Archive of SID

بررسی اثر نوع چربی بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانوحامل‌های لیپیدی جامد حاوی فیکوسیانین

امین سیدیعقوبی[1]، فخری شهیدی[2*]، محبت محبی[3]، مهدی وریدی[4]،

شیوا گل محمدزاده[5]

۱- دانشجوی دکتری، علوم و صنایع غذایی، پردیس دانشگاه فردوسی مشهد
۲- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد
۳- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد
٤- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه فردوسی مشهد
٥- دانشیار گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی مشهد
(تاریخ دریافت: ٩٤/١٠/٠٥ تاریخ پذیرش: ٩٥/٠٦/٠٨)

چکیده

هدف از این مطالعه، بررسی تاثیر درصدهای مختلف چربی شامل مقادیر ۱۰۰٪ گلیسرول دی استئارات (GDS)، ۱۰۰٪ گلیسرول مونو استئارات (GMS)، ۱۰۰٪ اسید استئاریک (SA) و ترکیب چربی ها شامل ۵۰:۵۰ GDS:GMS، ۵۰:۵۰ GDS:SA و ۵۰:۵۰ SA:GMS بر خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانوحامل های لیپیدی جامد فیکوسیانین بود. استفاده از گلیسرول دی استئارات به دلیل ساختار متفاوت و دارا بودن یک شبکه لیپیدی نامنظم از کارایی درون پوشانی بهتری در مقایسه با دو چربی دیگر برخوردار بود. کمترین اندازه ذرات، بیشترین پتانسیل زتا و کمترین شاخص چندبس پاشیدگی به ترتیب مربوط به فرمولاسیون های حاوی ۱۰۰٪ GMS ، ۵۰:۵۰ GMS+SA و ۱۰۰٪ GDS بود. GDS در مقایسه با سایر لیپیدها از پایداری بهتری برخوردار بود و کمترین میزان رسوب دهی و چسبندگی به ذرات در آن مشاهده شد. کارایی درون پوشانی در فرمولاسیون‌های بدست آمده در محدوده ۳۹/۸۰ تا ٦٢/٣٨ درصد بود. به منظور بررسی ویژگی‌های مرفولوژیکی، ارزیابی رفتارهای حرارتی و ساختارهای شیمیایی موجود در نانوذرات لیپیدی از دستگاه‌های TEM، DSC و FTIR استفاده شد. نتایج نشان داد فیکوسیانین به دلیل دارا بودن ویژگی‌های امولسیفایری مناسب می‌تواند در سیستم های نانولیپیدی نانوپوشانی شود. در این میان فیکوسیانین نانوپوشانی شده با GDS به دلیل ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و ساختاری متفاوت در مقایسه با GMS و SA، از پایداری بهتری برخوردار بود و کمترین تغییرات در اندازه ذرات، پتانسیل زتا و شاخص چندبس پاشیدگی مشاهده شد.

کلید واژگان: حامل های لیپیدی، پایداری، فیکوسیانین.

*مسئول مکاتبات: fshahidi@um.ac.ir

www.SID.ir

Archive of SID

۱- مقدمه

اسپیرولینا پلاتنسیس به عنوان یک ریزجلبک سبز-آبی قادر است مقادیر زیادی از محصولات با ارزش بیولوژیکی بالا از جمله فیکوبیلی‌پروتئین‌ها را تولید نماید. فیکوبیلی پروتئین‌ها دسته‌ای از پروتئین‌های محلول در آب هستند که رنگ درخشانی داشته و دارای پیوند کووالانسی می‌باشند. به حلقه‌های تراپیرولی با زنجیره باز اصطلاحاً فیکوبیلین گفته می‌شود[۳].

از نقطه نظر جذب طیف‌های مرئی می‌توان فیکوبیلی پروتئین-ها را به ٤ گروه تقسیم کرد: فیکواریتروسیانین‌ها (با طول موج ٥٦٠ تا ٦٠٠ نانومتر)، فیکواریترین‌ها (با طول موج ٤٨٠ تا ٥٧٠ نانومتر)، فیکوسیانین‌ها (با طول موج ٥٩٠ تا ٦٣٠ نانومتر) و آلو-فیکوسیانین‌ها (با طول موج ٦٢٠ تا ٦٦٥ نانومتر). عمده-ترین رنگدانه‌های تولید شده توسط سیانوباکتری اسپیرولینا پلاتنسیس، آلو-فیکوسیانین و سی-فیکوسیانین است که هر دو به رنگ آبی می‌باشند. سی-فیکوسیانین رنگدانه حاصل از فوتوسنتز فیکوبیلی‌پروتئین بوده و بیشترین درصد رنگدانه حاضر در ریزجلبک اسپیرولینا پلاتنسیس، متعلق به آن می‌باشد، در حالی‌که آلوفیکوسیانین به مقادیر کمتر و تنها در هسته مرکزی این ریزجلبک یافت می‌شود [٤].

فیکوسیانین به عنوان ماده رنگی در تولید انواع نوشیدنی‌های سلامتی بخش، شربت‌ها، انواع شیرینی‌ها، آبنبات و نیز در لوازم آرایشی از جمله رژ لب و خط چشم استفاده می‌شود [٥]. به کارگیری فناوری نانو در تمام بخش‌های یک سیستم غذایی از تولید تا فرآوری، نگهداری و طراحی مواد، فراورده‌ها و کاربردهای بی‌بدیل، تغییرات چشمگیری ایجاد کرده است. این فناوری در ابعاد گسترده تر، علاوه بر نوآوری در ویژگی‌های مواد غذایی مانند بافت، طعم، خواص حسی دیگر، قدرت رنگ‌دهی، قابلیت فرآوری و پایداری در عمر ماندگاری محصول منجر به تولید فراورده‌های جدیدی نیز خواهد شد. همچنین فناوری نانو در بهبود قابلیت انحلال، پایداری حرارتی و زیست دسترس پذیری خوراکی ترکیبات زیست‌فعال موثر می باشد [٦و٧].

برخی از نانوحامل‌های غذایی مانند پوشش‌های پلیمری زیست تخریب پذیر طبیعی یا بر پایه لیپید بیشتر برای ریزپوشانی استفاده می‌گردند. نانومولسیون‌ها، نانولیپوزوم‌ها، نانوذرات لیپیدی جامد و حامل های لیپیدی نانو ساختار در نانوحامل‌های بر پایه لیپید کاربرد گسترده‌ای دارند، از این نانوحامل ها در صنایع داروسازی، آرایشی و غذایی استفاده می‌شود. از پلیمرهای طبیعی مانند آلبومین، ژلاتین، آلژینات، کلاژن، کیتوزان و آلفا لاکتالبومین در فرمولاسیون سیستم‌های رسانش نانو استفاده می‌گردد. در دهه اخیر پیشرفت‌های چشمگیری در زمینه تولید نانوحامل غذایی صورت گرفته و فراورده های مختلفی (مانند پروتئین آب پنیر) به عنوان نانوحامل ها به منظور افزایش زیست دسترس پذیری غذا-داروها در انتقال و رهایش نانو ذرات حاوی ویتامین به مخاط روده و نیز رسانش مواد معدنی بر پایه نانو تولید و عرضه شده است [٨و٩].

نانوحامل‌های غذایی معمولاً بر پایه کربوهیدرات، پروتئین یا لیپید هستند. سیستم‌های رهایش بر پایه نانو ذرات لیپیدی، انواع مختلفی دارند و شامل نانومولسیون‌ها، نانولیپوزوم‌ها، نانونیوزوم‌ها، نانو ذرات لیپیدی جامد، نانو غشاهای لیپیدی، نانو ذرات کروی لیپیدی و حامل‌های لیپیدی نانو ساختار می‌باشند. این نانوحامل‌ها افزایش دهنده حلالیت و زیست‌دسترس‌پذیریِ ترکیبات چربی دوستی هستند که در آب حلالیت ضعیفی دارند بنابراین، حامل های خوراکیِ مناسبی به شمار می روند. انتخاب یک سیستم مناسب جهت رهایش ترکیبات زیست فعال تحت تاثیر خواصی از جمله حلالیت و پایداری ترکیب زیست فعال، ایمنی و کارایی شبکه‌های لیپیدی حامل ترکیب زیست فعال، نوع و نحوه کاربرد می‌باشد.

نانوریزپوشانی بر پایه ترکیبات لیپیدی از جمله روش‌های نوین در حوزه فناوری نانو است. با استفاده از سیستم رهایش بر پایه لیپیدهای طبیعی می‌توان انواع مواد با حلالیت‌های مختلف را در مقیاس صنعتی مورد ریزپوشانی قرار داد. در این سیستم با کنترل و ممانعت از تخریب یا تغییر ترکیبات زیست‌فعال می-توان کارایی درون پوشانی برخی ترکیبات فعال سمّی را افزایش و میزان سمّیت آن‌ها را کاهش داد. یکی دیگر از ویژگی‌های منحصر به فرد نانوحامل‌های لیپیدی، رهایش هدفمند مواد به داخل بدن با استفاده از مکانیسم‌های فعال (ترکیب آنتی بادی-ها) و غیرفعال (اندازه ذرات) می‌باشد [١٠و١١].

در سیستم‌های رهایش می‌توان پایداری مواد محلول در آب را افزایش داد و یا در صورت نیاز، با بکارگیری روش‌های هم افزایی ترکیبات محلول در چربی را جایگزین نمود [١٢]. همچنین، ریزپوشانی ترکیبات زیست‌فعال از طریق حامل های لیپیدی توان درمانی آن‌ها را افزایش می‌دهد. بر اساس مطالعات،

www.SID.ir

Archive of SID

این امر از طریق تسهیل رهایش بین سلولی و افزایش زمان حضور آن‌ها در سلول حاصل می‌شود [۱۳].

در فرمولاسیون سیستم‌های رهایش ذرات بر پایه لیپید عناصر سازنده اصلی شامل، امولسیفایرها (پولوکسامر ۱۸۸، پلی سوربات ۲۰، لسیتین)، لیپیدها (تری گلیسیریدها، استروئیدها)، لیپیدهای دو لایه‌ای (فسفولیپیدها) و لیپیدهای غیر دولایه‌ای (لیپیدهای سخت، مخلوط مونو، دی و تری گلیسیرید) می‌باشد [١٤].

نانوذرات لیپیدی جامد اولین بار جهت بارگیری داروهای لیپوفیل طراحی شدند. هر چند امروزه برای داروهای هیدروفیل نیز استفاده می شوند. یکی از معایب این حامل های دارویی، ظرفیت کم آنها برای پذیرش داروی محلول در آب است که با توجه به شبکه لیپیدی آنها در بهترین حالت به ۲۵ درصد می رسد. ظرفیت پذیرش دارو در این نانوذرات به خصوص جهت داروهای هیدروفیل به محلولیت دارو در لیپید مذاب، قابلیت اختلاط بین لیپید و دارو و ساختار فیزیکی و شیمیایی شبکه لیپیدی بستگی دارد. برخی متغیرها از جمله نقطه ذوب، سرعت کریستالیزه شدن لیپید و شکل کریستال های لیپید تاثیر به‌سزایی در تشکیل نانوذرات لیپیدی دارند. همچنین طول زنجیره اسید چرب لیپیدهای سازنده، بر اندازه ذرات اثرگذار می باشد [۱۵].

در این مطالعه به بررسی اثر استفاده از نوع چربی در سیستم نانوذرات لیپیدی جامد با هدف بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانوحامل های لیپیدی بدست آمده از ترکیب زیست فعال فیکوسیانین پرداخته می شود.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

در این پژوهش گلیسرول مونو استئارات با نام تجاری Geleol و گلیسرول دی استئارات با نام تجاری Precirol ATO5 از شرکت Gattefosse فرانسه تهیه شد. اسید استئاریک و توئین ۸۰ از شرکت Merck آلمان، پلوکسامر ۱۸۸ از شرکت Uniqema بلژیک، فیکوسیانین با نام تجاری Futural Spirulina Blue از شرکت Roha هند، و سایر مواد شیمیایی از درجه آزمایشگاهی و ساخت شرکت مرک آلمان تهیه شد. در فرایند تهیه نمونه ها از آب دیونیزه استفاده شد.

۲-۲- روش‌ها

به منظور تهیه فرمولاسیون اولیه (فاقد فیکوسیانین)، از ترکیب انواع چربی های جامد شامل GMS، GDS و SA با درصدهای مشابه و یکسان از سورفکتانت های توئین ۸۰ و پلوکسامر ۱۸۸ استفاده شد. در فرایند ساخت نانوحامل های لیپیدی از دستگاه هوموژنیزاسیون با فشار کششی بالا (مدل دیاکس ۹۰۰ ساخت شرکت Heidolph آلمان) استفاده شد. مدت زمان این فرایند در مجموع ٤/٥ دقیقه بود که از سرعت-های ۳ به مدت ۲/۵ دقیقه، ٤ به مدت ۱ دقیقه و ۵ به مدت ۱ دقیقه استفاده شد. سپس به منظور کاهش اندازه ذرات و توزیع یکنواخت آن از دستگاه پروب سونیکیتور (مدل Sonipreb 130 ساخت شرکت MSE انگلستان) استفاده شد. فرایند سونیکاسیون از ٤٥ سیکل تشکیل گردید که به منظور کنترل دمای نمونه و کمترین تاثیر در افزایش دما، هر سیکل به صورت اتوماتیک به مدت ٤ ثانیه روشن و ۱ ثانیه خاموش گردید. پس از اتمام فرایند سونیکاسیون، نمونه به سرعت وارد حمام آب ٤ درجه سانتی‌گراد شد. پس از سرد شدن نمونه وارد ویال های شیشه ای شد و سپس به منظور جلوگیری از اکسیداسیون مقداری گاز بی اثر آرگون به قسمت فوقانی نمونه دمیده، سپس با استفاده از پارافیلم درب ویال به طور کامل بسته و جهت جلوگیری از نفوذ نور به دور ویال فویل آلومینیم کشیده شد. کلیه نمونه‌ها تا انجام آزمون های تعیین اندازه ذرات، پتانسیل زتا و شاخص چند بس پاشیدگی در یخچال ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید.

۲-۳- تعیین اندازه ذرات، شاخص چندبس پاشیدگی و پتانسیل زتا

متوسط اندازه ذرات، شاخص چند بس پاشیدگی و نیز پتانسیل زتا با دستگاه PSA[1] (مدل 30HS, Nanoseries ساخت شرکت Malvern انگلستان) و در زاویه ثابت ۹۰ درجه سانتی‌گراد اندازه گیری شد. قطر ذرات بر مبنای تابعی از شدت پراکنش نور با فرض کروی بودن آن‌ها محاسبه شد. روش انجام آزمون به این صورت است که ۱۰ میکرولیتر از نمونه تهیه شده در همان‌روز پس از انتقال به میکروسل کوارتز با حجم ۱/۵ میلی‌لیتر، با ۹۹۰ میکرولیتر آب دیونیزه رقیق شد (به میزان ۱ به ۱۰۰). اندازه ذرات بر حسب Z-average گزارش شد.

www.SID.ir

Archive of SID

۲-٤- بررسی پایداری فیزیکی نانوذرات لیپیدی حاوی فیکوسیانین

به منظور بررسی میزان پایداری و تغییرات حاصل در فرمولاسیون های برتر حاصل از فاز انتخابی که از لحاظ ظاهری فاقد رسوب و ذرات معلق به هم چسبیده باشند، در زمان های ۱، ۳ و ٦ ماه توسط دستگاه PSA فاکتورهای اندازه ذرات، شاخص چند بس پاشیدگی و پتانسیل زتا مورد ارزیابی مجدد قرار گرفت. کلیه نمونه ها تا زمان فرارسیدن آزمون پایداری مطابق شرایط مندرج در بخش روش ساخت در دمای ٤ درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند. همچنین به منظور انجام آزمون های حرارتی DSC و طیف سنجی FTIR، نمونه های SLN با استفاده از دستگاه خشک کن انجمادی (مدل DW3 ساخت شرکت Heto Hotten دانمارک) تهیه و مورد بررسی قرار گرفت.

۲-٤- کارایی درون پوشانی (EE)

برای محاسبه کارایی درون پوشانی لازم است ابتدا منحنی کالیبراسیون در غلظت های مختلف از فیکوسیانین حل شده در آب بدست آید. برای این منظور غلظت های ۱ تا ۰/۰۲۵ میلی-گرم در میلی‌لیتر فیکوسیانین در آب تهیه گردید سپس جذب این نمونه ها با دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ٦۲۰ نانومتر محاسبه شد [١٦]. درصد کارایی درون پوشانی مطابق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$EE\,(\%) = \frac{(W_T - W_F)}{W_T}$$

در فرمول فوق:

W_T معادل وزن کل فیکوسیانین به کار رفته در فرمولاسیون نانوحامل لیپیدی؛

W_F معادل مقدار فیکوسیانین آزاد در فاز فیلتر شده.

۲-۵- تعیین نقطه ذوب و مطالعات آنالیز حرارتی (DSC)

آنالیز حرارتی به منظور بررسی خصوصیات کریستال یا ذوب نانوذرات لیپیدی حاوی فیکوسیانین با استفاده از دستگاه DSC (مدل 822e شرکت Mettler Toledo سوئیس) مورد مطالعه قرار گرفت. در یک پن آلومینیومی مقدار ۵ میلی گرم SLN فاقد فیکوسیانین قرار داده و درب آن را با وسیله مخصوص محکم گردید و با کمک سوزن سوراخ کوچکی در مرکز آن ایجاد شد. در پن دیگر نیز اتمسفر به عنوان رفرنس مدنظر قرار گرفت. آنالیز نمونه ها تحت اثر گاز نیتروژن صورت پذیرفت. با توجه به نقطه ذوب GDS، SA و GMSکه به ترتیب در محدوده ٦۵، ۷۰ و ۷۲ درجه سانتی‌گراد قرار دارد، دمای دستگاه در محدوده ٤ تا ۲۰۰ درجه سانتیگراد تنظیم شد. در هر دقیقه ۱۰ درجه سانتیگراد دمای کوره افزایش یافت [۱۷].

۲-٦- آنالیز طیف سنج مادون قرمز تبدیل فوریه (FTIR)

طیف سنجی مادون قرمز با استفاده از دستگاه FTIR (مدل Avatar 370 ساخت شرکت Termo Nicolet آمریکا) انجام شد. فرکانس دستگاه بین cm^{-1} ۵۰۰ تا cm^{-1} ٤۰۰۰ تنظیم گردید. مقادیر لازم از نمونه با نسبت ۱ به ۵۰ از پلت KBr تهیه و آنالیز گردید.

۲-۷- بررسی مورفولوژی نانوذرات لیپیدی (TEM)

برای بررسی مورفولوژی نانوذرات لیپیدی از روش عکس-برداری میکروسکوپ الکترونی عبوری TEM (مدل CM120 ساخت شرکت فیلیپس هلند) استفاده گردید. نمونه حدود ۵۰ برابر با آب مقطر رقیق شد، سپس ۲۰ میکرولیتر از نمونه روی سطح پوشش داده شده با کربن قرار گرفت و پس از ۳۰ ثانیه به وسیله فیلتر کاغذی خشک گردید. ۲۰ میکرولیتر از اورانیل استات ۲٪ در آب، روی پوشش قرار گرفت و پس از ۳۰ ثانیه با فیلتر کاغذی خشک شد، سپس نمونه مذکور در زیر میکروسکوپ الکترونی مورد مشاهده و بررسی قرار گرفت [۱۸].

۲-۸- روش آماری به کار رفته در این پژوهش

تمام آزمون‌های مورد بررسی در سه تکرار انجام و نتایج در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. سپس میانگین صفات با نرم افزار آماری SPSS و براساس آزمون چند دامنه‌ای دانکن در سطح معنی‌داری ۵ درصد ($p \leq ۰/۰۵$) مقایسه شد.

www.SID.ir

Archive of SID

۳- نتایج و بحث

۳-۱- اندازه ذرات، پتانسیل زتا، شاخص چندبس باشیدگی و کارایی درون پوشانی

همانطور که در جدول ۱، مشاهده می شود استفاده از نوع چربی ها تاثیر معنی داری بر اندازه ذرات، پتانسیل زتا، شاخص چندبس پاشیدگی و کارایی درون پوشانی نمونه های SLN حاوی فیکوسیانین داشت (P<۰/۰۵). با توجه به اینکه در برخی از منابع نوع و میزان سورفکتانت توئین ۸۰ و پلوکسامر ۱۸۸ وابسته به نوع چربی به کار رفته در فرمولاسیون می‌باشد، لذا در این مطالعه اثر ترکیبی استفاده از این سورفکتانت ها با مقادیر مساوی بر ویژگی های فیزیکوشیمیایی فرمولاسیون های تولید شده بررسی شد [۱۹]. نتایج نشان داد فرمولاسیون شماره ۲ در مقایسه با سایر فرمولاسیون‌ها از اندازه ذرات کمتری برخوردار بود (زمان صفر) اما در مدت زمان سه و شش ماه تغییرات معنی داری در میزان اندازه ذرات، شاخص چند بس پاشیدگی و نیز پتانسیل زتا مشاهده شد(P<۰/۰۵). فرمولاسیون شماره ۱ در مقایسه با سایر فرمولاسیون ها از پایداری نسبتاً بهتری برخوردار بود و علت این امر می تواند ساختار شیمیای این ترکیب باشد. GDS با دو اسید چرب مختلف C18 و C16 دارای شبکه لیپیدی نامنظمی ایجاد کرده و بارگیری بهتری به دنبال خواهد داشت. وجود یک شبکه لیپیدی نامنظم منجر به افزایش درصد کارایی درون پوشانی و رهایش کنترل شده ترکیبات زیست فعال می‌شود [۲۰]. همچنین نتایج نشان می دهد در SLN های تهیه شده با GDS ذرات از لحاظ اندازه و شاخص چند بس پاشیدگی پایداری مناسبی دارند [۱۷]. فرمولاسیون شماره ۳ بیشترین سایز ذرات و کمترین پایداری را نشان داد به طوریکه در مدت زمان ٦ ماه نمونه دچار افزایش ناگهانی در ویسکوزیته شد. اسید استئاریک به دلیل ساختار خاصی که دارد اندکی نور را افتراق داده و لذا در حین سایزگیری اندکی تفاوت در تکرار ایجاد نمود [۲۱].

نتایج بررسی اثر چربی بر کارایی درون پوشانی نانوحامل های لیپیدی نشان داد مقدار فیکوسیانین درون پوشانی شده در نمونه های تهیه شده با GDS و فرمولاسیون های ترکیبی با GDS به مراتب از کارایی بیشتری در مقایسه با نمونه های فرموله شده با GDS و استئاریک اسید برخوردار است.

نکته دیگری که می توان در این بررسی به آن اشاره کرد، نقش امولسیفایری رنگدانه فیکوسیانین می باشد که خود به دلیل ماهیت پروتئینی تا حدودی در تثبیت این رنگدانه در ساختار نانوذره موثر بود. نتایج تحقیقات نشان می‌دهد افزودن فیکوسیانین می‌تواند منجر به بهبود معناداری در ویژگی‌های رئولوژیکی امولسیون‌ها شود که با افزایش غلظت فیکوسیانین مشهودتر می‌باشد [۲۲]. در خصوص خاصیت امولسیفایری فیکوسیانین می‌توان گفت در برهم کنش مولکول‌های پروتئین فیکوسیانین در حد فاصل بین سطح قطرات روغن و لایه های سطحی از پروتئین احتمال کاهش کشش سطحی با تشکیل فیلم تقویت می‌شود [۲۳]. در مطالعات انجام شده استفاده از ۰/۱ تا ۳۰ درصد چربی و ۰/۵ تا ۵ درصد سورفکتانت در تهیه نانوحامل های لیپیدی مناسب می‌باشد [۲]. استفاده از GDS (پریسرول) به عنوان چربی موثر در افزایش کارایی ریزپوشانی در سیستم نانوحامل های لیپیدی منجر به افزایش کارایی ریزپوشانی تا ۹۸/۵ درصد شد [۱]. در مقایسه کارایی ریزپوشانی در سیستم SLN با استفاده از چربی‌های جامد GDS، GMS، گلیسرول تری استئارات مشخص شد استفاده از GDS پس از گلیسرول تری استئارات بیشترین کارایی در ریزپوشانی نانوحامل های لیپیدی جامد حاوی اولانزاپین را نشان داد [۲٤]. GDS، دی گلیسیریدی با دو اسید چرب متفاوت C16 و C18 می‌باشد که به صورت مخلوطی از تری

Table 1 Formulation composition (percent weight/weight emulsion) and zero time analysis of solid lipid nanoparticles

Formulation	Glycerol di stearate	Glycerol mono stearate	Stearic Acid	Particle Size (nm)	Zeta Potential (mv)	polydispersity index	encapsulation efficiency (%)
1	500mg	-	-	97.13 ± 0.23^{D}	-16.14 ± 0.10^{D}	0.15 ± 0.03^{E}	62.38 ± 1.31^{A}
2	-	500mg	-	80.52 ± 0.10^{E}	-21.28 ± 0.23^{D}	0.32 ± 0.10^{BC}	53.91 ± 2.45^{C}
3	-	-	500mg	310.71 ± 2.35^{A}	-29.56 ± 0.19^{AB}	0.35 ± 0.11^{B}	32.59 ± 0.71^{E}
4	250mg	250mg	-	92.49 ± 0.46^{D}	-19.72 ± 0.46^{C}	0.25 ± 0.02^{CD}	57.48 ± 2.83^{BC}
5	250mg	-	250mg	193.00 ± 1.62^{B}	-24.92 ± 0.37^{B}	0.31 ± 0.08^{C}	44.52 ± 3.15^{D}
6	-	250mg	250mg	160.19 ± 1.06^{C}	-33.13 ± 0.18^{A}	0.43 ± 0.05^{A}	39.80 ± 2.08^{D}

for all formulations,0.1% Phycocyanin, 3% surfactant Tween 80+Poloxamer 188 (50-50) and up to 100%purified water were added
values in each column followd by different letters are significantly different (P<0.05)

www.SID.ir

Archive of SID

استئارین، تری پالمیتین و دی استئارین است. بنابراین انتظار می‌رود شبکه لیپیدی نامنظم تری در مقایسه با گلیسرول مونواستئارات و اسید استئاریک داشته و منجر به افزایش قدرت بارگیری و رهایش کنترل شده ترکیب دارو می‌شود [۲۰].

۳-۲- بررسی پایداری نانوذرات لیپیدی جامد

نتایج مطالعات پایداری نانوذرات لیپیدی جامد نشان می‌دهد، استفاده از GDS و ترکیب سورفکتانت توئین ۸۰ به همراه پلوکسامر ۱۸۸ منجر به پایداری نانوذرات در ویژگی‌های اندازه ذرات، شاخص چندبس پاشیدگی و پتانسیل زتا به مدت ٦ ماه شد. همچنین GDS در مقایسه با گلیسرول مونواستئارات گروه‌های عاملی هیدروفیل‌تری دارد [۲۵]. سازگار بودن نوع سورفکتانت با چربی از اهمیت بالایی برخوردار است. برخی از سورفکتانت ها از جمله پولوکسامر ۱۸۸ و توئین ۸۰ به ترتیب سازگاری بیشتری با GDS و GMS یا استئاریک اسید دارند. همچنین سمیت سلولی آنها بسیار ناچیز می باشد [۱۹].

Table 2 Stability study of produced nanocarries and stored in 4°C

Characterization	formulation	zero month	third month	sixth month
Particle Size (nm)	1	97.13 ± 0.23^{A}	101.52 ± 0.11^{A}	180.63 ± 1.03^{A}
	2	80.52 ± 0.10^{B}	114.24 ± 0.49^{A}	120.36 ± 0.31^{A}
	3	310.71 ± 2.35^{C}	490.36 ± 1.42^{B}	534.03 ± 2.18^{A}
	4	92.49 ± 0.46^{B}	100.25 ± 0.20^{AB}	113.05 ± 0.27^{A}
	5	193.00 ± 1.62^{C}	215.28 ± 2.39^{BC}	302.00 ± 0.72^{A}
	6	160.19 ± 1.06^{B}	189.42 ± 1.70^{AB}	201.59 ± 0.69^{A}
Polydispersity index	1	0.15 ± 0.03^{A}	0.19 ± 0.1^{A}	0.22 ± 0.02^{A}
	2	0.32 ± 0.10^{C}	0.41 ± 0.05^{B}	0.47 ± 0.08^{A}
	3	0.35 ± 0.11^{B}	0.41 ± 0.19^{A}	0.43 ± 0.09^{A}
	4	0.25 ± 0.02^{A}	0.28 ± 0.03^{A}	0.29 ± 0.06^{A}
	5	0.31 ± 0.08^{B}	0.53 ± 0.10^{A}	0.57 ± 0.08^{A}
	6	0.43 ± 0.05^{C}	0.60 ± 0.07^{B}	0.75 ± 0.1^{A}
Zeta potential (mv)	1	-16.14 ± 0.10^{A}	-14.28 ± 0.35^{B}	-13.80 ± 0.10^{B}
	2	-21.28 ± 0.23^{AB}	-23.11 ± 0.23^{A}	-20.40 ± 0.92^{B}
	3	-25.56 ± 0.19^{B}	-31.67 ± 1.69^{A}	-30.06 ± 0.82^{B}
	4	-19.72 ± 0.46^{A}	-16.30 ± 0.59^{B}	$-15.391.72^{B}$
	5	-24.92 ± 0.37^{B}	-26.48 ± 0.29^{A}	-25.01 ± 0.54^{B}
	6	-33.13 ± 0.18^{A}	-25.10 ± 0.50^{B}	-23.49 ± 0.43^{B}

values in each row followed by different letters are significantly different ($P<0.05$)

۳-۳- مطالعات آنالیز حرارتی (DSC)

نتایج آزمون DSC کلیه فرمولاسیون‌ها در جدول ۳ نشان داده است. مطابق نتایج می‌توان گفت نقطه ذوب فیکوسیانین در دمای ۱۷۱ درجه سانتی‌گراد می‌باشد. نقطه ذوب چربی خالص گلیسرول دی استئارات، اسید استئاریک و گلیسرول مونو استئارات نیز به ترتیب ٦٥/٤، ٦٩/٥ و ٧١/٩ درجه سانتی‌گراد بود. نتایج نشان داد نقطه ذوب SLN های تهیه شده در مقایسه با چربی خالص کمتر و اختلاف معنی دار می باشد ($P<۰/۰۵$). این کاهش می‌تواند به دلیل تغییر در ساختار چربی و تبدیل آن از فرم β' به β باشد [١٦]. در نتایج DSC مربوط به نمونه های SLN یک شیفت ملایم به سمت چپ مشاهده شد که علت اصلی، تغییرات ساختاری و تبدیل شدن ماده به نانوذره می‌باشد. در نمودار DSC فیکوسیانین، پیک اول در دمای ۸۵ درجه مربوط به رطوبت می‌باشد و پیک دوم مربوط به نقطه ذوب فیکوسیانین است. در کلیه نمودارهای DSC حاوی فیکوسیانین پس از آغاز حرارت دهی از دمای محیط تا ۲۰۰ درجه هیچ گونه پیکی مشاهده نشد که این امر مبین انحلال فیکوسیانین در لیپیدهای ذوب شده و تغییر ساختار کریستالی آن به صورت آمورف می‌باشد. زیرا اگر فیکوسیانین درون ساختار شبکه لیپیدی قرار نمی گرفت و فرایند ساخت

www.SID.ir

Archive of SID

فرمولاسیون ها به درستی انجام نمی شد در زمان خشک کردن انجمادی احتمال قرارگرفتن فیکوسیانین روی سطح نانوذرات بالا بود.

رفتار حرارتی نانوذرات لیپیدی حاوی فیکوسیانین در جدول ٣ نشان داده شده است.

Table 3 thermal behavior of nano lipid carriers

Formulation	T_{eo}	T_m
1	56.2	64.7^{C}
2	63.3	68.6^{A}
3	52.7	66.3^{B}
4	69.4	65.9^{B}
5	54.8	65.3^{BC}
6	56.2	68.1^{A}

values in each row followed by different letters are significantly different (P<0.05)

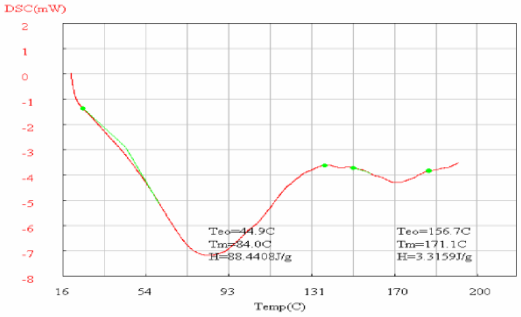

Fig 1 DSC thermograph of Phycocyanin

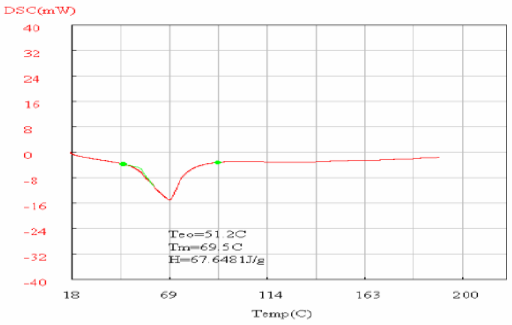

Fig 2 DSC thermograph of stearic acic

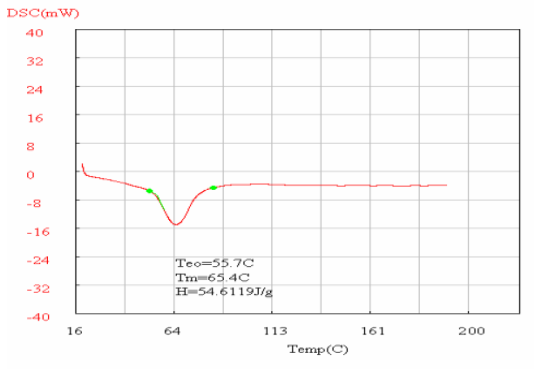

Fig 3 DSC thermograph of glycerol distearate

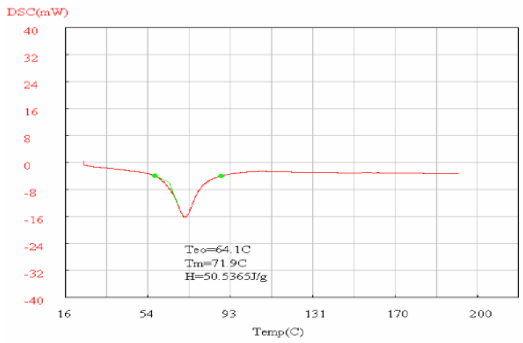

Fig 4 DSC thermograph of glycerol monostearate

٣-٤- نتایج FTIR

نتایج FTIR فیکوسیانین خالص نشان داد این ماده دارای باندهای آمیدی نوع یک (C=O) در عدد موج ١٦٥٨ cm^{-1} و باندهای آمیدی نوع دو (C=O) در عدد موج ١٥٤٦ cm^{-1} می باشد. وضعیت و شکل باند آمیدی نوع یک در آنالیز ساختار نوع دو پروتئین به کار گرفته می شود. با توجه به نتایج بدست آمده می‌توان گفت این پیک بیانگر ساختار آلفا هلیکس از نوع دوم پروتئین می‌باشد. حلقه های آروماتیک فیکوسیانین نیز در حد فاصل عدد موج ١٥٠٠ تا ١٦٠٠ cm^{-1} مشاهده شد. پیک های مربوط به اسیدهای کربوکسیلیک نیز در مقادیر ١٠٨٠ تا ١٣٠٠ cm^{-1} مشاهده شد. در نتایج بدست آمده از آنالیز FTIR حاصل از گلیسرول مونو استئارات، گلیسرول دی استئارات و اسید استئاریک باندهای C=O در محدوده cm^{-1} ١٧٣٢، حلقه‌های آروماتیک در محدوده ٧٢٠ cm^{-1} و نیز باندهای هیدروژنی متصل به گروه اسیدهای کربوکسیلیک C-

www.SID.ir

Archive of SID

H در محدوده $2850 cm^{-1}$ نشان داده شده است. نتایج طیف سنجی نانوحامل های لیپیدی جامد و نیز چربی های خالص نشان داد کلیه نتایج بدست آمده با مطالعات انجام شده مطابقت دارد[۲۶].

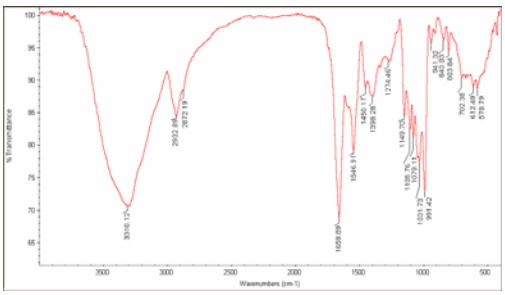

Fig 5 FTIR Spectrum of Phycocyanin

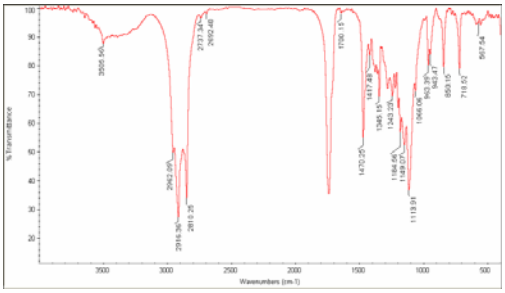

Fig 6 FTIR spectrum of Stearic acid

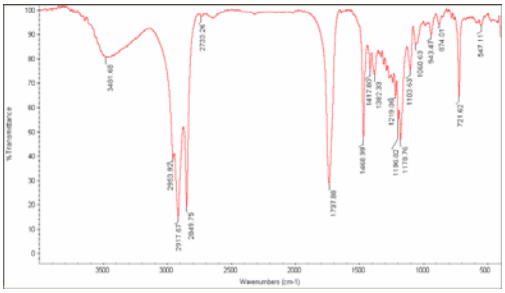

Fig 7 FTIR spectrum of glycerol distearate

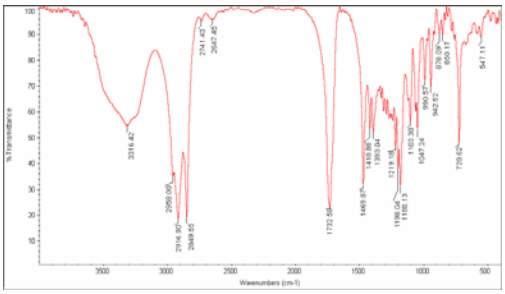

Fig 8 FTIR spectrum of glycerol monostearate

۳-۵- مرفولوژی نانوذرات

به منظور بررسی مورفولوژی نانوذرات از دستگاه میکروسکوپ الکترونی عبوری استفاده شد. نتایج نشان داد در فرمولاسیون شماره ۳، ۵ و ٦ به دلیل استفاده از اسید استاریک ذرات حالت بیضوی داشته ولی در فرمولاسیون های تهیه شده از گلیسرول دی استئارات و مونو استئارات شکل ذرات به صورت تجمعی و کروی بود. در مقایسه با ابعاد بدست آمده توسط دستگاه PSA نتایج TEM صرفاً در خصوص فرمولاسیون های حاوی اسید استاریک دارای اختلاف معنی داری بود ($P<0/05$). علت این موضوع می تواند به دلیل افتراق نور در زمان سایز گرفتن باشد. اندازه ذرات بدست آمده با فرمولاسیون حاوی اسید استاریک ۲۵۰ نانومتر و با استفاده از گلیسرول دی استئارات ۷۰ نانومتر می باشد. در بررسی مورفولوژی نانوذرات لیپیدی، نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی تونلی بیانگر تائید تشکیل نانوذرات با ابعاد کمتر از ۸۰ نانومتر بود. شکل کروی نانوذرات منجر به افزایش در توان رهایش کنترل شده فیکوسیانین در شرایط مختلف محیطی است [۲۷].

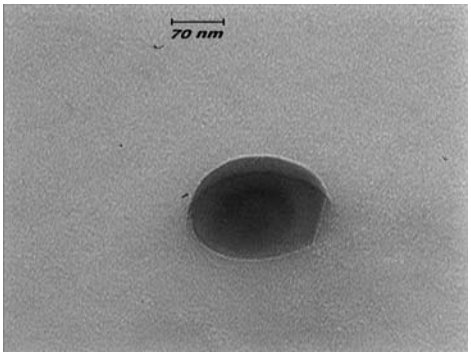

Fig 9 TEM morphology of Solid lipid nanoparticles prepared of glycerol distearate

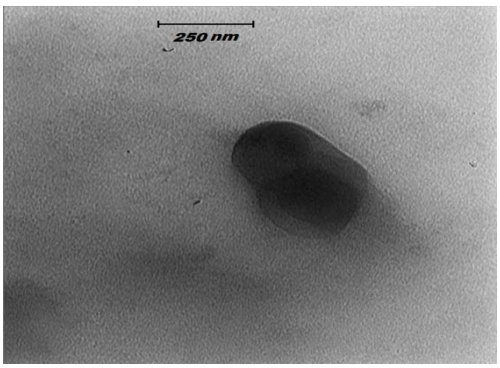

Fig 10 Fig 9 TEM morphology of Solid lipid nanoparticles prepared of Stearic acid

www.SID.ir

Archive of SID

٤- نتیجه گیری

هدف از این مطالعه بررسی اثر ۳ نوع چربی مختلف بر ویژگی-های فیزیکوشیمیایی و پایداری نانوذرات لیپیدی جامد حاوی فیکوسیانین بود. نتایج این پژوهش نشان داد فیکوسیانین به عنوان یک آنتی اکسیدان طبیعی به دلیل ساختار پیچیده و اتصالات قوی بین رنگدانه با پروتئین، می‌تواند در ایجاد یک رفتار امولسیفایری دوگانه جهت ترکیب با ساختار چربی نقش موثری داشته باشد. در بررسی ویژگی‌های اندازه ذرات، پتانسیل زتا و شاخص چندبس پاشیدگی نانوحامل‌های لیپیدی جامد حاوی فیکوسیانین مشخص شد فرمولاسیون‌های تهیه شده از GDS و ترکیب آن با GMS و SA در مقایسه با فرمولاسیون‌های تهیه شده از GMS و SA دارای بیشترین میزان پایداری و کمترین میزان رسوب دهی بود. فناوری نانوپوشانی بر پایه ترکیبات لیپیدی می‌تواند منجر به افزایش مقاومت و کاهش تخریب فیکوسیانین شود. با توجه به دامنه محدود فیکوسیانین به تغییرات pH و نیز عدم پایداری در دماهای بالا، استفاده از نانوحامل های لیپیدی می‌تواند در بهبود شرایط فوق موثر واقع گردد.

٥- تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله از جناب آقای پروفسور محمود رضا جعفری به سبب حمایت های علمی و همچنین سرکار خانم دکتر مریم اسکندری به سبب همکاری در آنالیز نانوذرات از گروه فارماسیوتیکس دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد کمال تشکر را دارد.

٦- منابع

[1] Pezeshki, A., Ghanbarzadeh, B., Hamishehkar, H., Moghadam, M., Mohamadi, M. 1393. Encapsulation of vitamin A palmitate in nanostructured lipid carrier (NLC)- effect of particle size, encapsulation efficiency and stability. *Journal of innovative food technology,* 2(5): 67-82.

[2] Kelidari, H.R., Akbari, J. Saeedi, M. 1391. Application and Characterization of Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers as Drug Delivery Systems. *The journal of mazandaran university of medical science, 22(98):321-337.*

[3]
Antelo, F.S., A.V. Costa, G., and Kalil, S. J. 2008.thermal degradation kinetics of the phycocyanin from *spirulina platensis.biochemical engineering journal*, 41: pp. 43-47.

[4]Moreas, C.C., Burkert, J.F.D.M., and Kalil, S.J. 2009. c-phycocyanin extraction process for large-scale use. *journal of food biochemistry*, 34: pp. 133-148.

[5] ou, y., lin, l., pan, q., yang, x., and cheng, x. 2012. preventive effect of phycocyanin from spirulina platensis on alloxan-injured mice. environmental toxicology and pharmacology, 34: pp. 721-726.

[6]Huang., Q., Yu., H. and Ru., Q. 2010. bioavailability and delivery of nutraceuticals using nanotechnology. *journal of food science,* 75**(1)**: pp. 50-57.

[7]Ezhilarasi, P.N., Karthik, P., Chhanwal, N., and Anandharamakrishnan, c. 2013. nanoencapsulation techniques for food bioactive components: a review. *food bioprocess techology*, 6(3): pp. 628–647.

[8]Chen, L.Y., Remondetto, G.E., and Subirade, M. 2006a. food protein based materials as nutraceutical delivery systems. *trends food science and technology*, 17(5): pp. 272–283.

[9] Reis, C.P., Neufeld, R.J., Ribeiro, A.J., and Veiga, F. 2006. nanoencapsulation i. methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. *nanomedical-nanotechnology*, 2(1): pp. 8–21.

[10] Mozafari, M.R., and Mortazavi, S.M. 2005 .nanoliposomes: from fundamentals to recent developments. trafford pub. ltd., oxford, uk.

[11] Fathi, M., Mozafari, M.R.,and Mohebbi, M. 2012. nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *trends in food science and technology*, 23: pp.13-27.

[12] Gouin, S. 2004. microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *trends food science and technology*, 15(7): pp. 330–347.

[13] Stone, W. L., and Smith, M. 2004. therapeutic uses of antioxidant liposomes. *molecular biotechnology,* 27(3): pp. 217–230.

[14] Attama, A.A., Momoh, M.A., and Builders, P.F. 2012. lipid nanoparticulate

www.SID.ir

Archive of SID

drug delivery systems: a revolution in dosage form design and development. in tech, croatia: pp. 107–140.

[15] Mehnert, W., and Mader, K. 2012. solid lipid nanoparticles production, characterization and applications. *advance drug delivery review*, 64: pp. 83–101.

[16] Fathi, M., Varshosaz, J., Mohebbi, M., and Shahidi, F. 2013. hesperetin-loaded solid lipid nanoparticles and nanostructure lipid carries for food fortification: preparation, characterization, and modeling. *food bioprocess technology*, 6: pp. 1464-1475.

[17] Wissing, S.A., and Muller, R.H. 2002. the influence of the crystallinity of lipid nanoparticles on their occlusive properties. *intenrnational journal of pharmaceutics*, 242: pp. 377-379.

[18] Jores, K., Mehnert, W., Drechsler, M., Bunjes, H., Johann, C., and Mader, K. 2004. investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (sln) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy, *journal of controlled release*, 95: pp. 217-227.

[19] Gualbert, J., Shahgaldianm, P., and Coleman, A.W. 2003. interactions of amphiphilic calix[4]arene-based solid lipid nanoparticles with bovine serum albumin. 257(2): pp. 69-73.

[20] Wong, H.L., Bendayan, R.H., and Rauth, A.M. 2007. chemotheraphy with anticancer drugs encapsulated in solid lipid nanoparticles. *advance drug delivery review*, 59: pp. 491-504.

[21] Pizzol, C.D., Filippin monterio, F.B., Restrepo, J.A.S., Pittela, F., Silva, A.H., Souza, P.A.D., Ca,pos, A.M.D., Pasa, T.B.C. 2014. Influence of Surfactant and Lipid Type on the Physicochemical Properties and Biocompatibility of Solid Lipid Nanoparticles. *Internation journal of environment public health*, 11(**8**): pp. 8581-8596.

[22] Gershwin, M.E., and Belay, A. 2008. spirulina in human nutrition and health. crc press, pp. 122-142.

[23] Papadopoulos, K. 2008. food chemistry research developments. nova science publisher inc, pp. 92-94.

[24] Vivek, K., Harivarhan, R., and Ramachandra, S.R.M. 2007. investigations of the effect of the lipid matrix on drug entrapment, in vitro release, and physical stability of olanzapine-loaded solid lipid nanoparticles. *aaps pharmaceutical science technology*, 8(4)**:** pp. 83.

[25] Badilli, U., Tuba Sengel Turk, C., Besikci, A.O., and Tarimci, N. 2015. development of etofenamate-loaded semisolid sln dispersions and evaluation of anti-inflammatory activity for tropical application. *current drug delivery*, 12: pp. 200-209.

[26] Coates, J. 2000. interpretation of infrared spectra, a practical approach. *encyclopedia of analytical chemistry*. john wiley & sons, PP. 10815-10837.

[27] Hejri, A., Khosravi, A., Gharanjigh, K., and Hejazi, M. 2013. optimization of the formulation of β-carotene loaded nanostructured lipid carriers prepared by solvent diffusion method. *food chemistry*, 141: pp. 117-123.

www.SID.ir

Archive of SID

The effect of different lipids on physicochemical characteristics and staibility of phycocyanin-loaded solid lipid nanoparticles

Seyed Yagoubi, A. [1], Shahidi, F. [2*], Mohebbi, M. [3], Varidi, M.[4], Golmohammadzadeh, Sh.[5]

1.Ph.D student of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, International Campus, Iran.
2. Prof., Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.
3. Associate Prof., Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.
2. Assistant Prof., Department of Food Science and Technology, Ferdowsi University of Mashhad, Iran.
3. Associate Prof., Nanotechnology Research Center, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

(Received: 2015/12/26 Accepted: 2016/08/29)

The aim of this study, was to evaluate the effect of different percentages of lipid contain 100% glycerol distearate (GDS), glycerol monostearate (GMS), stearic acid (SA) and lipid composition of 50:50 GDS:GMS, 50:50 GDS:SA and 50:50 SA:GMS on the physicochemical properties of phycocyanin-loaded solid lipid nanoparticles. The results showed that the use of GDS due to the different structure and having an irregular lipid network had the better encapsulation efficiency in compared with other lipids. The minimum particle size, maximum zeta potential and minimum polydispersity index were belongs to formulations no. 2, 6 and 1 respectively. The results indicated that GDS in compared with other lipids had better stability during 6 months and the lowest desposition and adhesion of the particles were observed in this type of lipid. The produced nanocarriers had encapsulation efficieny ranging of 39.80 to 62.38. TEM, DSC and as well as FTIR were also employed to evaluate the morphological characteristics, thermal behavior and chemical structure of lipid nanoparticles.

Keywords: Nanocarriers, Stability, Phycocyanin.

* Corresponding Author E-Mail Address: fshahidi@um.ac.ir

www.SID.ir