

تهیه و ارزیابی نانو کمپلکس پروتئین-کورکومین با استفاده از پیونددهنده عرضی خوراکی

نرگس شاهقلیان^۱، قدیر رجب زاده^۲

۱- نویسنده مسئول: استادیار گروه مهندسی بیوسیستم، دانشگاه شهید چمران اهواز، اهواز، ایران، پست الکترونیک: n.shahgholian@scu.ac.ir

۲- استاد گروه نانوفناوری مواد غذایی، موسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۱/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۱۵

چکیده

سابقه و هدف: بهره‌مندی از تأثیر ترکیبات گیاهی با خواص درمانی، به فراهم زیستی مواد مؤثره آنها بستگی دارد. کورکومین دارای محدودیت‌هایی مانند پایداری و حلالیت کم و حساسیت به شرایط فرآوری و سیستم گوارشی است. این تغییر با هدف بررسی افزایش پایداری کورکومین در نانو کمپلکس آلبومین و با ایجاد پیوند عرضی انجام شده است.

مواد و روش‌ها: برای افزایش حلالیت و پایداری کورکومین، نانو کمپلکس کورکومین-آلبومین تهیه شد. طرح آماری RSM-FCCD جهت بهینه‌سازی سه فاکتور در تهیه نانوذرات استفاده شد. فاکتورها شامل در صد حجمی فاز آلی (۶/۴-۱۱/۱۱)، pH (۳-۷) و نسبت کورکومین (۲۰۰۰-۵۰۰۰ میکروگرم) بودند. برای ایجاد پیوند عرضی از گلو تار آلدئید و تانیک اسید استفاده شد. اندازه ذرات، پتانسیل زتا (به روش DLS)، مورفولوژی ذرات (AFM، FE-SEM) و نیز ایجاد پیوند عرضی (به روش روش نین هیدرین و FT-IR) مورد بررسی قرار گرفتند. بررسی فاکتورها و پاسخ‌ها با استفاده از نرم‌افزار Design Exper.8 انجام شد.

یافته‌ها: در روش تهیه کمپلکس با کورکومین، شرایط بهینه جهت تولید نانوذرات آلبومین در pH دور از نقطه ایزوالکتریک آلبومین و درصد حجمی فاز آلی ۱۱/۴ درصد بدست آمد. برای دستیابی همزمان به کوچکترین ذره با بیشترین میزان درون پوشانی کورکومین و فاکتور مطلوبیت، کارایی بهینه در ۳۴۰۰ میکروگرم کورکومین بدست آمد. کارایی درون پوشانی کورکومین ۷۲/۵۴ درصد و اندازه ذرات کوچکتر از ۲۳۰ نانومتر بودند. کاربرد تانیک اسید، موجب افزایش کارایی درون پوشانی کورکومین در نانو کمپلکس آلبومین شد ($p < 0.05$).

نتیجه‌گیری: نتایج این مطالعه نشان داد که استفاده از نانو کمپلکس آلبومین-کورکومین و تانیک اسید به عنوان عامل پیوندی موجب افزایش درون پوشانی و پایداری کورکومین می‌شود.

واژگان کلیدی: اسید تانیک، آلبومین، کورکومین، نانو سوسپانسیون، نانو کمپلکس، نین هیدرین

• مقدمه

یکی از حوزه‌های کاربردی در صنایع غذایی و دارویی که نانوفناوری بر آن مؤثر بوده، مبحث انتقال مواد غذایی فراسودمند و مکمل‌ها برای افزایش فراهم زیستی یا حلالیت انواع آنتی اکسیدان‌ها، ویتامین‌ها، مواد معدنی و فیتواستروئول‌ها است. در این موضوع، توجه ویژه‌ای به مواد بیوپلیمری در ریزپوشانی مواد زیست فعال شده است و از این رو حامل‌های پروتئینی مورد توجه خاص قرار گرفته‌اند (۱، ۲).

برخی از پروتئین‌های شیر مانند آلبومین سرم گاوی (BSA) توانایی تشکیل پیوند با انواع مولکول‌های کوچک را دارند. آلبومین یک پروتئین کروی است که ساختار اصلی آن

مارپیچ آلفاست. این ترکیب، در خون نقش پیونددهنده و حمل انواع لیگاندهای کوچک را بر عهده دارد و دارای سه مکان ویژه اتصال به یون‌های فلزی، لیپید و نوکلئوتیدها است (۳). به واسطه حضور مقادیر زیاد آمینواسیدهای باردار در آلبومین (لیزین، آرژنین، آسپاراتات و گلو تارات)، این ترکیب قابلیت جذب الکترواستاتیک ذرات با بار مثبت و یا منفی را دارد (۴). آلبومین یک پروتئین اسیدی حل پذیر در pH ۷/۴ است. در ۴۰ در صد اتانول حل می‌شود و می‌توان آن را در در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱۰ ساعت بدون تأثیرات نامطلوب حرارت داد (۵). BSA دارای ۱۷ پیوند دی‌سولفیدی درون

کورکومین برای استفاده در غذاهای فراسودمند استفاده شده و نتایج نشان داده که کمپلکس کورکومین و ایزوله پروتئین سویا باعث افزایش حلالیت در آب و پایداری و جذب کورکومین از روده می‌شود (۱۳). برای ریزپوشانی کورکومین موادی مانند بتا لاکتوگلوبولین شیر (۱۴)، میسل کازئین (۱۵)، مخمر ساکارومیسس سروریه (۱۶) و بتاکازئین شیر (۱۷) مورد استفاده قرار گرفته و نتایج مطلوبی گزارش شده است.

ایجاد پیوند عرضی موجب تشکیل شبکه‌ای می‌شود که در آن نانوذرات پیوند عرضی شده می‌توانند مولکول‌های دیگر را در داخل ساختار خود به دام بیندازند (۱۸). به منظور پایداری نانوذرات پروتئینی و حفظ یکپارچگی ساختار آنها، روش‌های فیزیکی و شیمیایی برای ایجاد پیوند عرضی اتخاذ می‌شود که لزوم توجه به غیر سمی بودن آن از اهمیت برخوردار است (۲). تانیک اسید ($C_{76}H_{52}O_{46}$) پلیمری از مولکول‌های گالیک اسید (Gallic acid) و یک مولکول گلوکز مرکزی است. تعداد مولکول‌های اسید گالیک در ساختار تانیک اسید معمولاً ۸ عدد است. ساختارهای مولکولی متفاوت برای تانیک اسید وجود دارد و این ترکیب قابلیت هیدرولیز به واحدهای گلوکز، گالیک یا الاجیک اسید (Ellagic acid) را دارد. تانیک اسید بدون بو و دارای مزه قابض تلخ است، با پروتئین واکنش داده و کمپلکس نامحلول تشکیل می‌دهد (۱۹).

در این مطالعه هدف تهیه نانوذرات کورکومین تلفیق شده در ساختار آلبومین است. تاکنون اغلب تحقیقات در حوزه کورکومین و افزایش پایداری آن در ساختارهای بیوپلیمری با پیوند دهنده عرضی غیرخوراکی و سمی گلوکارآلدئید مورد بررسی قرار گرفته است. در این پژوهش، عملکرد تانیک اسید به عنوان یک استحکام دهنده عرضی خوراکی مورد بررسی قرار می‌گیرد و تغییرات در اندازه ذرات و کارایی درون‌پوشانی کورکومین پایش می‌شود. در مجموع هدف بررسی توانایی تشکیل نانوکمپلکس پایدار آلبومین با پلی فنل تانیک اسید برای افزایش پایداری و متعاقباً افزایش حلالیت کورکومین بود.

• مواد و روش‌ها

مواد: آلبومین سرم گاوی BSA (fraction V) ۱۲۰۱۸ / ۱/ (MW=۶۶ KD) و کورکومین (C_{1۳}H_۸O_۶) محصول شرکت سیگمای آلمان و حلال‌ها (هیدروکلریک اسید، اتانول، سیتریک اسید، اتیل استات، سدیم هیدروکسید و دیگر مواد شیمیایی) با درجه آزمایشگاهی، تانیک اسید (۷۷۸)، نین هیدرین (۱۰۶۷۶۲)، تری سدیم استات، گلیسین، گلوکار آلدئید نیز محصول شرکت مرک آلمان بودند. نام آلبومین که

مولکولی است که این پل‌های دی‌سولفیدی، نقش مهمی در حفظ ساختار فشرده دارند، چون محدودیت در فاصله و زوایای ایجاد شده در ساختار موجب می‌شود که حالت‌های تاخورده نسبت به ساختار تانخورده پایداری باشد (۶). BSA یک آمفولیت است و بار الکتریکی سطحی آن وابسته به pH است، لذا این امکان در ساختار آن فراهم شده است که بتواند مکان‌های پیوندی بارگذاری و سپس رهایش دارو در بدن را داشته باشد. پیوند هیدروژنی و نیروهای ضعیف واندروالس نقش مهمی در ایجاد برهم‌کنش‌ها دارند (۶). آلبومین سرم گاوی دارای وزن مولکولی ۶۶ کیلودالتون و نقطه ایزوالکتریک ۴/۷ در آب و در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد است (۵). توالی آمینواسیدهای BSA، ۷۶ درصد با سرم آلبومین خون انسان شباهت دارد (۷). آلبومین فراوان‌ترین پروتئین موجود در پلاسمای خون است و در تنظیم فشار اسمزی خون ایفای نقش می‌کند (۸).

بسیاری از تحقیقات نشان می‌دهد که مواد طبیعی پلی‌فنلی، دارای جنبه‌های درمانی ضد التهاب، ضد اکسایش و ضد سرطانی هستند. مطالعات سم‌شناسی، نشان داده است که کورکومین، حتی در مقادیر بالای مصرفی، یک ماده غیر سمی است. بیش از دوهزار سال است که از زردچوبه در پزشکی سنتی در طیف وسیعی با استناد به خواص کورکومینوئید در آن، استفاده شده است (۹). کورکومین از لحاظ شیمیایی یک پلی فنل زرد رنگ به نام دی‌فروروئیل متان (Diferoloyl methan) است که از ریزوم زردچوبه (Turmeric curcuma) (longa) استخراج می‌شود (۱۰). در ریزوم گیاه کورکوما لانگا-ال (Zingiberaceae)، که به نام تومریک مشهور است، سه نوع کورکومینوئید موجود است که مجموع کل و نسبت بین آنها متفاوت است و مهم‌ترین جزء کورکومینوئید، معمولاً کورکومین آن است (۱۱) و دارای فرمول شیمیایی $C_{21}H_{20}O_6$ با وزن مولکولی ۳۶۸/۳۸ گرم بر مول است. کورکومین دارای دو حلقه آروماتیک شامل گروه‌های اورتو-متوکسی فنولیک است که بوسیله هفت کربن اتصال دهنده بتا-دی کتون غیر اشباع در موقعیت آلفا و بتا به هم وصل شده‌اند. گروه‌های "دی کتون" خاصیت تاتومریزاسیون کتون-انول از خود نشان می‌دهند که بسته به شرایط محیطی به اشکال مختلف کنفورماسیونی وجود دارد.

نتایج استفاده از مصرف خوراکی روزانه ۱۲ میلی گرم بر میلی‌لیتر از کورکومین در انسان نشان می‌دهد که تنها به مقدار ۵۰ نانوگرم بر میلی‌لیتر در سرم خون مشاهده می‌شود (۱۲). پروتئین جداسازی شده از سویا جهت ریزپوشانی

و فاکتورهای معنی‌دار) تجزیه رگرسیونی انجام شد. در نهایت کل فرایند بهینه‌سازی شد. هدف در این روش کمینه‌یابی اندازه ذرات و بیشینه‌یابی درصد درون‌پوشانی کورکومین با وزن یکسان ($w = 1$) بود و اعتبار شرایط بهینه با مقدار مطلوبیت پاسخ‌ها در محدوده صفر تا یک بررسی شد.

جدول ۱. ترجمه سطوح واقعی فاکتورها به سطوح کدبندی شده (متغیرهای مستقل فرایندهای بهینه‌سازی و مقادیر آنها)

فاکتورها	نماد	کد و سطح مربوطه		
		-۱	۰	+۱
pH	A	۳	۵	۷
(mg) کورکومین	B	۲	۳/۵	۵
درصد حجمی فاز آلی (r)	C	۶/۴	۸/۷۵	۱۱/۱۱

پیوند میان شبکه نانوذرات آلبومین: نمونه نانوذرات آلبومین حاوی کورکومین، با استفاده از گلو تار آل‌دئید (۲۵ درصد وزنی-حجمی) به میزان ۰/۷۵ میلی گرم در هر میلی گرم آلبومین، در دمای اتاق، با سرعت هم‌زدن ۵۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۲۴ ساعت پیوند عرضی شدند (۲۵). به منظور جایگزینی عامل پیوند عرضی گلو تار آل‌دئید، با مواد غیرسمی و ایمن، استفاده از اسید تانیک در دستور کار قرار گرفت که بر روی نمونه‌های بهینه از نظر اندازه ذره و درصد درون‌پوشانی کورکومین در این روش اعمال شد. پس از یافتن نقاط بهینه، سوسپانسیون آلبومین-کورکومین به طور مشابه تهیه و محلول آبی تانیک اسید (۲۰-۱۰ درصد وزنی-وزنی BSA) اضافه شد و به مدت ۳۰ دقیقه بر روی همزن (۵۰ درجه سانتی‌گراد، ۵۰۰ دور بر دقیقه) قرار گرفت. اندازه ذرات حاصل در محلول، پس از ایجاد پیوند عرضی و صوت‌دهی به مدت ۳۰ ثانیه، ثبت شد و نمونه‌ها پس از یک-شبهانه روز نگهداری در دمای یخچال، (۳۰ دقیقه، با نیروی نسبی سانتریفوژی $RCF = 7155/2$) سانتریفوژ شدند و رسوب نرم حاصل، خشک شد (۲۸-۲۶).

تعیین اندازه ذرات و چگالی بار سطحی: قطر متوسط و توزیع اندازه ذرات، با استفاده از زتاسایز پراکنش نوری پویا Instruments Ltd., UK (DLS, Zetasizer Nano, Malvern در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد، طول موج ۶۳۳ نانومتر و زاویه تشخیص ۹۰ درجه، تعیین شد. سل کوارتز برای تعیین اندازه ذرات استفاده شد. در سوسپانسیون اولیه بدون رقیق‌سازی، قطر متوسط ذرات بر اساس شدت گزارش گردید. از همین دستگاه با استفاده از مکانیسم ترکیبی سرعت‌متر دوپلر لیزر و آنالیز فازی پراکنش نوری، برای اندازه‌گیری بار سطحی ذرات نیز استفاده

در مطالب این متن ذکر می‌شود، اختصار نام آلبومین سرم گاوی است.

تهیه نانوکمپلکس آلبومین-کورکومین: نانوذرات آلبومین به روش امولسیون‌سازی-تبخیر با انجام اصلاحاتی نسبت به روش ارائه شده توسط Zhang و همکاران تهیه شدند (۲۴-۲۰). محلول کورکومین در حلال اتیل‌استات آ ماده و در حجم‌های مورد نیاز به محلول آبی آلبومین (۵/۰ درصد وزنی-حجمی، ۵۰ میلی‌لیتر) که قبلاً تهیه و فیلتر شده و یک شبانه روز دهیدراته شده بود، اضافه شد. مخلوط به مدت ۲ دقیقه با اولتراتوراکس (۵۰۰ دور بر دقیقه)، هم‌وزن شد و سپس امولسیون خام اولیه به محفظه دو جداره ژاکت‌دار (با دمای تنظیمی ۱۰ درجه سانتی‌گراد)، اضافه گردید و به مدت ۷ دقیقه توسط پروب MS-۷۰ در معرض امواج فراصوت قرار گرفت. برای تبخیر حلال، مخلوط به تبخیرکننده چرخان (Buchi labortechnik, switzerland) منتقل شد (۳۰ دقیقه، ۴۵ درجه سانتی‌گراد). اندازه ذرات و پتانسیل زتا در نانوسوسپانسیون بدست‌آمده بررسی شد و به روش خشک‌کردن انجمادی خشک شد. این پودر برای انجام سایر آزمایشات در فریزر ۴- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

ارزیابی تأثیر فاکتورهای مختلف بر اندازه ذرات و کارایی درون‌پوشانی کورکومین در روش تهیه نانوذرات آلبومین بر اساس طراحی آزمایش‌ها به روش سطح پاسخ در ۲۰ نمونه آزمایشی مختلف که در سه فاکتور (طبق جدول ۱) با هم متفاوت بودند، بررسی شد.

فاکتورها و دامنه آن‌ها بر اساس هدف استفاده از کمترین میزان مصرف حلال و نیز کمترین میزان ممکن pH و نیز بیشترین مقدار ممکن استفاده از کورکومین بر اساس پیش‌تست انتخاب شد. کورکومین در محلول‌های آبی متحمل واکنش تجزیه نیز می‌شود و با افزایش pH نرخ تجزیه افزایش می‌یابد (۱۲). در همگی این آزمایش‌ها وزن کلی آلبومین و حجم کار ثابت در نظر گرفته شدند. این روش بدون حضور ماده مؤثره کورکومین نیز، برای تهیه نانوذرات کنترل استفاده شد.

طرح آزمایش‌روش سطح پاسخ در بررسی اندازه ذره و کارایی درون‌پوشانی کورکومین: مطالعه جامعی برای ارزیابی اندازه ذرات و کارایی درون‌پوشانی کورکومین با تغییر سه فاکتور (جدول ۱)، در قالب طرح آماری سطح پاسخ-طرح مرکب رویه محور (RSM-FCCD) انجام شد. با استفاده از نرم‌افزار Design Expert 8.0 (software of Stat Ease® Inc., Minneapolis, USA) ارزیابی‌های آماری انجام شد و برای برازش داده‌ها و بررسی فاکتورها (به منظور بررسی همبستگی

دمای اتاق نگهداری شد. مقدار کمی از سوسپانسیون (شامل نمونه پیوندشده با گلو تار آلدئید)، به طور یکنواخت روی یک صفحه میکا که روی یک دیسک نمونه سوار شده بود، پخش شد و نمونه در دمای اتاق خشک شد. در این کار میکروسکوپ نیروی اتمی (full model no.0101/A, ARA Pajoohehsh, Iran) مورد استفاده قرار گرفت. یک کانتیلور با tip سیلیکونی micromash با سطح مقطع مربعی و دارای پوشش آلومینیومی انعکاس دهنده استفاده شد. تصاویر در مد تپینگ و با سرعت روبش ۱ line/s ثبت شدند. با استفاده از نرم افزار Nanoara V2، تصاویر دوبعدی برای تخمین اندازه ذرات استفاده شد. تصویربرداری سه بعدی نیز به منظور بررسی توپولوژی سطحی ذرات صورت گرفت (۳۰).

آماده سازی نمونه برای تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدان: الکتروگراف نانوذرات پودری استحکام دهی شده با تانیک اسید با استفاده از FE-SEM (MIRA3, TSCAN, Czech Republic)، ثبت گردید. نمونه نانوذرات به یک نوار کربنی هادی الکتریسیته قرار گرفته روی اسنتاب منتقل شد و با کوتر (SC7620, England) تحت خلأ، با طلا پوشش نانومتری داده شد. سپس مشاهده میکروسکوپی نمونه انجام شد. روبش در ولتاژ ۲۰ کیلوولت انجام شد (۳۱).

ارزیابی شاخص ایجاد پیوند عرضی: به منظور تعیین شاخص ایجاد پیوند عرضی در نمونه های نانوذرات تهیه شده به دو روش ذکر شده (شامل گلو تار آلدئید، و تانیک اسید)، آزمون نین هیدرین انجام شد. نین هیدرین به طور گسترده ای برای تعیین اسیدهای آمینه به روش رنگ سنجی استفاده می شود. واکنش نین هیدرین در طی سه مرحله آلدئید، دی اکسید کربن و نین هیدرین احیا تشکیل می شود. رنگ آبی ارغوانی نشانگر پیشرفت این واکنش است. بر اساس مقایسه طیف سنجی در طول موج ۵۶۷ نانومتر، تعداد گروه های آمینوی موجود در نمونه ها قبل و بعد از پیوند عرضی، برای محاسبه شاخص پیوند عرضی استفاده شد (۳۲، ۳۳).

با استفاده از اسپکتروفتومتر UV-vis (Shimadzu, UV-1601, Japan)، جذب در طول موج ۵۷۶ نانومتر خوانده شد. غلظت اسیدهای آمینه آزاد با استفاده از معادله ۳ محاسبه شد که $[NH_2]$ مقدار گروه های آزاد اسید آمینه (بر اساس ماده خشک (میلی مول بر گرم)، A، مقدار عددی جذب، V حجم محلول (میلی لیتر)، و ϵ جذب مولی رنگ آبی ارغوانی است که ۱۶۴۰ (میلی لیتر/مول سانتی متر) در نظر گرفته شد. l طول مسیر (۱ سانتی متر) و m جرم نمونه (گرم) بود. مقدار $[NH_2]$

شد. سل یکبار مصرف دو شاخکی برای نمونه بکار گرفته شد (۲۹).

تعیین کارایی درون پوشانی کورکومین در شبکه نانوذرات آلبومین: کارایی درون پوشانی کورکومین تلفیق شده در نانوذرات در نمونه های نانوذره بازسازی شده به روش اسپکتروسکوپی UV-Vis بررسی شد. منحنی استاندارد غلظت کورکومین در محلول اتانول نیز ترسیم و معادله استاندارد آن بدست آمد. ابتدا استوک محلول کورکومین به غلظت ۱۰ قسمت در میلیون، تهیه شد. سپس با رقیق سازی نمونه به ترتیب نمونه های ۱ تا ۹ قسمت در میلیون تهیه شد و با خواندن مقدار جذب به روش طیف سنجی UV-Vis منحنی استاندارد غلظت در برابر جذب رسم و معادله استاندارد بدست آمد.

از نمونه های تهیه شده، سوسپانسیون ۴/۵ میکرومولار در بافر فسفات ۱۰ میلی مولار تهیه و طیف سنجی پس از نگهداری نمونه به مدت یک ساعت و پس از افزودن محلول الکلی و سانتریفوژ نمونه انجام شد. برای اندازه گیری کورکومین آزاد، از محلول رویی نمونه استحکام دهی شده با تانیک اسید نیز، برای طیف سنجی و محاسبه درصد درون پوشانی کورکومین، استفاده شد. برای اندازه گیری کورکومین آزاد، نانو سوسپانسیون تهیه شده اولیه سانتریفوژ شد (۲۰ دقیقه، ۱۵۰۰ دور بر دقیقه با شعاع سانتریفوژی ۵۰ میلی متری)، محلول رویی حاصل در اتانول حل شده و با استفاده از رنگ سنجی در طول موج ۴۲۶ نانومتر، غلظت کورکومین آزاد بر اساس منحنی استاندارد کورکومین بدست آمد.

کارایی درون پوشانی کورکومین (EE) و میزان بارگذاری در نانوذرات که نسبت کورکومین تلفیقی به کل ماده جامد را می-سنجد، با استفاده از معادلات ۱ و ۲ محاسبه شد، که در این معادلات $W_{total\ CN}$ وزن کورکومین کل، $W_{free\ CN}$ وزن کورکومین آزاد و W_n وزن نانوذرات را نشان می دهند (۲۲، ۲۰).

$$EE(\%) = \frac{W_{total\ CN} - W_{free\ CN}}{W_{total\ CN}} \times 100 \quad (1)$$

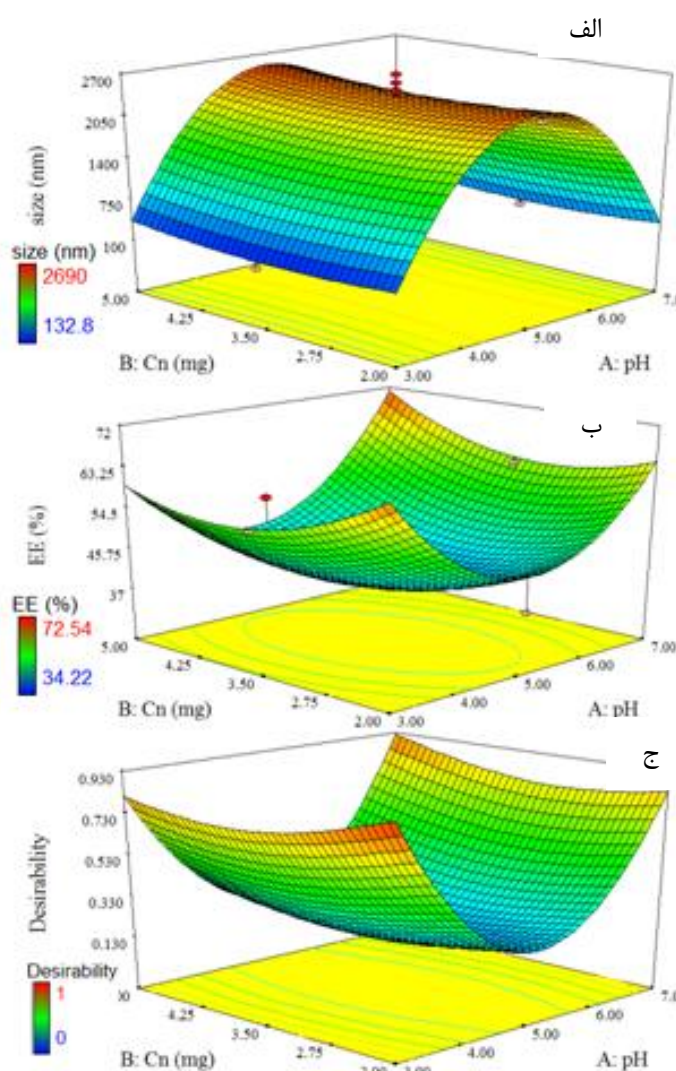
$$LE(\%) = \frac{W_{total\ CN} - W_{free\ CN}}{W_n} \times 100 \quad (2)$$

بررسی مورفولوژی و توپوگرافی سطحی نانوذرات: مطالعات توپولوژی و اندازه ذرات سوسپانسیون نانوذرات حاوی کورکومین با میکروسکوپ نیروی اتمی AFM و مطالعات مورفولوژی و اندازه ذرات نانوپودر حاصله توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدان SEM انجام شد.

آماده سازی نمونه برای تصویربرداری با میکروسکوپ نیروی اتمی (AFM): سوسپانسیون تهیه شده از نانوذرات آلبومین-کورکومین در دو pH ۵ و ۷ به مدت ۳۰ دقیقه در

• یافته‌ها

اندازه ذره و کارایی درون پوشانی کورکومین به روش سطح پاسخ: مطالعه جامعی برای ارزیابی اندازه ذرات و کارایی درون پوشانی کورکومین با تغییر سه فاکتور در قالب طرح آماری سطح پاسخ- طرح مرکب مرکزی RSM-FCCD انجام شد. فاکتورها و پاسخ‌ها در نرم‌افزار Design Exper.8 بررسی و با معادله چند جمله‌ای درجه دوم برازش شدند. ارزیابی تأثیر فاکتورهای مختلف بر اندازه ذرات و کارایی درون پوشانی کورکومین در شکل ۱ ارائه شده است.



شکل ۱. طرح سه بعدی سطح پاسخ تأثیر همزمان pH و محتوای کورکومین در نقطه مرکزی نسبت فازی (۸/۷۵) روی الف) اندازه نانوذرات آلبومین ب) درصد تلفیق کورکومین در ذرات آلبومین و ج) مطلوبیت-سنجی برای کاهش اندازه ذرات و افزایش درصد تلفیق کورکومین در ذرات، به طور همزمان

برای تعیین شاخص ایجاد پیوند عرضی (CI) استفاده شد (معادله ۴) که در آن محاسبه بر اساس مقایسه با نمونه بدون پیوند عرضی (native) انجام شده است (۳۴، ۳۵).

$$[NH_2] = AV/\epsilon lm \quad (3)$$

$$CI (\%) = [NH_2]_{native} - [NH_2]_{cross-linked} / [NH_2]_{native} \quad (4)$$

مطالعه تغییر رفتار گروه‌های عاملی: طیف تبدیل فوری مادون قرمز برای کورکومین خالص، BSA و نانوذرات شاهد و حامل کورکومین (پیوند عرضی شده/نشده)، با استفاده از اسپکتروفتومتر (Thermo Nicolet, AVATAR, 370 FT-IR, USA) FT-IR ثبت شد. نمونه‌ها با KBr ساییده شده و با استفاده از پرس هیدرولیکی به قرص تبدیل شدند. طیف عبوری نمونه‌ها، در دمای معمولی و در دامنه اعداد موج $[cm^{-1}] 4000-500$ ثبت گردید (۳۶).

ارزیابی پایداری ذرات: به منظور بررسی پایداری کورکومین درون پوشانی شده در آلبومین، اندازه نانوذرات و بقای کورکومین طی نگهداری محصول نهایی بررسی شد. بدین منظور یک ویال دربسته از نانوذرات خشک شده به روش انجمادی، در یک ظرف دربسته در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد و رطوبت نسبی ۶۰ درصد به مدت یک‌ماه نگهداری شد (guidelines issued by ICH, 1993). اندازه ذرات و شاخص بس‌پاشیدگی پس از طی این مدت ثبت شد. میانگین داده‌ها $\pm$ انحراف معیار در سه تکرار ارائه شد. نانوذرات، پس از صوت‌دهی معمول به مدت ۲۰ ثانیه در آب دیونیزه بازسازی شده و اندازه ذرات در سوسپانسیون حاصل با استفاده از زتاسایزر (Malvern, UK) بررسی شد (۳۷).

تجزیه و تحلیل آماری: تجزیه و تحلیل آماری در بهینه‌سازی مقدار کورکومین بارگذاری شده در نانوذرات آلبومین به روش سطح پاسخ با استفاده از نرم‌افزار Design Expert 8.0 (software of Stat Ease® Inc., Minneapolis, USA) انجام شد و برای برازش داده‌ها و بررسی فاکتورها (به منظور بررسی همبستگی و فاکتورهای معنی‌دار) تجزیه رگرسیونی انجام شد. تجزیه و تحلیل آماری نمونه استحکام‌دهی شده بر اساس میانگین سه تکرار انجام شد. تجزیه واریانس یک‌سویه، با استفاده از نرم‌افزار SPSS، نسخه ۲۱، SPSS Inc., Chicago, IL, USA) انجام شد. مقایسه میانگین‌ها با آزمون دانکن در سطح معنی‌داری $p < 0.05$ انجام شد.

آلبومین، غلظت واکنش دهنده هاست. این شاخص برای نمونه‌های حاوی گلو تار آل‌دئید و تانیک اسید به ترتیب ۷۱/۳، ۵۷/۵ درصد به دست آمد. نین هیدرین، سریعاً با گروه‌های لیزین در دسترس واکنش می‌دهد.



شکل ۲. از راست به چپ: سوسپانسیون نانو کورکومین پس از استحکام دهی با تانیک اسید و گلو تار آل‌دئید

مورفولوژی و توپوگرافی سطحی نانوذرات آلبومین حاوی کورکومین: مورفولوژی نانوذرات آلبومین که در تهیه آنها عامل تقویت ساختاری تانیک اسید استفاده شده بود در شکل ۳ به روش میکروسکوپ الکترونی گسیل میدان نشان داده شده است. تأثیر تانیک اسید بر نانو ساختار نشان داد که نظم‌آرایی مجدد ذرات پروتئینی موجب ایجاد ذرات کروی در یک ساختار فشرده شده است. در این تصاویر متوسط اندازه ذرات در حدود ۵۳/۳۸ نانومتر برآورد شد (شکل ۳). در حالی که، متوسط اندازه ذرات به روش DLS در حدود ۲۰۰ نانومتر گزارش شد. اگر ذرات در حین خشک کردن دچار شوک الکتریکی و ایجاد تجمعات خوشه‌ای نشوند، نتایج اندازه ذرات در روش DLS معمولاً بیش از روش SEM است.

مطالعه تغییر رفتار گروه‌های عاملی با ایجاد پیوند عرضی: طیف‌سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز برای مشخصه‌یابی باندهای موجود در نانوذرات آلبومین، قبل و پس از ایجاد پیوند عرضی استفاده شد. به منظور بررسی تغییرات شیمیایی رخ داده پس از ایجاد پیوندهای عرضی، طیف‌های کورکومین، آلبومین، نانوذرات شاهد و پیوند شده با تانیک اسید در شکل ۴ ارائه شده است. مقایسه پیک‌ها در نمونه‌های مختلف نشان داد که طیف‌های IR آمیدی (به ویژه آمید III)، در هر نمونه منحصر به فرد هستند و این بدان معناست که مکان‌های N-H، در دسترس‌ترین مکان‌ها برای ایجاد پیوندهای عرضی هستند.

تغییر همزمان در سطوح کورکومین و pH به شکل درجه دو و متقابل، موجب تغییرات قابل توجه در ریزپوشانی کورکومین شد ($P < 0.05$). نتایج تجزیه و تحلیل واریانس یک‌سویه در بررسی کارایی درون‌پوشانی کورکومین، مقادیر بالای ضریب تبیین ($R^2 = 0.9955$) و غیر معنی‌دار بودن عدم برازش، بیانگر مناسب بودن مدل برای شرح سطح پاسخ بود. معادله نهایی (۵) درصد درون‌پوشانی کورکومین را در قالب فاکتورهای کدبندی شده (جدول ۱) نشان می‌دهد.

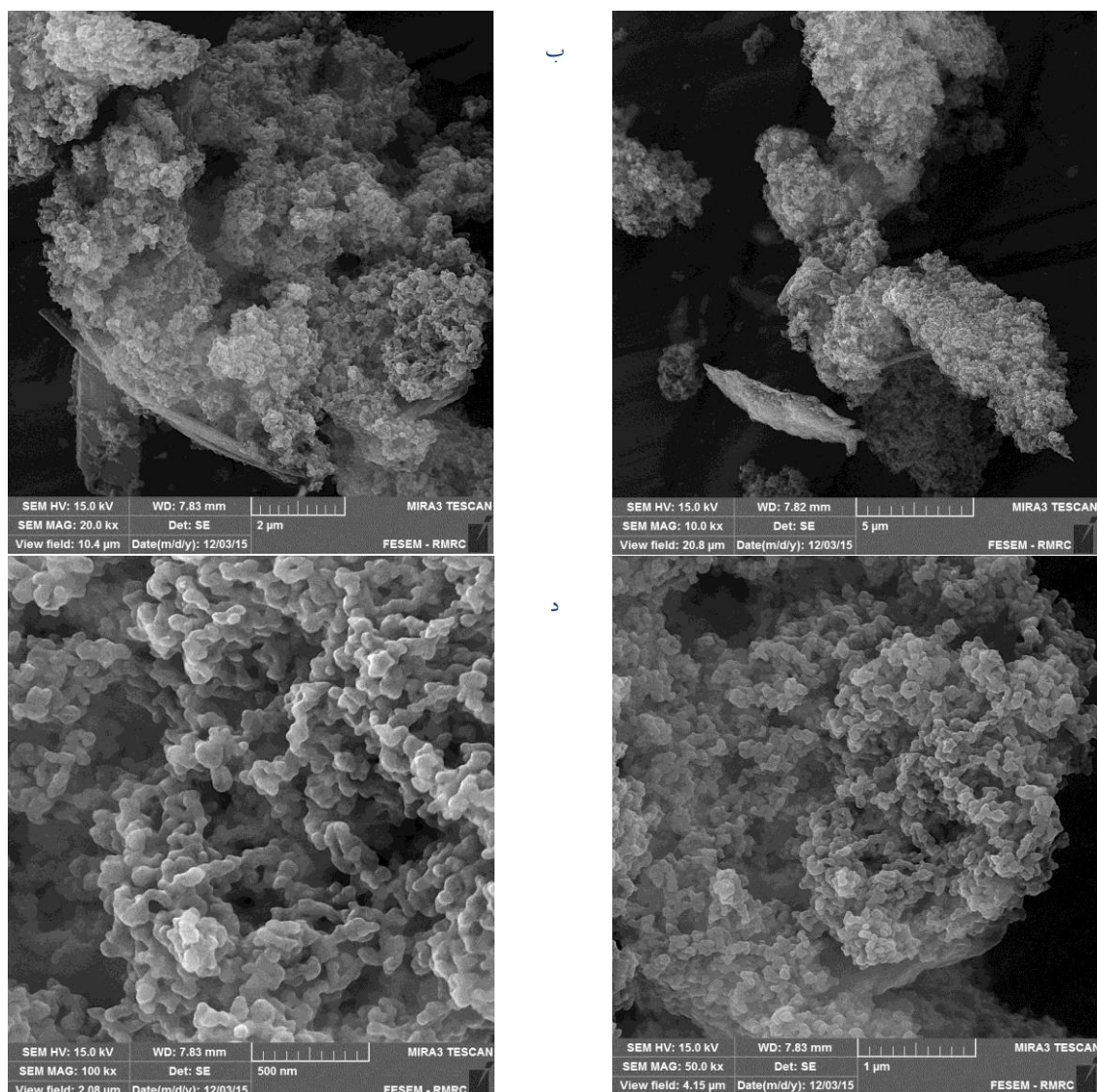
(۵)

$$B^2 + 7/23 A^2 + 19/61 AB + 3/57 AB + 38/67 = \text{درون پوشانی} (%)$$

بر طبق نتایج سطح پاسخ و مطلوبیت مورد نظر، شرایط بهینه (برای دستیابی به حداقل اندازه ذرات و حداکثر کارایی درون‌پوشانی کورکومین)، در گستره ۱۰/۰۴ تا ۱۰/۶۳ درصد از حجم حلال آلی، pH ۷ و ۳/۴ میلی گرم محتوای کورکومین (در مقدار ثابت نیم درصد آلبومین) قرار داشت. در این حالت اندازه ذرات کمتر از ۲۳۰ نانومتر و متوسط کارایی درون‌پوشانی کورکومین در نانوذرات آلبومین ۷۲/۵۴ درصد و گنجایش بارگذاری (ظرفیت بارگذاری نانوذرات) ۱۴/۵۰۸ میکروگرم بر میلی گرم بود. تهیه اندازه ذرات کوچک‌تر، تحت تأثیر تغییرات pH قرار گرفت. این pH در گستره نقاط بسیار دورتر از نقطه ایزوالکتریک آلبومین قرار داشت. چون در نواحی نزدیک به نقطه ایزوالکتریک، برهم کنش پروتئین-پروتئین به‌جای برهم کنش آب-پروتئین غالب می‌شود. در pH ۷ و ۳ بدلیل تدافعات الکترواستاتیکی اندازه ذرات کوچک شد.

در نمونه نانوذرات آلبومین پیوند شده با تانیک اسید (Ta)، متوسط اندازه ذرات کمتر از $200 \pm 4/8$ نانومتر بود و با افزایش مقدار تانیک اسید، اندازه ذرات به شکل معنی‌داری افزایش یافت و به مقدار ۸۰۰ تا ۹۵۰ نانومتر رسید. نکته قابل توجه این بود که روش بکار رفته توانایی بسیار خوبی در درون‌پوشانی کورکومین داشت و کارایی درون‌پوشانی به $93 \pm 4/1$ درصد رسید. سوسپانسیون نانوذرات آلبومین حاوی کورکومین، تهیه شده با انواع عوامل ایجاد پیوند عرضی در شکل ۲ نشان داده شده است.

ارزیابی شاخص ایجاد پیوند عرضی در نانوذرات آلبومین با آزمون نین‌هیدرین: به منظور تأیید واکنش عوامل ایجاد پیوند با نانوذرات و تخمین درجه ایجاد پیوند عرضی، آزمون نین‌هیدرین انجام شد. نتایج نشان داد که در دمای ثابت، مهم‌ترین عامل تأثیرگذار بر درجه ایجاد پیوند عرضی بین



شکل ۳. تصاویر FE-SEM نانوذرات آلومین پیوندشده با تانیک اسید (الف) ۱۰KX (ب) ۲۰KX (ج) ۵۰KX (د) ۱۰۰KX ، MPS: ۵۳/۳۸ نانومتر (Mean Particle Size)

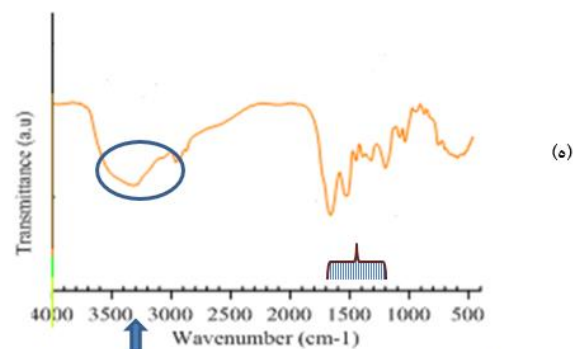
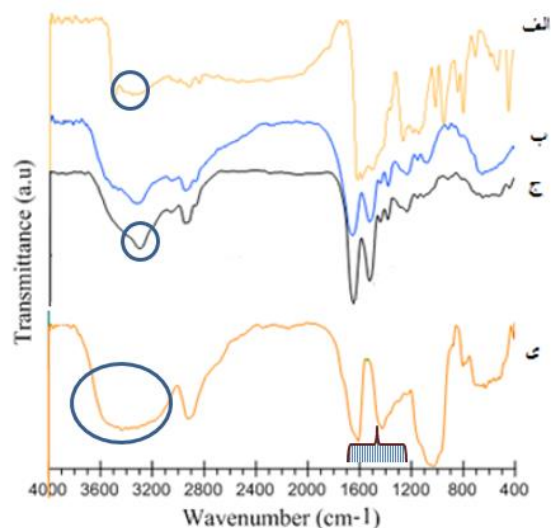
در نمونه حاوی تانیک اسید (شکل ۵-ه) بارزترین تغییر در پهن‌شدگی باند مربوط به گروه‌های هیدروکسیل مشهود است. در ناحیه اثر انگشت در ناحیه باند C=O متقارن، کاهش عدد موج از 1451 cm^{-1} و 1391 cm^{-1} به 1446 cm^{-1} و 1388 cm^{-1} مشاهده شد و باند آمید III از 1242 cm^{-1} به اعداد موج پایین‌تر در حدود 1319 cm^{-1} منتقل شد. در واقع حضور گروه‌های هیدروکسیل تانیک اسید موجب پهن‌شدگی باند گروه‌های هیدروکسیل می‌شود و ارتعاش‌های کششی پیوندهای قوی‌تر، نسبت به پیوندهای ضعیف‌تر در انرژی بالاتر و در نتیجه در طول موج کوتاه‌تر ظاهر می‌شوند.

طیف IR در آلومین شامل ۴ پیک مشخصه در اعداد موج $3320, 1664, 1534$ و 1242 cm^{-1} است که به ترتیب نماینده باند هیدروکسیل، آمید I، II و III هستند (شکل ۴-ب). سه باند اول در نانوذرات شاهد نسبت به آلومین، به طور مشخص به نواحی با عدد موج بالاتر، تغییر مکان دادند (شکل ۴-ج).

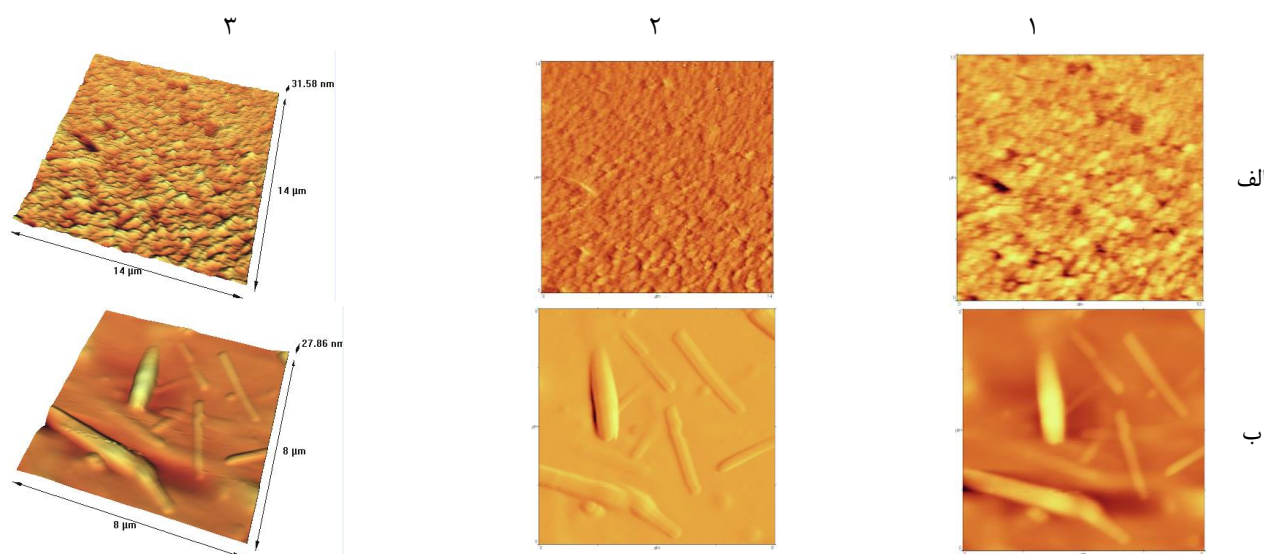
در نانوذرات پیوندشده با گلوکارآلدئید در مقایسه با نمونه شاهد، تغییر مشخصی در کشش هیدروکسیل (قدرت و شدت)، مشاهده شد که به معنای پیوند گروه هیدروکسیل آن با آلومین بود: باند آمید II در نمونه پیوند شده با گلوکارآلدئید از 1534 cm^{-1} به عدد موج پایین‌تر (1524 cm^{-1}) منتقل شد (شکل ۴-د).

ارزیابی پایداری نانوذرات کورکومین در سوسپانسیون:
توپوگرافی سطحی نانوذرات با استفاده از روش AFM مورد بررسی قرار گرفت. مطالعه شامل بررسی نمونه سوسپانسیون نانوذرات در pH ۷ بود. تصویر سه بعدی ناهمواری‌های سطحی را نشان می‌دهد. ذرات غالباً به صورت جداگانه مشاهده شد و ذرات بزرگ احتمالاً از تجمع ذرات کوچک ایجاد شده است. این بررسی علاوه بر تأیید ساختار کروی ذرات، نتایجی مورد انتظار و مشابه با اندازه‌گیری ذرات به روش DLS را ارائه نمود. کورکومین بلوری شکل بلند چند میکرونی، نیز در این ذرات مشاهده نشد، که این موضوع نشان داد که کورکومین بخوبی در شبکه پروتئینی محبوس و با آن تلفیق شده است (شکل ۵-الف).

نانو سوسپانسیون حاوی ذرات کورکومین پس از نگهداری به مدت ده روز در حضور پایدارکننده گلو تار آلدئید، متحمل بلورینگی شده و بتدریج از حالت آمورف به شکل بلورهای سوزنی کشیده به طول و قطر نسبی 2450×250 نانومتر تبدیل شد (شکل ۵-ب). به منظور بررسی پایداری کورکومین درون پوششانی شده در آلبومین، اندازه نانوذرات و بقای کورکومین طی نگهداری محصول نهایی بررسی شد. اندازه ذره در نمونه پودری تهیه شده به روش بهینه، پس از نگهداری در شرایط ذکر شده مجدداً اندازه‌گیری شد و تغییر معنی‌داری در اندازه ذرات و میزان درون پوششانی کورکومین مشاهده نشد. ارزیابی در نمونه پودر تأیید کرد که ذرات اندازه و محتوای کورکومین را به خوبی حفظ کردند.



شکل ۴. طیف IR (الف) کورکومین؛ (ب) آلبومین؛ (ج) نانوذرات آلبومین شاهد؛ (د) نانوذرات آلبومین پیوندشده با گلو تار آلدئید و (ه) طیف IR نانوذرات آلبومین پیوند شده با اسید تانیک (دایره آبی و گروه به ترتیب اعداد موج بر حسب cm^{-1}) در ناحیه هیدروکسیل ۳۳۲۰ و آمیدی (۱۶۶۴-۱۵۳۴-۱۲۴۲) را نشان می‌دهند.



شکل ۵. الف- تصاویر AFM از نانوذرات آلبومین حاوی کورکومین در سوسپانسیون، در pH ۷؛ و ب- تصاویر AFM از سوسپانسیون نانوذرات آلبومین حاوی کورکومین پایدارشده با گلو تار آلدئید، پس از ده روز نگهداری، توپوگرافی (۱) سطحی دو بعدی؛ (۲) نوسانی و (۳) سه بعدی

• بحث

بررسی نوع پیوندهای آلومین-کورکومین

نوع پیوندها: ساختار کورکومین، حاوی گروه‌های متوکسی فنیل، هیدروکسی فنیل و بتادی‌کتون (کربونیل و انولیک) است و وجود تاتومری کتو-انول در این ترکیب حالت مناسبی برای پیوندهای مستقیم ایجاد می‌کند. تاتومریزاسیون عملکردهای شیمیایی مازاد برای کورکومین ایجاد می‌کند: قسمت میانی مولکول به دو حالت گیرنده و دهنده در پیوند هیدروژنی عمل می‌کند و اجازه می‌دهد کورکومین در حمله نوکلئوفیلی به عنوان پذیرنده میشلی عمل کند و با پیوند کووالانسی به سولفیدریل‌های سیستمین هسته‌دوست پیوند شود (۳۸).

پروتئین کروی آلومین شامل یک سطح باردار با گروه‌های قطبی و یک هسته با زنجیره‌های آبگریز است. با افزودن حلال، هیدراسیون و الکترولیز پروتئین بر هم می‌ریزد، پتانسیل زتا کاهش می‌یابد و قسمتی از زنجیره‌های آبگریز به سطح می‌آیند (۳۹). در نتیجه، جذب بین مولکول‌های پروتئین افزایش می‌یابد و تجمعات نسبتاً کوچک پروتئینی شروع به شکل‌گیری می‌کنند و اندازه ذرات پروتئینی افزایش می‌یابد. در این مرحله کورکومین در داخل ذرات پروتئینی به دام می‌افتد و برخی از مولکول‌ها به مناطق پیرامونی آن‌ها متصل می‌شود و مقداری نیز به حالت آزاد باقی می‌ماند. برخی از ذرات اعم از مونومری یا الیگومری، مستعد برگشت به کنفورماسیون اصلی هستند. پس از استحکام‌دهی پیوندهای آمیدی توسط عوامل ایجادکننده پیوند، از تغییر شکل ذرات جلوگیری به عمل می‌آید. افزایش قطبیت دیسپرسیون پس از تبخیر حلال، شرایط را از لحاظ ترمودینامیکی برای برهم‌کنش‌های آبگریز بین مولکول‌های کورکومین و گروه‌های غیرقطبی فراهم می‌آورد و برهم‌کنش بین مولکول‌های کورکومین موجب رسوب کورکومین غیرپیوندی می‌شود (۴۰).

آلومین و کورکومین هر دو در pH خنثی دارای بار منفی هستند. در این حالت برهم‌کنش‌های آبگریز کاهش می‌یابد و تدافعات الکترواستاتیک در درون نانوذرات افزایش می‌یابد و ذرات متلاشی می‌شوند. پس از ایجاد پیوند عرضی با گلو تار آلدئید بین ذرات، پیوند ایجادشده از تجزیه ذرات جلوگیری می‌کند (۴۱).

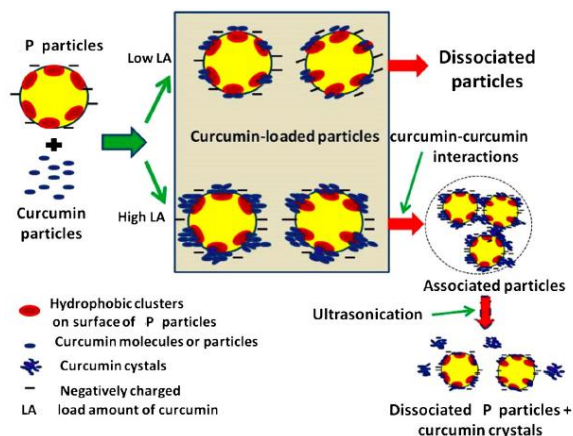
بررسی پتانسیل زتا، ظرفیت بارگذاری و پیوند عرضی:

در نمونه نانوذرات آلومین پیوندشده با گلو تار آلدئید، تأثیر عامل ایجاد پیوند عرضی بر ظرفیت بارگذاری در نانوذرات نیز نشان داد که افزایش نسبت گلو تار آلدئید تا مقدار خاصی

موجب افزایش ظرفیت بارگذاری شد و مقدار مازاد آلدئید تنها موجب افزایش شاخص پاشیدگی در نانوذرات شد. در فرمول‌های متفاوت کارایی درون‌پوشانی 3 ± 16 تا 4 ± 59 درصد برآورد شد. نتایج مشابه توسط دیگر محققان گزارش شده است (۴۲). Teng و همکاران (۲۰۱۲)، نشان دادند که پس از افزودن گلو تار آلدئید به میزان ۰ تا ۱۵۰ درصد، میزان بار سطحی نانوذرات از $28/3$ - به $44/2$ - میلی‌ولت افزایش یافت. غلظت‌های بالای این ماده با مصرف گروه‌های آمینواسید، بار منفی کلی را بیشتر می‌کند. بر اساس نتایج حاصله در آزمون‌های متعدد، می‌توان این‌طور نتیجه‌گیری نمود که غلظت کم گلو تار آلدئید نقش اساسی در حفظ اندازه ذرات دارد. پتانسیل زتای نمونه شاهد و نمونه حاوی کورکومین نزدیک به هم بود و اختلاف زیادی بین آن‌ها دیده نشد ($24/9$ -). بنابراین کورکومین برهم‌کنش‌های الکترواستاتیکی با گروه‌های باردار پروتئین داده است و با حضور کورکومین پتانسیل زتای کل تغییر چندانی نکرده است (۴۰).

نانوذرات پروتئینی، تشکیلات فشرده نزدیک به هم هستند که مولکول گلو تار آلدئید به عنوان یک مولکول کوچک براحتی به گروه‌های عاملی دسترسی پیدا می‌کند. گلو تار آلدئید با حمله نوکلئوفیلی به گروه‌های آمینوی پروتئین، کندانسیون آلدول یا افزایشی از نوع میشل-شیف-باز، ایجاد می‌کند (۴۳). در یک بررسی، پایش پیوند عرضی نمونه‌های کازئین (5mg/ml) با گلو تار آلدئید، توسط کروماتوگرافی غربال مولکولی انجام شد. نتایج نشان داد که با افزودن تنها $0/1$ درصد گلو تار آلدئید، وزن مولکولی تجمعات حاصل نسبت به نوع شاهد ۴۰ برابر می‌شود. افزایش غلظت‌های بیشتر گلو تار آلدئید، تغییر قابل توجهی در پروفایل کروماتوگرام ایجاد نکرد و تجمعات در همان محدوده حجمی قبلی ظاهر شدند. افزودن گلو تار آلدئید در غلظت‌های کم، موجب تشکیل دایمر یا الیگومرهای با M_r کمتر شد و در عوض تجمعات بزرگ ایجاد شد. گلو تار آلدئید به سرعت با گروه‌های لیزین آزاد واکنش داد و مقدار مازاد آن پلیمریزه شد. این پیوندها از نوع کووالانسی / الکترواستاتیک گزارش شد (۴۴). از سوی دیگر عوامل ایجادکننده پیوند، سریعاً با گروه‌های لیزین در دسترس واکنش می‌دهند و سپس بدلیل ممانعت فضایی با مولکول‌های مشابه خود پلیمریزه می‌شوند. در این حالت در گلو تار آلدئید ایجاد الیگومر می‌شود (۴۴).

گزارش شده است که تأثیر تیمار پروتئین با ترکیبات پلی‌فنلی، به عوامل مختلفی مانند خواص آبدوستی / آبگریزی، غلظت و ساختار فضایی پروتئین / فنل و pH بستگی دارد (۴۵).



شکل ۶. طرح‌واره تشکیل نانو کمپلکس کورکومین-پروتئین (P)، در مقادیر بارگذاری کم/زیاد کورکومین و تأثیر فراصوت بر کمپلکس تشکیل شده (۴۹).

در ارزیابی شاخص پیوند، می‌توان ذکر کرد که آلبومین، ۵۹ گروه آمینوی آزاد دارد که توانایی ایجاد پیوند کووالانسی با عوامل ایجاد پیوند عرضی دارد. با این وجود بدلیل ساختار کروی مولکول آلبومین ممکن است امکان دسترسی به این منابع برای انجام واکنش و ایجاد پیوند محدود شود (۴۴). در حالت طبیعی حدود ۲۰ درصد از گروه‌های لیزین غیرقابل دسترس هستند (۵۰).

بررسی ترکیب اسید تانیک در پیوند با پروتئین‌ها: در مقایسه با دیگر ترکیبات پلی‌فنلی، تانیک اسید بیشترین تعداد گروه‌های هیدروکسیل متصل به حلقه آروماتیک بنزن را داراست. در نتیجه تعداد زیادی گروه کینون در طی فرایند اکسایش آن شکل می‌گیرد که توانایی ایجاد پیوند عرضی با پروتئین‌ها را دارد. در غلظت‌های بالای پلی‌فنل‌ها این ترکیبات بین خودشان پیوند برقرار می‌کنند و برهم کنش کمتری با پروتئین‌ها نشان می‌دهند. نتایج بررسی تجمع تانن با آلبومین، با روش پراکنش نور شامل اسپکتروسکوپی همبستگی فوتون و پراکنش ریلی (Rayleigh) توسط پژوهشگران نیز نشان داد که ذرات با قطر کمتر از یک میکرومتر در pH خنثی تشکیل می‌شود. پراکنش نور ریلی به شدت وابسته به اندازه ذرات است (R^6) و پس از مخلوط کردن پروتئین و تانن (به نسبت ۰/۴ به ۱۰ میلی‌گرم) مشاهده شد که تعداد ذرات در هر ثانیه افزایش یافت و پس از ۵۰ دقیقه این مقدار به ۱۰۰۰ کیلو در هر ثانیه رسید. این روش در حضور غلظت‌های متغیر تانن نشان داد که تا غلظت ۳ میلی‌گرم از تانن نسبت به ۱۰ میلی‌گرم، این رابطه خطی بوده و پس از آن بدلیل ایجاد تجمعات، از رابطه خطی منحرف شد (۵۱). گزارش شده است که در ژلاتین، گروه‌های

پلی‌فنل‌ها لیگاند‌های چنددندانه‌ای هستند و در غلظت‌های بالای پروتئین با مولکول‌های پروتئینی مجاور بیشتر واکنش می‌دهند تا با خودشان (۴۶). هر چه ترکیبات فنلی بزرگ‌تر و یا تعداد مکان‌های واکنش‌پذیر فنل بیشتر باشد، امکان ایجاد پیوندهای قوی‌تری با پروتئین وجود دارد. در مقایسه با دیگر ترکیبات پلی‌فنلی، تانیک اسید بیشترین تعداد گروه‌های هیدروکسیل متصل به حلقه آروماتیک بنزن را داراست. در نتیجه تعداد زیادی گروه کینون در طی فرایند اکسیداسیون آن شکل می‌گیرد که توانایی ایجاد پیوند عرضی با پروتئین‌ها را دارد. در غلظت‌های بالای پلی‌فنل‌ها این ترکیبات بین خودشان پیوند برقرار می‌کنند و برهم کنش کمتری با پروتئین‌ها نشان می‌دهند (۴۵). در توافق با نتایج گزارش شده در پژوهش پیش‌رو، Shpigelman (۲۰۱۰) نشان داد که حضور پلی‌فنل اپی‌گالاکتوکاتکین، بدون افزودن مواد شیمیایی ایجادکننده پیوند، موجب افزایش پایداری نانوذرات بتا لاکتوگلوبولین می‌شود. برهم‌کنش بین پروتئین و پلی‌فنل شامل پیوندهای هیدروژنی و برهم‌کنش‌های $\pi-\pi$ گزارش شد (۴۶). طبق بررسی محققان، پیوند عرضی ژلاتین با کافئیک اسید و تانیک اسید در بالای pH ۹ موجب تشکیل هیدروژل‌های نامحلول شد. گزارش شد که واکنش‌پذیری با تغییر در pH، غلظت محلول پروتئینی و مقدار پلی‌فنل‌ها تغییر یافت. نتایج مطالعات با روش NMR، ایجاد واکنش در مکان‌های فعال فنلی با گروه‌های آمینوی پروتئین را که موجب تشکیل پیوندهای کووالانسی است، تأیید کرد (۴۷).

مکانیسم تشکیل کمپلکس پروتئین-کورکومین: یک مکانیسم پیشنهادی، مکانیسم مولکولی تشکیل کمپلکس است که طرح‌واره تشکیل آن در شکل ۶ نشان داده شده است. بارگذاری مقدار بالای کورکومین، موجب پوشش کامل سطح خوشه‌های آب‌گریز پروتئین می‌شود، در حالی که گروه‌های باردار روی سطح کمتر مورد تأثیر قرار می‌گیرند. مصرف زیاد کورکومین منجر به تجمع ذرات از طریق پل پیوندی بین ذرات کورکومین می‌شود. به دنبال این تجمع، بار سطحی ذرات متجمع افزایش می‌یابد. برعکس در مقادیر بارگذاری کم کورکومین، برهم‌کنش بین ذرات منفرد نسبت به نیروی تدافع الکتروستاتیک بین ذرات ضعیف‌تر است و در نتیجه ذرات در حالت غیرمجموع و جدا باقی می‌مانند (۴۹).

• نتیجه‌گیری

در این پژوهش، به منظور تهیه ناکمپلکس آلبومین-کورکومین در روش امولسیون‌سازی، اتیل استات در حجم بسیار کم جایگزین استفاده از حلال‌های کلردار شد و نتایج مطلوب و قابل قبولی بدست آمد. با بررسی سه فاکتور مستقل در طرح آماری RSM-FCCD، pH ۷ بهترین شرایط برای تهیه کوچکترین ذرات با بیشینه بارگذاری کورکومین بود. بر اساس نتایج تجربی و مطلوبیت مورد نظر نسبت فاز آلی به آبی و محتوای کورکومین به ترتیب ۱۰/۴ درصد حجمی و ۳۴۰۰ میکروگرم بدست آمدند و در این حالت کارایی درون‌پوشانی کورکومین ۷۲/۵۴ درصد و اندازه ذرات کوچکتر از ۲۳۰ نانومتر بودند. برخلاف اکثر روش‌های بکاررفته در منابع که برای ایجاد پیوند عرضی بین نانوذرات آلبومین از گلوآل‌آلدئید استفاده کرده‌اند، در پژوهش اخیر از ترکیب فنلی خوراکی و غیر سمی تانیک اسید استفاده شد. از سوی دیگر، به منظور افزایش درصد درون‌پوشانی کورکومین در نانوساختار آلبومین، استفاده از تانیک اسید به عنوان عامل پیوندی در نانوسوسپانسیون آلبومین حاوی کورکومین، گزینه مناسبی بود. سایر مشخصه‌یابی‌های ذرات شامل تعیین شاخص ایجاد پیوند عرضی به روش نین‌هیدرین، بررسی تغییر رفتار گروه‌های عاملی با FT-IR، بررسی تصاویر میکروسکوپ الکترونی به روش SEM و AFM بود. شکل کروی ذرات در هر دو مورد کاربرد پیونددهنده‌های عرضی (گلوآل‌آلدئید و اسید تانیک) تایید شد. تانیک اسید توانایی خوبی در ایجاد پیوند عرضی بین ذرات آلبومین و افزایش کارایی درون‌پوشانی کورکومین نشان داد ($p < 0.05$). در این پژوهش، در روش تهیه ناکمپلکس آلبومین-کورکومین، استفاده از تانیک اسید به جای گلوآل‌آلدئید، به عنوان یک پایدارکننده سامانه‌های پروتئینی از دو جنبه اهمیت کاربردی دارد: خوراکی و غیر سمی است و از سوی دیگر به طور معنی‌داری موجب افزایش کارایی درون‌پوشانی کورکومین با ماهیت آبگریز شد.

پیشنهاد می‌شود کاربرد تانیک اسید جهت بررسی ماهیت استحکام‌دهی آن در سایر مواد بیوپلیمری مانند کربوهیدرات‌ها و پروتئین‌های با منابع گیاهی با درجه حلالیت‌های متفاوت به منظور بررسی و مقایسه توانایی آنها در درون‌پوشانی کورکومین مورد ارزیابی قرار گیرد. به منظور انجام تحقیقات بیشتر در راستای پژوهش اخیر و ارتقای سطح موضوعات مشابه، پیشنهاد می‌شود ایجاد تغییر در خواص سطحی نانوذرات پروتئینی به روش‌های متفاوت برای بررسی تغییر در توانایی درون‌پوشانی کورکومین مورد بررسی قرار گیرد.

عاملی موجود در لیزین، آرژنین و هیستیدین با ترکیبات فنلی تانیک اسید واکنش داده و تحت شرایط قلیایی، پیوندهای کووالانسی C-N تشکیل می‌دهند. گروه‌های هیدروکسیل سرین نیز به طور مشابه در واکنش با گروه‌های هیدروکسیل و متوکسی تانیک اسید در پیوندهای هیدروژنی شرکت می‌کنند (۵۲).

بررسی رفتار گروه‌های عاملی، مورفولوژی و پایداری ذرات کورکومین: ناحیه طیف آمید III (1650 cm^{-1}) - اگرچه دارای سیگنال‌های نسبتاً ضعیف است، اما بهترین ناحیه برای تفسیر تغییرات ساختاری در پروتئین‌هاست (۵۳). طبق گزارش، تانیک اسید بدلیل وجود گروه‌های متعدد OH با کلاژن از طریق پیوندهای هیدروژنی واکنش می‌دهد. طیف‌های مشخص تانیک اسید شامل پیوند کششی OH در 3388 cm^{-1} ، C=O کششی در 1715 cm^{-1} و گروه‌های اتری در $1198-1025 \text{ cm}^{-1}$ است. مطالعات ایجاد پیوند عرضی بین الاستین و کلاژن با تانیک اسید از طریق پیوند هیدروژنی، الکترووالانسی و برهم‌کنش‌های آب‌گریز گزارش شده است که در ساختار سه مارپیچی کلاژن تغییر اساسی ایجاد نکرد (۵۴).

پایداری کم کورکومین در معرض نور، اکسیدکننده‌ها، قلیا، آنزیم و گرما موجب عدم استفاده و بهره‌مندی وسیع از این ماده شده است (۵۵). در ارزیابی پایداری نانوذرات کورکومین در سوسپانسیون، نتایج مشابه توسط چن و ژونگ (۲۰۱۵)، گزارش شده است (۴۳). طی بررسی انجام شده توسط دیگر پژوهشگران، دیسپرسیون پروتئین سویا-کورکومین بررسی شد و نتایج نشان داد که ذرات به شکل همگن و منفرد دارای ارتفاع ۲ تا ۴ نانومتر و سطح $30-50 \times 40-60$ نانومتر بودند که این مورفولوژی ماهیت نانوذره‌ای را تأیید کرد و در توافق با نتایج DLS بود. پس از اعمال فراصوت همواری سطح و نظم ساختاری کمتر شد و ذرات متجمع بزرگ دارای ارتفاعی بیشتر تا ۱۵ نانومتر برای ذرات تیمارشده با فراصوت بودند (۵۶). نتایج نشان داد که لزوم خشک کردن سوسپانسیون برای نگهداری طولانی مدت کورکومین به شکل آمورف ضروری به نظر می‌رسد. به طور مشابه، کورکومین کریستالی در نانوذرات Poly lactic-co-glycolic acid (PLGA) حاوی کورکومین نیز مشاهده و گزارش شده است (۵۷).

• References

- Jampilek J, Kos J, Kralova K. Potential of nanomaterial applications in dietary supplements and foods for special medical purposes. *Nanomaterials*. 2019;9(2):296.
- Elzoghby AO, Samy WM, Elgindy NA. Protein-based nanocarriers as promising drug and gene delivery systems. *Journal of controlled release*. 2012;161(1):38-49.
- Livney YD. Milk proteins as vehicles for bioactives. *Current opinion in colloid & interface science*. 2010;15(1-2):73-83.
- BROWN JR. Serum albumin: amino acid sequence. *Albumin: Structure, Function and Uses*: Elsevier; 1977. p. 27-52b.
- Sailaja AK, Amareshwar P, Chakravarty P. Different techniques used for the preparation of nanoparticles using natural polymers and their application. *Int J Pharm Pharm Sci*. 2011;3(2):45-50.
- David C, Foley S, Mavon C, Enescu M. Reductive unfolding of serum albumins uncovered by Raman spectroscopy. *Biopolymers: Original Research on Biomolecules*. 2008;89(7):623-34.
- Tubio G, Nerli B, Picó G. Relationship between the protein surface hydrophobicity and its partitioning behaviour in aqueous two-phase systems of polyethyleneglycol-dextran. *Journal of Chromatography B*. 2004;799(2):293-301.
- Lin H, Lan J, Guan M, Sheng F, Zhang H. Spectroscopic investigation of interaction between mangiferin and bovine serum albumin. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2009;73(5):936-41.
- Tennesen HH, Greenhill JV. Studies on curcumin and curcuminoids. XXII: Curcumin as a reducing agent and as a radical scavenger. *International journal of pharmaceutics*. 1992;87(1-3):79-87.
- Mukerjee A, Vishwanatha JK. Formulation, characterization and evaluation of curcumin-loaded PLGA nanospheres for cancer therapy. *Anticancer research*. 2009;29(10):3867-75.
- Singh R, Tønnesen HH, Vogensen SB, Loftsson T, Másson M. Studies of curcumin and curcuminoids. XXXVI. The stoichiometry and complexation constants of cyclodextrin complexes as determined by the phase-solubility method and UV-Vis titration. *Journal of inclusion phenomena and macrocyclic chemistry*. 2010;66(3):335-48.
- Yallapu MM, Jaggi M, Chauhan SC. Curcumin nanoformulations: a future nanomedicine for cancer. *Drug discovery today*. 2012;17(1-2):71-80.
- Saldanha SN, Tollefsbol TO. The role of nutraceuticals in chemoprevention and chemotherapy and their clinical outcomes. *Journal of oncology*. 2012;2012.
- Sneharani AH, Karakkat JV, Singh SA, Rao AA. Interaction of curcumin with β -lactoglobulin: stability, spectroscopic analysis, and molecular modeling of the complex. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2010;58(20):11130-9.
- Rahimi Yazdi S. Changing the structure of casein micelles to improve the delivery of bioactive compounds: University of Guelph; 2012.
- Paramera EI, Konteles SJ, Karathanos VT. Stability and release properties of curcumin encapsulated in *Saccharomyces cerevisiae*, β -cyclodextrin and modified starch. *Food chemistry*. 2011;125(3):913-22.
- Esmaili M, Ghaffari SM, Moosavi-Movahedi Z, Atri MS, Sharifzadeh A, Farhadi M, et al. Beta casein-micelle as a nano vehicle for solubility enhancement of curcumin; food industry application. *LWT-food science and technology*. 2011;44(10):2166-72.
- Lee J, Yeo M, Kim W, Koo Y, Kim GH. Development of a tannic acid cross-linking process for obtaining 3D porous cell-laden collagen structure. *International journal of biological macromolecules*. 2018;110:497-503.
- Krezanoski JZ. Tannic Acid: Chemistry, Analysis, and Toxicology: An Episode in the Pharmaceutics of Radiology. *Radiology*. 1966;87(4):655-7.
- Desai NP, Tao C, Yang A, Louie L, Zheng T, Yao Z, et al. Protein stabilized pharmacologically active agents, methods for the preparation thereof and methods for the use thereof. Google Patents; 1999.
- Dreis S, Rothweiler F, Michaelis M, Cinatl Jr J, Kreuter J, Langer K. Preparation, characterisation and maintenance of drug efficacy of doxorubicin-loaded human serum albumin (HSA) nanoparticles. *International journal of pharmaceutics*. 2007;341(1-2):207-14.
- Zhang J-Y, He B, Qu W, Cui Z, Wang Y-b, Zhang H, et al. Preparation of the albumin nanoparticle system loaded with both paclitaxel and sorafenib and its evaluation in vitro and in vivo. *Journal of microencapsulation*. 2011;28(6):528-36.
- Zhang Z-H, Wang X-P, Ayman WY, Munyendo WL, Lv H-X, Zhou J-P. Studies on lactoferrin nanoparticles of gambogic acid for oral delivery. *Drug delivery*. 2013;20(2):86-93.
- Wang Z, Li Z, Zhang D, Miao L, Huang G. Development of etoposide-loaded bovine serum albumin nanosuspensions for parenteral delivery. *Drug Delivery*. 2015;22(1):79-85.
- Mishra V, Mahor S, Rawat A, Gupta PN, Dubey P, Khatri K, et al. Targeted brain delivery of AZT via transferrin anchored pegylated albumin nanoparticles. *Journal of drug targeting*. 2006;14(1):45-53.
- Heijmen F, Du Pont J, Middelkoop E, Kreis R, Hoekstra M. Cross-linking of dermal sheep collagen with tannic acid. *Biomaterials*. 1997;18(10):749-54.
- Guo Y, Bao Y-h, Sun K-f, Chang C, Liu W-f. Effects of covalent interactions and gel characteristics on soy protein-tannic acid conjugates prepared under alkaline conditions. *Food Hydrocolloids*. 2021;112:106293.
- Xie L, Ciftci O, Zhang Y. Encapsulation of astaxanthin-enriched camelina oil extract in ovalbumin/gum arabic stabilized emulsion with/without crosslinking by tannic acid. *ES Food & Agroforestry*. 2020;1(2):77-84.
- Chen F-P, Li B-S, Tang C-H. Nanocomplexation between curcumin and soy protein isolate: Influence on curcumin stability/bioaccessibility and in vitro protein digestibility.

- Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2015;63(13):3559-69.
30. Hoo CM, Starostin N, West P, Mecartney ML. A comparison of atomic force microscopy (AFM) and dynamic light scattering (DLS) methods to characterize nanoparticle size distributions. *Journal of Nanoparticle Research*. 2008;10(1):89-96.
 31. Bae S, Ma K, Kim TH, Lee ES, Oh KT, Park E-S, et al. Doxorubicin-loaded human serum albumin nanoparticles surface-modified with TNF-related apoptosis-inducing ligand and transferrin for targeting multiple tumor types. *Biomaterials*. 2012;33(5):1536-46.
 32. Jiang T, Ren X-J, Tang J-L, Yin H, Wang K-J, Zhou C-L. Preparation and characterization of genipin-crosslinked rat acellular spinal cord scaffolds. *Materials Science and Engineering: C*. 2013;33(6):3514-21.
 33. Kirchmayer DM, Watson CA, Ranson M. Gelapin, a degradable genipin cross-linked gelatin hydrogel. *RSC advances*. 2013;3(4):1073-81.
 34. Yuan Y, Chesnutt B, Utturkar G, Haggard W, Yang Y, Ong J, et al. The effect of cross-linking of chitosan microspheres with genipin on protein release. *Carbohydrate Polymers*. 2007;68(3):561-7.
 35. Mendoza-Novelo B, Cauch-Rodríguez JV. The effect of surfactants, crosslinking agents and L-cysteine on the stabilization and mechanical properties of bovine pericardium. *Journal of Applied Biomaterials and Biomechanics*. 2009;7(2):123-31.
 36. Jahanshahi M, Najafpour G, Rahimnejad M. Applying the Taguchi method for optimized fabrication of bovine serum albumin (BSA) nanoparticles as drug delivery vehicles. *African Journal of Biotechnology*. 2008;7(4).
 37. Khan H, Ali M, Ahuja A, Ali J. Stability testing of pharmaceutical products-comparison of stability testing guidelines. *Current Pharmaceutical Analysis*. 2010;6(2):142-50.
 38. Gupta SC, Prasad S, Kim JH, Patchva S, Webb LJ, Priyadarsini IK, et al. Multitargeting by curcumin as revealed by molecular interaction studies. *Natural product reports*. 2011;28(12):1937-55.
 39. Li W, Li S. A study on the adsorption of bovine serum albumin onto electrostatic microspheres: Role of surface groups. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2007;295(1-3):159-64.
 40. Teng Z, Luo Y, Wang Q. Nanoparticles synthesized from soy protein: preparation, characterization, and application for nutraceutical encapsulation. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2012;60(10):2712-20.
 41. Li J, Yao P. Self-assembly of ibuprofen and bovine serum albumin- dextran conjugates leading to effective loading of the drug. *Langmuir*. 2009;25(11):6385-91.
 42. Arnedo A, Espuelas S, Irache J. Albumin nanoparticles as carriers for a phosphodiester oligonucleotide. *International Journal of Pharmaceutics*. 2002;244(1-2):59-72.
 43. Migneault I, Dartiguenave C, Bertrand MJ, Waldron KC. Glutaraldehyde: behavior in aqueous solution, reaction with proteins, and application to enzyme crosslinking. *Biotechniques*. 2004;37(5):790-802.
 44. Silva CJ, Sousa F, Gübitz G, Cavaco-Paulo A. Chemical modifications on proteins using glutaraldehyde. *Food Technology and Biotechnology*. 2004;42(1):51-6.
 45. Balange AK, Benjakul S. Effect of oxidised phenolic compounds on the gel property of mackerel (*Rastrelliger kanagurta*) surimi. *LWT-Food Science and Technology*. 2009;42(6):1059-64.
 46. Beart JE, Lilley TH, Haslam E. Polyphenol interactions. Part 2. Covalent binding of procyanidins to proteins during acid-catalysed decomposition; observations on some polymeric proanthocyanidins. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2*. 1985(9):1439-43.
 47. Shpigelman A, Israeli G, Livney YD. Thermally-induced protein-polyphenol co-assemblies: beta lactoglobulin-based nanocomplexes as protective nanovehicles for EGCG. *Food Hydrocolloids*. 2010;24(8):735-43.
 48. Zhang X, Do MD, Casey P, Sulistio A, Qiao GG, Lundin L, et al. Chemical cross-linking gelatin with natural phenolic compounds as studied by high-resolution NMR spectroscopy. *Biomacromolecules*. 2010;11(4):1125-32.
 49. Chen F-P, Li B-S, Tang C-H. Nanocomplexation of soy protein isolate with curcumin: Influence of ultrasonic treatment. *Food Research International*. 2015;75:157-65.
 50. Mir MM, Fazili KM, Qasim MA. Chemical modification of buried lysine residues of bovine serum albumin and its influence on protein conformation and bilirubin binding. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1992;1119(3):261-7.
 51. Lin H-C, Chen P-C, Cheng T-J, Chen RL. Formation of tannin-albumin nano-particles at neutral pH as measured by light scattering techniques. *Analytical biochemistry*. 2004;325(1):117-20.
 52. Zhang X, Do MD, Casey P, Sulistio A, Qiao GG, Lundin L, et al. Chemical modification of gelatin by a natural phenolic cross-linker, tannic acid. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2010;58(11):6809-15.
 53. Cai S, Singh BR. Identification of β -turn and random coil amide III infrared bands for secondary structure estimation of proteins. *Biophysical chemistry*. 1999;80(1):7-20.
 54. Albu MG, Ghica MV, Giurginca M, Trandafir V, Popa L, Cotrut C. Spectral characteristics and antioxidant properties of tannic acid immobilized on collagen drug-delivery systems. *Revista de Chimie-Bucharest*. 2009;60(7):666-72.
 55. Zebib B, Mouloungui Z, Noirot V. Stabilization of curcumin by complexation with divalent cations in glycerol/water system. *Bioinorganic chemistry and applications*. 2010;2010.
 56. Chen H, Zhong Q. A novel method of preparing stable zein nanoparticle dispersions for encapsulation of peppermint oil. *Food Hydrocolloids*. 2015;43:593-602.
 57. Shahani K, Panyam J. Highly loaded, sustained-release microparticles of curcumin for chemoprevention. *Journal of pharmaceutical sciences*. 2011;100(7):2599-609.

Preparation and Assessment of Protein-Curcumin Nanocomplex Using Oral Crosslinker

Shahgholian N^{*1}, Rajabzadeh Gh²

1- **Corresponding author: Assistant Professor, Department of Biosystems Engineering, Shahid Chamran University of Ahvaz, Ahvaz, Iran, E-mail: n.shahgholian@scu.ac.ir*

2- *Professor, Department of Food Nanotechnology, Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran*

Received 6 Mar, 2022

Accepted 24 Apr, 2022

Background and Objectives: Benefits of the effects of plant compounds with therapeutic characteristics depend on the bioavailability of their active ingredients. Curcumin includes limitations such as low stability and solubility as well as sensitivity to processing conditions and gastrointestinal conditions. Therefore, novel methods such as nanocomplex preparation in these compounds have been developed.

Materials & Methods: To increase solubility and stability of curcumin, a curcumin-albumin nanocomplex was prepared. The response surface methodology-face centered composite design statistical design was used to optimize three factors in preparation of nanoparticles. Factors included organic phase volume (6.4–11.11% v/v), pH (3–7) and curcumin ratio (5000–000 µg). Glutaraldehyde and tannic acid were used for crosslinking. Particle size, zeta potential (dynamic light scattering method), particle morphology (field emission-scanning electron microscopy, atomic force microscopy) and crosslinking index (ninhydrin and Fourier-transform infrared spectroscopy) were investigated. Factors and responses were analyzed using Design Expert Software v.8.

Results: In curcumin nanocomplex, the optimal conditions for the production of albumin nanoparticles were assessed at pH far from the isoelectric point of albumin and a volume proportion of the organic phase of 11.4%. For simultaneous achievement of the smallest particle with the highest curcumin encapsulation and desirability factor, the optimum efficiency was achieved at 3400 µg of curcumin. Curcumin encapsulation efficiency and particle size was 72.54% and less than 230 nm, respectively. Use of tannic acid increased the efficiency of curcumin entrapment in albumin nanocomplex ($p < 0.05$).

Conclusion: Results of this study showed that use of albumin-curcumin nanocomplex along with tannic acid as a crosslinking agent increased encapsulation and stability of curcumin.

Keywords: Tannic acid, Albumin, Curcumin, Nanosuspension, Nanocomplex, Ninhydrin