی که درصد اسانس آنغوزه بیشتری دارند از جذب طول موج بیشتری برخوردارند.




**شکل ۸. جذب نور فیلم‌های ژلاتینی حاوی غلظت‌های مختلف اسانس آنغوزه تلخ**

## عبور نور از فیلم‌های ژلاتینی

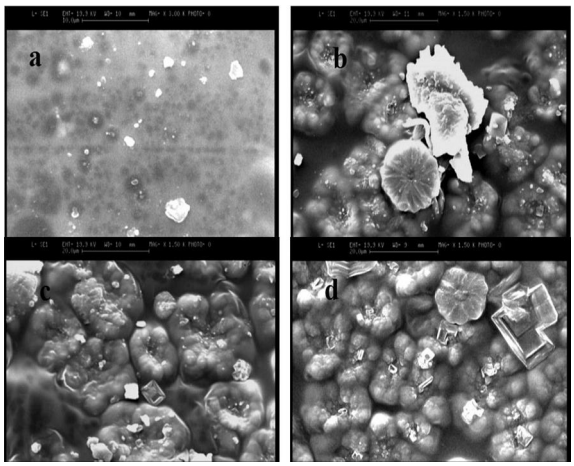
نتایج جذب نور فیلم‌های ژلاتینی حاوی غلظت‌های مختلف به طور خلاصه در شکل ۹ آمده است. عبور نور از فیلم‌های ژلاتینی حاوی غلظت‌های مختلف اسانس آنغوزه در طول موج ۲۰۰ تا ۲۸۰ نانومتر برابر با ۱۰۰ درصد است و در طول موج ۴۸۰ تا ۹۰۰ نانومتر، ۸۰ درصد می‌باشد که در این حالت ۲۰ درصد جذب نور وجود دارد. اما در طول موج ۴۲۰ نانومتر جذب کامل داشته و هیچ نوری در این طول موج از فیلم عبور نمی‌کند و نور عبوری در این طول موج به صفر درصد می‌رسد.




**شکل ۹. درصد نور عبوری از فیلم‌های ژلاتینی حاوی اسانس آنغوزه**

## مورفولوژی فیلم‌ها

نتایج آنالیز میکروسکوپ الکترونی در شکل ۱۰ نشان داده شده است. در بررسی عکس‌های میکروسکوپ الکترونی با بزرگ‌نمایی ۱۰۰X، از فیلم‌های ژلاتینی دارای غلظت‌های صفر، ۴، ۶ و ۸ درصد اسانس آنغوزه تلخ استفاده شده است.



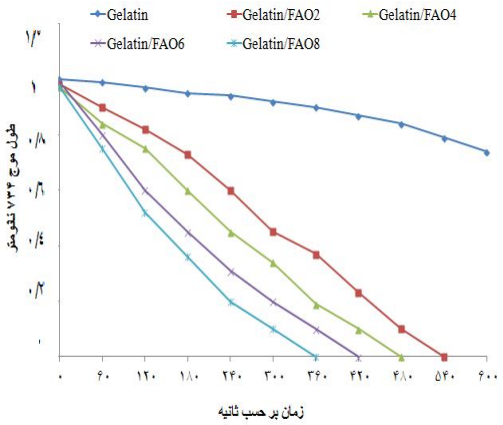

**شکل ۱۰. عکس میکروسکوپ الکترونی در بزرگنمایی ۱۰۰x از فیلم ژلاتین اسانس آنغوزه تلخ**

## سرعت آزادسازی اسانس از فیلم ژلاتینی

سرعت آزادسازی فیلم‌های ژلاتینی حاوی غلظت‌های مختلف اسانس آنغوزه تلخ با استفاده از روش رنگ‌زدایی ABTS مورد بررسی قرار گرفت و با استفاده از دستگاه اسپکتوفتومتر در طول موج ۷۳۴ نانومتر رنگ سنجی

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 3:49 +0430 on Friday March 23rd 2018

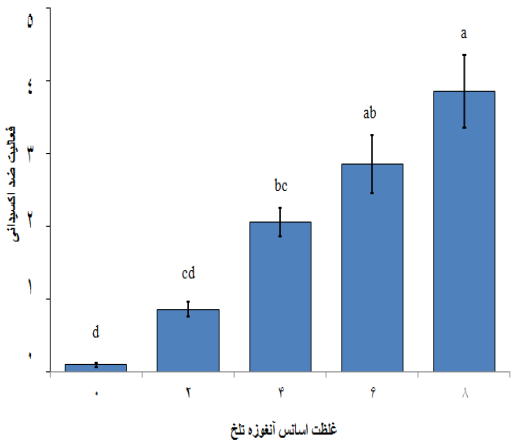
مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج به دست آمده در شکل ۱۱ گزارش شده است.




**شکل ۱۱. آزاد شدن غلظت‌های مختلف اسانس آنغوزه تلخ از فیلم‌های ژلاتینی**

## فعالیت ضد اکسیدانی فیلم ژلاتینی

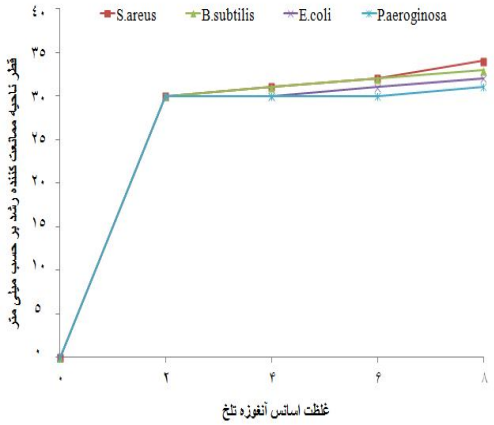
فعالیت ضد اکسیدانی فیلم‌های ژلاتین حاوی غلظت‌های مختلف اسانس آنغوزه تلخ با استفاده از روش رنگ‌زدایی ABTS مورد بررسی قرار گرفت. میزان رنگ زدایی به صورت میلی‌گرم اسید آسکوربیک معادل در هر گرم از فیلم در شکل ۱۲ گزارش شده است. فیلم‌های ژلاتینی بدون اسانس آنغوزه تلخ فعالیت بسیار کمی در برابر رنگ‌زدایی ABTS از خود نشان دادند.




**شکل۱۲. فعالیت ضد اکسیدانی فیلم‌های ژلاتینی حاوی غلظت‌های مختلف اسانس آنغوزه تلخ**

## فعالیت ضد میکروبی فیلم ژلاتینی

سنجش اثرات ضد میکروبی فیلم ژلاتینی حاوی اسانس آنغوزه تلخ از طریق روش انتشار دیسک مورد بررسی قرارگرفت. نتایج حاصل از انتشار دیسک در شکل ۱۳ خلاصه شده است. فیلم‌های بدون اسانس آنغوزه تلخ هیچ‌گونه فعالیت ضد باکتریایی از خود نشان نمی‌دهند، در صورتی که فیلم‌های ژلاتینی حاوی غلظت‌های مختلف فعالیت ضد باکتریایی قابل توجهی دارند. بیشترین فعالیت ضد باکتریایی به ترتیب متعلق به باکتری‌های باسیلوس سباتیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا است که به عنوان یک عامل ضد میکروبی خوب در نظر گرفته شده‌اند. از این رو، فیلم‌های ژلاتینی حاوی غلظت‌های مختلف اسانس آنغوزه فعالیت ضد باکتریایی خوبی در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی دارند و این ویژگی در مورد باکتری‌های گرم مثبت بیشتر از باکتری‌های گرم منفی است.




**شکل۱۳. انتشار دیسک‌های ژلاتینی حاوی غلظت‌های مختلف اسانس آنغوزه تلخ**

## بحث

در مطالعات پیشین اجزای تشکیل دهنده اسانس آنغوزه عبارت بودند از: ۴۰ درصد (E)-1-propenyl sec-butyl disulfide، ۸/۷ درصد (Z)-1-propenyl sec-butyl disulfide، ۷/۸ درصد germacrene B، ۵/۹

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 3:49 +0430 on Friday March 23rd 2018

درصد a-Pinene و ۵ درصد b-Pinene. از این رو، تجزیه و تحلیل گاز کروماتوگرافی اسانس آنغوزه تلخ در این تحقیق تقریبا مشابه با تجزیه و تحلیل مطالعات پیشین می‌باشد، با این حال تفاوت‌هایی وجود دارد که به دلیل کیفیت و کمیت اسانس آنغوزه تلخ است.

ژلاتین محلول در آب است و هنگام تماس با سطوح آبدار می‌تواند تا حدودی حل شود. هم‌چنین زمانی که برای مدت زمان طولانی در محیطی با رطوبت بالا قرار می‌گیرد ممکن است ساختار فیبری خود را از دست بدهد. با این حال، اتصالات عرضی درون فیلم ژلاتین می‌تواند ساختار ژلاتین را تثبیت کند و باعث کاهش حلالیت آن در محیط آبی شود(۶). به طور کلی، اثرات مواد افزودنی (اسانس‌های گیاهی) در حلالیت فیلم ژلاتینی به نوع ترکیبات و خاصیت آب دوستی و آب گریزی ترکیبات افزوده شده وابسته است(۲۲). اسانس آنغوزه تلخ از ترکیبات آب گریز می‌باشد که در تعامل با دمین‌های آب‌گریز ژلاتین می‌تواند مانع از شکل‌گیری شبکه‌های ژلاتین شود که باعث افزایش حلالیت فیلم ژلاتین می‌گردند(۲۳).

در یک مطالعه، فیلم‌های ژلاتینی کیتوزان به همراه اسانس روغنی موجب افزایش قابل توجه حلالیت فیلم شدند. این نتیجه با نتایج مطالعه‌ی ما یکسان است(۲۴). این نتایج نشان می‌دهند که فیلم‌های ژلاتین حاوی غلظت‌های مختلف اسانس آنغوزه تلخ گزینه مناسبی برای بسته‌بندی مواد غذایی دارای رطوبت کم هستند که این بسته‌بندی در مقابل رطوبت کم و آب مقاوم می‌باشد.

ژلاتین یک ماده آب دوست است و موجب جذب مولکول‌های آب به سمت خود می‌شود. فیلم ژلاتین متخلخل درصد تورم بالاتری دارد، زیرا وجود تخلخل در ساختار شبکه‌ای آن موجب می‌گردد که آب بیشتری به داخل فیلم کشیده شود(۲۵). افزودن اسانس آنغوزه تلخ به محلول ژلاتین به دلیل داشتن ساختار آب گریز اسانس آنغوزه تلخ باعث کاهش درصد تورم می‌شود. دمین‌های آب گریز ژلاتین می‌توانند با قسمت‌های آب گریز اسانس آنغوزه تلخ ارتباط برقرار کنند، این امر باعث افزایش تعامل سطحی بین ماتریس (ژلاتین) و اسانس آنغوزه تلخ می‌شود(۶). اشباع شبکه ژلاتین با اسانس آنغوزه تلخ موجب می‌گردد که مولکول‌های آب نتوانند به علت آب گریز بودن اسانس آنغوزه تلخ منتشر شوند و درصد تورم کاهش یابد. این نتایج نشان می‌دهند که فیلم‌های ژلاتینی حاوی اسانس آنغوزه تلخ گزینه مناسبی برای بسته‌بندی مواد غذایی مقاوم در برابر آب هستند.

با توجه به اتصالات عرضی ایجاد شده در اثر گلوتارآلدئید، اسانس آنغوزه درون فیلم‌های ژلاتینی محصور می‌شود. آنغوزه خاصیت آب‌گریزی دارد و با دمین‌های ژلاتین پیوند برقرار می‌کند. در نتیجه با افزایش درصد اسانس آنغوزه، آب کمتری جذب فیلم‌های ژلاتینی می‌شود و فیلم با درصد اسانس آنغوزه بیشتر آب‌گریزتر می‌گردد.

پیوند مولکول‌های آب با ژلاتین باعث کاهش انتقال بخار آب از طریق فیلم ژلاتین می‌شود(۲۵، ۲۷). ادغام مواد افزودنی مانند اسانس‌های گیاهی به فیلم ژلاتین باعث تغییر قابل توجهی در انتقال بخار آب از طریق فیلم ژلاتین می‌گردد. ظرفیت نهایی نفوذپذیری بخار آب به خاصیت آب دوستی و آب گریزی تمامی ترکیبات افزوده شده به فیلم ژلاتین وابسته است. دمین‌های آب گریز ژلاتین می‌توانند از طریق قسمت‌های آب‌گریز اسانس با آن ارتباط داشته باشند و در نتیجه باعث بالا رفتن ارتباط سطحی ماتریکس و اسانس شوند. این پدیده مانع از بروز فعل و انفعالات بین زنجیره‌های ژلاتین و مولکول آب می‌شود و در نتیجه مولکول‌های آب آزادانه از طریق فیلم انتقال می‌یابند و درصد نفوذپذیری بخار آب افزایش پیدا می‌کند(۲۷). نفوذپذیری بخار آب فیلم کیتوزان حاوی اسانس آویشن افزایش قابل توجهی نسبت به فیلم کیتوزان بدون اسانس آویشن داشته است که این نتیجه با نتایج ما تطابق دارد(۲۲).

فیلم‌های ژلاتین به واسطه‌ی پیوندهای ضعیف از جمله پیوند هیدروژنی و پیوندهای هیدروفوب (آب‌گریز) پایدار هستند. با این وجود، افزودن غلظت‌های مختلف

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 3:49 +0430 on Friday March 23rd 2018

آنغوزه تلخ به ویژه غلظت‌های بیشتر باعث کاهش قابل توجهی در کشش فیلم می‌شود. هم‌چنین، اسانس آنغوزه تلخ احتمالا در کاهش تعامل بین مونومرهای ژلاتین نقش دارد، هم‌چنین ممکن است مانعی برای فعل و انفعالات زنجیره به زنجیره‌ای ژلاتین باشد که باعث کاهش مقاومت کششی و افزایش هم‌زمان ازدیاد طول در نقطه پارگی فیلم می‌شود(۲۸). فیلم‌های ژلاتینی ادغام شده با اسانس‌های مرکبات، مقاومت کششی پایین‌تری دارند، اما کشیدگی بالاتر و ازدیاد طول بیشتری در نقطه پارگی نسبت به فیلم‌های ژلاتینی بدون اسانس مرکبات دارند که با نتایج ما یکسان می‌باشد(۱۹). در نتیجه اسانس آنغوزه باعث کاهش استحکام کششی و افزایش طول در نقطه پارگی می‌شود. اتصالات عرضی ناشی از گلوتار آلدئید موجب افزایش مقاومت مکانیکی فیلم‌ها می‌گردد. این نتایج نشان می‌دهند که ژلاتین ادغام شده با اسانس آنغوزه تلخ در غلظت‌های مختلف، گزینه مناسبی برای بسته‌بندی مواد غذایی از نظر فیزیکی است.

جذب فیلم‌های ژلاتینی به دلیل ساختار آمینو اسیدی شان است که با افزودن درصد اسانس آنغوزه تلخ باعث می‌شوند با قسمت‌های آب گریز ژلاتین پیوند برقرار کرده، اتصالات عرضی درون فیلم‌ها شکسته شده و فشردگی بیشتری پیدا کنند. در نتیجه افزودن اسانس آنغوزه تلخ به فیلم‌های ژلاتینی باعث می‌شود که فیلم‌های ژلاتینی با توجه به درصد اسانس افزوده شده افزایش جذب نور قابل توجهی داشته باشند و کدرتر باشند. مطالعات نشان دادند که درصد جذب نور فیلم‌های ژلاتینی ادغام شده با اسانس ترنج و لیمو، با توجه به درصد اسانس ادغام شده، در مقایسه با فیلم‌های ژلاتینی بدون اسانس ترنج و لیمو بیشتر است(۱۷). با توجه به نتایج به دست آمده، فیلم‌های ژلاتینی ادغام شده با اسانس آنغوزه تلخ موجب جلوگیری از عبور اشعه‌های مضر می‌شوند و برای بسته‌بندی مواد غذایی حساس به نور و مواد دارویی مناسب هستند.

با افزایش غلظت اسانس آنغوزه، عبورنور در طول موج ۲۰۰ تا ۲۸۰ نانومتر هیچ‌گونه تاثیر مثبت یا منفی ندارد، اما درصد نور عبوری از فیلم در طول موج ۲۸۰ تا ۹۰۰ نانومتر کاهش می‌یابد. در یک مطالعه مشخص شد که فیلم‌های ژلاتینی ادغام شده با اسانس ترنج و لیمو در مقایسه با فیلم‌های ژلاتینی بدون اسانس ترنج و لیمو بسته به درصد اسانس عبور نور در محدوده‌ای از طول موج‌ها کاهش می‌یابند(۳). با توجه به این نتایج، فیلم‌های ژلاتینی تهیه شده گزینه مناسبی برای بسته‌بندی مواد غذایی و دارویی حساس به نور هستند.

فیلم ژلاتینی حاوی ۸ درصد اسانس آنغوزه تلخ نسبت به فیلم‌های ژلاتینی حاوی ۴ و ۶ درصد اسانس آنغوزه تلخ و فیلم‌های ژلاتینی بدون اسانس آنغوزه فشردگی بیشتری دارند. از آن جایی که اسانس آنغوزه به دلیل آب گریز بودن با دمین‌های آب گریز ژلاتین پیوند برقرار می‌کند، باعث می‌شود اتصالات عرضی درون فیلم شکسته شود و پیوندهای بین آنغوزه و دمین‌های ژلاتین بیشتر و شدیدتر گردد. از این رو، فیلم‌های ژلاتین حاوی درصد بیشتر اسانس آنغوزه تلخ به دلیل پیوندهای بیشتری که با دمین‌های آب گزیر ژلاتین تشکیل می‌دهند، فشردگی بیشتری نسبت به فیلم‌های بدون اسانس آنغوزه تلخ پیدا می‌کنند. در نتیجه با افزایش غلظت اسانس آنغوزه فیلم‌های ژلاتینی فشرده‌تر و آب گریزتر می‌شوند.

با توجه به نتایج به دست آمده، فیلم‌های ژلاتینی حاوی ۸ درصد اسانس آنغوزه تلخ در مدت زمان کوتاه تر در حدود ۳۶۰ ثانیه ABTS را بی‌رنگ می‌کنند (به دلیل آزاد شدن سریع‌تر اسانس آنغوزه تلخ). در صورتی که فیلم‌های ژلاتینی دارای درصدهای کمتر اسانس آنغوزه، ABTS را در مدت زمان بیشتری بی‌رنگ می‌کنند و فیلم‌های بدون اسانس آنغوزه، ABTS را رنگ‌زدایی نمی‌کنند.

مطالعات مختلفی در مورد خواص ضد اکسیدانی پپتیدهای مشتق شده از ژلاتین مورد بررسی قرار گرفته است، این مطالعات نشان داده است که پپتیدهای مشتق شده از هیدرولیز آنزیمی ژلاتین، مهار کننده پراکسیداسیون لیپیدی،

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 3:49 +0430 on Friday March 23rd 2018

جاذب رادیکال‌های آزاد و انتقال دهنده یون‌های آهن می‌باشند. خواص ضد اکسیدانی پپتیدها با ترکیب اسید آمینه، وزن مولکولی، ساختار لیپیدها و آب‌گریز بودن لیپیدها رابطه مستقیم دارد(۷). فیلم‌های ژلاتین حاوی غلظت‌های مختلف اسانس آنغوزه، ABTS را بی‌رنگ می‌کنند که بسته به غلظت استفاده شده رنگ بری بیشتری وجود خواهد داشت(۱۹). ژلاتین پوست ماهی حاوی اسانس مرکبات و فیلم‌های کیتوزان حاوی اسانس آویشن، فعالیت ضد اکسیدانی بسیار قوی دارند که مشابه نتایج ما می‌باشد(۲۲). این فعالیت ضد اکسیدانی اسانس آنغوزه تلخ را می‌توان به قسمت‌هایی از اسانس مانند فنول‌ها، فلانوئیدها، ترپن‌ها و ترکیبات گوگردی نسبت داد(۲۹) که با توجه به نتایج به دست آمده، فیلم‌های ژلاتین حاوی اسانس آنغوزه گزینه مناسبی جهت بسته‌بندی ایمن مواد غذایی می‌باشند که موجب می‌گردند فعالیت اکسیداتیو مواد غذایی کاهش یابد.

فیلم‌های ژلاتینی حاوی غلظت‌های مختلف، فعالیت ضد باکتریایی قابل توجهی دارند که بیشترین فعالیت ضد باکتریایی به ترتیب برای باکتری‌های باسیلوس سابتیلیس، استافیلوکوکوس اورئوس، اشرشیاکلی و سودوموناس آئروژینوزا می‌باشد که به عنوان یک عامل ضد میکروبی خوب در نظر گرفته شده‌اند. بنابراین فیلم‌های ژلاتینی حاوی غلظت‌های مختلف اسانس آنغوزه فعالیت ضد باکتریایی خوبی در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی دارند و فعالیت ضد باکتریایی در مورد باکتری‌های گرم مثبت بهتر از فعالیت در برابر باکتری‌های گرم منفی است.

فیلم‌های تهیه شده از پوست یونیکام حاوی اسانس‌های ضروری(۱۷)، فیلم‌های کیتوزان حاوی اسانس آویشن، فیلم‌های خوراکی سویا حاوی اسانس آویشن و پونه کوهی فعالیت ضد باکتریایی بسیار خوبی را از خود نشان داده‌اند که با نتایج ما تطابق دارد. فعالیت ضد میکروبی چندین اسانس گیاهی به اثبات رسیده است. اسانس‌های گیاهی با حمله کردن به فسفولیپیدهای موجود در غشای سلولی باعث افزایش نفوذپذیری سیتوپلاسم می‌شوند و نیز موجب ایجاد فعل و انفعالات با آنزیم‌های موجود در دیواره سلولی می‌گردند. بنابراین، مقاومت باکتری‌های گرم منفی به دلیل نقش محافظتی لیپوپلی ساکاریدهای موجود در دیواره سلولی یا پروتئین‌های غشاء خارجی که با محدوده آب گریز به وسیله لایه‌های لیپوپلیساکارید ترکیب می‌شوند، بیشتر است(۲۲). هم‌چنین، اسانس‌های گیاهی توانایی ایجاد اختلال در ساختارهای چربی دیواره سلول باکتریایی که منجر به تخریب غشاء سلولی، نشت سیتوپلاسمی، سلول و در نهایت مرگ سلول باکتری می‌شود را دارا می‌باشند. کاهش PH در باکتری به دلیل اختلالات ایجاد شده در غشاء سلولی می‌باشد که منجر به از دست دادن کنترل فرایندهای سلولی مانند سنتز ATP، انتشار ATP، اختلال در رونویسی DNA و اختلال در سنتز پروتئین می‌شود(۱۷). اسانس‌های ضروری گیاهی می‌توانند به غشاء میتوکندری نفوذ کنند و منجر به نفوذپذیری بیشتر اندامک شوند و روند نشت یون پتاسیم را افزایش دهند. نشت یون پتاسیم به خارج از سلول یک نشانه واضح و روشن از آسیب غشاء و مرگ سلول می‌باشد. اسانس آنغوزه تلخ باعث نفوذپذیری غشاء سلول شده و ساختار غشاء را مختل می‌کند و در نهایت باعث مرگ سلول باکتری می‌شود. این نتایج نشان می‌دهد که اسانس آنغوزه تلخ ترکیب شده با فیلم ژلاتین گزینه مناسبی برای بسته‌بندی ایمن مواد غذایی ضد میکروبی است و هم‌چنین رشد باکتری‌های بیماری‌زای مواد غذایی را کاهش می‌دهد.

## نتیجه گیری

با توجه به تمامی خاصیت‌های فیلم ژلاتین مانند قدرت کشش، ازدیاد طول در نقطه شکست، حلالیت در آب، تورم و نفوذپذیری بخار آب و رنگ سفید فیلم‌ها می‌توان نتیجه گرفت که افزودن اسانس آنغوزه تلخ به فیلم ژلاتین که دارای پیوند عرضی است، باعث کاهش قابل توجه در استحکام کششی، افزایش حلالیت آب، کاهش تورم، افزایش نفوذپذیری بخار آب و افزایش سفیدی رنگ

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 3:49 +0430 on Friday March 23rd 2018

فیلم می‌شود. فیلم‌های ژلاتینی بدون اسانس آنغوزه تلخ، فعالیت ضد اکسیدانی کمی دارند؛ در صورتی که فیلم ژلاتین حاوی اسانس آنغوزه تلخ فعالیت ضد اکسیدانی بسیار بالایی دارد. هم‌چنین فیلم‌های ژلاتینی حاوی اسانس آنغوزه تلخ فعالیت ضد باکتریایی خوبی در مقابل باکتری‌های گرم مثبت و به میزان کمتر در مقابل باکتری‌های گرم منفی دارند.

فیلم‌های هیدروفیل ژلاتینی حاوی اسانس آنغوزه تلخ خواص بسیار خوبی از خود نشان دادند از جمله: مقاومت کششی، مقاومت در برابر نفوذپذیری بخار آب، انعطاف‌پذیری، سفیدی رنگ فیلم و خاصیت ضد اکسیدانی و ضد میکروبی. این فیلم‌های تهیه شده با اسانس آنغوزه تلخ یک ماده مطلوب در بسته‌بندی مواد غذایی می‌باشند.

## تشکر و قدردانی

این مطالعه برگرفته از طرح تحقیقاتی مصوب دانشگاه علوم پزشکی زاهدان به شماره ۶۴۸۷ می‌باشد. بدین‌وسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی زاهدان و هم‌چنین مرکز تحقیقات بیماری‌های عفونی و گرمسیری که ما را در انجام این تحقیق یاری نمودند تشکر می‌نماییم.

## منابع

1. Schrieber R, Gareis H. Gelatine handbook: theory and industrial practice: John Wiley & Sons; 2007.
2. Alemán A, Giménez B, Montero P, Gómez-Guillén M. Antioxidant activity of several marine skin gelatins. LWT-Food Science and Technology. 2011;44(2):407-13.
3. Gómez-Guillén M, Turnay J, Fernández-Dıaz M, Ulmo N, Lizarbe M, Montero P. Structural and physical properties of gelatin extracted from different marine species: a comparative study. Food Hydrocolloids. 2002;16(1):25-34.
4. Rawdkuen S, Sai-Ut S, Benjakul S. Properties of gelatin films from giant catfish skin and bovine bone: a comparative study. European Food Research and Technology. 2010;231(6):907-16.
5. Tharanathan R. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. Trends in Food Science & Technology. 2003; 14(3):71-8.
6. Bigi A, Cojazzi G, Panzavolta S, Rubini K, Roveri N. Mechanical and thermal properties of gelatin films at different degrees of glutaraldehyde crosslinking. Biomaterials. 2001; 22(8): 763-8.
7. Cao N, Yang X, Fu Y. Effects of various plasticizers on mechanical and water vapor barrier properties of gelatin films. Food Hydrocolloids. 2009;23(3):729-35.
8. Marsh K, Bugusu B. Food packaging-roles, materials, and environmental issues. Journal of food science. 2007;72(3):R39-R55.
9. Zhao R, Torley P, Halley PJ. Emerging biodegradable materials: starch-and protein-based bio-nanocomposites. Journal of Materials Science. 2008;43(9):3058-71.
10. Appendini P, Hotchkiss JH. Review of antimicrobial food packaging. Innovative Food Science & Emerging Technologies. 2002; 3(2): 113-26.
11. Hanušová K, Dobiáš J, Klaudisová K. Effect of packaging films releasing antimicrobial agents on stability of food products. Czech J Food Sci. 2009;27:347-9.
12. Gómez-Guillén M, Pérez-Mateos M, Gómez-Estaca J, López-Caballero E, Giménez B, Montero P. Fish gelatin: a renewable material for developing active biodegradable films. Trends in Food Science & Technology. 2009; 20(1):3-16.
13. Solórzano-Santos F, Miranda-Novales MG. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. Current opinion in biotechnology. 2012;23(2):136-41.
14. Tajkarimi M, Ibrahim S, Cliver D. Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food control. 2010;21(9):1199-218.
15. Iranshahy M, Iranshahi M. Traditional uses, phytochemistry and pharmacology of asafoetida (Ferula assa-foetida oleo-gum-resin)A review. Journal of ethnopharmacology. 2011;134(1):1-10.
16. Nazari ZE, Iranshahi M. Biologically active sesquiterpene coumarins from Ferula species. Phytotherapy Research. 2011;25(3):315-23.
17. Ahmad M, Benjakul S, Prodpran T, Agustini TW. Physico-mechanical and antimicrobial properties of gelatin film from the

Downloaded from amuj.arakmu.ac.ir at 3:49 +0430 on Friday March 23rd 2018

skin of unicorn leatherjacket incorporated with essential oils. Food Hydrocolloids. 2012; 28(1): 189-99.
18. Saleem M, Alam A, Sultana S. Asafoetida inhibits early events of carcinogenesis: a chemopreventive study. Life sciences. 2001; 68(16): 1913-21.
19. Tongnuanchan P, Benjakul S, Prodpran T. Properties and antioxidant activity of fish skin gelatin film incorporated with citrus essential oils. Food Chemistry. 2012;134(3):1571-9.
20. Bauer A, Kirby W, Sherris JC, turck, Turck M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. American journal of clinical pathology. 1966;45(4):493-6.
21. Maneerung T, Tokura S, Rujiravanit R. Impregnation of silver nanoparticles into bacterial cellulose for antimicrobial wound dressing. Carbohydrate polymers. 2008; 72(1): 43-51.
22. Rhim JW, Gennadios A, Handa A, Weller CL, Hanna MA. Solubility, tensile, and color properties of modified soy protein isolate films. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2000; 48(10): 4937-41.
23. Altiok D, Altiok E, Tihminlioglu F. Physical, antibacterial and antioxidant properties of chitosan films incorporated with thyme oil for potential wound healing applications. Journal of Materials Science: Materials in Medicine. 2010; 21(7): 2227-36.
24. Gómez-Estaca J, de Lacey AL, López-Caballero M, Gómez-Guillén M, Montero P. Biodegradable gelatin–chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. Food Microbiology. 2010; 27(7):889-96.
25. Avena-Bustillos R, Chiou B, Olsen C, Bechtel P, Olson D, McHugh T. Gelation, oxygen permeability, and mechanical properties of mammalian and fish gelatin films. Journal of food science. 2011;76(7):E519-E24.
26. Hong YH, Lim GO, Song K. Physical properties of Gelidium corneum–gelatin blend films containing grapefruit seed extract or green tea extract and its application in the packaging of pork loins. Journal of food science. 2009; 74(1): C6-C10.
27. Zhang S, Wang Y, Herring J, Oh JH. Characterization of edible film fabricated with channel catfish (Ictalurus punctatus) gelatin extract using selected pretreatment methods. Journal of food science. 2007;72(9):C498-C503.
28. Limpisophon K, Tanaka M, Osako K. Characterisation of gelatin–fatty acid emulsion films based on blue shark (Prionace glauca) skin gelatin. Food Chemistry. 2010;122(4):1095-101.
29. Kavoosi G, Rowshan V. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of essential oil obtained from Ferula assa-foetida oleo-gum-resin: effect of collection time. Food Chemistry. 2013;138(4):2180-7.