

یک روش سبز برای میکروکپسوله کردن استرول‌های گیاهی با چربی‌های طبیعی

ذوالفقار مهدلو^۱، راهبه امیری دهخوارقانی^{۲*}، علی نیازی^{۳*}، عاطفه تمدن^۴ و مریم تاج آبادی ابراهیمی^۵

۱. دانشجوی دکترا گروه شیمی، دانشکده علوم، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران.

۲. دانشیار گروه شیمی، دانشکده علوم، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران.

۳. استاد گروه شیمی، دانشکده علوم، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران.

۴. استادیار گروه شیمی، دانشکده علوم، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران.

۵. دانشیار گروه زیست شناسی، دانشکده علوم، واحد تهران مرکزی، دانشگاه آزاد اسلامی تهران، تهران، ایران.

چکیده

در این پژوهش، به کپسوله کردن استرول‌های گیاهی در مقیاس میکرو به عنوان ترکیبی برای کاهش خطر ابتلا به سرطان‌های هورمونی با استفاده از چربی‌های طبیعی (چربی گوسفند و روغن شترمرغ) پرداخته شده است. ابتدا استرول‌های گیاهی از روغن کنجد استخراج و سپس، با روش نامیزه دوگانه کپسوله شدند. برای شناسایی میکروکپسول‌های به دست آمده، روش‌های طیف‌سنجی فروسرخ تبدیل فوریه (FTIR)، طیف‌سنجی مرئی-فرابنفش (UV-Vis)، میکروسکوپی الکترونی روبشی (SEM) و سوانگاری گازی (GC) به کار گرفته شد. طراحی باکس-بهینکن سه‌عاملی سه‌سطحی (BBD) برای اولویت‌بندی عوامل مؤثر بر فرایند نامیزه دوگانه به منظور بهینه‌سازی ظرفیت بارگذاری، به کار گرفته شد. شرایط عملیاتی بررسی شده نشان داد که اندازه کپسول‌ها در گستره میکرومتر و محتوای استرول‌های گیاه (EE%) برابر با ۸۳/۵۵ درصد بود. رهاسازی کنترل شده کپسول‌ها در دمای محیط آزمایش بررسی شد. پایداری استرول‌های گیاهی کپسوله شده در مدت سه ماه بررسی شد. و نتیجه‌ها نشان داد که روش نامیزه دوگانه سبز بهینه، روشی مناسب برای تولید نانوذره‌های چربی جامد (SLNs) پایدار برای کپسوله کردن استرول‌های گیاهی است.

واژه‌های کلیدی: روش سبز، کپسوله کردن، استرول‌های گیاهی، چربی‌های طبیعی.

فناوری کپسوله کردن یک فناوری در حال گسترش است که کاربردهای خفته‌ای در صنایع دارویی و سایر صنایع دارد. این روش‌ها می‌توانند برای محافظت از ترکیب‌های حساس در برابر اثرهای مخرب محیطی و همچنین، برای تحویل کنترل‌شده در محل‌های هدف استفاده شوند [۱ و ۲]. این پوشش‌ها به‌عنوان حامل می‌توانند دارو را به‌طورمستقیم به سلول‌های هدف برسانند و در نتیجه موجب افزایش اثربخشی دارو شوند. آن‌ها می‌توانند جذب دارو را در بدن افزایش دهند و از تخریب زودرس آن جلوگیری کنند که موجب افزایش ثبات دارو در خون می‌شود [۳ و ۴]. کپسول‌های پوششی می‌توانند دارو را به صورت واپایش‌شده و در زمان‌های مشخص آزاد کنند و در نتیجه موجب کاهش تعداد دفعه‌های مصرف دارو و بهبود نتیجه‌های درمانی شوند. با هدف‌گیری دقیق‌تر سلول‌های بیمار، کپسول‌ها می‌توانند عوارض جانبی داروها را کاهش دهند. همچنین، کپسول‌ها می‌توانند انحلال داروهای نامحلول را افزایش دهند و جذب آن‌ها را در بدن بهبود بخشند. با افزایش اثربخشی و فراهم‌زیستی دارو، کپسول‌ها می‌توانند دوز مصرفی دارو را کاهش دهند که موجب کاهش هزینه‌ها و عوارض جانبی می‌شود. این مزایا موجب شده‌اند که به کپسول‌ها به‌عنوان یکی از روش‌های نوین و مؤثر در دارورسانی توجه شود [۵].

استرول‌های گیاهی در بهبود سلامتی انسان مؤثر هستند [۶ و ۷]. برای مثال می‌توان به کاهش التهاب، پیشگیری از بیماری‌های قلبی و اثرهای پادسرطانی اشاره کرد [۸ تا ۱۰]. استرول‌های گیاهی ترکیب‌های فعال زیستی هستند که به‌طور طبیعی در غذاها با منشأ گیاهی یافت می‌شوند. ساختار شیمیایی آن‌ها مشابه کلسترول است که فقط در غذاهایی با منشأ حیوانی یافت می‌شود [۱۱]. کامپسترول^۱، β -سیتوسترول^۲، استیگماسترول^۳ و ارگوسترول^۴ اعضای خانواده استرول‌های گیاهی هستند. همچنین، توکوفرول‌ها و استرول‌های گیاهی اجزای مغذی برجسته‌ای هستند که بخش قابل‌توجهی از جزء غیرصابونی روغن‌های گیاهی را تشکیل می‌دهند. با این حال، محدودیت اصلی آن‌ها حلالیت ضعیف در محیط آبی (۲ تا ۳ درصد در دمای ۲۵ درجه سلسیوس) و ناپایداری در دماهای بالا در جریان هوا است [۱۱ تا ۱۳].

در این پژوهش، برای حل مشکل‌های پراکندگی ضعیف و ناپایداری استرول‌های گیاهی که ویژگی مطلوبی برای سلامتی انسان دارند، استرول‌های گیاهی با میکروکپسوله‌شدن، به شکلی پایدارتر و با کارایی بالاتر، تهیه شدند. این روش سبز در مقایسه با سایر روش‌ها [۱۴ و ۱۵] به‌دلیل استفاده از مواد طبیعی (چربی گوسفند و روغن شترمرغ) نسبت به روش‌های شیمیایی مزایای بیشتری دارد. روش باکس-بهنکن برای بهینه‌سازی متغیرهای مؤثر به‌کارگرفته شد.

1. Campesterol
2. β -sitosterol
3. Stigmasterol
4. Ergosterol

بخش تجربی

مواد و دستگاه‌ها

طیف‌های FTIR با استفاده از قرص KBr در دمای اتاق با دستگاه FTIR 410، Jasco Inc Easton، ساخت ایالات متحده آمریکا، ثبت شد. با میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی FESEM، SIGMA VP-500، شرکت ZEISS آلمان، ریخت‌شناسی سطح میکروکپسول‌ها انجام شد. غلظت استرول‌های گیاهی با یک اسپکتروفتومتر UV-Vis (Perkin Elmer/Lambda 25 UV/Vis spectrophotometer) ساخت ایالات متحده آمریکا) در گستره ۲۰۰ تا ۴۰۰ نانومتر ارزیابی شد. مخلوط واکنش در یک حمام فراصوت QSiC به مدت ۳۰ دقیقه قرار داده شد. ترکیب استرول‌های گیاهی به‌دست‌آمده با یک دستگاه سوانگاری گازی Shimadzu GC-9A متصل به یک آشکارساز یونش شعله هیدروژنی (FID)، تجزیه و تحلیل شد. یک ستون مویینه شیشه‌ای DB-1 برای جداسازی استفاده شد. شرایط عملیاتی ستون به شرح زیر بود: هلیوم به‌عنوان گاز حامل با نرخ جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه با نسبت بین نرخ جریان ستون و نرخ جریان تقسیمی ۱:۵۰؛ دمای ۳۰۵ درجه سلسیوس برای آشکارساز و محفظه گازسازی در نظر گرفته شد؛ دمای ورودی ۲۸۰ درجه سلسیوس بود و دمای ستون از ۱۵۰ درجه سلسیوس به ۳۲۰ درجه سلسیوس با نرخ ۵ درجه سلسیوس در دقیقه افزایش یافت. شناسایی اجزای میکروکپسول‌ها با طراحی باکس-به‌نکن سه‌عاملی سه‌سطحی (BBD) و با نرم‌افزار Minitab نسخه ۱۶ انجام شد. سامانه Milli-Q (Millipore, Bedford, MO) برای به‌دست‌آوردن آب یون‌زدوده به‌کار گرفته شد. روغن کنجد، اتانول و پتاس از شرکت سیگما بدون هیچ‌گونه تصفیه بیشتر تهیه شدند. لسیتین سویا، چربی گوسفند، روغن شترمرغ و گلوکز از شرکت کیمیا اکسیر خریداری شدند.

روش استخراج

۵/۶ گرم پتاس با ۵ گرم روغن در مقدار کافی اتانول ۱ مولار حل و به‌مدت ۱ ساعت بازروانی شد. سپس، مخلوط واکنش با دی‌اتیل اتر و آب به‌نسبت مساوی در قیف جداکننده ریخته و فاز آلی جدا شد. حلال فاز آلی با کمک تبخیرکن چرخان جدا و رسوب به‌دست‌آمده در محلول متانول و استون و آب خالص‌سازی و در خشکانه نگهداری شد. استرول‌های گیاهی به‌دست‌آمده از این روش (۳۰۰ میلی‌گرم در ۱۰۰ گرم روغن) با مقدارهای گزارش‌شده در پژوهش‌های پیشین همخوانی دارد [۱۶].

میکروکپسوله کردن/استرول‌های گیاهی

مقدارهای متفاوتی برحسب جدول ۱، از پیه گوسفند و روغن شترمرغ به داخل یک ارلن ۲۵ میلی‌لیتری منتقل شد. سپس، اتانول گرم به آن افزوده شد تا روغن‌ها به خوبی در آن حل شوند. پس‌از آن، به داخل ارلن گلوکز با درصدهای متفاوت افزوده شد. برای تعیین بهترین مقادیر برای میکروکپسوله‌کردن، ۱۷ آزمایش با مقادیر متفاوتی از مواد در زمان‌های متفاوت انجام شد. پس از مراحل یادشده، محتویات ارلن به مدت ۵ دقیقه با یک دستگاه همگن‌ساز با قدرت ۴۰ وات هم‌زده شد تا یک مخلوط همگن با ذراتی با قطر کم به‌دست آید. به مخلوط به‌دست آمده مقدار مناسبی

از استرول‌های گیاهی خالص افزوده شد. سپس، به مدت ۳۰ دقیقه تا دمای ۴۰ درجه سلسیوس نمونه داخل دستگاه فراصوت قرار گرفت تا استرول خالص حل شود. پس از اینکه ارلن از حمام فراصوت خارج شد، داخل آن یک مگنت قرارداده شد و بر روی همزن مغناطیسی به مدت ۱ دقیقه با دور مناسب قرار گرفت. سپس، ۵ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر با مقدار متفاوتی از لسیتین به‌عنوان نامیزه‌کننده به محلول افزوده و به مدت ۳۰ ثانیه با دستگاه همگن‌ساز با قدرت ۴۰ وات، هم‌زده شد. مخلوط به‌دست‌آمده به یک ارلن ۱۰۰ میلی‌لیتری منتقل و با همزن مغناطیسی در دمای اتاق به خوبی مخلوط شد. سپس، ۵۰ میلی‌لیتر آب دوبار تقطیر با دمای ۳ درجه سلسیوس و ۱۰ میلی‌لیتر لسیتین ۱ درصد به سرعت به آن افزوده شد. ارلن با ورقه آلومینیومی پوشانده شد و طی مدت زمان‌های متفاوتی با همزن مغناطیسی هم‌زده شد. محتویات ارلن به داخل یک بالن ته‌گرد ۱۰۰ میلی‌لیتری منتقل و با دستگاه تبخیرکن چرخان، یک سوم حلال آن تبخیر شد. نمونه‌ها به مدت ۲۰ دقیقه در دمای منفی ۵ درجه سلسیوس، با دستگاه گریزانه با دور ۱۲۰۰۰ rpm جدا شدند. رسوب روی سطح مایع به آرامی جمع‌آوری و پس از حدود ۲ ساعت روتاری رسوب ژله‌ای‌مانند به‌دست آمد. فراورده به مدت ۳ روز در خشکانه خشک شد.

رهاش دارو

استرول‌های کپسوله استخراج‌شده، در ۵۰ میلی‌لیتر محلول بافر فسفات با pH برابر ۷/۴ غوطه‌ور شدند و برطبق مقادیر داروی آزادشده منحنی وابستگی رسم شد. در بشرهای حاوی ۳۰ میلی‌لیتر محلول بافر فسفات، لوله‌های مهر و موم غوطه‌ور، و در دمای ۲۵، ۳۷ و ۵۰ درجه سلسیوس در گرم‌خانه قرارداده شدند. طی شش ساعت، در هر نیم ساعت، آزادسازی استرول‌های گیاهی بررسی شدند.

پایداری استرول‌های گیاهی کپسوله‌شده

پایداری استرول‌های گیاهی استخراج‌شده در مقایسه با استرول‌های گیاهی کپسوله‌شده در شرایط آزمایشگاهی با رطوبت معمولی در دمای اتاق و شرایط یخچال با دمای ۴ درجه سلسیوس و رطوبت معمولی در دمای ۴ درجه سلسیوس به مدت سه ماه با به‌کارگیری روش UV-Vis بررسی شد.

طراحی آزمایش با روش باکس بهنکن

برای بهینه‌سازی و ارزیابی تأثیر متغیرهای مستقل روش BBD به‌کارگرفته شد. سطوح و گستره‌های استفاده‌شده برپایه آزمایش‌های مقدماتی انتخاب شدند. گستره‌های آزمایشی مربوط به متغیرهای مستقل شامل نسبت چربی گوسفند به روغن شترمرغ (X_1 : ۱ تا ۲)، درصد گلوکز (X_2 : ۴۰ تا ۶۰)، مقدار استرول‌های گیاهی (X_3 : ۰/۰۶ تا ۱)، درصد لسیتین (X_4 : ۶ تا ۱۰) و زمان میکروکپسوله‌سازی (X_5 : ۲ تا ۵)، بودند. تعداد آزمایش‌های موردنیاز برای توسعه BBD می‌تواند به‌صورت معادله ۱ در نظر گرفته شود.

$$N = 2 K (K - 1) + C_0 \quad (1)$$

که در آن، C_0 تعداد نقاط مرکزی و k تعداد عامل‌های موردبررسی است. بنابراین، ۱۷ آزمایش برای بهینه‌سازی پنج متغیر در سه سطح پایین، متوسط و بالا انجام شد. نقطه مرکزی طراحی آزمایش ۳ بار برای تخمین خطا تکرار شد. آزمایش‌ها به صورت تصادفی انجام شدند تا تأثیرهای تغییرپذیری غیرقابل توضیح در پاسخ‌های شناسایی شده به کمینه برسد. نوع کلی معادله چندجمله‌ای مرتبه دوم به صورت معادله ۲ بود.

$$Y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} X_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (2)$$

که در آن، Y و X_i به ترتیب پاسخ پیش‌بینی شده و متغیر مستقل هستند. X_i^2 نمایانگر جمله درجه دوم و $X_i X_j$ برای جمله‌های تعاملی استفاده می‌شود. β_i ، β_{ii} و β_{ij} ($i \neq j$) به ترتیب ضرایب خطی، درجه دوم و تعاملی هستند. در حالی که β_0 و ε به ترتیب نشان‌دهنده خطای ثابت و خطای تصادفی هستند [۱۷].

نتیجه‌ها و بحث

ترکیب و محتوای استرول‌های گیاهی با به‌کارگیری روش تجزیه GC بررسی شد. با مقایسه زمان‌های بازداری پیک‌های GC استرول‌ها با استانداردهای داخلی یا مرجع، نوع استرول‌های گیاهی شناسایی شدند. روش‌های اعتبارسنجی برای تعیین استرول‌ها مانند ارزیابی‌های کنترل کیفیت با GC-FID گزارش شده‌اند [۱۸]. برپایه اطلاعات به‌دست‌آمده، جزء اصلی Δ^{23} -استیگماستادی انول (۴۷ درصد) و سایر اجزا شامل استیگماسترول و اونااسترول بودند که این اجزا ممکن است بسته به روش استخراج و نوع دانه روغنی متفاوت باشند. بنابراین، انواع استرول‌های گیاهی و مقدار آن‌ها می‌توانند متغیر باشند.

همان‌گونه که در بخش تجربی اشاره شد، برای بهینه‌سازی و ارزیابی متغیرهای مهم، روش BBD به‌کار گرفته شد. در مجموع، ۱۷ آزمایش شامل شش تکرار در نقطه مرکزی به صورت تصادفی برپایه ماتریس باکس-بهنکن انجام شد (جدول ۱). سطوح و گستره‌های استفاده‌شده برپایه آزمایش‌های مقدماتی انتخاب شدند. پاسخ آزمون در مقدارهای متفاوت متغیرها برپایه مقدار جذب استرول‌های گیاهی بارگذاری‌شده در ۲۱۲ nm $\lambda_{\max}$ = بررسی شد. برهمین پایه، آزمون ۱۱ با بیشینه جذب برای استرول‌های گیاهی بارگذاری‌شده به عنوان آزمون انتخابی در نظر گرفته شد و مقادیر آزمایش برپایه این آزمون بهینه گشت. رابطه بین پاسخ‌ها و متغیرهای ورودی، داده‌ها در یک معادله ریاضی چندجمله‌ای مرتبه دوم (معادله ۳) قرار داده شدند. تحلیل وردایی (ANOVA) اهمیت مدل را تعیین کرد. همان‌طور که در جدول ۲ ارائه شده است، اهمیت هر حالت با استفاده از مقادیر p آن‌ها ارزیابی شد. برپایه نتیجه‌های به‌دست‌آمده از جدول‌های ۱ و ۲، مشاهده می‌شود که روش موردنظر به‌طور قابل‌توجهی تحت تأثیر سه عامل مقدار استرول‌ها، درصد گلوکز و نسبت چربی گوسفند به روغن شترمرغ، قرار گرفته است.

$$Y_{\text{جذب}} = 0.725 + 0.055 X_1 + 0.073 X_2 + 0.086 X_3 + 0.028 X_4 + 0.013 X_5 + 0.044 X_1 X_2 + 0.045 X_1 X_3 + 0.014 X_1 X_4 + 0.024 X_2 X_3 + 0.059 X_2 X_4 - 0.088 X_1^2 \quad (3)$$

جدول ۱ عامل‌ها و سطوح آن‌ها در ماتریس طراحی و پاسخ مشاهده‌شده
 X_1 : نسبت چربی گوسفند به روغن شترمرغ، X_2 : درصد گلوکز،
 X_3 : مقدار استرول‌های گیاهی (گرم)، X_4 : درصد لسیتین و X_5 :
 زمان میکروکپسوله‌سازی (ساعت))

آزمایش‌ها	عامل‌های سطوح				
	X_5	X_4	X_3	X_2	X_1
۱	۲/۰۰	۱۰/۰۰	۱/۰۰	۵۰/۰۰	۱/۰۰
۲	۲/۰۰	۱۰/۰۰	۰/۰۶	۵۰/۰۰	۲/۰۰
۳	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۰/۰۶	۵۰/۰۰	۱/۰۰
۴	۲/۰۰	۶/۰۰	۰/۰۶	۴۰/۰۰	۱/۰۰
۵	۵/۰۰	۶/۰۰	۰/۰۶	۵۰/۰۰	۲/۰۰
۶	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۰/۰۶	۴۰/۰۰	۲/۰۰
۷	۵/۰۰	۱۰/۰۰	۱/۰۰	۴۰/۰۰	۱/۰۰
۸	۳/۵۰	۸/۰۰	۰/۵۳	۴۵/۰۰	۱/۵۰
۹	۲/۰۰	۱۰/۰۰	۱/۰۰	۴۰/۰۰	۲/۰۰
۱۰	۵/۰۰	۶/۰۰	۱/۰۰	۴۰/۰۰	۲/۰۰
۱۱	۵/۰۰	۶/۰۰	۱/۰۰	۵۰/۰۰	۱/۰۰
۱۲	۳/۵۰	۸/۰۰	۰/۵۳	۴۵/۰۰	۱/۵۰
۱۳	۳/۵۰	۸/۰۰	۰/۵۳	۴۵/۰۰	۱/۵۰
۱۴	۳/۵۰	۸/۰۰	۰/۵۳	۴۵/۰۰	۱/۵۰
۱۵	۳/۵۰	۸/۰۰	۰/۵۳	۴۵/۰۰	۱/۵۰
۱۶	۳/۵۰	۸/۰۰	۰/۵۳	۴۵/۰۰	۱/۵۰
۱۷	۲/۰۰	۶/۰۰	۱/۰۰	۵۰/۰۰	۲/۰۰

تحلیل وردایی^۱ مدل وایازش^۲ ($ANOVA^3$) نشان می‌دهد که متغیرهایی با $P < 0.05$ بسیار معنی‌دار هستند (جدول ۲). کیفیت مدل با همخوانی ضریب R^2 با R^2 تنظیم‌شده بررسی شد. یک مدل وایازش ($R^2 > 0.95$) همخوانی بسیار بالایی را نشان می‌دهد. مقدار بسیار بالای R^2 (۰/۹۹۵۶) نشان‌دهنده همخوانی عالی بین مقادیر پیش‌بینی‌شده و تجربی بود و این مدل ۹۹/۴۸ درصد از تغییرپذیری پاسخ را توصیف کرد. افزون‌براین، R^2 تنظیم‌شده (۰/۹۸۹۹) نیز بسیار بالا بود و معنی‌دار بودن مدل را تأیید کرد. آزمون عدم‌پرازش می‌تواند شکست مدل در نشان‌دادن

1. Variance
 2. Regression
 3. Analysis of variance (ANOVA)

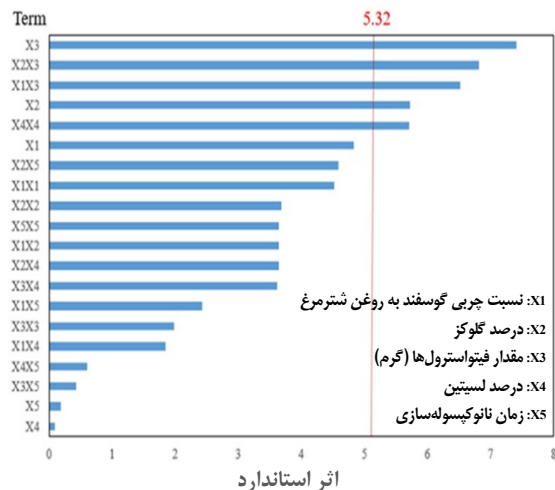
داده‌های تجربی در حوزه تجربی در نقاطی که در تحلیل وایزش در نظر گرفته نشده‌اند را اندازه‌گیری کند. عدم برازش غیرمعنی‌دار بود که نشان‌دهنده اهمیت مدل درجه دوم برای پاسخ بود [۱۸ و ۱۹].

برای بررسی ضریب تاثیر متغیرها بر پاسخ آزمون، نمودار پارتو به کار گرفته شد. همان گونه که در شکل ۱ مشاهده می‌شود، تاثیر مقدار استرول گیاهی و درصد گلوکز از بقیه متغیرها بیشتر و درصد چربی گوسفند به روغن شترمرغ از اهمیت بعدی برخوردار است.

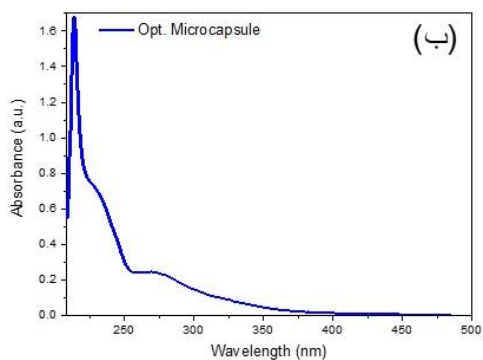
جدول ۲ تحلیل و ردایی (ANOVA) برای بررسی عبارات خطی، درجه دوم و تعاملی برای هر متغیر پاسخ ($R^2 = 99.48$)، پیش‌بینی شده ($R^2 = 99.26$) و تنظیم شده ($R^2 = 99.12$)

متغیرها	مجموع مربع ها (SS)	میانگین مربع ها (MS)	مقدار F	مقدار p
مدل	۰/۱۵۰۰	۰/۰۱۴۰	۴۰/۹۱	۰/۰۰۰۴
X ₁	۰/۰۱۷۰	۰/۰۱۷۰	۴۹/۴۹	۰/۰۰۰۹
X ₂	۰/۰۲۹۰	۰/۰۲۹۰	۸۶/۷۸	۰/۰۰۰۲
X ₃	۰/۰۲۴۰	۰/۰۲۴۰	۷۲/۱۷	۰/۰۰۰۴
X ₄	۰/۰۰۳۵	۰/۰۰۳۵	۷/۶۵	۰/۰۳۹۵
X ₅	۰/۰۲۸۰	۰/۰۲۸۰	۸۴/۱۲	۰/۰۰۰۳
X ₁ ²	۰/۰۲۹۰	۰/۰۲۹۰	۸۶/۵۷	۰/۰۰۰۲
X ₁ X ₂	۰/۰۰۳۱	۰/۰۰۳۱	۱۵/۱۹	۰/۰۱۱۴
X ₁ X ₃	۰/۰۰۴۶	۰/۰۰۴۶	۰/۸۵	۰/۰۳۹۹
X ₁ X ₄	۰/۰۰۷۴۰	۰/۰۰۷۴۰	۲۲۰/۰۷	۰/۰۰۰۱
X ₂ X ₃	۰/۰۰۳۴	۰/۰۰۳۴	۶/۸۵	۰/۰۴۷۲
X ₂ X ₄	۰/۰۰۱۴۰	۰/۰۰۱۴۰	۴۱/۱۲	۰/۰۰۱۴
X ₂ X ₅	۰/۰۰۱۹۰	۰/۰۰۱۱۵	۲۵/۴۲	۰/۰۳۲۵۰
X ₃ X ₄	۰/۰۰۲۸۰	۰/۰۰۲۹۰	۶۶/۲۲	۰/۰۴۱۵۰
X ₃ X ₅	۰/۰۰۶۳۲۰	۰/۰۰۷۰۰	۱۴/۷۲	۰/۰۳۸۴۰
X ₄ X ₅	۰/۰۰۱۴۷	۰/۰۰۱۵۰	۵۸/۵۶	۰/۰۲۵۶۰
باقی مانده	۰/۰۰۳۵	۰/۰۰۸۹		
عدم انطباق	۰/۰۰۴۵	۰/۰۰۵۵	۲/۳۲	۰/۰۵۲۰۱
خطا	۰/۰۰۳۸	۰/۰۰۱۴۰		

در شکل ۲-الف، تصویر استرول‌های گیاهی کپسوله‌شده نشان داده شده است. همچنین، طیف جذب UV-Vis از استرول‌های گیاهی کپسوله‌شده نهایی (شکل ۲-ب) به مقدار ۱ میلی گرم در ۱ میلی لیتر هگزان در حضور نمونه خالی (بدون استرول‌ها) گرفته شد. بیشینه پیک جذب استرول‌های گیاهی کپسوله‌شده در ۲۱۲ نانومتر ($\pi \rightarrow \pi^*$) انتقال قرار دارد. همچنین، برخی پیک‌های جذب در طول موج‌های بالاتر پدیدار شده‌اند که می‌تواند به انتقال $n \rightarrow \pi^*$ گروه OH- مربوط باشد.



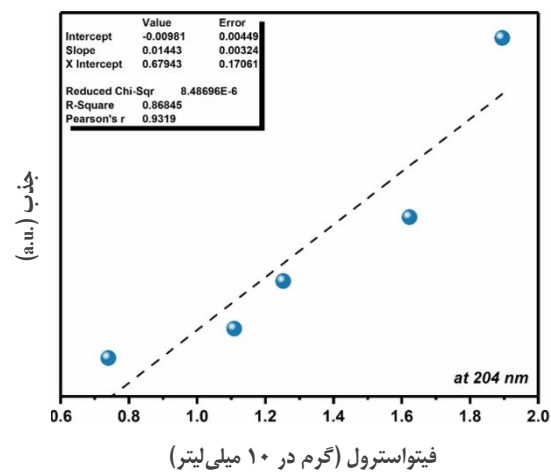
شکل ۱ نمودار پارتو



شکل ۲ تصویر (الف) و طیف UV-Vis (ب) استرولهای گیاهی کپسوله شده

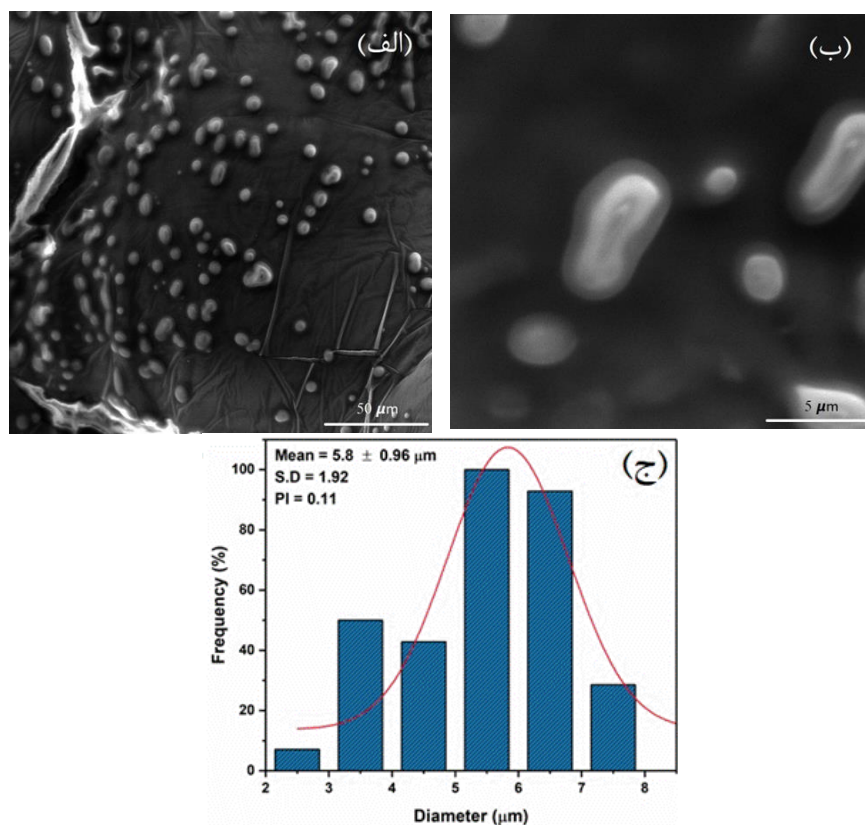
از سوی دیگر، منحنی واسنجی غلظت استرولهای گیاهی با استفاده از غلظت‌های شناخته شده آنها در ۱۰ میلی لیتر n-هگزان در طول موج ۲۱۲ نانومتر مطالعه شده است (شکل ۳). برای تعیین محتوای استرولهای گیاهی در کپسول‌های نهایی، با مقدارهای به دست آمده از بررسی UV-Vis، نسبت وزن دارو در نانوکپسول‌ها به غلظت اولیه مورد استفاده دارو محاسبه شد. برپایه معادله ۴، محتوای استرولهای گیاهی یا کارایی به دام انداختن دارو (EE%) در شرایط بهینه، ۸۳/۵۵ درصد بود.

$$EE\% = \left(\frac{\text{وزن دارو در نانوذرات}}{\text{وزن داروی اولیه}} \right) \times 100 \quad (4)$$



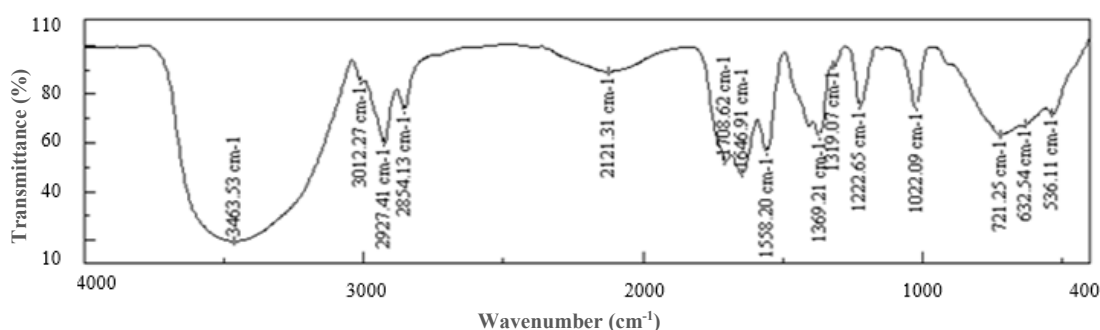
شکل ۳ منحنی واسنجی

برپایه تصویرهای SEM (شکل ۴)، ذره‌های فراورده تهیه‌شده در شرایط بهینه به تقریب کروی شکل هستند. همچنین، کپسوله‌شدن فیتواسترویل‌ها در تصویر با مقیاس ۵ میکرومتر، به‌خوبی قابل مشاهده است.



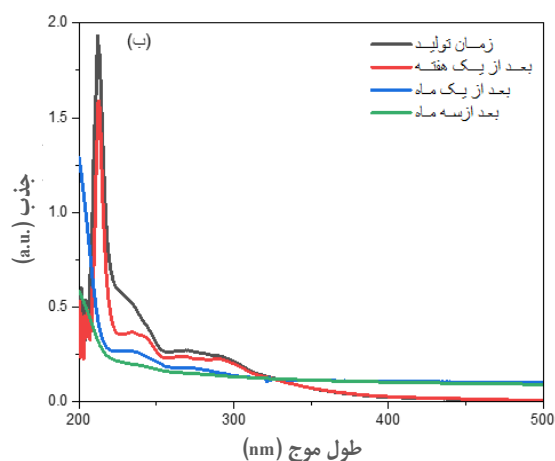
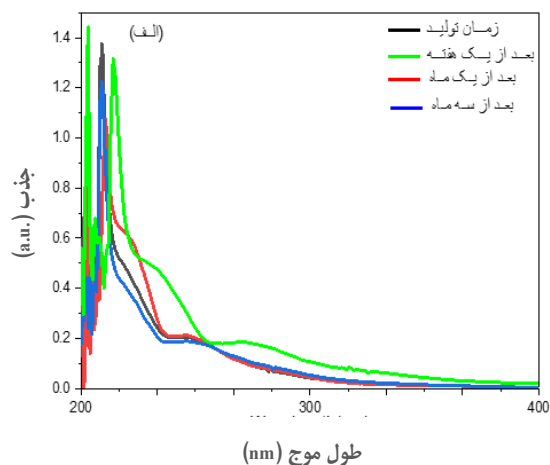
شکل ۴ تصویرهای SEM فراورده بهینه کپسول‌های حاوی استرویل با بزرگنمایی‌های متفاوت (الف و ب) و نمودار اندازه ذره‌ها (ج)

طیف FTIR استرول‌های گیاهی میکروکپسوله‌شده در شکل ۵ نشان داده شده است. در این طیف، نوارهای مشاهده‌شده در 2854 cm^{-1} و 2927 cm^{-1} مربوط به ارتعاش‌های کششی نامتقارن پیوندهای C-H در گروه‌های آلیفاتیک هستند. نوار ناحیه 1558 cm^{-1} می‌تواند به ارتعاش متقارن $\text{C}=\text{CH}-\text{CH}_2$ نسبت داده شود و نوارهای 1022 cm^{-1} تا 1369 cm^{-1} بیانگر ارتعاش‌های ثانویه C-O در گروه C-O-H هستند. نوار جذب قوی و گسترده در حدود 3463 cm^{-1} می‌تواند مربوط به ارتعاش کششی O-H باشد. افزون‌براین، نوار جذبی در 1708 cm^{-1} می‌تواند به ارتعاش‌های کششی C=O در بخش چربی و لسیتین نسبت داده شود. بنابراین، کپسوله‌سازی استرول‌ها با گروه‌های عاملی پوشش به‌کاررفته در فراورده مشخص شده است [۲۰، ۲۱].



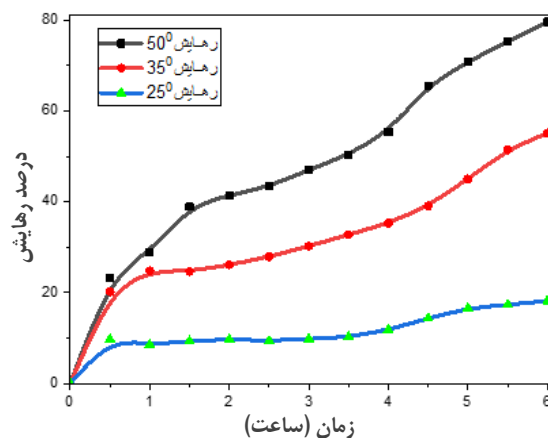
شکل ۵ طیف FTIR استرول‌های گیاهی کپسوله‌شده

تغییر احتمالی ساختار شیمیایی استرول‌های گیاهی، به‌ویژه در شرایط عادی (از طریق اکسایش)، ما را به بررسی پایداری دو نوع استرول‌های گیاهی خالص و پوشش‌دار در رابطه با جذب UV آن‌ها ترغیب کرد. پایداری استرول‌های گیاهی استخراج‌شده در مقایسه با استرول‌های گیاهی کپسوله‌شده با به‌کارگیری روش UV-Vis در ۲۱۲ نانومتر (شکل ۶-الف و ب)) که بیشینه طول موج جذب استرول‌های گیاهی استخراج‌شده است، بررسی شد. مشخص شد که پایداری استرول‌های گیاهی کپسوله‌شده در همه شرایط مطالعه‌شده (شرایط آزمایشگاهی) بیشتر از استرول‌های گیاهی خالص بود. این ممکن است به دلیل قطبیت‌های مشابه میکروکپسول‌ها و استرول‌ها با گروه‌های آلکیل زنجیره بلند برای ایجاد تعامل‌های واندروالسی قوی‌تر بین آن‌ها یا ویژگی پاداکسیدانی روغن شترمرغ باشد. بنابراین، ترکیب‌های طبیعی پوشش خوبی برای محافظت از استرول‌های گیاهی در برابر عامل‌های محیطی هستند [۲۲].



شکل ۶ مقایسه پایداری استرول‌های گیاهی میکروکپسوله‌شده در شرایط آزمایشگاه (الف) در مقابل استرول‌های گیاهی خالص (ب)

با توجه به ترکیب لیپیدی میکروکپسول‌ها، آن‌ها حساسیت قابل توجهی به تغییرهای دما نشان می‌دهند و بنابراین، نیاز به نظارت دقیق دما در طول فرایند آزادسازی دارند [۲۳]. برای بررسی تأثیر دما بر آزادسازی ترکیب دارویی، استرول‌های گیاهی کپسوله‌شده در سه دمای متفاوت بررسی شدند. آزادسازی استرول‌های گیاهی در دمای ۲۵ درجه سلسیوس، همان‌گونه که در شکل ۷ نشان داده شده است، کاهش به‌تقریب یکنواختی را نشان داد. بنابراین، امکان نگهداری استرول‌های گیاهی در دمای اتاق در حالی که بخش قابل توجهی از آن‌ها حفظ می‌شود، وجود دارد. افزون‌براین، مشاهده شد که آزادسازی استرول‌های گیاهی با افزایش چشمگیری در دمای ۵۰ درجه سلسیوس رخ می‌دهد. در نتیجه، کپسول‌ها در دمای محیط آزادسازی واپایش‌شده‌ای را نشان می‌دهند که می‌تواند به تغییرها در ترکیب ساختاری غشای کپسول‌ها نسبت داده شود. بنابراین، میکروکپسول‌های پایدار قابلیت نگهداری ماده موثره (استرول‌های گیاهی) را در دمای محیط بدون وقوع انعقاد را دارند [۱۷ و ۲۴].



شکل ۷ رهايش تجمعی استرول‌های استخراج‌شده

نتیجه‌گیری

استرول‌های گیاهی از روغن کنجد با جداسازی بخش صابونی، استخراج شدند. میکروکپسول‌های روغن شترمرغ و چربی گوسفند حاوی استرول‌های گیاهی با استفاده از یک ماده سطح‌فعال طبیعی (لسیتین سویا) با روش نامیزه دوگانه به‌طور موفقیت‌آمیز تولید شدند. نیروی محرکه اصلی برای نامیزه دوگانه می‌تواند مربوط به کاهش انرژی الکترواستاتیک آزاد بین یون‌هایی با بار مخالف باشد که تغییر برخی عامل‌ها مانند pH و غلظت ترکیب‌ها، در شکل‌گیری این فرایند موثر هستند. این تنش‌های سطحی کاهش‌یافته می‌توانند قابلیت افزایش کپسوله‌سازی اجزای فعال را داشته باشند. به‌طور کلی، اثرهای هم‌زدن و امواج فراصوت با جلوگیری از تشکیل تجمع‌های قابل‌توجه، تسهیل پراکندگی و افزایش شکست قطرات، مشهود است. با دستکاری این متغیرها، می‌توان فرایند نامیزه را واپایش کرد. بررسی متغیرها و مقدار تاثیر آن‌ها با روش باکس-بهنکن مطالعه شد. برپایه BBD، همه روندهای یافت‌شده همبستگی خوبی با محتوای استرول‌های گیاهی نشان دادند. مقادیر بهینه نشان داد که نسبت چربی گوسفند به روغن شترمرغ باید در کمترین مقدار، ۲ باشد که برای بدن بسیار مفیدتر است. برپایه محاسبه‌ها، مقدار استرول‌ها بیشترین ضریب تأثیر را دارد و ۰/۰۶ گرم از آن برای تشکیل کپسول‌ها کافی است. با این حال، گلوکز به‌عنوان عاملی که می‌تواند تجمع ذره‌ها را کاهش دهد، باید به‌طور تقریبی نزدیک به بیشینه مقدار باشد. افزایش زمان هم‌زدن و ماده سطح‌فعال (لسیتین) تأثیر زیادی بر نتیجه‌ها نداشت. بنابراین، کمینه مقدار لسیتین (۶ درصد) و زمان ۲ ساعت برای ایجاد یک مخلوط همگن مناسب بود. در شرایط بهینه مذکور کارایی خوبی از کپسوله‌شدن (۸۳/۵۵ درصد) به‌دست آمد. مشخص شد که پایداری استرول‌های گیاهی کپسوله‌شده در مقایسه با استرول‌های گیاهی استخراج‌شده در همه شرایط مطالعه‌شده بالاتر است. همچنین، استرول‌های گیاهی کپسوله‌شده نشان دادند که در دمای محیط آزادسازی کنترل شده‌ای داشتند. نوآوری این کار استفاده از اجزای خوراکی و طبیعی برای ایجاد یک کلوئید پایدار با هدف شیمی سبز بود که طراحی فرآورده‌های جدید با کاهش استفاده از مواد خطرناک برای کپسوله‌سازی است. به این ترتیب، در پژوهش انجام‌شده مشکل‌های تشکیل کپسول‌های چربی با کمک نامیزه دوگانه همراه با فراصوت (به‌صورت هم‌زمان) و بهینه‌سازی متغیرها با روش باکس-بهنکن، برطرف شد.

بدین وسیله از دانشگاه آزاد واحد تهران مرکزی و همه کسانی که در انجام این پژوهش کمال همکاری را داشتند، تشکر و قدردانی می‌شود.

مراجع

- [1] Mansouri Gharaghoushi S, Nikpour Nezhati M, Baharvand H, Mohammadian T, Ahmad Panahi H. Encapsulated magnetic nanoparticles with a polymer containing boronic acid groups for separation and enrichment of horseradish peroxidase glycoprotein. *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* 2022;71:946–958. **doi: org/10.1080/00914037.2021.1931208 (2022)**
- [2] Haidong Zh, Hongyu X, Jiaping M, Gangxiang W. Bortezomib-encapsulated metal–phenolic nanoparticles for intracellular drug delivery. *RSC Advances.* 2024;14(36):26176–26182. **doi: org/10.1039/d4ra03504f**
- [3] Ovinuchi E, Samson O. F, Deinmo E, Jessica I. Polyphenol encapsulated nanofibers in wound healing and drug delivery. *European Journal of Medicinal Chemistry Reports.* 2024;12:100184. **doi: org/10.1016/j.ejmcr.2024.100184**
- [4] Hennie M J, Werner F, Jo K, Marianne H. Nano-strategies for advancing oral drug delivery: Porous silicon particles and cyclodextrin encapsulation for enhanced dissolution of poorly soluble drugs. *International Journal of Pharmaceutics.* 2024;666:124809. **doi: org/10.1016/j.ijpharm.2024.124809**
- [5] Alberto B, Chun YJW, Hale O, Hanieh Gh, Yigong G, Hui X O, et al. Nasal delivery of encapsulated recombinant ACE2 as a prophylactic drug for SARS-CoV-2. *International Journal of Pharmaceutics.* 2024;655:124009. **doi: org/10.1016/j.ijpharm.2024.124009**
- [6] Hu Y, Xiong L, Huang W, Cai H, Luo Y, Zhang Y, Lu B. Anti-inflammatory effect and prostate gene expression profiling of steryl ferulate on experimental rats with non-bacterial prostatitis. *Food Funct.* 2014;5:1150–1159. **doi: org/10.1039/C4FO00052H**
- [7] Moreau RA, Whitaker BD, Hicks KB. Phytosterols, phytostanols, and their conjugates in foods: Structural diversity, quantitative analysis, and health-promoting uses. *Prog. Lipid. Res.* 2002;41:457–500. **doi: org/10.1016/s0163-7827(02)00006-1**
- [8] Law M. Plant sterol and stanol margarines and health. *BMJ* 2000;320:861–864. **doi: org/10.1136/bmj.320.7238.861**
- [9] Suttiarporn P, Chumpolsri W, Mahatheeranont S, Luangkamin S, Teepsawang S, Leardkamolkarn V. Structures of phytosterols and triterpenoids with potential anti-cancer activity in bran of black non-glutinous rice. *Nutrients.* 2015;7:1672–1687. **doi: org/10.3390/nu7031672**
- [10] Gylling H, Simonen P. Phytosterols, phytostanols, and lipoprotein metabolism. *Nutrients.* 2015;7(9):7965–7977, **doi: 10.3390/nu7095374**
- [11] Fernandes P, Cabral J. Phytosterols: Applications and recovery methods. *Bioresour. Technol.* 2007;98:2335–2350. **doi: 10.1016/j.biortech.2006.10.006**
- [12] Abidi S. Chromatographic analysis of plant sterols in foods and vegetable oils. *J. Chromatogr. A* 2001;935:173–201. **doi: 10.1016/s0021-9673(01)00946-3**
- [13] Vaikousi H, Lazaridou A, Biliaderis CG, Zawistowski J. Phase transitions, solubility, and crystallization kinetics of phytosterols and phytosterol-oil blends. *J Agric Food Chem.* 2007;55:1790–1798. **doi: org/10.1021/jf0624289**

- [14] Pavani M, Singha P, Ranjan Dash D, Asaithambi N, Kumar Singh S. Novel encapsulation approaches for phytosterols and their importance in food products: A review. *J Food Proc Eng*. 2022;45,8, e14041. **doi: org/10.1111/jfpe.14041**
- [15] Mohammadi M, Jafari M, Hamishehkar H, Ghanbarzadeh B. Phytosterols as the core or stabilizing agent in different nanocarriers. *Trends in Food Sci & Tech*. 2020; 101:73-88. **doi: org/10.1016/j.tifs.2020.05.004**
- [16] Dikshit S, Bubna S, Gupta A, Kumar P. Advances in various techniques for isolation and purification of sterols. *J Food Sci Technol*. 2020;57:2393–2403. **doi: org/10.1007/s13197-019-04209-3**
- [17] Yang R, Xue L, Zhang L, Wang X, Qi X, Jiang J, et al. Phytosterol contents of edible oils and their contributions to estimated phytosterol intake in the chinese diet. *Foods* 2019. **doi: org/10.3390/foods8080334**
- [18] Beveridge TH, Li TS, Drover JC. Phytosterol content in American ginseng seed oil. *J. Agric. Food Chem*. 2002;50:744–750. **doi: 10.1021/jf010701v**
- [19] Kei N, M. Shahidul I, Syed ShHSh, Zhuolin L, Yuji T, Ronny B. Relationship between nitrate, heavy metal, and sterols contents in Japanese agricultural soils with risk of groundwater pollution. *Chemosphere*. 2024;361:142335. **doi: org/10.1016/j.chemosphere.2024.142335**
- [20] Martins Q, Almeida PV, Ferreira Q.S, Oliveira A, Aguirre C, Faria JLB. Investigation of ostrich oil via Raman and infrared spectroscopy and predictions using the DFT method. *Vib. Spectrosc*. 2019;104:102945. **doi: org/10.1016/j.vibspec.2019.102945**
- [21] Battaglia L, Panciani PP, Muntoni E, Capucchio MT, Biasibetti E, Bonis PE, et al. Lipid nanoparticles for intranasal administration: Application to nose-to-brain delivery. *Expert Opin. Drug Deliv*. 2018;15(4):369–378. **doi: org/10.1080/17425247.2018.1429401**
- [22] Bowen Y, Tian Zh, Yan L, Baiyi L. Guidelines for extraction and quantitative analysis of phytosterols and oxidation products, *Food*. 2023;4:108. **doi: org/10.1002/efd2.108**
- [23] Tang CH, Chen HL, Dong JR. Solid Lipid Nanoparticles (SLNs) and Nanostructured Lipid Carriers (NLCs) as Food-Grade Nanovehicles for Hydrophobic Nutraceuticals or Bioactives. *Appl. Sci*. 2023;13:1726. **doi: org/10.3390/app13031726**
- [24] Lan Y, Lemeng Sh, János M, Béla P. Encapsulation of a drug into electrospun fibers spun from water soluble polymers to control solubility and release. *Heliyon*. 2024;10(20):e38935. **doi: org/10.1016/j.heliyon.2024.e38935**

A Green Method for Microencapsulation of Plant Sterols Using Natural Fats

Z. Mahdlou¹, R. Amiri Dehkharghani^{2,*}, A. Niazi^{3,*}, A. Tamaddon⁴,

M. Tajabadi Ebrahim⁵

1. PhD Student of Department of Chemistry, CT.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran.

2. Associate Prof. of Department of Chemistry, CT.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran.

3. Professor of Department of Chemistry, CT.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran.

4. Assistant Prof. of Department of Chemistry, CT.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran.

5. Associate Prof. of Department of Biology, CT.C., Islamic Azad University, Tehran, Iran.

Abstract: This work discusses the microencapsulation of plant sterols as a compound to reduce the risk of hormone-related cancers using natural fats (sheep fat and ostrich oil). First, plant sterols were extracted from sesame oil and then encapsulated using the double emulsion method. Techniques such as Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy, ultraviolet-visible (UV-Vis) spectroscopy, scanning electron microscopy (SEM), and gas chromatography (GC) were used to identify the obtained microcapsules. A three-factor, three-level Box-Behnken design (BBD) was used to prioritize the factors affecting the double emulsion process to optimize the loading capacity of solid lipid nanoparticles (SLNs). The operational conditions indicated that the capsule size was in the micrometer range, and the plant sterol content (EE %) was 83.55%. The controlled release of the capsules was examined at room temperature. The stability of the encapsulated plant sterols was evaluated over three months. The obtained results showed that this optimized green double emulsion method was a suitable approach for producing stable coating for encapsulating plant sterols.

Keywords: Green method, Encapsulation, Plant sterols, Natural fats.

* Corresponding Authors Email: rahebeha@gmail.com; Rah.Amiri@iauctb.ac.ir; aliniazi@gmail.com