



استفاده از میکروهیدروژل‌های بارگذاری شده با نیوزوم و لیپوزوم در ریزپوشانی و رهش طولانی مدت ترکیبات کوچک مولکول آب‌دوست

علیرضا مهرگان نیکو^۱، رسول کدخدایی^{۲*}، بهروز قرآنی^۳

- ۱ دکتری، گروه شیمی مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، مشهد
- ۲ دانشیار، گروه نانوفناوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، مشهد
- ۳ استادیار، گروه نانوفناوری مواد غذایی، پژوهشکده علوم و صنایع غذایی، مشهد

(تاریخ دریافت: ۹۵/۸/۱. تاریخ پذیرش: ۹۵/۹/۲)

چکیده

در این مطالعه سامانه هیدروژلی آلژینات کلسیم بارگذاری شده با نیوزوم‌ها و لیپوزوم‌ها به‌منظور ریزپوشانی کافئین به‌عنوان یک ترکیب زیست فعال آب‌دوست با وزن مولکولی پایین، با هدف طولانی کردن زمان رهش آن مورد استفاده قرار گرفت. به‌منظور بارگذاری لیپوزوم‌ها یا نیوزوم‌ها در شبکه آلژیناتی و کاهش اندازه هیدروژل از روش الکترواسپری در محلول کلرور کلسیم استفاده شد. چرخه‌های پی‌اپی انجماد-رفع انجماد نیز با رویکرد کند کردن آهنگ رهش کافئین به‌کارگرفته شد. نتایج، گویای بالاتر بودن کارایی ریزپوشانی نیوزوم‌ها نسبت به لیپوزوم‌ها در به دام اندازی کافئین بودند. هم‌چنین داده‌های سنجش آهنگ رهش بیانگر تأثیر مثبت چرخه‌های انجماد-رفع انجماد و کارآمدتر بودن سامانه هیدروژل بارگذاری شده با نیوزوم در مقایسه با لیپوزوم بود. لیپوزوم‌های تولید شده از لسیتین با خلوص بالاتر در مقایسه با لسیتین تجاری کارایی درون پوشانی و الگوی رهش بهتری را از خود نشان دادند. نتایج مدل‌سازی ریاضی انتشار کافئین از ذرات هیدروژلی با توجه به مدل کورسمیر-پیاس مؤید پیروی آهنگ رهش از قانون انتشار فیک بود. بررسی‌ها نشان داد که میکروهیدروژل‌های بارگذاری شده با نیوزوم و لیپوزوم از قابلیت مناسبی در ریزپوشانی ترکیبات غذایی و دارویی آب‌دوست با هدف رهش بلند مدت برخوردار می‌باشند. هم‌چنین مشخص شد که استفاده از روش الکترواسپری منجر به تولید ذراتی با توزیع اندازه یکنواخت می‌گردد و از این رو می‌تواند به‌عنوان جایگزینی برای روش‌های مرسوم تولید میکروذرات هیدروژلی از پلیمرهای طبیعی مورد توجه قرار گیرد.

واژه‌های کلیدی: هیدروژل بارگذاری شده، لیپوزوم، نیوزوم، کافئین، الکترواسپری، ریزپوشانی.

* نویسنده مسئول: r.kadkhodaei@rifst.ac.ir

1- مقدمه

لیپوزوم‌ها سال‌های طولانی است که به‌عنوان سامانه‌های رهش دارو در بدن انسان کاربرد داشته و به‌دلیل دارا بودن قابلیت رهاسازی ترکیبات آبدوست و آب‌گریز در بازه زمانی به‌نسبت طولانی مورد توجه می‌باشند [1]. لیپیدهای متداول مورد استفاده در تولید لیپوزوم فسفولیپیدها به‌ویژه فسفاتیدیل کولین (لسیتین) و فسفاتیدیل اتانول آمین می‌باشند [2]. با داشتن ویژگی‌های ساختاری خاص، لیپوزوم‌ها قادر به درون‌پوشانی ترکیبات آبدوست در فاز آبی و ترکیبات آب‌گریز در بخش فسفولیپیدی دولایه‌ای خود هستند [3].

نیوزوم‌ها از هیدراسیون مواد فعال سطحی غیریونی آلکیل یا دی آلکیل پلی گلیسرول اتر با کلسترول ساخته شده و گونه‌هایی با ساختار لایه‌ای می‌باشند [4]. همانند لیپوزوم‌ها، نیوزوم‌ها نیز در محیط‌های درون تنی باعث طولانی شدن زمان ماند ترکیبات زیست فعال در سامانه گردش خون شده و با افزایش پایداری متابولیک آن‌ها رسانش به بافت هدف را تقویت می‌کنند [5]. سامانه‌ها بر پایه لیپید اغلب با مسئله ناپایداری مواجه هستند، هرچند زیست سازگاری بالاتری را در مقایسه با سامانه‌های پلیمری از خود نشان می‌دهند، زیرا از اجزای طبیعی بدن انسان محسوب می‌شوند. با این حال از آنجایی که سامانه‌ها بر پایه پلیمر پایداری بیشتری در مقایسه با انواع لیپیدی دارند به‌کارگیری پلیمر به همراه لیپید می‌تواند مقاومت آن‌ها در برابر تخریب را افزایش دهد [6].

بیوپلیمرهای غیرسمی و با سازگاری زیستی نظیر کیتوزان، آلژینات، پکتین، نشاسته و کاراگینان به‌طور عمده به‌عنوان اجزای ساختمانی میکرو و نانو ذرات استفاده می‌شوند [7]. توسط چنین پلی ساکاریدهایی می‌توان ذرات ژلی تهیه نمود که در تولید غذاهایی با ساختار نوپدید و ویژگی‌ها و قابلیت‌های بهبود یافته کاربرد داشته باشند. شبکه ژلی علاوه بر تشکیل بافت مستحکم، نفوذپذیری مولکول‌ها و یون‌ها را نیز فراهم می‌آورد [8].

آلژینات بیوپلیمر طبیعی است که از جلبک‌های دریایی قهوه‌ای استخراج می‌شود و به‌دلیل مقرون به صرفه بودن و ویژگی‌های خوب ژل شونده‌گی به‌طور گسترده‌ای مورد استفاده قرار می‌گیرد. غیرسمی بودن، زیست سازگاری، پایداری دمایی

و شیمیایی از شاخصه‌های اصلی آلژینات هستند که آن را گزینه‌ای مناسب برای استفاده در ریزپوشانی ترکیبات زیست فعال و پروبیوتیک‌ها ساخته است [9]. آلژینات کوپلیمر خطی از آلفا-ال-گلورونیک اسید و بتا-دی-مانورونیک اسید است که با پیوندهای گلیکوزیدی 1 به 4 به یکدیگر متصل شده و دارای ویژگی چسبندگی به مخاط می‌باشد [10، 11]. این پلی ساکارید با ایجاد شبکه هیدروژلی با اندازه منافذ 80 تا 100 آنگستروم به‌عنوان پرکاربردترین بیوپلیمر در ریزپوشانی و رسانش ترکیبات زیست فعال و پروبیوتیک‌ها مورد توجه می‌باشد [12، 13]. برای توضیح سازوکار ژل شدن آلژینات با کاتیون‌های دو ظرفیتی از مدل شانه تخم مرغی استفاده می‌شود که بر مبنای آن یون‌ها با ایجاد اتصال عرضی بین گروه‌های کربوکسیل دو رشته آلژینات مجاور هم موجب قرار گرفتن منظم آن‌ها در کنار یکدیگر و تشکیل شبکه می‌شوند [14].

شبکه ژلی آلژینات کلسیم از قابلیت به دام اندازی ذراتی نظیر لیپوزوم و نیوزوم که می‌توانند حاوی ترکیبات هیدروفیل یا هیدروفوب باشند برخوردار است. محققین مختلفی از این ویژگی برای تولید هیدروژل‌های بارگذاری شده با سامانه‌های مذکور با هدف حفظ و یا طولانی کردن زمان رهش ترکیبات فراسودمند استفاده کرده اند. بوجانا و همکاران آنتی اکسیدان طبیعی ترانس-رزوراترول را در سامانه لیپوزوم-آلژینات کلسیم به دام انداخته و قابلیت آن را در کنترل انتقال جرم و کند کردن زمان رهش بررسی نمودند. استارسدات و بانجس امکان به دام اندازی نانوذرات لیپیدی در شبکه هیدروژلی آلژینات کلسیم و میزان پایداری آن‌ها در این شرایط را مورد مطالعه قرار داده و سامانه هیدروژل بارگذاری شده با لیپوزوم را به‌عنوان حامل مناسبی برای ترکیبات مؤثره غذایی و دارویی معرفی کردند. علاوه بر آلژینات سایر شبکه‌های هیدروژلی نیز برای حمل لیپوزوم‌ها و نیوزوم‌های استفاده شده‌اند. به‌عنوان نمونه انتشار داروی لیدوکائین هیدروکلرید از هیدروژل کربوپول محتوی لیپوزوم‌های حامل این دارو مورد بررسی واقع شده است [17]. دیتیزیو و همکاران سامانه هیدروژلی ژلاتین-پلی اتیلن گلاکول را به‌منظور رهش آهسته کلروهگزیدین و سیپلوفلوکساسین از لیپوزوم‌ها طراحی نمودند. هم‌چنین سامانه هیدروژلی مخلوط

دیگر مصرف کمتر از 200 mg میلی گرم کافئین نیز تأثیر چندانی بر جلوگیری از بروز خواب و حفظ هوشیاری ندارد [25]. بنابراین با توجه به عوارض جانبی مصرف یکجای مقادیر بالای کافئین، بهره‌مندی از اثرات مثبت آن در زندگی روزانه و نیز در فعالیت‌های نظامی مستلزم به کارگیری سامانه‌های درون پوشانی و رهش مناسبی است که بتواند به تدریج و در یک بازه زمانی طولانی مدت کافئین را آزاد نماید [26].

پژوهش حاضر با هدف به دام اندازی کافئین در سامانه‌های لیپوزومی یا نیوزومی و بارگذاری آن‌ها در شبکه هیدروژلی آلژینات به منظور کنترل سرعت رهش در شرایط محیطی انجام شده است.

2- مواد و روش‌ها

2-1- مواد

آلژینات سدیم تجاری با درصد خلوص بالا (وزن مولکولی $\sim 120000 \text{ g/mol}$) از شرکت فیبریسل آلمان تهیه گردید. کلسترول و کافئین از شرکت سیگما آلدْرِیچ آلمان و اتانول، کلروفرم، کلرید کلسیم بدون آب، اسید کلریدریک، مونوسدیم فسفات دو آب و دی سدیم فسفات هفت آب از شرکت مرک انگلیس خریداری شدند. لستین خالص سویا (خلوص بالای 95٪) از شرکت لیپوئید سوئیس تهیه شد و لستین تجاری از شرکت نان قدس رضوی به صورت هدیه دریافت گردید. برای تهیه کلیه محلول‌ها آب یون زدایی شده مورد استفاده قرار گرفت.

2-2- تولید نیوزوم و لیپوزوم

تولید نیوزوم‌ها بر مبنای روش هیدراسیون لایه نازک انجام شد [27]. به این منظور اسپن 60 و کلسترول به نسبت 7 به 3 به همراه کافئین درون یک بالن ته گرد ریخته شده و با افزودن کلروفرم حل شدند. جهت تسهیل هم خوردن 5 قطعه سنگ جوش به بالن اضافه شد. حذف کلروفرم و تشکیل لایه نازک به کمک تبخیرکننده دوار تحت خلاء و در دمای 50°C صورت گرفت. هم‌چنین برای حذف حداکثری حلال، لایه نازک تشکیل شده به مدت یک شب در آون 50°C قرار داده شد. به منظور هیدراسیون لایه نازک آب یون زدایی شده به بالن

صمغ‌های زانتان-لویبای خرنوب برای به دام اندازی نیوزوم بارگذاری شده با ترکیباتی نظیر ایبوپروفن و کالکئین به کار برده شده است [19].

در این پژوهش از روش الکترواسپری یا پاشش الکتروهیدرودینامیک¹ به منظور تشکیل ذرات هیدروژل بهره برده شد. اساس فرایند الکترواسپری بر مبنای اتمیزه کردن یک مایع توسط میدان الکتریکی است. در این روش محلول پلیمری مورد نظر به آرامی به داخل مجرای یک نازل رسانا که یکی از قطب‌های میدان به آن متصل شده پمپ می‌شود. دافعه الکترواستاتیکی زیادی که در داخل محلول پلیمری شکل می‌گیرد باعث رانش آن به سمت خروجی نازل شده و چگالی بار الکتریکی زیادی در سطح قطره حاصله به وجود می‌آید. چنان‌چه اختلاف پتانسیل الکتریکی میدان به اندازه کافی بالا باشد که بتواند بر کشش سطحی محلول غلبه نماید، قطره خروجی تحت تأثیر نیروی جاذبه قطب مخالف به شکل خاصی که اصطلاحاً مخروط تیلور نامیده می‌شود در می‌آید و جریان بسیار باریکی از محلول در مقیاس نانو یا میکرو از رأس آن به سمت قطب مخالف پرتاب می‌شود [20-22]. از آنجایی که قطب مخالف در محلول جمع‌آوری کننده حاوی عامل اتصال دهنده عرضی قرار دارد، جریان‌های محلول پلیمری به محض رسیدن به محلول جمع‌آوری کننده به سرعت و قبل از خروج ترکیبات مؤثره از آن‌ها به ذرات هیدروژل تبدیل شوند و به این ترتیب محتویات همراه آن‌ها در داخل شبکه نیمه جامد محبوس می‌شود [14، 23]. با کنترل بالایی که بر روی اندازه قطرات در روش الکترواسپری وجود دارد می‌توان به ذراتی با اندازه کوچک و توزیع یکنواخت دست یافت. این ویژگی عامل مهمی در فرایند ریزپوشانی محسوب شده به‌طوری که می‌توان با توجه به الگوی رهش مورد نظر برای هر ترکیب مؤثره تنظیمات لازم را انجام داد [20].

کافئین (1 و 3 و 7- تری متیل زانتین) یک آکالوئید طبیعی است که به علت توانایی تحریک سامانه عصبی مرکزی به تنهایی و یا همراه با سایر ترکیبات در ساختار بسیاری از داروهای تأخیر خواب و حفظ هوشیاری به کار می‌رود. تحقیقات نشان می‌دهد که مصرف مقادیر بالای کافئین به صورت یکجا اثرات جانبی سوئی بر سیستم عصبی و قلبی و عروقی دارد [24]. از طرف

1. Electrohydrodynamic spraying

از میکروسکوپ نوری (Labomed, USA) استفاده شد. همچنین قطر متوسط نیوزوم‌ها و لیپوزوم‌ها توسط دستگاه زتاسایز (Malvern Instruments Ltd., UK) بر اساس تفرق نور لیزر و بر مبنای رابطه (1) به دست آمد.

$$\overline{D}[1,0] = \frac{\sum n_i d_i}{\sum n_i} \quad (1)$$

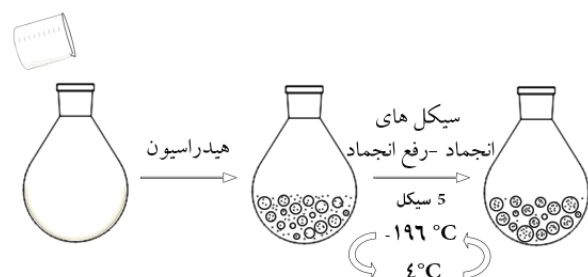
میانگین اندازه ذرات هیدروژل آلژینات کلسیم بر اساس متوسط قطر حجمی مطابق رابطه (2) تعیین گردید:

$$\overline{D}[4,3] = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3} \quad (2)$$

در معادلات فوق n_i تعداد ذرات با قطر متوسط d_i باشند.

2-5- تعیین راندمان درون پوشانی نیوزوم‌ها و لیپوزوم‌ها

به منظور ارزیابی راندمان درون پوشانی، وزن مشخصی از لیپوزوم‌ها و نیوزوم‌ها به آب مقطر اضافه شده و به منظور اطمینان از خروج کامل کافئین از آن‌ها به مدت 24 h در دمای محیط نگهداری شدند. غلظت کافئین بعد از رقیق سازی نمونه توسط اسپکتروفتومتر (CromTech Ct-5700, Taiwan) و بر اساس معادله خط $y = 0/0474 x + 9 \times 10^{-5}$ با ضریب رگرسیونی 0/9976 از منحنی استاندارد جذب غلظت‌های مشخص کافئین (2/5 تا 25 mg/Lit) در طول موج 273 nm به دست آمد. در رابطه مذکور x و y به ترتیب غلظت کافئین (mg/Lit) و میزان جذب نمونه می‌باشند.



شکل (1) طرح‌واره تولید لیپوزوم به روش هیدراسیون لایه نازک همراه با فرایند انجماد-رفع انجماد

محتوی آن اضافه و پس از تکان دادن‌های شدید اولیه ادامه هم زدن با انتقال به یک شیکر الکتریکی همراه با تکان‌های شدید در فواصل ده دقیقه‌ای انجام شد. برای کوچک‌تر و یکنواخت‌تر شدن نیوزوم‌ها، امواج فراصوت با فرکانس 20KHz و با 70% توان اسمی مولد (Bandeline HD3200, 100 W, Germany) از طریق پروب تیتانیومی به قطر 19 mm (Bandelin sonopuls MS 73, Germany) در دو بازه زمانی 2 min در دمای 4°C به نمونه‌ها اعمال شد.

تولید لیپوزوم‌ها نیز بر اساس روش هیدراسیون لایه نازک صورت پذیرفت [28]. از لستین در دو نوع تجاری و خالص به این منظور استفاده شد که به‌طور جداگانه به همراه کلسترول و کافئین در مقادیر مشخص به بالن ته گرد انتقال یافتند. برای حل کردن لستین تجاری از کلروفرم و برای لستین خالص از اتانول استفاده شد. به این ترتیب لیپوزوم‌های چندلایه تولید شدند. برای تک لایه‌ای نمودن لیپوزوم‌ها تیمار فراصوت در شرایط عملیاتی مشابه تولید نیوزوم‌ها و در چهار بازه زمانی دودقیقه‌ای در دمای 4°C به نمونه‌ها اعمال گردید. برای جداسازی لیپوزوم‌ها از سانتریفیوژ (Hermle Z23HK, Ger) با سرعت 38000 g در دمای 20°C به مدت یک ساعت استفاده شد.

2-3- انجماد-رفع انجماد لیپوزوم‌ها

پس از تولید لیپوزوم‌ها از لستین خالص به منظور ارزیابی فرایند انجماد و رفع انجماد بر بالا بردن کارایی ریزپوشانی، فرایند انجماد-رفع انجماد مطابق شکل (1) روی لیپوزوم‌های تک لایه و چندلایه اعمال شد. سوسپانسیون حاوی لیپوزوم ابتدا توسط نیتروژن مایع منجمد گردید و سپس در دمای 4°C رفع انجماد صورت پذیرفت. این فرایند 5 نوبت متوالی بر روی نمونه‌ها اعمال شد و سپس به منظور شکستن خوشه‌های احتمالی تشکیل شده به مدت 3 min در دمای محیط در حمام فراصوت (Elmasonic, ermanyG) با فرکانس 15 KHz قرار داده شدند.

2-4- سنجش اندازه ذرات

جهت تعیین اندازه و بررسی مورفولوژی ذرات هیدروژل

6-2- تولید هیدروژل‌های بارگذاری شده با نیوزوم‌ها و لیپوزوم‌ها

پس از تهیه نیوزوم‌ها و لیپوزوم‌های حامل کافئین، محلول‌های حاوی آن‌ها به‌طور جداگانه به محلول آلژینات سدیم اضافه شد. غلظت اولیه محلول آلژینات طوری انتخاب گردید که بعد از مخلوط با محلول‌های نیوزومی یا لیپوزومی غلظت نهایی آن به 3٪ برسد. مطابق پژوهش پیشین، این غلظت بالاترین غلظت مناسب به‌منظور الکترواسپری این نوع از آلژینات تعیین شده بود. هم‌چنین با در نظر گرفتن کارایی ریزپوشانی نیوزوم و لیپوزوم‌ها و محاسبه محتوای کافئین آن‌ها، مقادیر آن‌ها به گونه‌ای درون هیدروژل‌های پر شده لحاظ گردید که ذرات هیدروژل حاوی مقادیر یکسانی از کافئین باشند [29]. برای تهیه محلول آلژینات مقدار مناسبی از این پلی ساکارید به آب یونزدایی شده در دمای 40°C افزوده شد و یک شب همراه با هم‌خوردن ملایم در دمای 4°C نگهداری گردید تا به‌طور کامل آب‌گیری نماید. به‌منظور اختلاط دو محلول و پراکنده کردن نیوزوم‌ها و لیپوزوم‌ها از شیکر لوله به مدت یک دقیقه استفاده شد. برای الکترواسپری سوسپانسیون‌های نیوزومی و لیپوزومی و تولید ذرات هیدروژل بارگذاری شده با آن‌ها، دستگاه الکترورسی با اندکی تغییر در نحوه پاشش در بهترین شرایط عملیاتی که در مطالعات اولیه حاصل شده بود، مطابق شکل (2) به‌کار برده شد. شرایط عملیاتی مذکور عبارت بودند از: ولتاژ 8 Kv، فاصله نازل تا محلول گردآورنده 8cm (D)، ارتفاع سطح محلول آلژینات در مخزن تا خروجی

نازل 20cm (H) و قطر داخلی نازل پلاستیک 500 μm ظرف گردآورنده حاوی محلول 2٪ کلرید کلسیم بود.

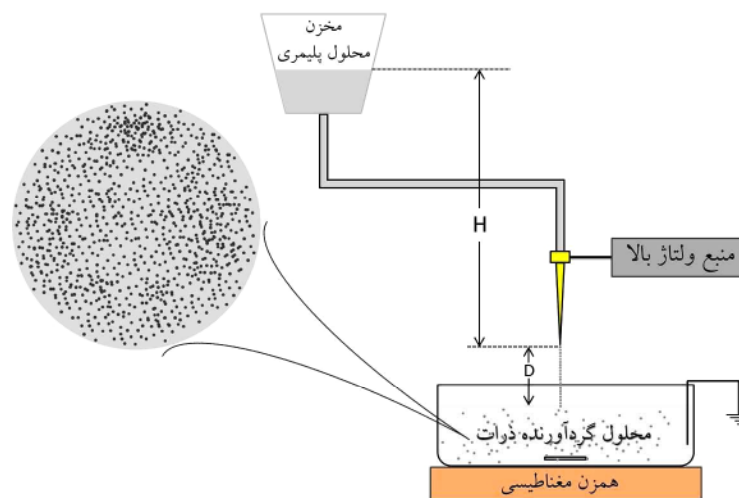
7-2- بررسی رهش کافئین از هیدروژل‌های بارگذاری شده
به‌منظور تعیین سرعت رهش کافئین از هیدروژل‌های بارگذاری شده، نمونه‌های مورد نظر در دمای 37°C به مدت 2 h در محلول اسید کلریدریک (pH = 1/2) و 6 h در محلول بافر فسفات (pH = 7/4) همراه با هم‌زدن (انکوباتور شیکر دار، سرعت 100rpm)، قرار گرفتند. سپس در فواصل معین 3 ml نمونه برداشته شد و پس از اندازه‌گیری جذب آن در طول موج 273 nm دوباره به محلول اصلی بازگردانده شد. درصد کافئین آزاد شده با تقسیم عدد جذب قرائت شده به عدد جذب حاصل از خروج کامل کافئین از ذرات محاسبه گردید.

8-2- کینتیک رهش کافئین

به‌منظور توصیف الگوی رهش کافئین از میکروهیدروژل‌ها آلژیناتی، مدل‌های ریاضی درجه صفر، درجه اول، هیگوچی و کورسمیر-پپاس به‌کار برده شدند و بر اساس میزان ضریب تعیین R^2 و مجموع مربعات تفاضل (SS) مورد ارزیابی قرار گرفتند. در مدل درجه صفر که مطابق رابطه (3) بیان می‌گردد:

$$Q_1 = Q_0 + K_0 t \quad (3)$$

Q_1 مقدار ماده آزاد شده در زمان t ، Q_0 مقدار اولیه ماده در



شکل (2) طرح ساده تولید میکروهیدروژل‌های بارگذاری شده با لیپوزوم یا نیوزوم به روش الکترواسپری

معنی‌دار 0/05 درصد انجام شد. برای مقایسه میانگین‌ها آزمون توکی ($P < 0/05$) به کار برده شد. محاسبات مربوط به کینتیک رهش کافئین با کمک نرم افزار متلب (a2014) صورت گرفت و نمودارهای مربوط به رهش توسط نرم افزار اکسل (2016) ترسیم شدند.

3- نتایج و بحث

3-1- اندازه ذرات

به نیوزوم‌ها و لیپوزوم‌هایی که بدون اعمال امواج فراصوت و تنها با تکان‌های شدید در مرحله هیدراسیون حاصل می‌شوند اصطلاحاً چندلایه گفته می‌شود که اغلب دارای توزیع اندازه غیریکنواختی هستند. با اعمال امواج فراصوت لیپوزوم‌های تک لایه ایجاد می‌شوند که اندازه کوچک‌تری داشته و توزیع آن‌ها یکنواخت‌تر می‌باشد [34]. این کاهش اندازه به حفره‌زایی صوتی نسبت داده می‌شود که با تشکیل و فروپاشی حباب‌های ریز هوا همراه است. نوسان دیواره این حباب‌ها در حین رشد و نیز فروهش آن‌ها، میدان‌های برشی و امواج مؤینگی ایجاد می‌کند که باعث کشیدگی طولی لیپوزوم‌های درشت اندازه و ایجاد ضمایم لوله مانند طولی در آن‌ها می‌شود. ساختارهای مذکور متعاقباً شکسته شده و به لیپوزوم‌های کوچک‌تر تقسیم می‌شوند [35]. چنان که در شکل (3) مشاهده می‌شود در حضور امواج فراصوت قطر نیوزوم‌ها به حدود 100 nm کاهش یافت، این در حالی است که مشاهدات میکروسکوپی نیوزوم‌های چندلایه با قطری حدود $10\text{ }\mu\text{m}$ را نشان دادند. افزون بر این منحنی توزیع اندازه آن‌ها نیز به صورت تک قله‌ای باریکی درآمد که گویای یکنواخت‌تر شدن گستره پراکنش اندازه ذرات می‌باشد. در تحقیقی مشابه، راکمانی و سانکار گزارش کردند که اعمال فراصوت نیوزوم‌های چندلایه توپین 80 با قطر اولیه 2 تا μm 3/5 را به نیوزوم‌های تک لایه‌ای با اندازه 801 nm تبدیل کرد. در شکل (4) منحنی‌های توزیع اندازه لیپوزوم‌های چندلایه و تک لایه نشان داده شده است که گویای توزیع نایک‌نواخت این نوع از لیپوزوم‌ها در سه مقدار مختلف می‌باشد. بیش‌ترین تجمع لیپوزوم‌ها در 342 nm و بعد از آن در 955 و 5560 nm ملاحظه گردید. همان‌گونه که ملاحظه می‌شود در اثر اعمال فراصوت علاوه بر کاهش قابل ملاحظه اندازه لیپوزوم‌ها به حدود

محلول پیرامونی (که عموماً برابر صفر در نظر گرفته می‌شود) و K_0 ثابت رهش درجه صفر می‌باشد. معادله درجه صفر سامانه‌هایی را توصیف می‌کند که رهش ماده مستقل از غلظت آن می‌باشد [30]. در این مدل فرض می‌شود که ساختار سامانه حامل متلاشی نشده و سطح انتشار دست نخورده باقی می‌ماند. در مدل درجه اول، سرعت رهش ماده از ذرات وابسته به غلظت آن می‌باشد و بر اساس معادله لگاریتمی رابطه (4) بیان می‌شود [31].

$$\log Q_t = \log Q_0 + \frac{K_1 t}{2.303} \quad (4)$$

مدل هیگوجی سرعت رهش ماده از یک شبکه نامحلول را بر مبنای انتشار فیک و به‌عنوان تابعی از ریشه دوم زمان رهش توصیف می‌کند [32]. مدل مذکور به‌صورت رابطه (5) بیان می‌شود که در آن K_H ثابت انتشار یا ثابت انحلال هیگوجی می‌باشد.

$$f_t = K_H t^n \quad (5)$$

مدل کورسمیر-پپاس مکانیسم رهش ماده را تلفیقی از انتشار ساده (قانون فیک) و انتقال نوع II (انتشار آب به داخل شبکه ماده حامل و تورم آن) در نظر می‌گیرد و به‌صورت رابطه (6) بیان می‌شود:

$$\frac{M_t}{M_\infty} = K t^n \quad (6)$$

در این عبارت M_t/M_∞ مقدار ماده آزاد شده در زمان t ، K ثابت سرعت رهش ماده که بیانگر ویژگی‌های شبکه ماکرومولکولی حامل، و توان انتشار n معرف مکانیسم رهش می‌باشد. برای رهش مبتنی بر انتشار فیک از شبکه حامل کروی شکل مقدار عددی آن 0/43، انتقال نوع II 0/85 و حالت تلفیقی $0/43 < n < 0/85$ می‌باشد. این مدل اغلب به‌منظور بررسی الگوی رهش از سیستم‌های پلیمری به کار برده می‌شود [33].

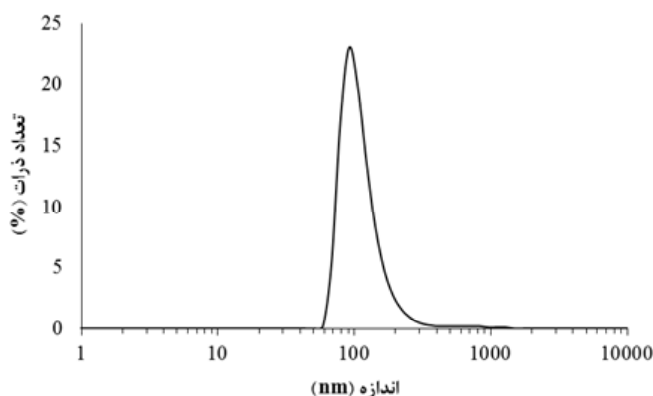
9-2- آنالیز آماری

به‌منظور بررسی تاثیر متغیرهای مختلف بر درون پوشانی و رهش کافئین آزمایشات در غالب طرح کاملاً تصادفی و آنالیز واریانس با استفاده از نرم افزار SPSS (نسخه 19) در سطح

حدود 38 nm، منحنی توزیع اندازه آن‌ها نیز از حالت چند قله‌ای و کاملاً پهن و گسترده به صورت باریک و کشیده‌ای درآمد که مؤید درجه بالای یکنواختی ذرات است.

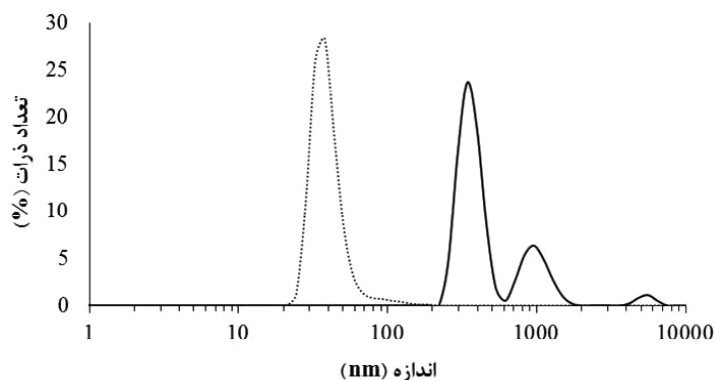
2-3- اثر انجماد-رفع انجماد بر اندازه ذرات

با اعمال فرایند انجماد-رفع انجماد به دلیل وقوع پدیده چنان که مشاهده می‌شود، اگر چه در حضور امواج فراصوت

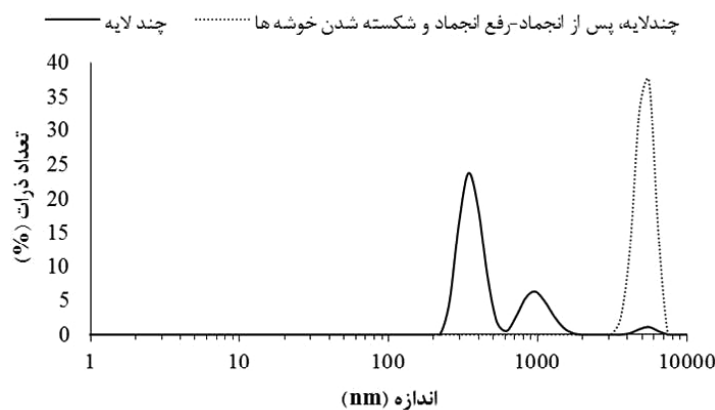


شکل (3) منحنی توزیع اندازه نیوزوم‌های تک لایه

تک لایه چند لایه —



شکل (4) منحنی توزیع اندازه لیپوزوم‌های چندلایه و تک لایه



شکل (5) توزیع اندازه لیپوزوم‌های چند لایه بعد از تولید و پس از اعمال انجماد-رفع انجماد و فراصوت

اتصالات بین لیپوزومی شکسته شد و منحنی توزیع اندازه تک قله و باریکی به دست آمد، اما آنچه مسلم است فرایند انجماد منجر به افزایش اندازه لیپوزوم‌ها به 5500 nm گردید.

3-3- اندازه ذرات هیدروژل بارگذاری شده از نیوزوم‌ها

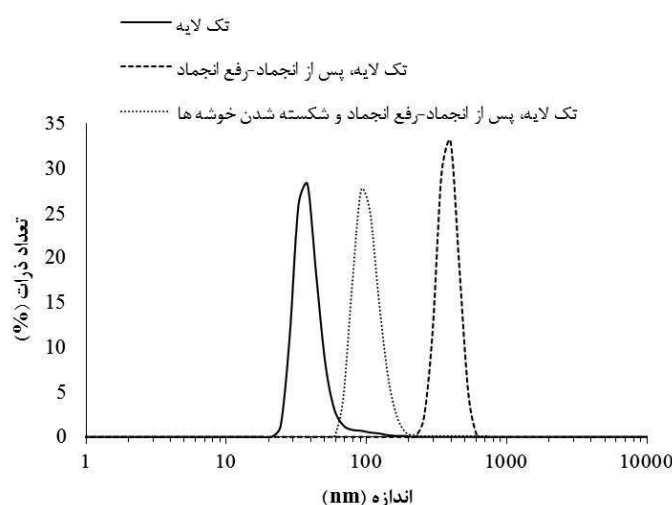
و لیپوزوم‌ها

استفاده از روش الکترواسپری برای بارگذاری لیپوزوم‌ها و نیوزوم‌ها در شبکه هیدروژلی آلژینات باعث شد که ذراتی با توزیع اندازه یکنواخت (عدد اسپن 0/898) و قطر متوسط $765/29 \mu\text{m}$ به دست آید. این در حالی است که در شرایط مشابه و بدون اعمال ولتاژ قطر ذرات به $2/7 \pm 1 \text{ mm}$ افزایش یافت (شکل‌های 7-الف و 7-ب). این نتایج مؤید کارایی بالای روش پاشش الکتریکی در تولید ذرات کوچک اندازه و با توزیع یکنواخت در مقایسه با سایر روش‌ها می‌باشد [39].

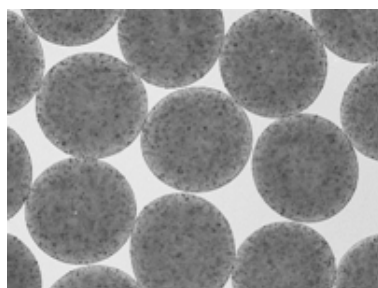
3-4- راندمان ریزپوشانی نیوزوم و لیپوزوم‌ها

راندمان درون پوشانی کافئین در ذرات نیوزومی 28/21% محاسبه گردید. در مقابل راندمان به دام اندازی توسط

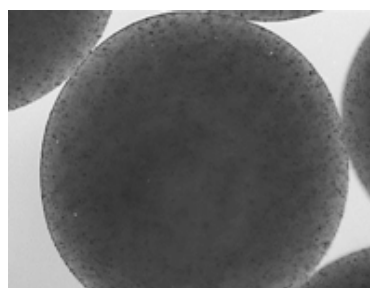
بررسی منحنی‌های توزیع اندازه لیپوزوم‌های تک لایه بلافاصله بعد از تولید، پس از انجماد-رفع انجماد و نیز بعد از صوت دهی (شکل 6) حاکی از این است که در اثر انجماد به علت نزدیک شدن لیپوزوم‌ها به یکدیگر و تماس آن‌ها با هم علاوه بر شکل‌گیری اتصالات ضعیف بین ذره‌ای که بعداً توسط امواج فراصوت شکسته شد، آمیختگی هم اتفاق افتاده است [37، 38]. تصور می‌شود با اجتماع لیپوزوم‌ها در کنار هم و پاره شدن غشای آن‌ها در اثر ایجاد بلورهای یخ در داخل و یا در فاز پیوسته بینابینی محتویات دو یا چند لیپوزوم با یکدیگر ادغام شده و سپس غشای پیرامون آن‌ها دوباره تشکیل می‌شود که نتیجه آن افزایش اندازه ذرات می‌باشد [38]. بعد از فرایند انجماد-رفع انجماد اندازه ذرات به 396 nm رسید که پس از قرار گرفتن در حمام فراصوت و شکسته شدن خوشه‌ها این



شکل (6) تغییرات منحنی توزیع اندازه لیپوزوم‌های تک لایه بعد از فرایند انجماد-رفع انجماد و پس از اعمال فراصوت



(ب)



(الف)

شکل (7) ذرات هیدروژل پرشده آلژینات کلسیم (الف) تولید شده بدون اعمال ولتاژ بالا (ب) با اعمال ولتاژ بالا (الکترواسپری)

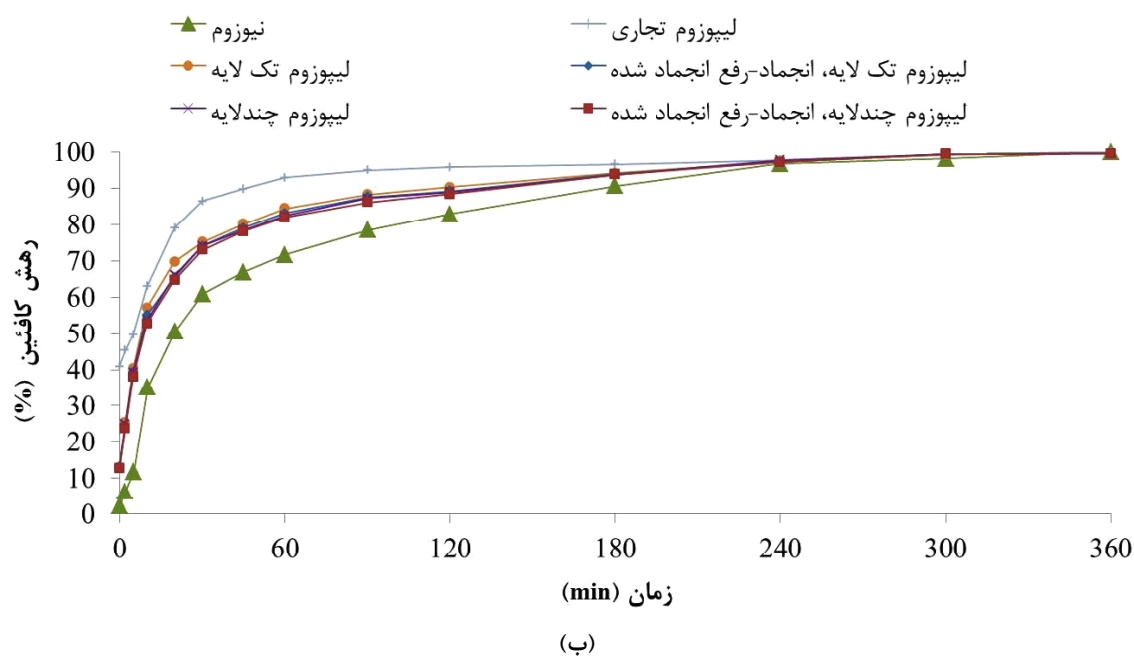
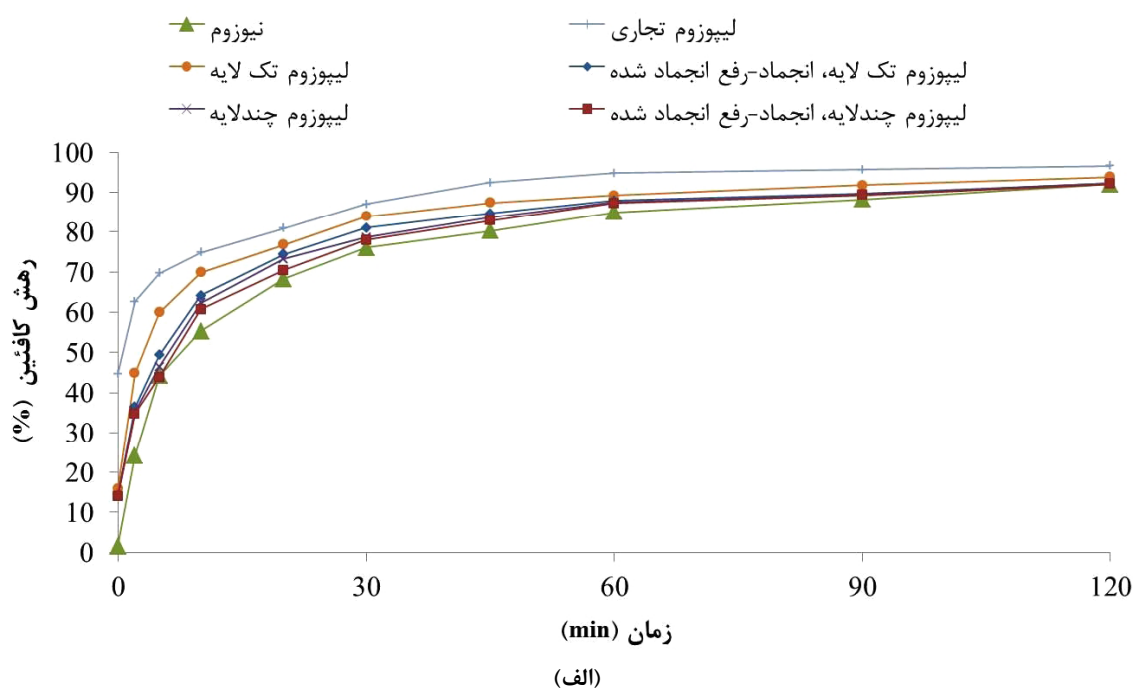
لیپوزوم‌های چند لایه حاصل از لستین تجاری بالغ بر 7/48% برآورد شد و در انواع تهیه شده با لستین خالص به 13/58% افزایش یافت، اما بعد از اعمال فراصوت و ایجاد لیپوزوم‌های تک لایه به 12/18% کاهش پیدا کرد که نشان دهنده تخریب و از دست رفتن محتویات آن‌ها در این شرایط می‌باشد. با این حال به‌طور کلی راندمان درون پوشانی لیپوزوم‌ها و نیوزوم‌ها برای ترکیبات آبدوست پایین است و عدد بالایی گزارش نشده است [19]. فام و همکاران نیوزوم و لیپوزوم محتوی کافئین با راندمان درون پوشانی 9/7% تولید نمودند. هم‌چنین ماریانکی و همکاران نیوزوم‌های بارگذاری شده با کافئین با استفاده از توئین 20 تهیه کردند و به راندمان درون پوشانی بسیار پایین 0/2% دست یافتند. شایان ذکر است که با اعمال چرخه‌های انجماد-رفع انجماد راندمان درون پوشانی برای لیپوزوم‌های چندلایه و تک لایه به‌ترتیب به 14/88 و 13/41% افزایش یافت. احتمال می‌رود علت این افزایش تخریب‌های موضعی ساختار لیپوزوم‌ها در اثر بلورهای یخ و امتزاج آن‌ها با یکدیگر باشد که افزایش حجم حفره داخلی و کاهش سطح را به دنبال دارد [38]. علاوه بر این در حین انجماد و به‌دلیل کاهش تدریجی آب آزاد کافئین تراوش یافته به فاز پیوسته تغلیظ شده و انتشار معکوس به داخل لیپوزوم‌ها اتفاق می‌افتد که در نتیجه مقدار آن در ذرات افزایش می‌یابد [37].

3-6- مدل‌سازی رهش کافئین از هیدروژل‌های بارگذاری شده

کینتیک رهش کافئین از میکروذرات آلژیناتی که با چهار مدل ریاضی درجه صفر، درجه اول، هیگچی و کورسمیر-پپاس برآورد گردید نشان داد که الگوی رهش از هیدروژل‌های پر شده با دو مدل کورسمیر-پپاس و سپس درجه اول برازش بهتری داشتند. مقادیر عددی ضرایب این مدل‌ها برای رهش کافئین در محیط‌های اسیدی و قلیایی در جدول (1) خلاصه شده‌اند. خاطر نشان می‌شود که در خصوص هیدروژل‌های بارگذاری شده با لیپوزوم‌های حاصل از لستین تجاری ضرایب رگرسیونی مناسبی به‌دست نیامد که گویای عدم قابلیت برازش داده‌های رهش این ذرات با مدل‌های ریاضی مورد نظر بود. با توجه به مقدار عددی n در مدل کورسمیر-پپاس که برای تمام سامانه‌های مورد بررسی کم‌تر از 0/43 می‌باشد (جدول 1) چنین به نظر می‌رسد که علی‌رغم تورم ذرات هیدروژل مکانیسم غالب آزاد شدن کافئین انتشار بر مبنای قانون فیک است. بر اساس این مدل اگر مقدار $0/43 \geq n$ باشد رهش از قانون فیک تبعیت می‌نماید و در صورتی که بین 0/43 تا 0/85 باشد مکانیسم انتشار ترکیبی از انتشار فیک و انتقال نوع II و اگر 0/85 باشد رهش به حالت انتقال نوع II می‌باشد [41].

3-5- رهش کافئین در شرایط اسیدی و بافر فسفات

بررسی منحنی‌های رهش نشان داد که ذرات هیدروژل به محض قرار گرفتن در محیط اسیدی به سرعت شروع به از دست دادن کافئین کردند (شکل 8) که عمدتاً به‌دلیل حلالیت بالای آن در حضور اسید و تراوایی کامل شبکه آلژیناتی به کاتیون هیدروژن می‌باشد. در بین هیدروژل‌های مورد مطالعه انواع بارگذاری شده با لیپوزوم‌های حاصل از لستین تجاری بیش‌ترین و با نیوزوم‌ها کم‌ترین نرخ رهش کافئین را داشتند. از طرف دیگر هیدروژل‌های حاوی لیپوزوم‌های چندلایه‌ای که تحت فرایند انجماد-رفع انجماد قرار گرفته بودند سرعت رهش کم‌تری در مقایسه با شبکه‌های دارای لیپوزوم‌های چندلایه اولیه و تک لایه از خود نشان دادند، که گویای تاثیر مثبت انجماد بر ابقای کافئین در ذرات می‌باشد. فادا و همکاران



شکل (8) الف) سرعت رشد کافئین از هیدروژل‌های بارگذاری شده با لیپوزوم‌ها و نیوزوم‌ها در حضور اسید کلریدریک طی 2 h در دمای 37°C . ب) سرعت رشد کافئین از هیدروژل‌های بارگذاری شده با لیپوزوم‌ها و نیوزوم‌ها در بافر فسفات طی 6 h در دمای 37°C .

جدول (۱) ضرایب مدل‌های درجه اول و کورسمر-تیلز برای رهش کافتین از هیدروژل‌های بارگذاری شده

کورسمر-تیلز									
درجه اول					هیدروژل بارگذاری شده				
اسید کلریدریک (pH=۱/۲)			بافر فسفات (pH=۷/۴)			اسید کلریدریک (pH=۱/۲)			n
K	RMSE	R ²	K	RMSE	R ²	K	RMSE	R ²	
۳۶/۵۱	۴/۴۶۳	۰/۹۶۰۱	۰/۱۵	۴۶/۶۸	۴/۵۳۹	۰/۹۶۶۰	۶/۴۶۳	۰/۰۶۴	۰/۹۳۱۰
۴۹/۲۷	۶/۳۳۲	۰/۷۸۹۵	۰/۱۱	۵۸/۶۲	۷/۷۸۲	۰/۴۸۴۱	۶/۸۳۲	۰/۱۱۷	۰/۷۳۵۵
۳۴/۷۵	۳/۹۳۴	۰/۹۶۶۶	۰/۱۹	۳۸/۷۴	۵/۲۹۳	۰/۹۶۶۳	۵/۴۳۳	۰/۰۵۷	۰/۹۲۸۶
۳۳/۴۷	۳/۴۲۳	۰/۹۶۶۰	۰/۲۱	۳۴/۹۰	۴/۷۳۳	۰/۹۷۰۰	۵/۸۴۱	۰/۰۵۳	۰/۹۲۹۲
۳۴/۴۶	۳/۳۲۹	۰/۹۶۶۵	۰/۲۰	۳۶/۶۸	۴/۵۹۱	۰/۹۶۶۸	۵/۱۱۲	۰/۰۵۶	۰/۹۲۸۹
۱۸/۴۶	۲/۶۷۳	۰/۹۶۶۱	۰/۲۴	۳۰/۰۱	۳/۹۲۸	۰/۹۸۳۲	۴/۹۵۳	۰/۰۵۸	۰/۹۳۴۷
لیپوزوم تک لایه					لیپوزوم حاصل از لستین تجاری				
۳۴/۷۵	۳/۹۳۴	۰/۹۶۶۶	۰/۱۹	۳۸/۷۴	۵/۲۹۳	۰/۹۶۶۳	۵/۴۳۳	۰/۰۵۷	۰/۹۲۸۶
۳۳/۴۷	۳/۴۲۳	۰/۹۶۶۰	۰/۲۱	۳۴/۹۰	۴/۷۳۳	۰/۹۷۰۰	۵/۸۴۱	۰/۰۵۳	۰/۹۲۹۲
۳۴/۴۶	۳/۳۲۹	۰/۹۶۶۵	۰/۲۰	۳۶/۶۸	۴/۵۹۱	۰/۹۶۶۸	۵/۱۱۲	۰/۰۵۶	۰/۹۲۸۹
۱۸/۴۶	۲/۶۷۳	۰/۹۶۶۱	۰/۲۴	۳۰/۰۱	۳/۹۲۸	۰/۹۸۳۲	۴/۹۵۳	۰/۰۵۸	۰/۹۳۴۷
لیپوزوم چند لایه همراه با انجماد-رفع انجماد					لیپوزوم چند لایه				
۳۴/۷۵	۳/۹۳۴	۰/۹۶۶۶	۰/۱۹	۳۸/۷۴	۵/۲۹۳	۰/۹۶۶۳	۵/۴۳۳	۰/۰۵۷	۰/۹۲۸۶
۳۳/۴۷	۳/۴۲۳	۰/۹۶۶۰	۰/۲۱	۳۴/۹۰	۴/۷۳۳	۰/۹۷۰۰	۵/۸۴۱	۰/۰۵۳	۰/۹۲۹۲
۳۴/۴۶	۳/۳۲۹	۰/۹۶۶۵	۰/۲۰	۳۶/۶۸	۴/۵۹۱	۰/۹۶۶۸	۵/۱۱۲	۰/۰۵۶	۰/۹۲۸۹
۱۸/۴۶	۲/۶۷۳	۰/۹۶۶۱	۰/۲۴	۳۰/۰۱	۳/۹۲۸	۰/۹۸۳۲	۴/۹۵۳	۰/۰۵۸	۰/۹۳۴۷

4- نتیجه گیری

مؤثر واقع شد و همچنین منجر به افزایش اندازه لیپوزوم‌ها گردید. بهترین نتایج رهش در هیدروژل‌های بارگذاری شده با نیوزوم‌ها ملاحظه گردید، درحالی که هیدروژل‌های حاوی لیپوزوم‌های تهیه شده با لستین تجاری ضعیف‌ترین نتایج را در خصوص از خود نشان دادند. از آن‌جا که ساختار لیپیدی نیوزوم و لیپوزوم در دستگاه گوارشی انسان آسیب پذیر می‌باشد، بارگذاری آن‌ها در شبکه‌های هیدروژلی با توجه به نقش حافظتی که پلیمر فراهم می‌کند قابلیت این دسته از گویچه‌ها را برای درون پوشانی و رسانش ترکیبات آب‌دوست و آب‌گریز با هدف رهش طولانی مدت مضاعف می‌نماید.

در این مطالعه قابلیت هیدروژل‌های بارگذاری شده با نیوزوم و لیپوزوم به‌منظور درون پوشانی کافئین به‌عنوان یک ترکیب آب‌دوست کوچک مولکول مورد بررسی قرار گرفت. به‌کارگیری روش الکترواسپری منجر به کاهش قابل توجه اندازه هیدروژل‌های حاصل نسبت به روش اکستروژن و بدون اعمال ولتاژ شد. نتایج نشان داد که لیپوزوم‌ها و نیوزوم‌های تک لایه که با اعمال امواج فراصوت حاصل شده بودند اندازه‌ای به مراتب کوچک‌تر از لیپوزوم‌های چندلایه داشته و دارای توزیع اندازه ذرات یکنواخت‌تری نیز بودند. تیمار انجماد-رفع انجماد تا حدود قابل ملاحظه‌ای در بالابردن راندمان درون پوشانی لیپوزوم‌ها

منابع

- [6] Dai, C., Wang, B., Zhao, H., Li, B., Wang, J. (2006). Preparation and characterization of liposomes-in-alginate (LIA) for protein delivery system. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.*, 47(2), 205–210.
- [7] Masalova, O., Kulikouskaya, V., Shutava, T., Agabekov, V. (2013). Alginate and Chitosan Gel Nanoparticles for Efficient Protein Entrapment. *Phys. Procedia.*, 40(0), 69–75.
- [8] Perez-Moral, N., Gonzalez, M. C., Parker, R. (2013). Preparation of iron-loaded alginate gel beads and their release characteristics under simulated gastrointestinal conditions. *Food Hydrocoll.*, 31(1), 114–120.
- [9] Stojanovic, R., Belscak-Cvitanovic, A., Manojlovic, V., Komes, D., Nedovic, V., Bugarski, B. (2012). Encapsulation of thyme (*Thymus serpyllum* L.) aqueous extract in calcium alginate beads. *J. Sci. Food Agric.*, 92(3), 685–696.
- [10] Lee, K. Y., Mooney, D. J. (2012). Alginate: Properties and biomedical applications. *Prog. Polym. Sci.*, 37(1), 106–126.
- [1] Tiwari, G., Tiwari, R., Sriwastawa, B., Bhati, L., Pandey, S., Pandey, P., & Bannerjee, S. K. (2012). Drug delivery systems: An updated review. *Int. J. Pharm. Investig.*, 2(1), 2–11.
- [2] Schaller, M., Korting, H. C. (1996). Interaction of liposomes with human skin: The role of the stratum corneum. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 18(3), 303–309.
- [3] Gulati, M., Grover, M., Singh, S., Singh, M. (1998). Lipophilic drug derivatives in liposomes. *Int. J. Pharm.*, 165(2), 129–168.
- [4] Kazi, K. M., Mandal, A. S., Biswas, N., Guha, A., Chatterjee, S., Behera, M. (2010). Niosome : A future of targeted drug delivery systems. *J. Adv. Pharm. Technol. Res.*, 1(4), 374–380.
- [5] Azmin, M. N., Florence, A. T., Handjani-Vila, R. M., Stuart, J. F., Vanlerberghe, G., Whittaker, J. S. (1985). The effect of non-ionic surfactant vesicle (niosome) entrapment on the absorption and distribution of methotrexate in mice. *J. Pharm. Pharmacol.*, 37(4), 237–242.

- [19] Marianecchi, C., Carafa, M., di Marzio, L., Rinaldi, F., di Meo, C., Alhaique, F., Coviello, T. (2011). A new vesicle-loaded hydrogel system suitable for topical applications: Preparation and characterization. *J. Pharm. Pharm. Sci.*, 14(3), 336–346.
- [20] Bock, N., Dargaville, T. R. R., Woodruff, M. a. A. (2012). Electrospraying of polymers with therapeutic molecules: State of the art. *Prog. Polym. Sci.*, 37(11), 1510–1551.
- [21] Jaworek, A., Sobczyk, A. T. (2008). Electro-spraying route to nanotechnology: An overview. *J. Electrostat.*, 66(4), 197–219.
- [22] Rayleigh, Lord. (1878). On the Instability of Jets. *Proc. London Math. Soc.*, 10, 4–13.
- [23] Park, H., Kim, P. H., Hwang, T., Kwon, O. J., Park, T. J., Choi, S. W., Kim, J. H. (2012). Fabrication of cross-linked alginate beads using electrospraying for adenovirus delivery. *Int. J. Pharm.*, 427(2), 417–425.
- [24] Lagarde, D., Batéjat, D., Sicard, B., Trocherie, S., Chassard, D., Enslin, M., Chauffard, F. (2000). Slow-release caffeine: a new response to the effects of a limited sleep deprivation. *Sleep.*, 23(5), 651–661.
- [25] Smith, A. P., Rusted, J. M., Savory, M., Eaton-Williams, P., Hall, S. R. (1991). The effects of caffeine, impulsivity and time of day on performance, mood and cardiovascular function. *J. Psychopharmacol.*, 5(2), 120–128.
- [26] Tan, D., Zhao, B., Mochhala, S., Yang, Y.-Y. (2006). Sustained-release of caffeine from a polymeric tablet matrix: An in vitro and pharmacokinetic study. *Mater. Sci. Eng. B.*, 132(1), 143–146.
- [27] Bagheri, A., Chu, B. S., Yaakob, H. (2014). Niosomal drug delivery systems: Formulation, preparation and applications. *World Appl. Sci. J.*, 32(8), 1671–1685.
- [28] Kavrakovski, Z., Popovska, O., Simonovska, J., [11] Mandal, S., Basu, S. K., Sa, B. (2009). Sustained Release of a Water-Soluble Drug from Alginate Matrix Tablets Prepared by Wet Granulation Method, 10(4), 1348–1356.
- [12] Al-Mayah, A. M. R. (2012). Simulation of enzyme catalysis in calcium alginate beads. *Enzyme Res.*, doi:10.1155/2012/459190.
- [13] Zhang, S., Shang, W., Yang, X., Zhang, S., Zhang, X., Chen, J. (2013). Immobilization of lipase using alginate hydrogel beads and enzymatic evaluation in hydrolysis of p-nitrophenol butyrate. *Bull. Korean Chem. Soc.*, 34(9), 2741–2746.
- [14] Suksamran, T., Opanasopit, P., Rojanarata, T., Ngawhirunpat, T., Ruktanonchai, U., Supaphol, P. (2009). Biodegradable alginate microparticles developed by electrohydrodynamic spraying techniques for oral delivery of protein. *J. Microencapsul.*, 26(7), 563–570.
- [15] Bojana, I., Verica, D., Viktor, N., Branko, B. (2013). Liposome-in-alginate systems for encapsulation of natural antioxidants. *In Insid. Symp.*, pp. 9–12.
- [16] Strasdat, B., Bunjes, H. (2013). Incorporation of lipid nanoparticles into calcium alginate beads and characterization of the encapsulated particles by differential scanning calorimetry. *Food Hydrocoll.*, 30(2), 567–575.
- [17] Pjanovic, R., Boskovic-Vragolovic, N., Veljkovic-Giga, J., Garic-Grulovic, R., Pejanovic, S., Bugarski, B. (2010). Diffusion of drugs from hydrogels and liposomes as drug carriers. *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, 85(5), 693–698.
- [18] Ditzio, V., Karlgard, C., Lilge, L., Khoury, A. E., Mittelman, M. W., Dicosmo, F. (1999). Localized drug delivery using crosslinked gelatin gels containing liposomes : Factors influencing liposome stability and drug release.

- [38] Agashe, H., Lagisetty, P., Awasthi, S., & Awasthi, V. (2010). Improved formulation of liposome-encapsulated hemoglobin with an anionic non-phospholipid. *Colloids Surfaces B Biointerfaces.*, 75(2), 573–583.
- [39] Mehregan Nikoo, A., Kadkhodae, R., Ghorani, B., Razzaq, H., Tucker, N. (2016). Controlling the morphology and material characteristics of electrospray generated calcium alginate microhydrogels. *J. Microencapsul.*, 1–28.
- [40] Fadda, A. M., Baroli, B. M., Maccioni, A. M., Sinico, C., Valenti, D., Alhaique, F. (1998). Phospholipid-detergent systems: Effects of polysorbates on the release of liposomal caffeine. *Farmaco.*, 53(10), 650–654.
- [41] Ram, H. N. A., Lachake, P., Kaushik, U., Shreedhara, C. S. (2010). Formulation and evaluation of floating tablets of liquorice extract. *Pharmacognosy Res.*, 2(5), 304–8.
- Kavrovski, Z., Rafajlovska, V. (2013). An Overview: Methods for Preparation and Characterization of Liposomes as Drug Delivery Systems. *Int. J. Pharm. Phytopharm. Res.*, 3(2), 13–20.
- [29] Mehregan Nikoo, A., Kadkhodae, R., Ghorani, B., Razzaq, H., Tucker, N. (2016). Controlling the morphology and material characteristics of electrospray generated calcium alginate microhydrogels. *J. Microencapsul.*, 2048, 1–28.
- [30] Hadjiioannou, T. P., Christian, G. D., Koupparis, M. A., Macheras, P. E. (1993). *Quantitative Calculations in Pharmaceutical Practice and Research*. VCH-Publishers.
- [31] Bourne, D. W. A. (2002). *Modern Pharmaceutics*. New York: Marcel Dekker.
- [32] Higuchi, T. (1963). Mechanism of Sustained- Action Medication. *J. Pharm. Sci.*, 52(12), 1145–1149.
- [33] Jose, S., Fangueiro, J. F., Smitha, J., Cinu, T. a., Chacko, a. J., Premaletha, K., Souto, E. B. (2013). Predictive modeling of insulin release profile from cross-linked chitosan microspheres. *Eur. J. Med. Chem.*, 60, 249–253.
- [34] J.S. Dua, Prof. A. C. Rana, D. a. K. B. (2012). Review article liposome: Methods of preparation and applications. *Int. J. Pharm. Stud. Res.*, 3(2), 7.
- [35] Woodbury, D. J., Richardson, E. S., Grigg, A. W., Welling, R. D., Knudson, B. H. (2006). Reducing liposome size with ultrasound: bimodal size distributions. *J. Liposome Res.*, 16(1), 57–80.
- [36] Supaporn, S. (2011). Effect of Freeze-Thawing Process on the Size and Lamellarity of PEG-Lipid Liposomes. *Open Colloid Sci. J.*, 4, 1–8.
- [37] Costa, A. P., Xu, X., Burgess, D. J. (2014). Freeze-Anneal-Thaw Cycling of Unilamellar Liposomes: Effect on Encapsulation Efficiency. *Pharm. Res.*, 31(1), 97–103.