



تولید نانوحامل های لیپیدی حاوی کورکومین و ارزیابی ویژگی های کیفی آن

فخری شهیدی^۱، شادی بلوریان^{۲*}، سید علی مرتضوی^۱، محبت محبی^۱، عبدالرضا باقری^۳

۱- استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

۲- استادیار، گروه پژوهشی افزودنی های غذایی پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی جهاد دانشگاهی خراسان رضوی.

۳- استاد، گروه بیوتکنولوژی و به نژادی گیاهان زراعی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه فردوسی مشهد.

چکیده

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۳۹۷/۱۲/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۳/۰۵

کلمات کلیدی:

نانوذرات لیپیدی جامد (SLN)،

حامل های لیپیدی نانوساختار (NLC)،

کورکومین،

ویژگی های فیزیکی.

DOI: 10.52547/fsct.18.08.22

* مسئول مکاتبات:

shadibolourian@yahoo.com

کورکومین با نام شیمیایی دی فروئیل متان یک پلی فنل هیدرو فوب می باشد که به سبب ویژگی های منحصر به فرد سلامتی زایی اش به عنوان یک ترکیب عملگر شناخته شده است. در این پژوهش، از نانوذرات لیپیدی جامد (SLN) و حامل های لیپیدی نانوساختار (NLC) به منظور انکپسولاسیون کورکومین و رفع معضلات مربوط به کاربرد این ترکیب در حوزه ی غذایی (ناپایداری، زیست فراهمی پایین، حلالیت ناچیز در محیط های آبی)، استفاده گردید. تولید نانوحامل ها با استفاده از روش ترکیبی هوموژنیزاسیون با نیروی برشی بالا و فراصوت صورت پذیرفت. تاثیر نسبت لیپیدها، نوع نانوحامل (SLN, NLC) و میزان بارگذاری کورکومین بر ویژگی های نانوحامل های تولیدی مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج بدست آمده به دلیل ساختار فیزیکی حجیم کورکومین و همچنین افزایش ویسکوزیته فاز پراکنده در حضور ماده ی مؤثره، بارگذاری کورکومین در نانوحامل ها باعث افزایش معنی دار در اندازه ذرات و شاخص پاشیدگی شد. نتایج آنالیز آماری نشان داد که نسبت لیپیدها، نوع نانوحامل (SLN و NLC) و بارگذاری کورکومین دارای تاثیر معناداری بر اندازه ی ذرات می باشد ($p < 0/05$). نتایج حاصل از کالریمتری روبشی افتراقی نشان داد که کورکومین بدون هیچ گونه برهمکنشی با سایر اجزا در ساختار نانوحامل ها به دام افتاده است. به طور کلی غلظت ۰/۰۵ گلیسرول دی استئارات و ۰/۲۵ کورکومین به عنوان شرایط بهینه برای تولید نانوحامل NLC بود.

۱- مقدمه

با افزایش آگاهی عمومی مبنی بر رابطه بین غذا و بیماری، تولیدکنندگان درحال تلاش برای غنی سازی غذاهای اصلی مردم با مواد مغذی و تولید فراورده های فراسودمند می باشند. از جمله گیاهانی که در سال های اخیر به دلیل وجود مواد موثره طبیعی و ایمن مورد توجه واقع شده است، گیاه زردچوبه می باشد [۱]. کورکومین با نام شیمیایی دی فرولیل متان (E100)، یک پلی فنل هیدروفوب مشتق شده از ریزوم گیاه زردچوبه (*Curcuma longa*) است. ریزوم زردچوبه حاوی سه آنالوگ رنگی مهم کورکومین، دمتوکسی کورکومین (DMC) و بیس دمتوکسی کورکومین (BDMC) است که در مجموع کورکومینوئید نامیده می شوند. این ترکیبات عامل ایجاد رنگ زرد در زردچوبه هستند که در موقعیت گروه متوکسی بروی حلقه آروماتیک با یکدیگر متفاوت می باشند. در میان این سه آنالوگ، کورکومین در زردچوبه از همه فراوان تر است [۲].

بر اساس تحقیقات انجام شده کورکومین دارای ویژگی های عملکردی چشمگیری می باشد و در مطالعات مختلف خواص متفاوتی از این ترکیب از جمله فعالیت ضدتوموری و ضدسرطانی، کاهش سطح کلسترول خون و کبد، افزایش عملکرد ایمنی بدن، جلوگیری از بیماری های قلبی-عروقی، جلوگیری از آسیب غشاء های زیستی در مقابل پراکسیداسیون، خاصیت ضد التهابی و کاهش آرتروز روماتیسمی و حفاظت در مقابل بیماری آلزایمر گزارش شده است. این اثرات به واسطه تنظیم عوامل رونویسی مختلف، عوامل رشد، سیتوکین های التهابی، کیناز های پروتئینی و آنزیم های دیگر ایجاد می شود [۳-۶].

با وجود منافع مختلف مذکور برای کورکومین، وجود بعضی موارد شامل حلالیت پایین در محیط آبی [۷]، حساسیت به شرایط نامطلوب محیطی و پایین بودن زیست دسترسی این ترکیب در سیستم گوارشی (۱۰ تا ۳۰ درصد از کورکومین مصرفی) [۸] باعث محدود شدن کاربرد این ترکیب در صنایع غذایی شده است. یکی از راه کارهای رفع این معضلات، استفاده از نانوانکپسولاسیون می باشد. در چندین دهه ی اخیر، کاربردهای بسیار فراوانی در خصوص نانوتکنولوژی در حوزه های مختلف غذایی مطرح گردیده است که یک مورد از کاربردهای بالفعل آن نانوانکپسولاسیون و رسانش مواد زیست

فعال در حوزه غذایی است. انکپسولاسیون، به عنوان یک شیوه ی امیدبخش برای محافظت از ترکیبات زیست فعال (از قبیل ویتامین ها، آنتی اکسیدان ها، پروتئین ها و لیپیدها) مطرح می باشد که می تواند این ترکیبات را در شرایط نامناسب محیطی محافظت نموده، ویژگی های نامطلوب آنها را بهبود بخشیده یا رفع نماید.

در این راستا استفاده از نانوانکپسولاسیون و تولید نانوحامل ها به عنوان ناقل هایی برای ترکیبات زیست فعال در محصولات فراسودمند، رو به افزایش می باشد [۹].

سیستم های نانوانکپسولاسیون را می توان به طور کلی به دو دسته سیستم های بر پایه پلیمر (کربوهیدرات و پروتئین) و سیستم های بر پایه لیپید تقسیم کرد. عدم وجود روش های مناسب برای تولید در مقیاس های صنعتی، در دسترس نبودن پلیمرهای مناسب، استفاده از حلال های آلی و همچنین طبیعت آگریزی بسیاری از مواد زیست فعال باعث شده است که میزان محصولات تولیدی بر پایه سیستم های پلیمری محدود باشد [۱۰]. از طرفی، استفاده از نانوحامل های لیپیدی در مقایسه با نانوحامل های کربوهیدراتی و پروتئینی دارای مزایایی از قبیل امکان تولید صنعتی و عدم نیاز به ترکیبات آلی برای تولید است [۱۱]. علاوه بر این، حضور لیپیدهای قابل هضم و خوراکی باعث تسهیل جذب مواد زیست فعال در روده کوچک نیز می شود، زیرا این لیپیدها میزان میسل های در دسترس برای هضم و انتقال ترکیبات آگریز را افزایش می دهند [۱۲].

نانوذرات لیپیدی جامد^۱ (SLN) و حامل های لیپیدی نانوساختار^۲ (NLC) نسل های جدیدی از حامل های لیپیدی می باشند که طی چندین سال اخیر توانسته اند در حوزه داروسازی و مواد غذایی توجه علمی و تجاری زیادی را به سوی خود جلب کنند [۱۳].

تیابونچای و همکاران (۲۰۰۷) نمونه های SLN حاوی کورکومینوئید را توسط روش میکروامولسیون در دمای ۷۵ درجه و با استفاده از اسید استئاریک و گلیسرول مونو استئارات تولید کردند. در این پژوهش مشخص شد که تغییر در میزان اجزاء فرمولاسیون می تواند بر میزان بارگذاری کورکومین، متوسط اندازه ذرات و پراکندگی اندازه ذرات موثر باشد. در شرایط بهینه فرایند، SLN خشک شده به روش انجمادی دارای

1. Solid Lipid Nanoparticles
2. Nanostructure Lipid Carrier

ذرات کروی شکل با اندازه متوسط ۴۵۰ نانومتر و شاخص پراکندگی ۰/۴ بود [۱۴].

در تحقیقی مشابه آپیراتیکیول و همکاران (۲۰۱۳)، از یک چربی کاتیونی بر پایه کلسترول برای تولید لیپوزوم استفاده کردند و لیپوزوم ایجاد شده از این چربی به عنوان یک حامل برای کورکومین مورد استفاده قرار گرفت. میزان جذب سلولی و سمیت سلولی مربوط به کورکومین آزاد و کپسوله شده مورد مقایسه قرار گرفت و مشخص گردید که با پوشش دهی کورکومین، میزان جذب افزایش و میزان سمیت کاهش یافته است [۱۵].

لین و همکاران (۲۰۰۹)، در تحقیقی دیاگرام سه فازی مربوط به کورکومین انکپسوله شده در سیستم امولسیون را رسم کردند. به منظور تهیه امولسیون از مواد قابل مصرف خوراکی (شامل لسیتن و توئین ۸۰ به عنوان امولسیفایر و اتیل اولئات به عنوان فاز روغن) استفاده شد. پایداری و خصوصیات کورکومین در میکروامولسیون مورد بررسی قرار گرفت. امولسیون با اندازه ذرات $245 \pm 71/8$ نانومتر پس از دو ماه نیز پایدار بود. بر اساس نتایج بدست آمده بیشترین میزان فاز روغن ۱۰/۳٪ بود، که در آن نسبت مولی لسیتن به توئین ۸۰ معادل ۰/۳ بود. انکپسولاسیون کورکومین علاوه بر ممانعت از تخریب کورکومین، منجر به افزایش غلظت کورکومین در فاز آبی شد. در این پژوهش نفوذ کورکومین با دیاگرام های فازی متفاوت به داخل پوست نیز مورد بررسی قرار گرفت [۱۶].

احمد و همکاران (۲۰۱۰) از سیستم نانو امولسیون (شعاع کمتر از ۱۰۰ نانومتر) و امولسیون معمولی (شعاع بیش از ۱۰۰ نانومتر) برای انکپسولاسیون و بررسی رهایش کورکومین استفاده کردند. در این تحقیق، تأثیر فرمولاسیون های لیپیدی مختلف بر انکپسولاسیون و زیست دسترسی کورکومین بررسی شد. برای تهیه امولسیون ها از چربی های بلند زنجیر (روغن ذرت)، کوتاه زنجیر (تری بوتیرین) و متوسط زنجیر (میگلیول ۸۱۲) استفاده شد. نرخ و میزان هضم فاز چربی تحت شرایط شبیه سازی شده روده ای مدل سازی و میزان کورکومین آزاد شده نیز محاسبه شد. نتایج نشان داد میزان زیست فراهمی کورکومین در اسیدهای چرب متوسط زنجیر بیشتر و در اسیدهای کوتاه زنجیر کمتر بود [۱۷].

انکپسولاسیون کورکومین در نانوذرات زئین (گومز- استاک و همکاران، ۲۰۱۱)، انکپسولاسیون کورکومین در کپسول های

توخالی ایجاد شده از طریق روش لایه به لایه و بررسی رهایش و میزان تأثیر سمیت سلولی کورکومین رها شده بر سلول های نرمال L ۹۲۹ (مانجو و اسرینواسان، ۲۰۱۱)، تولید نانوسفرهای مخاط چسب حاوی کورکومین با اتیل سلولز یا مخلوط متیل و اتیل سلولز و بررسی فعالیت بیولوژیکی و رهایش آنها در سیستم گردش خون (سواناتیپ و همکاران، ۲۰۱۱) و تولید نانوذرات حاوی کورکومین که نسبت به حرارت عکس العمل نشان داده و اندازه آنها تغییر می کند، همچنین بررسی اثرات ترکیبی آنها در تخریب سلول های سرطانی (رااو و همکاران، ۲۰۱۳) نیز از جمله تحقیقات دیگری می باشند که در مورد کورکومین انجام شده است [۲۰، ۱۸، ۱۹، ۲۱].

باتوجه به مزایای ذکر شده در رابطه با حامل های لیپیدی نانوساختار و نانو ذرات لیپیدی جامد در مقایسه با سایر سیستم های لیپیدی و پلیمری، در این پژوهش نیز از این حامل ها با هدف بارگذاری، افزایش پایداری و بهبود ویژگی های نامطلوب کورکومین استفاده گردید. پس از طراحی نانوحامل ها و بارگذاری کورکومین در آنها، تاثیر عوامل مختلف از قبیل نوع نانوحامل، میزان بارگذاری و نسبت لیپیدهای مصرفی بر ویژگی های مختلف نانوحامل های تولیدی مورد بررسی قرار گرفت.

۲- مواد و روش ها

کورکومین (CAS Number 458-37-7) از شرکت سیگما خریداری شد. گلیسرول مونو استئارات (GMS، شرکت بی دی اچ، انگلستان) لسیتن سویا (شرکت اکراس ارگانیک، آمریکا) و توئین ۸۰ (شرکت مرک، آلمان) با خلوص آزمایشگاهی تهیه گردیدند. گلیسرول دی استئارات (GDS) (پرسیرول آتو ۵) و اسید اولئیک از شرکت گتفوسه فرانسه خریداری شد.

۲-۱- تولید نانوحامل های لیپیدی حاوی رنگدانه

کورکومین

تولید نانوحامل ها در این پژوهش از طریق هموژنیزاسیون با فشار برشی بالا و امواج فراصوت انجام شد. به منظور تولید حامل های لیپیدی نانوساختار و نانوذرات لیپیدی جامد، فاز آبی

۲-۲- مشخصات نانوذرات تولیدی

۲-۲-۱- تعیین اندازه ذرات و شاخص چندبسی

پاشیدگی آن

متوسط اندازه ذرات و شاخص چندبسی پاشیدگی نانوذرات، با استفاده از طیف سنج الکترونی فوتون بر مبنای روش تفرق نور پویا توسط دستگاه تحلیل اندازه ذرات Particle Size Analyzer در دمای محیط و طول موج ۶۵۷ نانومتر اندازه گیری گردید [۱۰]. اهمیت اندازه گیری اندازه ذرات به تأثیر این شاخصبر رهائش مربوط می شود. میانگین شاخص Z به عنوان اندازه ذرات و شاخص پراکنش ذرات (PDI)^۱ گزارش شد. شاخص چندبسی پاشیدگی نشان دهنده میزان یکنواخت بودن دیسپرسیون بوده و از صفر تا یک متغیر است که هر چه این شاخص کمتر باشد، دیسپرسیون یکنواخت تر خواهد بود [۲۳].

۲-۲-۲- اندازه گیری پتانسیل زتا

پتانسیل زتا که در واقع شاخصی از بار الکتریکی سطح نانوذرات می باشد، با استفاده از دستگاه زتامتر Zeta (Compact, CAD instrumentation, France) اندازه گیری شد. در این آزمون، ابتدا تحرک الکتروفوریتیک ذرات دیسپرسیون (U_E) در یک میدان الکتریکی توسط روش های میکروسکوپی تعیین شد و پس از آن پتانسیل زتا (ζ) با استفاده از معادله ی اسمولوچوسکی توسط دستگاه محاسبه گردید.

$$U_E = \frac{4\pi\epsilon_r\epsilon_0\zeta(1+Kr)}{6\pi\mu}$$

که در این رابطه ϵ_r و ϵ_0 به ترتیب ثابت دی الکتریک نسبی و نفوذپذیری الکتریکی خلاء، Γ شعاع ذره، μ ویسکوزیته سوسپانسیون و k پارامتر دی-هاکل و مقداری ثابت می باشد [۲۳].

۲-۲-۳- بررسی ویژگی های حرارتی

به منظور بررسی ویژگی های حرارتی کورکومین، گلیسرول مونو استئارات، گلیسرول دی استئارات و نانو حامل های تولیدی از روش گرماسنجی پویشی تفاضلی^۲ (DSC) استفاده شد. برای انجام این آزمون از نمونه های خشک شده انجمادی استفاده گردید. ۵ میلی گرم از نمونه ها توزین شده و بر روی پن آلومینیومی دستگاه قرار داده شد. آزمون کالریمتری روبشی در

حاوی امولسیفایر (توئین ۸۰) و فاز لیپیدی حاوی لسیتین و کورکومین به طور جداگانه تهیه شدند. برای کلیه فرمولاسیون ها از ۳ درصد توئین ۸۰ و ۰/۶ درصد لسیتین در فرمولاسیون نهایی استفاده گردید. میزان فاز لیپیدی در تمامی نانوحامل ها ثابت و برابر ۵ درصد در نظر گرفته شد. به منظور ساخت حامل های لیپیدی نانوساختار، ۲۰ درصد از لیپیدهای جامد با اسید اولئیک جایگزین گردید. در این پژوهش تأثیر نسبت لیپیدها (نسبت گلیسرول مونو استئارات به گلیسرول دی استئارات) بارگذاری کورکومین (عدم بارگذاری کورکومین، بارگذاری در غلظت های ۰/۵ و ۰/۲۵ درصد) و نوع نانوحامل SLN و NLC بر ویژگی های نانوذرات تولیدی مورد بررسی قرار گرفت. ترکیب نانوحامل های تولیدی در جدول شماره ۱ نشان داده شده است.

Table 1 Independent variables and their levels used in the CCD design

Level of factors	GMS	GDS	Curcumin
-1	0	0	0
0	2.5	2.5	0.25
+1	5	5	0.5

فاز آبی و فاز چربی به طور جداگانه تهیه و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا به دمای یکسان برسند. فاز آبی به فاز چربی افزوده شده و به مدت ۱ دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد با سرعت ۲۰۰۰۰ دور بر دقیقه هموژن گردید، T 25 digital ULTRA- TURRAX, (IKA, Germany) پیش امولسیون تولیدی با استفاده از پروب فراصوت (XL 2020, Misonix, USA) با توان خروجی ۲۵٪ به تعداد ۵۰ سیکل (۴ ثانیه روشن و ۱ ثانیه خاموش) تحت تیمار فراصوت قرار گرفت. پس از اتمام فراصوت، نمونه تولیدی برای دومین بار به مدت ۱ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰۰ دور بر دقیقه در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد هموژن شد و در نهایت پس از سرد کردن دیسپرسیون تولیدی در حمام یخ، نانوحامل های لیپیدی تولید شدند [۲۲].

به منظور بررسی ویژگی های حرارتی نانوحامل ها، بخشی از دیسپرسیون تولیدی، در دمای ۳۰- درجه سانتی گراد و فشار ۰/۱ میلی بار به مدت ۴۸ ساعت تحت فرایند خشک کردن انجمادی قرار گرفت.

1. Poly Dispersity Index

2. Differential Scanning Calorimetry

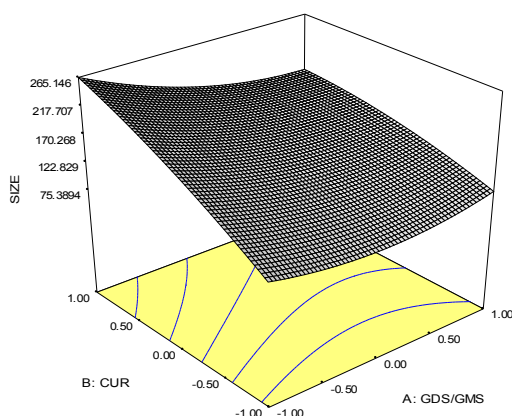


Fig 1 Response surface plot of the combined effect of lipids ratio and curcumin concentration on Particle size of NLC nanocarrier.

همان طور که در جدول شماره ۳، مشاهده می‌شود، در نانوحامل‌های تولیدشده به روش SLN، عبارات‌های نسبت لیپیدها، غلظت کورکومین، برهم‌کنش بین متغیرها و عبارت درجه دوم نسبت لیپیدها، عبارات‌های معنی‌دار بر تغییرات اندازه ذرات بودند. افزایش غلظت گلیسرول دی‌استئارات باعث کاهش اندازه‌ی نانوحامل‌های تولیدشده به روش SLN شد (شکل شماره ۲).

Table 3 Analysis of variance (ANOVA) for particle size of SLN nanocarriers

Source	DF	P value
A	1	0.031
B	1	0.043
A×B	1	0.013
A×A	1	0.031
B×B	1	0.388 ^{ns}
Error	6	
Total	11	

A: GDS/GMS (w/w)

B: Concentration of curcumin

ns: Not significant at 5 % level

در خصوص تأثیر نسبت لیپیدها بر اندازه ذرات لازم به ذکر است که گلیسرول مونو استئارات نسبت به گلیسرول دی‌استئارات دارای نقطه ذوب بیشتری است، این امر سبب افزایش ویسکوزیته‌ی فاز پراکنده در دیسپرسیون نانوحامل‌ها می‌شود که در نتیجه باعث کاهش نیروی اعمالی مؤثر (کارآیی) طی فرایند هوموژنیزاسیون و فراصوت شده و در نتیجه اندازه ذرات افزایش می‌یابد [۲۴]. همانطور که در شکل‌های شماره ۱ و ۲ مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت کورکومین اندازه نانوحامل‌های SLN و NLC افزایش یافت. این پدیده به دلیل

دامنه دمایی ۲۰ تا ۲۱۰ درجه سانتی‌گراد با نرخ دمایی ۱۰ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه و در حضور گاز نیتروژن با جریان ۳۰ میلی‌لیتر در دقیقه انجام شد (DSC 822، سوئیس) [۲۲].

۲-۳- روش آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها با استفاده از طرح کاملاً تصادفی با استفاده از GLM General Linear Model توسط نرم افزار SPSS صورت گرفت. مقایسه میانگین‌ها با استفاده از آزمون دانکن انجام شد. تمامی آزمایش‌ها در سه تکرار صورت گرفت.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- تأثیر نسبت لیپیدها و غلظت کورکومین

بر تغییرات اندازه نانوحامل‌های تولیدشده به

روش SLN و NLC

اندازه ذرات بر پایداری فیزیکی و شیمیایی، حلالیت، عملکرد بیولوژیک، نرخ رهایش، کدورت و تیرگی نانودیسپرسیون‌ها موثر می‌باشد [۱۰]. نتایج آنالیز واریانس (ANOVA) برای نانوحامل‌های NLC در جدول ۲ نشان داده شده است.

Table 2 Analysis of variance (ANOVA) for particle size of NLC nanocarriers

Source	DF	P value
A	1	0.024
B	1	0.011
A×B	1	0.703 ^{ns}
A×A	1	0.45 ^{ns}
B×B	1	0.228 ^{ns}
Error	6	
Total	11	

A: GDS/GMS (w/w)

B: Concentration of curcumin

ns: Not significant at 5 % level

با توجه به نتایج بدست آمده، نسبت گلیسرول دی‌استئارات به گلیسرول مونو استئارات و غلظت کورکومین اثرات معنی‌دار بر اندازه ذرات داشتند. در حالی که برهم‌کنش بین متغیرهای مستقل معنی‌دار نبود. مقادیر P در جدول ۲ نشان می‌دهد که همه متغیرها دارای اثر خطی بر اندازه متوسط نانوحامل‌های NLC می‌باشند. با افزایش غلظت گلیسرول در استئارات، اندازه نانوحامل‌ها کاهش یافت (شکل شماره ۱). این پدیده را می‌توان با توجه به نقطه ذوب و ساختار کریستالی این چربی‌ها تفسیر نمود [۲۴].

است. شکل ۳، بیانگر تأثیر متغیرهای مستقل بر شاخص چند بس پاشیدگی NLC، به صورت شمای سه بعدی می باشد. با توجه به معنی دار بودن اثرات خطی و درجه دوم غلظت کورکومین (جدول ۴)، وجود رابطه ی غیرخطی بین غلظت کورکومین و PDI مشخص است؛ به طوری که شکل ۳، نیز مبین این رفتار غیر خطی بوده و با افزایش غلظت کورکومین، میزان PDI افزایش یافت.

در رابطه با نحوه ی تأثیرگذاری نسبت لیپیدها باید اشاره شود که تأثیر خطی آن معنی دار نبود، در حالی که تأثیر درجه دوم معنی دار بود (جدول ۴) که چنین نتیجه گیری می شود که در شکل این پاسخ، انحناء وجود دارد. وجود انحناء (رابطه ی غیرخطی) با بررسی شکل ۳، به وضوح مشاهده می گردد.

Table 4 Analysis of variance (ANOVA) for PDI of NLC nanocarriers

Source	DF	P value
A	1	0.35 ^{ns}
B	1	0.012
A×B	1	0.42 ^{ns}
A×A	1	0.015
B×B	1	0.021
Error	6	
Total	11	

A: GDS/GMS (w/w)

B: Concentration of curcumin

ns: Not significant at 5 % level

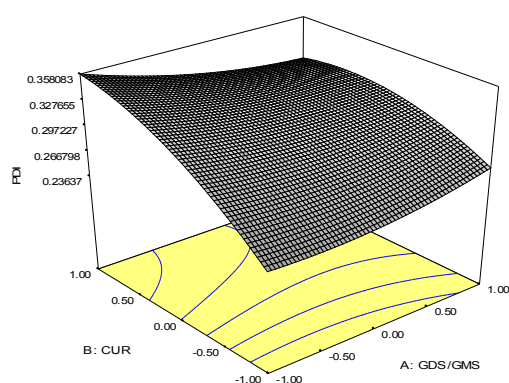


Fig 3 Response surface plot of the combined effect of lipids ratio and curcumin concentration on PDI of NLC nanocarrier.

در رابطه با نانوذرات لیپیدی جامد SLN، همان طور که در جدول ۵ مشاهده می شود، عباراتی که برای شاخص چند بس پاشیدگی معنی دار شدند شامل غلظت گلیسرول دی استئارات به گلیسرول مونواستئارات و غلظت کورکومین بودند. شکل ۴ بیانگر تأثیر متغیرهای مستقل بر شاخص چند بس پاشیدگی SLN، به صورت شمای سه بعدی می باشد. همان طور که

ساختار فیزیکی حجم کورکومین و در نتیجه اشغال کردن فضای زیادی از نانوحامل است.

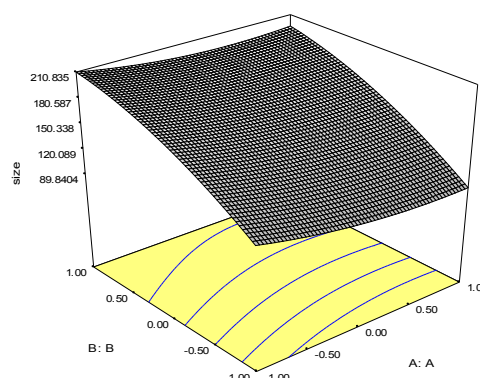


Fig 2 Response surface plot of the combined effect of lipids ratio and curcumin concentration on particle size of SLN nanocarrier.

همچنین افزایش ویسکوزیته فاز پراکنده در حضور ماده مؤثره و در نتیجه دشوار شدن کاهش اندازه ی ذرات در طی فرایند هوموژنیزاسیون نیز می تواند یکی دیگر از عوامل این افزایش باشد. به دلیل مقاومت بالاتر نسبت به نیروی ثقل به واسطه حرکت براونی، نانوذرات با اندازه کوچکتر دارای پایداری بیشتری است [۱۱].

خلیل و همکاران (۲۰۱۳) در پژوهش خود مشاهده کردند که افزودن روغن مایع به فرمولاسیون نانوحامل های حاوی ملوکسی کام^۱ باعث کاهش اندازه ذرات شد. این محققان دلیل کاهش اندازه ذرات را تحرک بیشتر زمینه یلپیدی پس از افزودن روغن مایع و در نتیجه توسعه تشکیل ذرات کوچک تر بیان کردند [۲۴].

۳-۲- تأثیر نسبت لیپیدها و غلظت کورکومین بر شاخص چند بس پاشیدگی نانوحامل های تولید شده به روش NLC و SLN

شاخص چند بس پاشیدگی نشان دهنده میزان یکنواختی دیسپرسیون بوده، به طور تئوری در محدوده صفر تا ۱ قرار دارد. مقادیر بزرگتر از ۰/۵ نشان دهنده ی پراکندگی وسیع اندازه ذرات می باشد [۱۰]. همان طور که در جدول ۴، مشاهده می شود، عباراتی که برای شاخص چند بس پاشیدگی NLC معنی دار شدند، شامل غلظت کورکومین (B) و عبارات درجه دوم غلظت کورکومین (B²) و درجه دوم نسبت لیپیدها (A²)

1. Meloxicam

۳-۳- تأثیر نسبت لیپیدها و غلظت کورکومین بر پتانسیل زتا نانوحامل‌های تولیدشده به روش SLN و NLC

پتانسیل زتا یک شاخص بسیار مهم در پایداری فیزیکی نانوحامل‌ها است و بالاتر بودن آن نشان‌دهنده پایداری بیشتر نانوحامل می‌باشد. منفی بودن بار سطحی ناشی از حضور گروه هیدروکسیل در توئین ۸۰ و لستین که امولسیفایرهای آنیونی هستند، می‌باشد. همان طور که در جدول ۶، مشاهده می‌گردد، عبارت‌های معنی‌دار بر تغییرات پتانسیل زتا NLC شامل غلظت کورکومین (B^2) و عبارت درجه دوم غلظت کورکومین (B^2) بودند. شکل ۵ بیانگر تأثیر متغیرهای مستقل بر پتانسیل زتابه صورت شمایی سه بعدی می‌باشد.

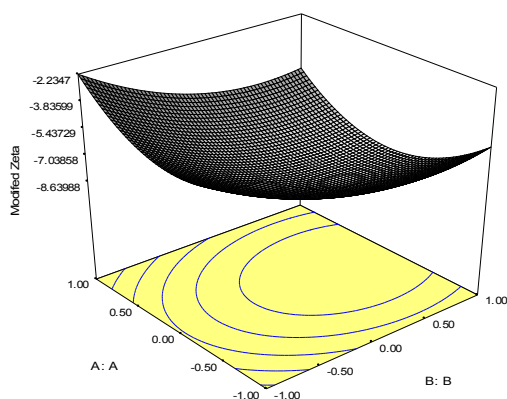


Fig 5 Response surface plot of the combined effect of lipids ratio and curcumin concentration on zeta potential of NLC nanocarrier

همان طور که مشاهده می‌شود، افزایش این متغیر سبب افزایش پتانسیل زتا در نمونه‌ها می‌شود. در حالی که تغییر نوع لیپید مصرفی هیچ تغییر معنی‌داری را در این شاخص به وجود نیاورد.

Table 6 Analysis of variance (ANOVA) for zeta potential of NLC nanocarriers

Source	DF	P value
<i>A</i>	1	0.068ns
<i>B</i>	1	0.038
<i>A</i> × <i>B</i>	1	0.788 ^{ns}
<i>A</i> × <i>A</i>	1	0.139 ^{ns}
<i>B</i> × <i>B</i>	1	0.018 ^{ns}
Error	6	
Total	11	

A: GDS/GMS (w/w)

B: Concentration of curcumin

ns: Not significant at 5 % level

مشاهده می‌شود در غلظت‌های بالای کورکومین، با افزایش غلظت گلیسرول دی استئارات، شاخص چند بس پاشیدگی کاهش می‌یابد. دلیل این امر را توان با توجه به نقطه ذوب و ساختار کریستالی این ترکیبات تفسیر نمود. با توجه به این که گلیسرول دی استئارات نسبت به گلیسرول مونو استئارات دارای نقطه ذوب کمتری است که این امر سبب کاهش ویسکوزیته ی فاز پراکنده در دیسپرسیون نانوحامل‌ها و در نتیجه توزیع یکنواخت تر ذرات می‌شود.

Table 5 Analysis of variance (ANOVA) for PDI of SLN nanocarriers

Source	DF	P value
<i>A</i>	1	0.022
<i>B</i>	1	0.01
<i>A</i> × <i>B</i>	1	0.583 ^{ns}
<i>A</i> × <i>A</i>	1	0.21 ^{ns}
<i>B</i> × <i>B</i>	1	0.463 ^{ns}
Error	6	
Total	11	

A: GDS/GMS (w/w)

B: Concentration of curcumin

ns: Not significant at 5 % level

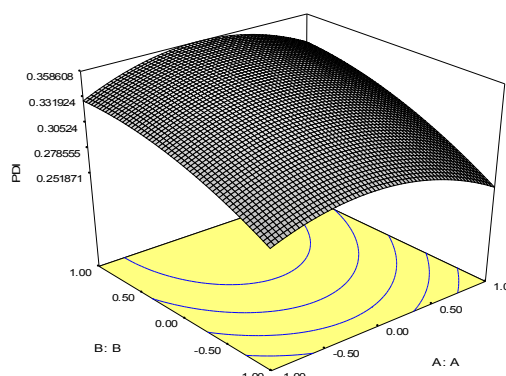


Fig 4 Response surface plot of the combined effect of lipids ratio and curcumin concentration on PDI of SLN nanocarrier

در خصوص تأثیر غلظت کورکومین، بر میزان PDI می‌توان بیان کرد که افزایش PDI در نانوحامل‌های حاوی کورکومین می‌تواند به علت افزایش حضور کورکومین آزاد (انکپسوله نشده) در سوسپانسیون باشد. هم‌چنین افزودن کورکومین به فرمولاسیون باعث دشوار شدن کاهش اندازه‌ی ذرات و ایجاد ذرات غیریکنواخت می‌شود که در نتیجه میزان PDI افزایش می‌یابد به همین دلیل افزایش غلظت کورکومین باعث افزایش بیشتر PDI می‌گردد [۱۰]. لاکاتوسو و همکاران (۲۰۱۳) نیز بیان کردند که افزایش غلظت لوتئین در حامل‌های لیپیدی نانو ساختار باعث افزایش میزان PDI می‌شود [۲۵].

گرفت. همانطور که در شکل ۷ مشاهده می شود، تنها یک پیک اندوترمیک در دمای ۱۸۰ درجه سانتی گراد برای نمونه کورکومین پودری مشاهده شد. وجود یک پیک اندوترمیک نشان دهنده خلوص و وجود یک نوع بلور در کورکومین پودری است. کری و همکاران (۲۰۱۶) در پژوهش خود دمای کورکومین پودری را ۱۷۹ درجه سانتی گراد گزارش کردند. همچنین با توجه به شکل ۷، مشاهده می گردد که در گرما نگاشت های مربوط به NLC و SLN تنها یک پیک ذوب وجود دارد و پیک مربوط به ذوب کورکومین در آن دیده نمی شود [۲۶]. وست سن و همکاران و خردمندیا و همکاران نیز طی تحقیقات خود بر روی نانوذرات لیپیدی و نانوذرات لیپیدی جامد حاوی کتوپروپین نتایج مشابهی را گزارش کردند. آن ها بیان کردند حذف پیک ذوب ترکیب فعال به دلیل آن است که در حامل به صورت غیر کریستالی انکپسوله شده است. همچنین سینی و همکاران (۲۰۱۲) حذف ذوب پیک ماده فعال در منحنی گرمایشی حامل های لیپیدی نانوساختار حاوی تاکرولیموس را به دلیل حل شدن کامل این ترکیب در زمینه لیپیدی بیان کردند [۲۷]. آن ها گزارش نمودند که کاهش اندازه ذرات و تشکیل آرایش جدید با نظم کمتر توسط لیپیدها و همچنین قابلیت امتزاج پذیری لیپیدها با ساختارهای مختلف و طول زنجیره های مختلف در نانوحامل های لیپیدی، مولکول های حل شده را در شبکه ی بلورین لیپید تثبیت می کند و از قرار گرفتن مولکول های حل شده به صورت قطرات چربی دوست کوچک جلوگیری می نماید.

همچنین با توجه به جدول شماره ۸، ذرات NLC نسبت به SLN دارای نقطه ی ذوب و آنتالپی کمتری می باشد که این امر احتمالاً به این دلیل است که افزودن روغن مایع به فرمولاسیون باعث تخریب ساختار کریستالی ماتریکس لیپیدی می شود که همین امر منجر به کاهش مقدار انرژی مورد نیاز برای غلبه بر نیروی بین شبکه ای و ذوب شدن نانوحامل ها در ساختار NLC می گردد.

Table 8 Melting temperature and enthalpy of developed nanocarriers

Nanocarriers	Enthalpy (j/g)	Melting point (°C)
NLC	60.54	52.64
SLN	68.35	54.29

تنها عبارت معنی دار برای SLN در خصوص نانوحامل های میزان پتانسیل زتا غلظت کورکومین بود (جدول ۷).

Table 7 Analysis of variance (ANOVA) for zeta potential of SLN nanocarriers

Source	DF	P value
A	1	0.539ns
B	1	0.004
A×B	1	0.151 ^{ns}
A×A	1	0.606 ^{ns}
B×B	1	0.843 ^{ns}
Error	6	
Total	11	

A: GDS/GMS (w/w)

B: Concentration of curcumin

ns: Not significant at 5 % level

تأثیر غلظت کورکومین بر پتانسیل زتا در شکل ۶، مشاهده می شود.

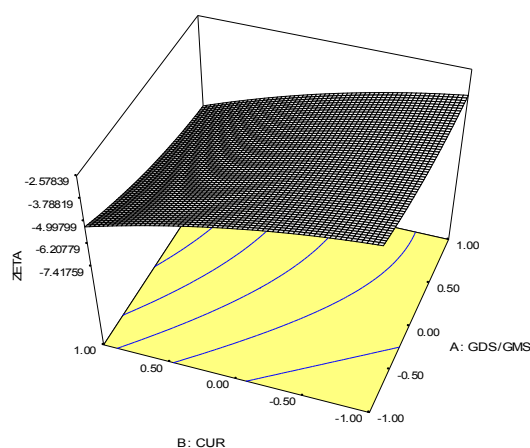


Fig 6 Response surface plot of the combined effect of lipids ratio and curcumin concentration on zeta potential of SLN nanocarrier

افزایش این متغیر سبب افزایش پتانسیل زتا در نانوحامل های تولیدی شد، در حالی که تغییر نوع لیپید مصرفی (نسبت گلیسرول دی استئارات به گلیسرول مونو استئارات) هیچ تغییر معنی داری در این پارامتر ایجاد نکرد. خلیل و همکاران (۲۰۱۳) نیز اظهار داشتند که هیچ رابطه ی معنی داری بین نوع لیپید مصرفی و میزان پتانسیل زتا وجود ندارد [۲۴].

۳-۴- رفتار حرارتی

رفتار حرارتی کورکومین و نانوحامل های NLC و SLN حاوی کورکومین که در شرایط بهینه تولید شده بودند با استفاده از روش گرماسنجی روبشی افتراقی (DSC) مورد بررسی قرار

ویسکوزیته فاز پراکنده در حضور ماده‌ی مؤثره، بارگذاری کورکومین در نانوحامل‌ها باعث افزایش معنی‌دار در اندازه ذرات و شاخص بس‌پاشیدگی شد. بطور کلی، با توجه به بررسی تأثیرات کمی و کیفی متغیرها بر اندازه ذرات، PDI و پتانسیل زتا ذرات NLC و ذرات SLN، می‌توان از غلظت ۵ درصد گلیسرول دی استئارات و ۰/۲۵ درصد کورکومین به عنوان شرایط بهینه برای تولید لیپید نانوساختار و نانوذرات لیپیدی استفاده نمود.

۵- منابع

- [1] Jayaprakasha, G., Rao, K., Jaganmohan, L., Sakariah, K.K. 2006. Antioxidant activities of curcumin, demethoxycurcumin and bisdemethoxycurcumin. *Food Chemistry*, 98(4): 720-724.
- [2] Bolourian Sh, Hosseini F, Rahimizade M, Fazli bazzaz B.B.S, Karimi M, Najaf najafi M. 1390. Natural edible color. jahad-e-daneshgahi-mashhad-publications.
- [3] Patricia F, Leal, Mara E. M. Braga, Daisy N. Sato, Joao E. Carvalho, Marcia O. M. Marques, M. Angela A. Meireles. 2003. Functional properties of spice extracts obtained via supercritical fluid extraction. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51: 2520-2525.
- [4] Joe B, Vijaykumar M, Lokesh B.R. 2004. Biological properties of curcumin-cellular and molecular mechanism of action. *Food Science and Nutrition*, 44:97-111.
- [5] Parvathy K.S., Negi P.S., Srinivas, P. 2009. Antioxidant, antimutagenic and antibacterial activities of curcumin- β -diglucoside. *Food Chemistry*, 115(1): 265-271.
- [6] Ravichandran, R. 2013. Studies on Dissolution Behaviour of Nanoparticulate Curcumin Formulation. *Advances in Nanoparticles*, 2, 51.
- [7] Martins A. F., Bueno P. V., Almeida E. A., Rodrigues, F. H., Rubira A. F., & Muniz, E. C. 2013. Characterization of χ -trimethyl chitosan/alginate complexes and curcumin release. *International journal of biological macromolecules*, 57, 174-184.
- [8] Chavhan S.S. and Sawant K.K. 2011. Nanosuspensions in drug delivery: recent advances, patent scenarios, and commercialization aspects, *Crit Rev. Ther. Drug Carrier Syst*, 28.5, 447-488.
- [9] Quintanilla-Carvajal, M. X., Camacho-Diaz, B. H., Meraz-Torres, L. S., Chanona-Perez, J. J., Alamilla-Beltran, L., Jimenez-

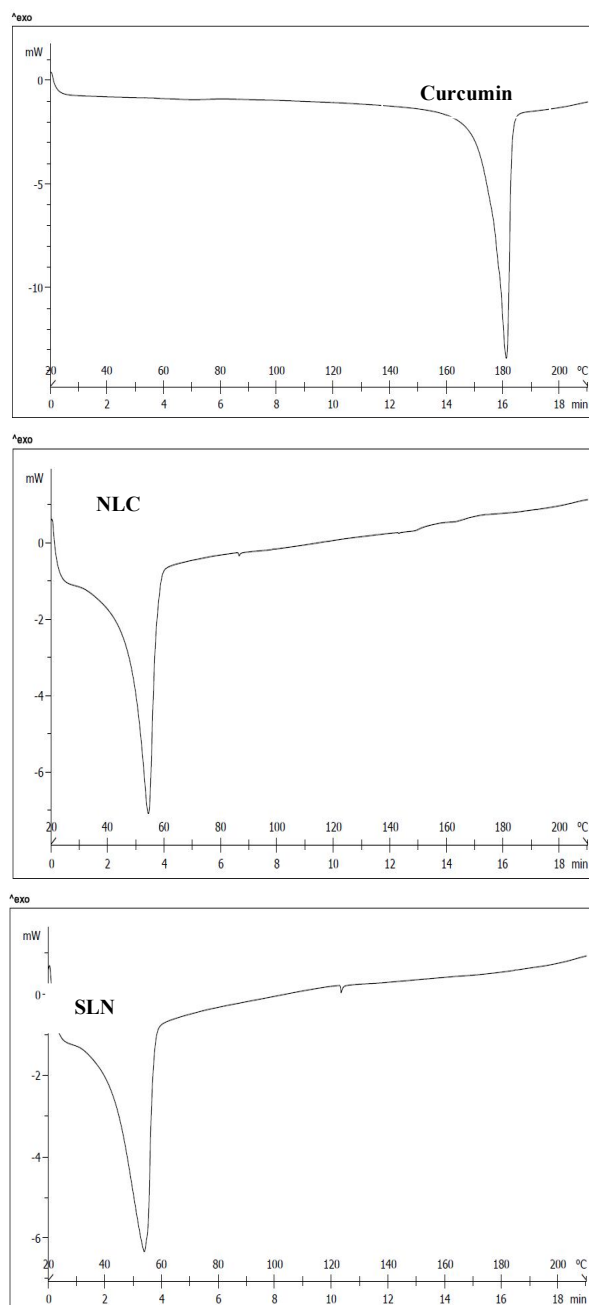


Fig 7 DSC thermographs of curcumin, NLC and SLN.

۴- نتیجه گیری

همان طور که قبلاً گفته شد ذرات NLC نسبت به ذرات SLN دارای اندازه ذرات و شاخص بس‌پاشیدگی کمتر، در حالی که دارای میزان بار الکتریکی سطحی بیشتری بوده است. می‌توان دلیل کاهش اندازه ی ذرات در NLC را حضور روغن مایع به صورت پراکنده در ذرات چربی و برهم زدن ساختار کریستالی چربی‌ها، بیان کرد. بر اساس نتایج بدست آمده به دلیل ساختار فیزیکی حجیم کورکومین و همچنین افزایش

- B: Biointerfaces, 82(2), 588-593.
- [20] Suwannateep, N., Banlunara, W., Wanichwecharungruang, S. P., Chiablaem, K., Lirdprapamongkol, K., & Svasti, J. 2011. Mucoadhesive curcumin nanospheres: Biological activity, adhesion to stomach mucosa and release of curcumin into the circulation. *Journal of Controlled Release*, 151(2), 176-182.
- [21] Rao, W., Zhang, W., Poventud-Fuentes, I., Wang, Y., Lei, Y., Agarwal, P., & He, X. 2014. Thermally responsive nanoparticle-encapsulated curcumin and its combination with mild hyperthermia for enhanced cancer cell destruction. *Acta Biomaterialia*, 10(2), 831-842.
- [22] Fathi, M., Varshosaz, J., Mohebbi, M., Shahidi, F. 2013. Hesperetin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructure Lipid Carriers for Food Fortification: Preparation, Characterization, and Modeling. *Food Bioprocess Technol*, 6:1464–1475.
- [23] Sze, A., Erickson, D., Ren, L., and Li, D. 2003. Zeta-potential measurement using the Smoluchowski equation and the slope of the current-time relationship in electroosmotic flow. *Journal of colloid and interface science*, 261(2): 402-410.
- [24] Khalil, R. M., Abd-Elbary, A., Kassem, M. A., Ghorab, M. M., and Basha, M. 2013. Nanostructured lipid carriers (NLCs) versus solid lipid nanoparticles (SLNs) for 85 topical delivery of meloxicam. *Pharmaceutical development and technology*, 19(3):304-314.
- [25] Lacatusu, I., Mitrea, E., Badea, N., Stan, R., Oprea, O., and Meghea, A. 2013. Lipid nanoparticles based on omega-3 fatty acids as effective carriers for lutein delivery. Preparation and in vitro characterization studies. *Journal of Functional Foods*, 5(3): 1260-1269.
- [26] Karri, v. , Gowthamarajan Kuppasamy, G. Talluri. 2016. Curcumin loaded chitosan nanoparticles impregnated into collagen-alginate scaffolds for diabetic wound healing. *International Journal of Biological Macromolecules*, 63: 1519-1529.
- [27] Singh, kk. And Pople. P. 2013. Development and evaluation of colloidal modified nanolipid carrier: application to topical delivery of tacrolimus, Part II--in vivo assessment, drug targeting, efficacy, and safety in treatment for atopic dermatitis. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 84(1):72-83.
- Aparicio, A., and Gutierrez-Lopez, G.F. 2010. Nanoencapsulation: a new trend in food engineering processing. *Food Engineering Reviews*, 2(1): 39-50.
- [10] Tamjidi F., Shahedi M., Varshosaz J., and Nasirpour A. 2013. Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*.
- [11] Fathi M., Mozafari M. R., and Mohebbi, M. 2012. Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends in food science & technology*, 23(1), 13-27.
- [12] McClements D. J. 2013. Edible lipid nanoparticles: Digestion, absorption, and potential toxicity. *Progress in lipid research*, 52(4): 409-423.
- [13] Awad, T.S., Helgasn, T., Kristbergsson, K., Decker, E.A., Weiss, J. and McClements, D.J. 2008. Effect of cooling and heating rates on polymorphic transformations and gelation of tripalmitin solid lipid nanoparticle (SLN) suspensions. *Food biophysics*, 3(2):155-162
- [14] Tiyaaboonchai W., Tungpradit W., and Plianbangchang P. 2007. Formulation and characterization of curcuminoids loaded solid lipid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 337(1), 299-306.
- [15] Apiratikul N., Penglong T., Suksen, K., Svasti, S., Chairoungdua, A., & Yingyongnarongkul, B. 2013. In vitro delivery of curcumin with cholesterol-based cationic liposomes. *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 39(4), 444-450.
- [16] Lin, C. C., Lin, H. Y., Chen, H. C., Yu, M. W., & Lee, M. H. 2009. Stability and characterisation of phospholipid-based curcumin-encapsulated microemulsions. *Food Chemistry*, 116(4), 923-928.
- [17] Ahmed, K., Li, Y., McClements, D. J., & Xiao, H. 2012. Nanoemulsion-and emulsion-based delivery systems for curcumin: Encapsulation and release properties. *Food chemistry*, 132(2), 799-807.
- [18] Gomes, G. V., Simplicio, I. A., Souto, E. B., Cardoso, L. P., and Pinho, S. C. 2013. Development of a Lipid Particle for β -Carotene Encapsulation Using a Blend of Tristearin and Sunflower Oil: Choice of Lipid Matrix and Evaluation of Shelf Life of Dispersions. *Food Technology and Biotechnology*, 51(3): 383-391.
- [19] Manju, S., & Sreenivasan, K. 2011. Hollow microcapsules built by layer by layer assembly for the encapsulation and sustained release of curcumin. *Colloids and Surfaces*



Production of Curcumin–Loaded Lipid Nanocarriers and Evaluation of Its Physicochemical Properties

Shahidi, F. ¹, Bolourian, Sh. ^{2*}, Mortazavi, S. A. ¹, Mohebbi, M. ¹, Bagheri, A. ³

1. Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad (FUM), Mashhad, Iran.
2. Department of Food Additives, Food Science and Technology Research Institute, Mashhad, Iran.
3. Department of Plant Biotechnology and Breeding, Faculty of Agriculture, Ferdowsi University of Mashhad (FUM), Mashhad, Iran.

ARTICLE INFO

Article History:

Received 2019/ 03/ 14

Accepted 2021/ 05/ 26

Keywords:

Nanoencapsulation,
Nanostructured lipid carrier,
Solid lipid nanoparticles,
Curcumin.

DOI: 10.52547/fsct.18.08.22

*Corresponding Author E-Mail:
shadibolourian@yahoo.com

ABSTRACT

Curcumin (diferuloylmethane), a polyphenol extracted from *Curcuma longa*, has been well known for its functional properties. In this study, nanostructured lipid carrier (NLC) and solid lipid nanoparticles (SLN) were used to encapsulate curcumin, overcoming its limitations in food application, such as instability, poor bioavailability and poor aqueous solubility. Nanocarriers were produced by a combination of high shear homogenization and ultrasonication methods. Effect of lipids ratio, type of nanocarriers and curcumin loading on some physicochemical properties of the nanocarriers were studied. Considering both bulky structure of curcumin and increase viscosity of dispersed phase in the presence of the active ingredient, incorporating the curcumin into the nanocarriers led to a significant increase in particle size and PDI. Statistical analysis showed that lipid ratio, nanocarrier type (SLN and NLC) and curcumin loading had a significant effect on particle size ($p < 0.05$). Based on DSC results, curcumin was well encapsulated by nanocarriers without interactions with other ingredients. Generally, the concentration of 0.05% glycerol distarate and 0.25% curcumin were optimal conditions for NLC nanocarrier production.