

## بررسی نانوکمپلکس آلومین سرم گاوی-کورکومین به روش طیف‌سنجی فلوروتابی

نرگس شاهقلیان<sup>۱</sup>، قدیر رجب زاده<sup>۲\*</sup> و بیژن ملانکه نیکویی<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی دکتری علوم و صنایع غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران

۲- دانشیار شیمی آلی، گروه شیمی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران

۳- دانشیار علوم دارویی، مرکز تحقیقات نانوفناوری و گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

دریافت: مهر ۱۳۹۴، بازنگری: آبان ۱۳۹۴، پذیرش: آذر ۱۳۹۴

**چکیده:** یکی از مهم‌ترین عملکردهای زیستی آلومین، توانایی پیوند با ترکیبات زیست‌فعال طبیعی و سنتزی است. لذا آلومین به‌عنوان حامل، برای پیوند با موادی مانند ترکیبات گیاهی با ویژگی‌های درمانی و دارویی گزینه مناسبی به نظر می‌رسد. از سوی دیگر پیشرفت‌های اخیر در زمینه علم نانو و انتقال غذا داروها، مستلزم پژوهش‌های گسترده در زمینه تهیه و بررسی ساختار نانوکمپلکس مواد زیست‌فعال است. در این مطالعه، برهم‌کنش آلومین گاوی با کورکومین به‌عنوان یک پلی‌فنل با خواص دارویی متعدد، به روش آزمون طیف‌سنجی فلوروتابی حالت پایدار، در pH فیزیولوژیکی، بررسی شده است. در بررسی خاموشی فلوروتابی دو جزء فلوروفور در آلومین، ثابت‌پیوندی و تعداد مکان‌های پیوند با کورکومین محاسبه شد. ثابت استرن-ولمر ( $K_{SV}$ ) و ثابت نرخ فرونشاندگی کورکومین ( $k_q$ )، به ترتیب  $2.88 \times 10^5 M^{-1}$  و  $0.58 \times 10^{14} M^{-1} S^{-1}$  به دست آمد. ثابت پیوند ( $K_p$ )، بر اساس معادله بنسی-هیلدربرند محاسبه و مقدار آن  $2 \times 10^5 M^{-1}$  بود. نسبت استوکیومتری پیوند ۱/۱ و مقدار  $\Delta G^\circ$  در تشکیل کمپلکس کورکومین-آلومین معادل  $-30.24 \text{ kJ mol}^{-1}$  بود که معرف یک واکنش خود به خودی و گرم‌زاست. بررسی پتانسیل زتای سوسپانسیون حاوی ذرات کمپلکس شده آلومین-کورکومین، پایداری کمپلکس ایجاد شده را تأیید کرد. تشکیل کمپلکس به روش میکروسکوپ الکترونی مورد بررسی قرار گرفت.

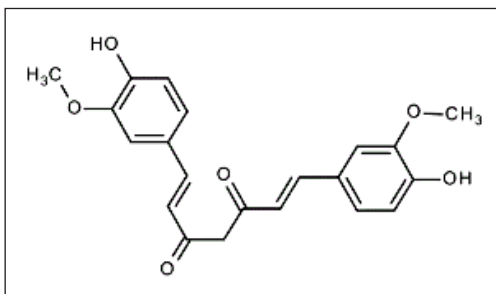
**واژه‌های کلیدی:** آلومین سرم گاوی، کورکومین، تشکیل کمپلکس، طیف‌سنجی فلوروتابی، پتانسیل زتا

### مقدمه

مواد در سامانه گوارشی، نفوذ کم این مواد در بافت هدف، شرایط فراوری (دما، اکسیژن و نور) و یا شرایط سامانه گوارشی (اسید، آنزیم و حضور دیگر مواد مغذی) از تأثیرات مفید این مواد کاسته می‌شود. بنابراین، استفاده از سازوکارهای محافظت‌کننده، که مولکول‌ها را تا زمان مصرف به شکل فعالشان حفظ کند و یا آن‌ها را به بافت موردنظر انتقال دهد، ضروری به نظر می‌رسد. در این راستا، سامانه‌های انتقال مواد بر اساس مواد پلیمری برای به دام اندازی و حفاظت از این مواد برای جنبه‌های درمانی مورد

بر اساس نظریه کارشناسان مواد غذایی، توانایی بالقوه غذاداروها و غذاهای فراسودمند برای انتقال مواد زیست‌فعال، تأثیر مستقیمی بر کاهش احتمال خطر مبتلا شدن به انواع بیماری‌ها را فراهم می‌آورد. پیدایش ترکیبات رژیمی با ویژگی درمانی و با عنوان غذادارو در سال‌های اخیر توجه پژوهشگران، تولیدکنندگان و مصرف‌کنندگان زیادی را به خود جلب کرده است. به دلیل محدودیت‌هایی مانند حلالیت کم و یا زمان ماندگاری کوتاه این

تمایز سلول‌های سرطانی و سالم، استفاده از مقدارهای بالای دارو را محدود می‌کند. از سوی دیگر کورکومین در حالت طبیعی دارای حالیت و پایداری کم است، لذا انتقال آن در بدن با استفاده از ساختارهای پلیمری طبیعی که سازگاری و زیست‌تخریب‌پذیری<sup>۴</sup> مناسبی از خود نشان می‌دهند، یک گزینه مناسب برای انتقال و جذب مطلوب آن در بدن است [۶]. کورکومین از لحاظ شیمیایی یک پلی فنل زردرنگ به نام دی فروروئیل متان<sup>۵</sup> است (شکل ۱)، که از ریزوم زردچوبه<sup>۶</sup> استخراج می‌شود و ماهیت سمی کمی دارد [۷]. افزون بر آن مقدار زیادی از آن با قیمت به صرفه قابل استحصال است. بیش از دو هزار سال است که از زردچوبه در پزشکی سنتی در طیف وسیعی از فعالیت‌های زیستی استناد شده به کورکومینوئید استفاده شده است. مطالعات توکسیکولوژی نشان داده است که کورکومین، جزء اصلی فعال بوده و یک ماده غیرسمی حتی در دوزهای بالای مصرفی است. مطالعات زیادی برای ارزیابی سازوکار فعالیت ضدالتهایی آن انجام پذیرفته است. نتیجه‌ها نشان می‌دهد که کورکومین، تأثیر دوگانه‌ای بر واکنش‌های رادیکالی اکسیژن دارد، بدین معنا که هم می‌تواند به‌عنوان به دام اندازنده<sup>۷</sup> رادیکال‌های هیدروکسیل عمل کند و هم بسته به شرایط، تشکیل رادیکال‌های هیدروکسیل را کاتالیز کند [۸].



شکل ۱- ساختار شیمیایی کورکومین

در این پژوهش برهم‌کنش کورکومین با سرم آلبومین به روش تیفسنجی فلورئورتابی مورد بررسی قرار گرفته و مقادیر کمی

توجه هستند. برای مثال، می‌توان به پروتئین‌ها به‌عنوان گروهی از پلیمرهای طبیعی اشاره کرد [۱].

آلبومین در خون فراوان‌ترین پروتئین موجود در پلاسماست که در تنظیم فشار اسمزی خون ایفای نقش می‌کند. برهم‌کنش مولکول‌های کوچک با سرم آلبومین می‌تواند اطلاعات مفیدی در مورد ویژگی‌های کمپلکس این مواد ارائه دهد که بر رفتار توزیع، غلظت فعال و متابولیت آن در جریان خون اشاره می‌کند. مطالعه عامل‌های پیوند، یافته‌های مفیدی در زمینه فرمولاسیون و دوز کاربردی داروها فراهم می‌آورد [۲]. سرم آلبومین یک پروتئین کروی است که ساختار اصلی آن پیچیده آلفاست. این ترکیب در خون کار پیوند و حمل انواع لیگاندهای کوچک را بر عهده دارد و دارای سه مکان ویژه اتصال به یون‌های فلزی، لیپید و نوکلئوتید است [۳]. به‌طور معمول منابع آلبومین مورد استفاده شامل اوالبومین<sup>۱</sup> تخم‌مرغ، آلبومین سرم شیر گاوی<sup>۲</sup> و سرم آلبومین انسانی است. آلبومین سرم گاوی دارای وزن مولکولی ۶۶ کیلوالتون و نقطه ایزوالکتریک ۴٫۷ در آب در دمای ۲۵ °C، فراوان و در دسترس است، خالص‌سازی این ترکیب ساده بوده و دارای خواص پیوندی غیرمعمول با لیگاندهاست [۴]. آلبومین به‌عنوان یک پروتئین غیرسمی و قابل متابولیزه در بدن و مشابه آلبومین موجود در سرم خون، نقش مهمی در انتقال مواد ایفا می‌کند. نانوذرات بر پایه آلبومین به‌عنوان حامل‌های مواد مورد توجه ویژه‌ای قرار گرفته‌اند. این امر به دلیل حضور مکان‌های پیوندی متنوع و توانایی آن در تشکیل پیوند با انواع مولکول‌هاست. به‌واسطه حضور مقدارهای زیاد آمینواسیدهای باردار در آلبومین (لیزین، آرژینین، آسپاراتات و گلوتامات)، این ترکیب قابلیت جذب الکترواستاتیک ذرات با بار مثبت و یا منفی را دارد [۵].

بسیاری از پژوهش‌ها نشان می‌دهد که مواد طبیعی پلی فنلی مانند کورکومین<sup>۳</sup> به‌عنوان یک غذا داروی فراسودمند، دارای جنبه‌های تغذیه‌ای و درمانی به‌عنوان عوامل ضدالتهاب، ضد اکسیدان و ضد سرطانی است. داروهای مرسوم ضدسرطانی به‌طور معمول ایجاد سمیت سلولی می‌کنند و تخریب غیرقابل

1. Ovalbumin  
5. Diferoloyl methan

2. Bovin Serum Albumin  
6. Turmeric curcuma longa

3. Curcumin  
7. Scavenger

4. Biocompatible & biodegradable

در غلظت ثابت آلومین ( $4.5 \mu\text{M}$ ) در بافر فسفات ( $50 \text{ mM}$ )؛  $\text{pH } 7.4$  (PBS) و در حضور غلظت‌های متفاوت محلول کورکومین ( $5 - 0.5 \mu\text{M}$ ) اندازه‌گیری شد. طیف نشری هر تیتراسیون به‌طور جداگانه در طول موج  $300$  تا  $450 \text{ nm}$  و طول موج برانگیختگی  $280 \text{ nm}$  با پهنای شکاف برابر با  $10 \text{ nm}$  و سرعت پویش (اسکن)  $1500 \text{ nm/min}$  ثبت شد. اندازه‌گیری‌ها در دمای  $25^\circ\text{C}$  انجام شد. پس از افزودن محلول کورکومین به آلومین، نمونه‌ها به مدت  $20$  ثانیه ورتکس شده و سپس به فلوتورتابی سنج منتقل شدند. پس از رسم نمودارهای لازم، ثابت‌های پیوند محاسبه شد.

#### اندازه‌گیری پتانسیل زتا

با استفاده از زتاسایز پراکنش نوری پویا (DLS, Zetasizer) با استفاده از زتاسایز پراکنش نوری پویا (Nano, Malvern Instruments Ltd., UK) در دمای  $25^\circ\text{C}$  و استفاده از سازوکار ترکیبی سرعت متر دوپلر لیزر و تجزیه فازی پراکنش نوری، پتانسیل زتای سوسپانسیون حاوی ذرات کمپلکس شده کورکومین-آلومین، اندازه‌گیری شد، در این آزمون، سل یک‌بار مصرف پلاستیکی دو شاخکی استفاده شد.

آماده‌سازی نمونه برای تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی روبشی SEM الکتروگراف نانوذرات پودری با استفاده از (Zeiss LEO, 1450 VP, Germany) ثبت شد. نمونه پودری بر روی یک نوار کربنی رسانای الکتریسیته تعبیه‌شده روی استاب<sup>۳</sup> قرار گرفت و با پوشش‌دهنده<sup>۴</sup> (SC7620, England) تحت خلاء، با طلا پوشش نانومتری داده شد. سپس مشاهده میکروسکوپی نمونه انجام شد. روبش در ولتاژ  $20$  کیلوولت انجام شد.

#### نتیجه‌ها و بحث

##### بررسی نانوکمپلکس کورکومین-آلومین

در تجزیه برهم‌کنش پیوندی کورکومین و آلومین، شدت فلوتورتابی کمپلکس کورکومین-آلومین در طول موج  $340 \text{ nm}$  (که حداکثر طول‌موج نشری آلومین در این طول‌موج است)

شاخص‌های پیوندی بین این دو محاسبه شده است. نتیجه‌های تشکیل کمپلکس به روش میکروسکوپ الکترونی روبشی و پایداری کمپلکس به‌دست آمده نیز به روش اندازه‌گیری پتانسیل زتا بررسی شده است.

#### بخش تجربی

مواد

BSA (fraction V)  $1/12018$  ( $\text{MW} = 66 \text{ KD}$ ) فراورده مرک آلمان، کورکومین (C1386) فراورده سیگمای آلمان و موادی مانند اتانول، سدیم هیدروکسید و دیگر مواد شیمیایی فراورده مرک با درجه تجزیه‌ای بودند. سایر ترکیب‌ها مانند  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  و  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ ،  $\text{NaCl}$ ،  $\text{KCl}$  همگی از نوع درجه تجزیه‌ای با خلوص بالا از فراورده‌های مرک انتخاب و مصرف شدند. نام آلومین که در مطالب این متن ذکر می‌شود، اختصار نام سرم آلومین گاوی (BSA) است.

##### تشکیل کمپلکس کورکومین با آلومین

مقداری کورکومین به محلول  $1\%$  (w/v) آلومین در آب افزوده و به مدت ده دقیقه همگن شد تا کورکومین در محلول پراکنده شود. سپس محلول به‌دست آمده یک شبانه‌روز در دمای اتاق بر روی هم زن قرار گرفت. کورکومین آزاد به روش سانتریفوژ ( $8000 \text{ rpm}$ ،  $20$  دقیقه) جدا شد و سوپرناتنت به‌دست آمده به روش پاششی خشک شد و پودر کمپلکس پروتئین-کورکومین به دست آمد.

##### بررسی برهم‌کنش کورکومین و آلومین به روش طیف‌سنجی فلوتورتابی

تجزیه کمی پتانسیل برهم‌کنش بین BSA و Cn (کورکومین) با استفاده از تیتراسیون فلوتورتابی انجام شد. اندازه‌گیری فلوتورتابی حالت پایدار<sup>۱</sup> با استفاده از طیف‌سنج فلوتورتابی FL-2500 (Hitachi, Japan) انجام شد. ویژگی ذاتی فلوتورتابی

1. Steady-state

2. Slit-width

3. Stub

4. Sputter-coater

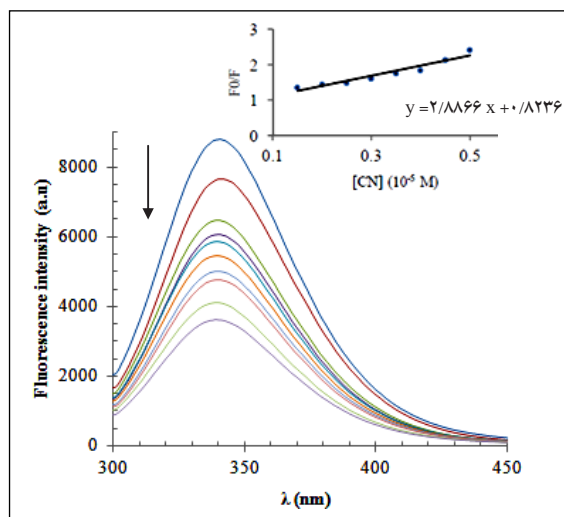
میکرومولار بود [۱۱].  $K_a$  بر اساس شیب منحنی شکل ۳-الف، محاسبه و مقدار آن  $1.0^5 M^{-1}$  به دست آمد.

$$1/\Delta F = 1/\Delta F_{max} + 1/(K_a \times \Delta F_{max} \times [Cn]) \quad (2)$$

وقتی کورکومین می‌تواند به‌طور مستقل به مجموعه‌ای از مکان‌های معادل در آلبومین متصل شود، تعادل بین مولکول‌های آزاد و پیوندی توسط معادله ۳ بیان می‌شود. تعداد مکان‌های پیوندی در هر مولکول آلبومین (استوکیومتری پیوند)  $(n)$ ، بر اساس معادله ۳ محاسبه شد. با استفاده از  $K_a$ ، تغییرات انرژی آزاد کمپلکس کورکومین-آلبومین ( $\Delta G^\circ$ )، از معادله ۴ به دست آمد [۱۲]. بر اساس شیب منحنی شکل ۳-ب، نسبت استوکیومتری پیوند ۱/۱ به دست آمد. مقدار  $\Delta G^\circ$  محاسبه شده در تشکیل کمپلکس کورکومین-آلبومین معادل  $-30.24 \text{ kJ mol}^{-1}$  بود که بر طبق انتظار یک واکنش گرمازا و خودبه‌خودی است.

$$\log (F_0 - F)/F = \log K_a + n \log [Cn] \quad (3)$$

$$\Delta G^\circ = -RT \ln K_a \quad (4)$$



شکل ۲ خاموشی فلوروتابایی آلبومین در حضور کورکومین، از بالا به پایین: طیف‌های نثری فلوروتابایی آلبومین در عدم حضور و حضور فزاینده مقدار کورکومین (۵-۴.۵-۳-۲.۵-۱.۵-۰.۵  $\mu M$ )، در بافر سدیم فسفات (۷.۴ pH و ۰.۱۰۵ مولار)، طول موج برانگیختگی ۲۸۰ nm و دمای  $25^\circ C$ . نمودار داخلی، دیاگرام استرن-ولمر آلبومین-کورکومین در طول موج نثری ۳۴۰ nm.

قرائت شد. افزودن متوالی کورکومین به محلول آلبومین، تغییری در مکان حداکثری پیک ایجاد نکرد. کورکومین با دو اسیدآمین ه فلوروفور موجود در آلبومین پیوند می‌دهد: Trp-212 که در درون مولکول آلبومین است و Trp-134 که بر روی سطح پروتئین قرار گرفته است [۹]. شکل ۲، طیف نثری آلبومین در غلظت‌های متفاوت کورکومین را در طول موج برانگیختگی ۲۸۰ nm نمایش می‌دهد. با افزایش غلظت کورکومین، شدت فلوروتابایی کاهش یافت و این نشان داد که پیوند بین کورکومین و آلبومین ایجاد شده است. خاموشی فلوروتابایی ذاتی برای تعیین ثابت پیوند با استفاده از معادله استرن-ولمر<sup>۱</sup> (معادله ۱) تجزیه شد که در آن  $F_0$  و  $F$  به ترتیب شدت فلوروتابایی آلبومین در حضور و عدم حضور کورکومین است [۱۰]. غلظت کورکومین  $[Cn]$ ،  $k_q$  ثابت نرخ خاموشی زیست مولکولی، و  $\tau_0$  نیمه‌عمر آلبومین در عدم حضور کورکومین است. ثابت خاموشی استرن-ولمر با معادله  $k_q \tau_0 = K_{SV}$  بیان می‌شود که این ثابت مطابق با غلظتی از کورکومین است که در آن شدت پیک ۵۰٪ کاهش می‌یابد.

$$F_0/F = 1 + k_q \tau_0 [Cn] = 1 + K_{SV} [Cn] \quad (1)$$

$K_{SV}$  و  $k_q$  به ترتیب از شیب منحنی و عرض از مبدا رگرسیون خطی (شکل ۲) تخمین زده شد. برای آلبومین، بر اساس محاسبات لا کوویکز (۲۰۰۴)،  $5 \times 10^{-9}$  ثانیه در نظر گرفته شد. شدت فلوروتابایی ذاتی آلبومین در حضور غلظت فزاینده کورکومین بر اساس سازوکار خاموشی استاتیک، کاهش یافت. خاموشی استاتیک مربوط به تشکیل کمپلکس فلوروفور-خاموش کننده در حالت پایه<sup>۲</sup> است. منحنی  $F_0/F$  در برابر  $[Cn]$  خطی بود (نمایش در نمودار داخلی شکل ۲) که نشان‌دهنده وقوع خاموشی استاتیک بود. ثابت پیوند ( $K_{SV}$ ) و  $k_q$  بر اساس این منحنی به ترتیب  $2.88 \times 10^5 M^{-1}$  و  $0.58 \times 10^{14} M^{-1} S^{-1}$  محاسبه استفاده از معادله بنسی-هیلدربرند<sup>۳</sup> (۱۹۴۹) در معادله ۲ محاسبه شد، که در آن  $\Delta F$  تفاوت شدت فلوروتابایی بین نمونه در حضور و عدم حضور کورکومین،  $\Delta F_{max}$  حداکثر مقدار  $\Delta F$  در قسمت مسطح،  $K_a$  ثابت تجمع و  $[Cn]$  غلظت کورکومین بر اساس

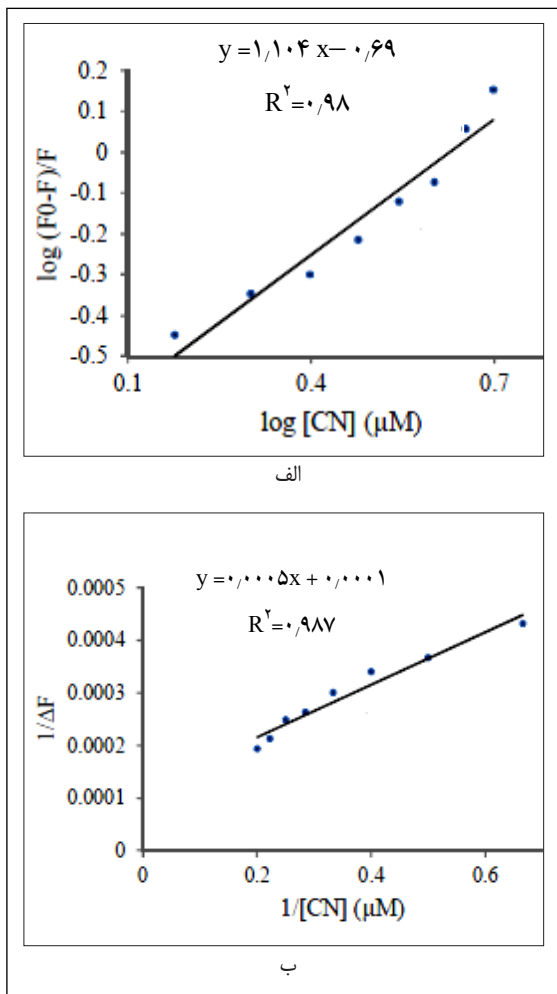
1. Stern-Volmer equation

2. Ground state

3. Benesi-Hilderbrand

فضایی کورکومین، قابلیت انطباق به شکل‌های متفاوت برای ایجاد حداکثر تماس‌های آب‌گریز با پروتئینی که به آن متصل می‌شود را داراست. برای مثال، حلقه‌های فنیلی کورکومین در برهم‌کنش‌های واندروالس  $\pi$ - $\pi$  با زنجیره‌های اسیدهای آمینه آروماتیک شرکت می‌کنند. در کورکومین با ساختار آب‌گریز، گروه‌های عاملی کربونیل و فنیل، که در انتها و مرکز مولکول قرار دارند، در پیوندهای هیدروژنی با ماکرومولکول‌های هدف شرکت می‌کنند. این ساختار، با ایجاد برهم‌کنش‌های قوی و مستقیم الکترواستاتیکی موجب افزایش انرژی آزاد مطلوب برای پیوستگی و تجمع<sup>۱</sup> می‌شود. 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 به‌عنوان پذیرنده میثلی عمل کند و با پیوند کووالانسی به سولفیدریل‌های سیستمین هسته‌دوست و نیمه سلنوسیتستین پیوند شود [۱۳].

ثابت پیوند گزارش شده در منابع در گستره  $10^4$  تا  $10^5$  بر مولار متنوع بود، که مقدار محاسبه شده در این بررسی، در گستره ثابت پیوندهای گزارش شده قرار داشت. مطالعات قبلی بزرگی ثابت پیوند را به برهم‌کنش‌های آب‌گریز بین پروتئین‌ها و مولکول‌های کوچک نسبت داده‌اند، که در آن‌ها پیوند در بسته‌های آب‌گریز پروتئین<sup>۲</sup> انجام می‌شود. این ثابت‌ها به تقریب یک برابر بزرگ‌تر از یافته‌های بوراسا و همکارانش (۲۰۱۰) بود. آن‌ها از بافر ۱۰ میلی مولار تریس-کلریدریک اسید<sup>۳</sup> استفاده کرده بودند [۱۴]. در مطالعه دیگر مقدار  $K_a$  محاسبه شده مشابه نتیجه‌های ارائه شده بود [۱۵]. لازم به ذکر است که در اکثر منابع نیمه‌عمر خاموشی به‌طور متوسط برای اکثر ترکیبات ثابت و  $10^{-8}$  ثانیه در نظر گرفته می‌شود. درحالی‌که در این بررسی،  $\tau_0$  برای آلومین به‌طور اختصاصی، بر اساس محاسبات لاکوویکز (۲۰۰۴)،  $5 \times 10^{-9}$  ثانیه در نظر گرفته شد. پیوند قوی کورکومین با مناطق آب‌گریز پروتئین، از برهم‌کنش‌های آن با مولکول‌های آب اطراف جلوگیری کرده و در نتیجه از آبکافت کورکومین، ممانعت به عمل می‌آید [۱۶].



شکل ۳ (الف) منحنی لگاریتمی خاموشی فلوروتابی آلومین در حضور غلظت‌های متفاوت کورکومین در دمای  $25^\circ\text{C}$  و (ب) منحنی  $1/\Delta F$  به‌عنوان تابعی از  $1/[CN]$  برای محاسبه نسبت استوکیومتری پیوند کورکومین-آلومین. (نمودارها در طول موج نشری  $340\text{ nm}$  و برانگیختگی  $280\text{ nm}$  و در غلظت  $4.5\ \mu\text{M}$  آلومین و کورکومین ( $5-10\ \mu\text{M}$ ) رسم شده‌اند).

#### بررسی پیوندهای آلومین-کورکومین

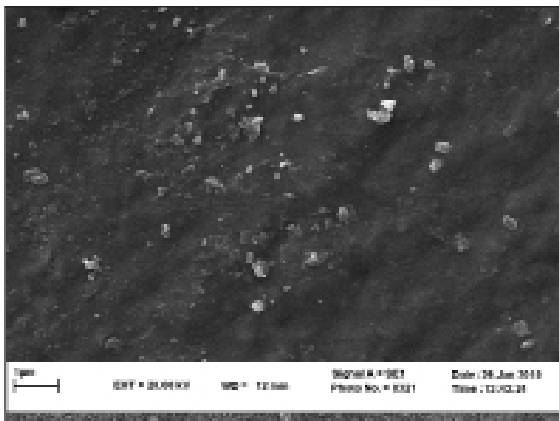
ساختار کورکومین حاوی گروه‌های متوکسی، فنیل، هیدروکسی فنیل و بتادی کتون (کربونیل و انولیک) است و وجود تاتومری کتو-انول در این ترکیب حالت مناسبی برای پیوندهای مستقیم ایجاد می‌کند. دو منطقه فنیلی آب‌گریز در کورکومین با یک ارتباط‌دهنده انعطاف‌پذیر به هم متصل می‌شوند. شکل

1. Association

2. The hydrophobic "pocket" of the protein

3. Tris-HCl buffer

خشک شده به روش انجمادی، تصویرهای میکروسکوپ الکترونی آن ثبت شد. نتیجه‌های الکتروگراف (در بزرگنمایی  $10000 \times$ ) در شکل ۴، نشان داد که اندازه ذرات در دامنه  $130$  تا  $337$  نانومتر قرار دارد. در بررسی میکروسکوپی، شکل کروی و سطح هموار در ذرات مشهود بود. تشکیل نانوکمپلکس آلومین-کورکومین پودری با مشاهده تصویرهای میکروسکوپی SEM تأیید شد.



شکل ۴ تصویر میکروسکوپ الکترونی ساختار کمپلکس آلومین-کورکومین در بزرگنمایی  $10000 \times$

### نتیجه‌گیری

در این مطالعه، برهم‌کنش آلومین سرم گاوی و کورکومین به روش طیف‌سنجی فلورنتاتیو به تفصیل مورد بحث قرار گرفت و ثابت استرن ولمر، ثابت نرخ فرونشاندگی کورکومین، ثابت پیوند و انرژی آزاد گیبس محاسبه شد. نتیجه‌ها نشان می‌دهد که کمپلکس آلومین-کورکومین از پایداری مناسبی برخوردار بوده و آلومین را می‌توان به‌عنوان حامل در ریزپوشانی کورکومین مورد استفاده قرار داد. لزوم به‌کارگیری این پروتئین در بررسی پلی فنل‌های گیاهی دیگر با ویژگی‌های دارویی می‌تواند باعث تعمیق دانش ریزپوشانی شده و روش مناسبی را برای حمل مواد زیست فعال به فرم مناسب در بدن فراهم کند.

در یک پژوهش، برهم‌کنش بین آلومین و آنتوسیانین مورد بررسی قرار گرفته است. نتیجه‌ها نشان داده که آنتوسیانین می‌تواند با تیروزین و تریپتوفان در آلومین از طریق پیوندهای هیدروژنی و واندرالس برهم‌کنش دهد. برهم‌کنش آنتوسیانین و آلومین موجب تشکیل کمپلکس به صورت نانوذرات شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی اندازه ذرات را کمتر از  $50$  نانومتر گزارش کرد [۱۷]. به‌طور مشابه، در برهم‌کنش سیانوکوبالامین با سرم آلومین مشخص شده است که هر دو جزء تریپتوفان در برهم‌کنش با ویتامین مذکور شرکت می‌کنند و پارامترهای ترمودینامیکی محاسبه شده نشان داد که برهم‌کنش غالب بین این دو ماده، برهم‌کنش آب‌گریز است [۱۸]. مطالعات نشان داده است که ایزوله پروتئین سویا نیز با کورکومین، تشکیل کمپلکس می‌دهد. مطالعات طیف‌سنجی فلورنتاتیو بر کمپلکس مذکور انجام و تشکیل کمپلکس به برهم‌کنش‌های آب‌گریز نسبت داده شد. به‌طور مشابه، رفتار خاموشی فلورنتاتیو ذاتی پروتئین ایزوله سویا با کورکومین مشاهده شد [۱۹].

### بررسی پتانسیل زتا

پتانسیل زتای نمونه شاهد و نمونه کمپلکس آلومین-کورکومین، نزدیک به یکدیگر و در گستره  $24.5$  تا  $27$  میلی ولت گزارش شد و اختلاف زیادی بین آن‌ها مشاهده نشد. کورکومین چهار پروتون قابل یونیزه شدن دارد و بار الکتریکی سطحی آن در اتانول حدود  $6 \text{ mV}$  برآورد شده است. بنابراین، حضور کورکومین در کنار پروتئین، تغییر چندانی در پتانسیل زتای کل ایجاد نکرده است [۲۰]. پتانسیل زتا نقش مهمی در پایداری کمپلکس دارد و با نزدیکی این مقدار به  $30$  میلی ولت و بیشتر، پایداری افزایش می‌یابد [۲۱]. بر این اساس کمپلکس‌های ایجاد شده از کورکومین-آلومین از پایداری مناسبی برخوردارند.

### ریخت‌شناسی نانوذرات به روش SEM

به‌منظور ریخت‌شناسی نمونه ذرات آلومین-کورکومین

- [1] Jahanshahi, M.; Mehravar, R.; *Dynamic Biochemistry, Process Biotechnology and Molecular Biology*, 3(SPEcial issue 2), 1-11, 2009.
- [2] Lin, H.; Lan, J.; Guan, M.; Sheng, F.; Zhang, H.; *SPEctrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular SPEctroscopy*, 73, 936-941, 2009.
- [3] Livney, Y.D.; *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 15, 73-83, 2010.
- [4] Elzoghby, A.O.; Samy, W.M.; Elgindy, N.A.; *Journal of Controlled Release*, 157, 168-182, 2012b.
- [5] Elzoghby, A.O.; Abo El-Fotoh, W.S.; Elgindy, N.A.; *Journal of Controlled Release*, 161,38-49, 2012a.
- [6] Yallapu, M.M.; Jaggi, M.; Chauhan, S.C.; *Drug Discovery Today*, 17 (1), 71-80, 2012.
- [7] Mukerjee, A.; Vishwanatha, J.K.; *Anticancer research*, 29, 3867- 3876, 2009.
- [8] Tennesen, H.H.; Greenhill, J.V.; *International journal of pharmaceutics*, 87, 79-87, 1992.
- [9] Beherens, P.Q.; Spiekerman, A.M.; Brown, J.R.; *Federation proceedings*, 34 (31), 591, 1975.
- [10] Lakowicz, J.R.; "Principles of fluorescence spectroscopy", 2nd Edition, Springer, New York; 945, 2004.
- [11] Benesi, H.A.; Hildebrand, J.; *Journal of the American Chemical Society*, 71, 2703-2707, 1949.
- [12] Shang, L.; Jiang, X.; Dong, S.; *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 184, 93-97, 2006.
- [13] Gupta, S.C.; Prasad, S.; Kim, J.H.; Patchva, S.; Webb, L.J.; Priyadarsini, I.K.; Aggarwal, B.B.; *Natural product reports*, 28, 1937-1955, 2011.
- [14] Bourassa, P.; Kanakis, C.; Tarantilis, P.; Pollissiou, M.; Tajmir-riahi, H.; *The Journal of Physical Chemistry B*, 114, 3348-3354, 2010.
- [15] Yang, M.; Wu, Y.; Li, J.; Zhou, H.; Wang, X.; *Journal of agricultural and food chemistry*, 61, 7150-7155, 2013.
- [16] Leung, M.H.; Kee, T.W.; *Langmuir*, 25, 5773-5777, 2009.
- [17] Zhou, R.; Dong, X.; Song, L.; Jing, H.; *Journal of Luminescence*, 155, 244-250, 2014.
- [18] Kamat, B.; Seetharamappa, J.; *Journal of Photoscience*, 11, 29-34, 2004.
- [19] Tapal, A.; Tiku, P.K.; *Food Chemistry*, 130(4), 960-965, 2012.
- [20] Teng, Z.; Luo, Y.; Wang, Q.; *Journal of agricultural and food chemistry*, 60, 2712-2720, 2012.
- [21] Du, J.; Ramachandran, C.; Weiner, N.; Müller, D.G.; *International Journal of Pharmacy*, 127, 273-278, 1996.



## BSA-curcumin nanocomplex study by fluorescence spectroscopy

N. Shahgholian<sup>1</sup>, Gh. Rajabzade<sup>2,\*</sup> and B. Malaekheh-Nekouei<sup>3</sup>

1. PhD Student of Food Science and Technology, Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran
2. Associate prof. of Organic Chemistry, Department of Chemistry, Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran
3. Associate prof. of Medicinal Science, Nanotechnology Research Center and Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

Received: October 2015, Revised: November 2015, Accepted: December 2015

**Abstract:** One of the most important functions of albumin, is the ability to interact with bioactive materials, either in natural or synthetic form. So, albumin seems to be a good choice as a carrier of plant compounds with health and medicinal benefits. In addition, developments in the field of nanoscience and nutraceutical delivery require extensive research on the preparation and characterization of nanocomplexes of bioactive materials. In this study, interaction of bovine serum albumin with curcumin, as a pharmacologically active ingredient, was investigated at physiological pH. The apparent binding constants and number of substantive binding sites were evaluated by fluorescent quenching method. Stern-Volmer constant (KSV) and curcumin quenching rate constant (kq), were  $2.88 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$  and  $0.58 \times 10^{14} \text{ M}^{-1}\text{S}^{-1}$ , respectively. Association binding constant (Ka), calculated based on the benesi-hilderbrand equation, was found to be  $2 \times 10^5 \text{ M}^{-1}$ . Stoichiometric ratio of bonding was 1.1 and  $\Delta G^\circ$  in albumin-curcumin complex formation was  $-30.24 \text{ kJmol}^{-1}$  which indicates a spontaneous reaction. By measuring the zeta potential of the suspension, stability and sustainability of the albumin-curcumin complex were confirmed. Complex formation was examined by scanning electron microscopy.

**Keywords:** Bovine Serum Albumin, Curcumin, Complex formation, Fluorescent Spectroscopy, Zeta potential.