



حامل‌های لیپیدی نانوساختار (NLC) حاوی ویتامین A پالمیتات؛ عوامل موثر بر اندازه ذرات، کارایی درون‌پوشانی و پایداری

اکرم پژشکی^۱، بابک قنبرزاده^{۲*}، حامد همیشه کار^۳، محمد مقدم^۴، مریم محمدی^۵

۱. دانشجوی دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
۲. دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
۳. دانشیار، مرکز تحقیقات دارویی پشمینه، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
۴. استاد، گروه اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
۵. دانش آموخته، گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

(تاریخ دریافت: ۹۳/۳/۲۱، تاریخ پذیرش: ۹۳/۴/۱۹)

چکیده

درون‌پوشانی ترکیبات غذا-دارو مانند ویتامین‌های محلول در چربی، توسط حامل‌های لیپیدی نانوساختار (NLC)، روشی مؤثر در افزایش پایداری آن‌ها در طی فرایند و نگهداری است. در این پژوهش، NLC حامل ویتامین A با استفاده از روش هوموژنیزاسیون گرم تولید و فرمولاسیون بهینه این نانوحامل‌های کلئیدی با تغییر شرایط مختلف از جمله نوع فاز لیپیدی جامد (کامپریتول ۸۸۸ATO، ستیل پالمیتات، پیرسروول AT05)، نوع فاز روغنی حامل (میگلیول ۸۱۲ و اکتیل اکتانیت)، نسبت لیپید جامد به روغن مایع و غلظت سورفاکtant مشخص شد. آزمون‌های تعیین اندازه ذرات، کارایی درون‌پوشانی، بررسی ریزساختار نانوحامل و پایداری درون‌پوشانی نانوحامل‌ها جهت تعیین خواص کاربردی نمونه‌ها انجام گرفت. نوع لیپید جامد و نسبت لیپید جامد به مایع اثر قابل ملاحظه‌ای در اندازه ذرات NLC داشت و غلظت سورفاکtant به جز در مقادیر بالا (۰/۸٪) تأثیر چشمگیری را نشان نداد. در حالی‌که، افزایش غلظت سورفاکtant موجب افزایش کارایی انکپسولاسیون و همچنین افزایش پایداری درون‌پوشانی گردید. فرمولاسیون حاوی ۰/۶٪ (w/v) پلوکسامر ۴۰۷ و نسبت ۱:۱۰ پیرسروول (فاز لیپیدی) به فاز روغنی اکتانیت حاوی ۳٪ ویتامین A پالمیتات، به عنوان فرمولاسیون بهینه با کمترین اندازه ذرات (۷۸ نانومتر با ضریب پراکنش ۰/۶۰۲) و با کارایی درون‌پوشانی ۹۸/۵٪ تعیین شد.

واژه‌های کلیدی: حامل‌های لیپیدی نانوساختار، اندازه ذرات، ویتامین A پالمیتات، درون‌پوشانی، پایداری.

* مسئول مکاتبات: Babakg1359@yahoo.com

۱- مقدمه

غلظت‌های بالا از ترکیبات زیست فعال در هر ذره و امکان تولید و استریلیزاسیون آن‌ها در مقیاس‌های بزرگ صنعتی برخوردار هستند [۹ و ۲]. در سال‌های اخیر، تحقیقات متعددی برای توسعه کاربرد NLC در غنی‌سازی مواد غذایی با ویتامین‌ها و ترکیبات غذا-دارو (نوتریسیتیکال) صورت گرفته است. در این زمینه می‌توان به تولید NLC حاوی بتاکاروتن بر پایه روغن اسکوالن و روغن هسته انگور [۱۰] با اندازه ذرات در مقیاس نانومتر (کمتر از ۱۰۰ نانومتر) و توزیع اندازه ذرات یکنواخت، درون‌پوشانی هیسپرتین در ساختارهای NLC با استفاده از کامپریتول (لیپید جامد)، اسید اولئیک و گلیسرول منو استئارات (روغن مایع) و توبیین ۸۰ [۱۱]. NLC حاوی لوئین بر پایه پیرسروول (لیپید جامد)، روغن مایع میوروول (پالمیتیک اسید منوگلیسریرید) و پلورونیک (به عنوان سورفاکtant) [۱۲]. NLC حاوی رتینوئیک اسید [۱۳] اشاره کرد. در پژوهشی نیز مولر و همکاران [۱۴] گزارش نمودند که NLC در درون‌پوشانی رتینوئیک اسید، به عنوان یک مانع فیزیکی میان رتینوئیدها و کاتالیست‌های اکسیداسیون عمل می‌کند و همچنین خاصیت پراکنش نور توسط آن‌ها موجب کاهش نفوذ نور به رتینوئیک اسید محصور شده می‌شود. یکی از متدائل‌ترین روش‌ها برای تولید و آماده‌سازی NLC، روش هموژنیزاسیون گرم با نیتروی برشی بالا است. در این روش ساختارهای نانوحامل را می‌توان از طریق ذوب نمودن چربی، سپس حل نمودن ترکیب زیست فعال در آن و در ادامه اعمال فرایند هموژنیزاسیون بر روی فاز لیپید ذوب شده در حضور عوامل فعال سطحی در ۵-۱۰ درجه سانتی‌گراد بالاتر از دمای ذوب لیپید، به دست آورد. این روش از مزایای بسیاری مانند آسانی فرایند، امکان تولید در مقیاس وسیع و صنعتی شدن، زیاد بودن میزان فاز لیپیدی در ساختار آن که به عنوان حامل ترکیبات فعال بوده و در نتیجه موجب کاراتر بودن درون‌پوشانی می‌شود، همچنین مدت زمان کم تولید در مقایسه با سایر روش‌ها، برخوردار است. علاوه بر این، مزیت اصلی روش هموژنیزاسیون نیتروی برشی بالا، توزیع یکنواخت نیترو در سیستم است که منجر به تولید ذرات کوچک با توزیع یکنواخت می‌شود و در نتیجه جهت ساخت ذرات زیر میکرون از لیپیدهای جامد، استفاده از این روش بسیار موثرتر

ویتامین A از جمله ویتامین‌های محلول در چربی است که با دارا بودن نقش‌های بیولوژیکی مهم در بدن انسان و متوسط نیاز روزانه ۹۰۰ میکروگرم، از اهمیت بهسزایی در سلامت بدن و کنترل بیماری‌ها برخوردار است. ویتامین A دارای حلالیت بسیار پایین در محیط‌های آبی بوده و شدیداً در حضور عوامل اکسید کننده، فلزات سنگین و ترکیبات تولید کننده رادیکال آزاد و همچنین نور ناپایدار است. درون‌پوشانی آن در نانوحامل‌های کلوئیدی، می‌تواند باعث افزایش حلالیت و پخش پذیری، کنترل رهایش در ماده غذایی و بدن و جلوگیری از بدطعمی و بد رنگی در مواد غذایی می‌شود [۲۱] و همچنین پایداری آن در مقابل عوامل محیطی (مانند اکسیداسیون و ایزومریزاسیون) در میزان چشم‌گیری افزایش و همچنین، دسترسی زیستی به میزان چشم‌گیری مواد مایع، می‌باید [۳ و ۴]. نانودرون‌پوشانی، فناوری قراردهی مواد مایع، جامد و گازی شکل درون کپسول‌های کوچک در مقیاس نانومتری است که در ادامه این کپسول‌ها محتويات درون خود را با آهنگی کنترل شده طی بازه‌های زمانی طولانی مدت، در مناطق هدف رها می‌کنند [۱]. نانوحامل‌های مورد استفاده در صنایع غذایی و دارویی به دو دسته نانوکپسول‌های بیوپلیمری و نانوکپسول‌های لیپیدی تقسیم‌بندی می‌شوند. به علت محدودیت صنعتی شدن نانوکپسول‌های بیوپلیمری، استفاده از نانوحامل‌های لیپیدی که امکان تولید در مقیاس صنعتی دارند و نیز دارای کارایی درون‌پوشانی بالا و زهرآگینی پایین هستند، متدائل‌تر است [۵]. نانوحامل‌های بر پایه لیپید در صنایع غذایی شامل نانومولسیون، نانولیپوزوم، نانونیوزوم، نانوفیتوزوم، نانوذرات لیپیدی (نانوذرات لیپیدی جامد SLN)¹ و حامل‌های لیپیدی نانوساختار (NLC)² هستند [۶ و ۷]. در مقایسه با نانومولسیون‌ها و نانولیپوزوم‌ها، حامل‌های لیپیدی نانوساختار به طور بالقوه، از مزایای منحصر به فرد و ویژه‌ای برای درون‌پوشانی ترکیبات چربی دوست از جمله بازده و کارایی بالاتر در درون‌پوشانی؛ پایداری بالاتر در برابر تفکیک گرانشی؛ سرعت رهایش پایین‌تر [۸]، عدم استفاده از حلال‌های آلی در تهیه‌ی آن‌ها و زهرآگینی جزئی؛ وجود

1. Solid Lipid Nanoparticle

2. Nano Lipid Carrier

روغن مایع حاوی ویتامین A پالمیتات تولید و در ادامه در زیر هوموژنیزاتور نیروی برشی قوی (۲۰۰۰ rpm) به قطرات ریز (در مقیاس نانو) تبدیل شد. به علت استفاده از دمای بالا در تهیه فرمولاسیون، لیپید جامد به صورت امولسیون قطرات لیپیدی محصور شده با لایه سورفاکtant در محیط آبی تولید شده و سپس با خنک شدن سیستم در دمای اتاق، نانوقطره‌های حاوی لیپید جامد و روغن مایع به شکل کریستال‌های نامنظم لیپیدی متبلور گشته و NLC تولید شد. با توجه به قرارگیری لایه سورفاکtant در اطراف هریک از نانوقطرات لیپیدی و ایجاد ممانعت فضایی بین دو قطره، پس از خنک شدن و تشکیل کریستال، حاملهای لیپیدی نانوساختار پایدار به صورت دیسپرس شده در محیط آبی تولید شد.

در این تحقیق به منظور یافتن فرمولاسیونی مناسب با اندازه ذرات در مقیاس نانومتری، از انواع فاز روغنی با نسبت‌های متفاوت لیپید جامد به روغن مایع و غلظت‌های مختلف سورفاکtant فاز آبی برای ساخت NLC حاوی ویتامین A پالمیتات استفاده شد. رسیدن به فرمولاسیون بهینه با تغییر شرایط مختلف از جمله غلظت سورفاکtant آبی، نوع فاز لیپیدی جامد، فاز روغنی حامل و نسبت لیپید جامد به روغن مایع حامل انجام شد. در جدول ۱ فرمولاسیون‌های مختلف حاملهای لیپیدی نانوساختار حاوی ویتامین A پالمیتات نشان داده شده است.

۳-۲- تعیین اندازه و توزیع اندازه ذرات

توزیع اندازه‌ی ذرات و قطر متوسط آن‌ها در دستگاه سنجش اندازه ذرات (با محدوده اندازه ذرات ۵۰ نانومتر تا ۵۰ میکرومتر) اندازه ذرات (با محدوده اندازه ذرات ۵۰ نانومتر تا ۵۰ میکرومتر) SHIMADZO مدل SALD 2101 (روش SLS) اندازه‌گیری روش پراش استاتیک پرتو لیزر (روش SLS) اندازه‌گیری شدند. متوسط اندازه ذرات بر اساس میانگین قطر حجمی توسط معادله (۱) محاسبه شد و کلیه نمونه‌ها در سه تکرار اندازه‌گیری شدند.

میانگین قطر حجمی (میانگین حجم معادل) یا DeBroukere mean:

$$\bar{D}_{[\xi, \tau]} = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3} \quad (1)$$

n_i : تعداد ذرات

d_i : قطر میانگین ذرات

از استفاده از اولتراتوراکس^۱ و اولتراسوند است که در استفاده از آن روش‌ها، توزیع غیر یکنواخت نیرو اتفاق می‌افتد [۱۵]. در پژوهشی هنتزچل [۱۶] گزارش کرد NLC حاوی بتاکاروتون (درون‌پوشانی شده در روغن حامل آلفا توکوفرول و تولید شده با استفاده از روش هوموژنیزاسیون داغ) دارای اندازه‌های ۸۵ نانومتری بوده و به مدت ۲۰ روز در دمای اتاق پایدار بودند. با توجه به مطالعات انجام شده، NLC پتانسیل خوبی برای غنی سازی مواد غذایی با ترکیبات زیست فعال آب‌گریز دارد. هدف از این پژوهش، آماده سازی NLC حاوی ویتامین A پالمیتات با استفاده از روش هوموژنیزاسیون گرم با نیروی برشی بالا و بررسی عوامل موثر بر اندازه ذرات، کارایی درون‌پوشانی و قابلیت حفاظت‌کنندگی آن‌ها از ویتامین A پالمیتات است.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

ویتامین A پالمیتات، اکتیل اکتانیت و پلوكسامر ۴۰۷ (سیگما، آلمان)، پرسیرون ATO5 (گلیسرول دی استئارات و تری استئارین و تری پالمیتین)، کامپریتول ATO888 (گلیسرول دی بهینات) Gattefossé، فرانسه، میگلیول ۸۱۲ (کاپریلیک/کاپریک اسید) Sasol، آلمان) و سایر مواد شیمیایی از شرکت مواد شیمیایی مرک (مرک، آلمان) تهیه شدند.

۲-۲- روش‌های تولید و آماده‌سازی

تهیه NLC‌های حاوی ویتامین A پالمیتات به روش هوموژنیزاسیون گرم با نیروی برشی بالا صورت پذیرفت [۱۷] (شکل ۱). ابتدا فاز روغنی (شامل لیپید جامد، روغن مایع و ویتامین A پالمیتات) در مقادیر وزنی مشخص شده در حمام آبی تا ۵ درجه بالاتر از نقطه ذوب چربی (دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد) حرارت داده شدند. سپس محلول سورفاکtant فاز آبی (پلوكسامر ۴۰۷) با دمای ۸۰ درجه سانتی‌گراد، به صورت قطره قطره به داخل فاز روغنی حاوی ویتامین A پالمیتات تحت دمای ۸۰ درجه و در زیر هوموژنیزاتور با نیروی برشی بالا (Hiedolph، ساخت آلمان) اضافه گردید. در این مرحله ابتدا امولسیون روغن در آب متشکل از قطرات درشت لیپید جامد

پس از تولید با محاسبه سطح زیرمنحنی پیک‌های حاصله از کروماتوگرافی مایع با عملکرد بالا^۱ (مدل HPLC) (Kenau ساخت آلمان) صورت پذیرفت. جهت رسم منحنی استاندارد کالیبراسیون غلظت‌های ۰/۵، ۰/۲، ۰/۱ میکرولیتر از ویتامین A پالمیتات در هر میلی لیتر فاز متحرک به دستگاه با شرایط ستون C18 (5µm، 250 mm×4.6mm)؛ سرعت جريان: ۲ ml/min طول موج: ۳۲۵nm؛ تزریق و سطح زیر منحنی محاسبه گردید. سطح زیر منحنی حاصل از پیک نمونه، در معادله به دست آمده از منحنی استاندارد گذاشته شد و غلظت ویتامین کیپسوله شده تعیین شد. بعد از روی معادله کارایی درون پوشانی (معادله^۳) درصد ویتامین درون پوشانی شده در نانوحامل‌های تولید شده بر پایه پیرسروول ATO5 (فاز لیپیدی جامد)، اکتیل اکتانیت حاوی ۳٪ ویتامین A پالمیتات (فاز روغنی مایع) با نسبت ۱:۱۰ و حاوی غلظت‌های مختلف سورفاکtant فاز آبی (w/v ۶٪ و ۴٪) به دست آمد [۱۰].

$$(3) \frac{\text{مقدار ویتامین کیپسوله شده}}{\text{مقدار کل ویتامین A اضافه شده}} = \frac{100}{\text{کارایی درون پوشانی}}$$

۶-۶- پایداری درون پوشانی

پایداری حامل‌های لیپیدی نانوساختار تولید شده با اندازه‌گیری میزان باقی مانده ویتامین بارگذاری شده در داخل NLC طی مدت دو ماه انجام شد. این آزمون در نانو حامل‌های بر پایه پیرسروول ATO5 (فاز لیپیدی جامد) و اکتیل اکتانیت حاوی ۳٪ ویتامین A پالمیتات (فاز روغنی مایع) با نسبت ۱:۱۰ و حاوی غلظت‌های مختلف سورفاکtant فاز آبی (w/v ۶٪ و ۴٪) در بازه‌های زمانی ۱، ۱۵، ۳۰ و ۶۰ روز پس از تولید) و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد با محاسبه سطح زیرمنحنی پیک‌های به دست آمده از HPLC صورت پذیرفت و میزان پایداری با استفاده از معادله ۴ محاسبه گردید [۲۱].

(4)

$$(4) \frac{\text{مقدار ویتامین A حفظ شده در طی نگهداری}}{\text{میزان پایداری}} = \frac{100}{\text{میزان پوشانی شده اولیه}}$$

$$(2) \text{Span} = \frac{D(90\%) - D(10\%)}{D(50\%)}$$

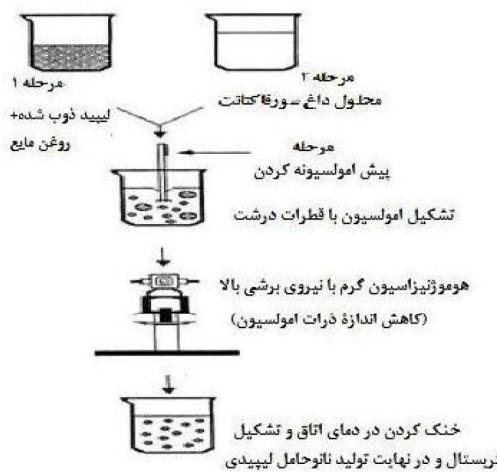
- (۹۰٪) D: قطری که حجم ذرات کوچک‌تر از آن، ۹۰٪ حجم کل ذرات موجود در سیستم را تشکیل می‌دهد.
- (۵۰٪) D: قطری که حجم ذرات کوچک‌تر از آن، ۵۰٪ حجم کل ذرات موجود در سیستم را تشکیل می‌دهد (قطر میانه).
- (۱۰٪) D: قطری که حجم ذرات کوچک‌تر از آن، ۱۰٪ حجم کل ذرات موجود در سیستم را تشکیل می‌دهد.

۴-۴- میکروسکوپی الکترونی عبوری (TEM)^۱

به منظور بررسی ریزساختار نانو ذرات لیپیدی و تأیید اندازه در مقیاس نانو (کوچک‌تر از ۱۰۰ نانومتر) از دستگاه میکروسکوپ الکترونی عبوری (Zeiss 100 KV) مدل Leo 906 استفاده شد. در ابتدا یک قطره از نمونه نانودیسپرسیون بهینه بر روی گردید فیلم کربنی قرار داده شده و پس از خشک شدن آن در دمای آزمایشگاه با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی عبوری تصویربرداری شد [۲۰].

۵-۲- کارایی درون پوشانی

به منظور استخراج ویتامین A پالمیتات از محلول NLC جهت بررسی کارایی درون پوشانی ویتامین، ابتدا نمونه‌ها تحت سانتریفوژ ملایم (rpm ۶۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه) قرار گرفتند. این عمل باعث می‌شود ویتامین آزاد با توجه به ماهیت لیپوفیل خود به بالای محلول بیاید. قسمت روشنایر با توجه به این که احتمال وجود ویتامین آزاد در آن بالا است دور ریخته شده و به یک میلی‌لیتر از محلول NLC حاوی ویتامین کیپسوله شده (برداشته شده از قسمت میانی فالکون)، ۰/۵ میلی‌لیتر کلروفرم اضافه و به مدت ۱۵ دقیقه جهت تخریب نانوحامل هم‌زده شد. بعد با سرعت ۱۰۰۰۰ rpm سانتریفوژ شد. در ادامه فاز کلروفرمی حاوی ویتامین کیپسوله شده جداسازی و تحت گاز ازت خشک گردید. در انتهای ۰/۵ میلی‌لیتر فاز متحرک حاوی متانول-استونیتریل با نسبت ۷:۰ آن اضافه گردید و بررسی راندمان درون پوشانی سیستم‌های NLC یک روز



شکل (۱) تولید NLC به روش هموزنیزاسیون گرم با نیروی برشی بالا

جدول (۱) فرمولاسیون‌های مختلف حامل‌های لیپیدی نانوساختار حاوی ویتامین A پالمیتات

متغیر	فرمولاسیون حامل‌های لیپیدی نانوساختار	فرمولاسیون ۱
ATO888	چربی جامد: کامپریتول ۲ gr + کامپریتول ۳ gr+ پلوکسامر ۰/۳ gr+ اکتیل اکتانیت ۰ gr	فرمولاسیون ۱
AT05	چربی جامد: پیرسروول ۳ gr + پلوکسامر ۰/۳ gr+ اکتیل اکتانیت ۰ gr	فرمولاسیون ۲
	چربی جامد: ستیل پالمیتات ۳ gr + پلوکسامر ۰/۳ gr+ اکتیل اکتانیت ۰ gr	فرمولاسیون ۳
۸۱۲ روغن مایع (oil): میگلیول ۸۱۲	۸۱۲ روغن مایع (oil): میگلیول ۸۱۲ gr + پلوکسامر ۰/۳ gr+ اکتیل اکتانیت ۰ gr	فرمولاسیون ۴
۸۱۲ روغن مایع (oil): میگلیول ۸۱۲	۸۱۲ روغن مایع (oil): میگلیول ۸۱۲ gr + پلوکسامر ۰/۳ gr+ اکتیل اکتانیت ۰ gr	فرمولاسیون ۵
روغن مایع (oil): اکتیل اکتانیت	۸۱۲ روغن مایع (oil): اکتیل اکتانیت ۰/۳ gr + پلوکسامر ۰/۳ gr+ اکتیل اکتانیت ۰ gr	فرمولاسیون ۶
٪۲ غلاظت سورفاکتانت (W/V)	٪۲ غلاظت سورفاکتانت (W/V) ۳ پیرسروول gr + پلوکسامر ۰/۳ gr+ اکتیل اکتانیت ۰ gr	فرمولاسیون ۷
٪۴ غلاظت سورفاکتانت (W/V)	٪۴ غلاظت سورفاکتانت (W/V) ۳ پیرسروول gr + پلوکسامر ۰/۳ gr+ اکتیل اکتانیت ۰ gr	فرمولاسیون ۸
٪۶ غلاظت سورفاکتانت (W/V)	٪۶ غلاظت سورفاکتانت (W/V) ۳ پیرسروول gr + پلوکسامر ۰/۳ gr+ اکتیل اکتانیت ۰ gr	فرمولاسیون ۹
٪۸ غلاظت سورفاکتانت (W/V)	٪۸ غلاظت سورفاکتانت (W/V) ۳ پیرسروول gr + پلوکسامر ۰/۳ gr+ اکتیل اکتانیت ۰ gr	فرمولاسیون ۱۰
نسبت چربی جامد / روغن مایع: ۲	نسبت چربی جامد / روغن مایع: ۲ ۳ پیرسروول gr + پلوکسامر ۰/۵ gr+ اکتیل اکتانیت ۰ gr	فرمولاسیون ۱۱
نسبت چربی جامد / روغن مایع: ۴	نسبت چربی جامد / روغن مایع: ۴ ۳ پیرسروول gr + پلوکسامر ۰/۷۵ gr+ اکتیل اکتانیت ۰ gr	فرمولاسیون ۱۲
نسبت چربی جامد / روغن مایع: ۶	نسبت چربی جامد / روغن مایع: ۶ ۳ پیرسروول gr + پلوکسامر ۰/۴۵ gr+ اکتیل اکتانیت ۰ gr	فرمولاسیون ۱۳
نسبت چربی جامد / روغن مایع: ۱۰	نسبت چربی جامد / روغن مایع: ۱۰ ۳ پیرسروول gr + پلوکسامر ۰/۰۵ gr+ اکتیل اکتانیت ۰ gr	فرمولاسیون ۱۴

۳- نتایج و بحث

۷-۲- تجزیه و تحلیل آماری

آزمون‌ها در سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی ۱-۳- اندازه و توزیع اندازه ذرات

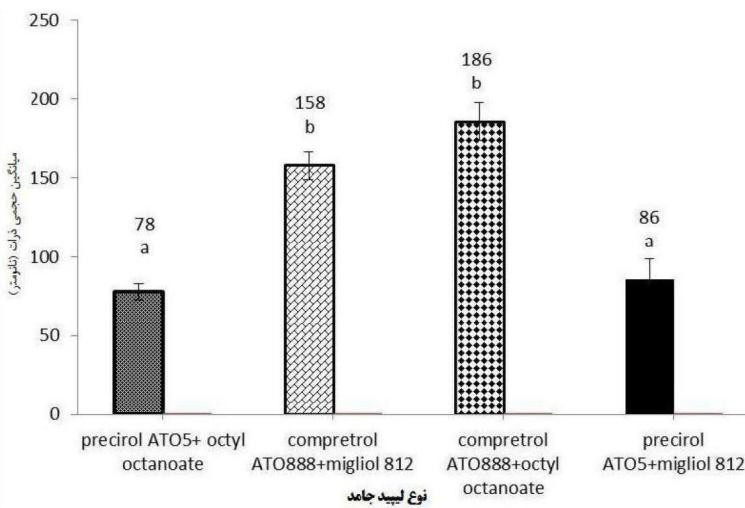
انجام شدند. تحلیل و ارزیابی (ANOVA) با اندازه ذرات و توزیع اندازه ذرات (تک پخش یا چند پخشی بودن) استفاده از مدل خطی (G.L.M) نرم افزار آماری SPSS (version 16.0 for Windows, SPSS Inc) در اهمیت ویژه‌ای در تعیین خصوصیات آن‌ها دارد. اندازه ذرات سطح احتمال $.۵\%$ ($P<0.05$) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن کوچک‌تر منجر به بروجود آمدن سطح تماس بیشتر و در نتیجه برای تأیید وجود اختلاف بین میانگین‌ها انجام گرفت. کارایی زیستی، شفافیت و حلایت بالاتر می‌شود. سیستم‌های

مطلوبی در یکنواختی توزیع و اندازه‌ذرات سیستم تولیدی نداشت، بنابراین از مقدار کمتر (۲ گرم) در فرمولاسیون‌ها استفاده شد. نقش اصلی لیپید جامد در تولید نانوذرات لیپیدی به روش هوموزیزاسیون گرم، در درجه اول افزایش پایداری فیزیکی نانوذرات لیپیدی است [۲۳]. ترکیب لیپید مورد استفاده، نوع کریستال به وجود آمده را مشخص می‌کند و در نتیجه می‌تواند بر پایداری نانوحامل تولیدی و خصوصیات رهایش ماده فعال به دام افتاده در ساختار آن موثر باشد. از گل瑟یریدها معمولاً به عنوان لیپید حامل استفاده می‌شود. این چربی‌ها تحت سرمایش ساختارهای چندشکلی مختلف (کریستال‌های α و β) را نشان می‌دهند.

از میان لیپیدهای مورد استفاده، پیرسروول AT05 به عنوان لیپید مناسب شناخته شد که به صورت مخلوطی از تری استئارین و تری پالمیتین و دی استئارین است. این ترکیب با چربی دوستی بالا در ساختار ماتریکس لیپیدی خود دارای فضاهای خالی زیادی است و می‌تواند ترکیب فعال را در خود جای دهد. در ارتباط با استفاده از کامپریتول ATO888، افزایش غلظت لیپید به دلیل بیشتر شدن برهم‌کنش بین ذرات، موجب افزایش ویسکوزیته و جامد شدن سیستم می‌شود، بنابراین از مقدار کمتر لیپید کامپریتول ATO888 ۲ گرم در فرمولاسیون‌ها استفاده شد. ستیل پالمیتات یک لیپید جامد هموزن است که از طریق استریفیکاسیون کاتالیز شده الكل چرب (ستیل الكل) و اسیدهای چرب (اسید پالمیتیک) حاصل می‌شود [۲۴]. لیپیدهای هموزن (مانند اسیدهای چرب میریستیک، استئاریک، پالمیتیک و ستیل پالمیتات) یا تری گل瑟یریدهای حاوی اسیدهای چرب یکسان معمولاً مستعد تشکیل کریستال‌های کامل به فرم β و صفحه‌ای شکل هستند. این ویژگی می‌تواند منجر ایجاد اندازه بزرگ‌تر ذرات و رانش ماده فعال از ساختار نانوحامل شود و در نتیجه تجمع کریستال‌ها و ناپایدار شدن سیستم در حین فرایند سرمایش شود. هم‌چنین این نوع کریستال‌ها به اکسیداسیون مستعدتر هستند. استفاده از لیپیدهای ناهمگون مانند پیرسروول با توجه به اینکه دارای کریستال‌های α بیشتری در ساختار خود هستند، مطلوب‌تر بوده و باعث تشکیل ذرات کروی بیشتری از نانوحامل می‌شوند [۱۷]. مهم‌ترین مشکل در ارتباط با

کلولیدی بایستی توزیع اندازه ذرات باریک در گستره زیر یک میکرون داشته باشد. باریک بودن توزیع اندازه ذرات، گرادیان غلظت ماده فعال با محیط را به حداقل می‌رساند و در نتیجه از رخ دادن فرایند رسیدگی استوالد (انتقال جرم از ذرات کوچک به ذرات بزرگ‌تر) جلوگیری می‌شود [۲۲]. هم‌چنین ثابت ماندن دو پارامتر اندازه و توزیع اندازه ذرات در طول یک دوره زمانی طولانی، نشان دهنده پایداری آن سیستم است. وقتی ترکیبات، روش و پارامترهای فرایند (زمان، دما، فشار، نوع تجهیزات و ...) به منظور بهینه کردن شرایط تولید تغییر می‌کنند، اندازه ذرات نیز تغییر می‌کند. از فاکتورهای موثر بر متوسط اندازه ذرات می‌توان به ماهیت نانوحامل، ماهیت ماده زیست فعال، فرایند فرمولاسیون، روش تولید و نسبت حامل به ماده فعال و شرایط محیطی مانند دما اشاره کرد [۱۰ و ۲۱]. در این تحقیق تأثیر عوامل مختلف (نوع لیپید، نسبت لیپید جامد به روغن مایع و غلظت سورفاکtant فاز آبی) بر اندازه و توزیع اندازه ذرات حامل‌های لیپیدی نانوساختار بحث شده است.

تأثیر نوع لیپید: از انواع لیپیدهای جامد (کامپریتول ATO888، ستیل پالمیتات، پیرسروول AT05) و فاز روغنی حامل ویتامین A پالمیتات (اکتیل اکتانیت) در تولید حامل‌های لیپیدی نانوساختار استفاده شد (جدول ۱). با استفاده از ستیل پالمیتات به عنوان لیپید جامد در هر دو فاز روغنی میگلیول ۸۱۲ و اکتیل اکتانیت، به علت تشکیل کریستال‌های منظم و فشرده بتا بلافلاله پس از خنک شدن (تا دمای اتاق) و کریستالیزاسیون، شاهد به هم پیوستن ذرات بلوری شده و ژله‌ای شدن در فرمولاسیون بودیم که منجر به ایجاد بافتی ویسکوز و سفت در همه سیستم شد. در ادامه پس از یک ساعت، کل فرمولاسیون سفت و یکپارچه شد که نشانگر تجمع ذرات بود. بنابراین در ادامه مراحل آزمایش این لیپید جامد کنار گذاشته شد و بقیه مراحل با دو لیپید دیگر انجام شد. با استفاده از کامپریتول ATO888 و پیرسروول AT05 به عنوان لیپید جامد در هر دو فاز روغنی میگلیول ۸۱۲ و اکتیل اکتانیت، بین اندازه ذرات NLC دو نوع لیپید متفاوت، اختلاف معنی‌داری مشاهده شد و استفاده از پیرسروول AT05 به عنوان لیپید جامد منجر به تولید اندازه ذرات کوچک‌تر با توزیع یکنواخت و باریک شد (شکل ۲). استفاده از مقادیر بالای کامپریتول ATO888 (۳ گرم) نسبت به نمونه حاوی لیپید جامد پیرسروول با همان مقدار، نتیجه



شکل(۲) اثر نوع حامل لیپیدی جامد مورداستفاده بر اندازه‌ی ذرات NLC با نسبت ۱:۱ لیپید جامد به روغن مایع و غلظت ۶٪ (وزنی/حجمی) سورفاکتانت (حروف متفاوت نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ آزمون دانکن).

پیدا می‌کند و در دماهای بالاتر کریستالیزه می‌شود و در نتیجه تشکیل کریستال‌های صفحه‌ای شکل β محتمل‌تر می‌گردد [۱۷]. علاوه‌بر این کریستال‌های β به علت ساختار کامل‌تر و فشرده‌تر موجب رانش ماده فعال از درون خود می‌شوند. لیو و همکاران [۲۶] استفاده از انواع لیپیدهای جامد شامل کامپریتول، پیرسروول و گلسریرین منواستئارات را جهت تهیه SLN‌های حاوی ایزووتریتونئین بررسی کردند. SLN‌های تولید شده با پیرسروول، در مقایسه با سایر لیپیدها دارای کوچک‌ترین اندازه‌ی ذرات با توزیع یکنواخت و پایداری فیزیکی بالا بود. لیو و وو [۱۲] در پژوهش خود بر روی بهینه‌سازی فرمولاسیون NLC حاوی لوئین گزارش نمودند از بین لیپیدهای جامد مورد استفاده (اسید استearیک، اسید میریستیک، پالمیتیک و پیرسروول (ATO5)) تنها پیرسروول قادر به تولید نانو ذرات لیپیدی پایدار گردید. استفاده از سایر لیپیدها، منجر به تولید سیستم دوفازه پس از ۲۴ ساعت نگهداری گردید. لاکاتوسا و همکاران [۱۰] نیز با استفاده از دو روغن طبیعی روغن هسته انگور و اسکوآلن به تولید حامل‌های لیپیدی نانوساختار حاوی بتاکلروتن پرداختند. آنان گزارش کردند با استفاده از هر دو نوع روغن، اندازه‌ی ذرات در حد نانومتر (به ترتیب ۸۹ و ۸۹ نانومتر برای روغن هسته انگور و اسکوآلن) با توزیع اندازه‌ی ذرات یکنواخت (کمتر از ۱۹۰) به دست آمد که با استفاده از روغن هسته انگور اندازه کوچک‌تری داشتند.

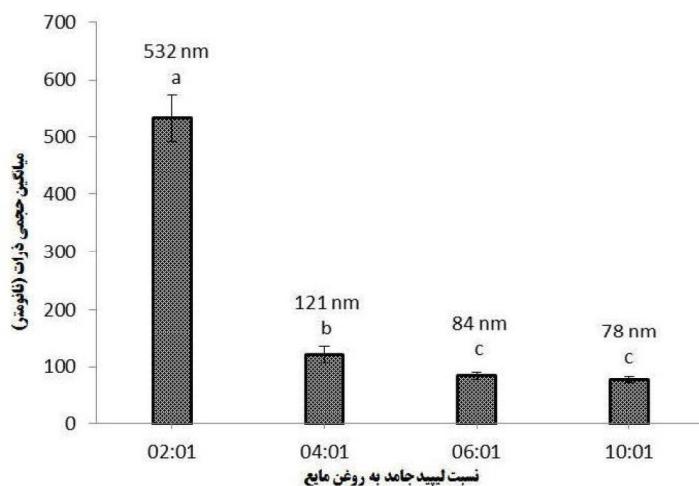
فرایند تولید نانوحامل‌ها، کنترل نمودن مسئله چند شکلی (پلی مورفیسم)^۱ در چربی‌هاست. ساختار α در سیستم‌های انتقال بهترین حالت بلوری است، زیرا که این شکل از کریستال چربی تقریباً نامنظم و بی‌شکل بوده، در حالی که ساختارهای β از نظم بیشتری در ساختار خود برخوردار هستند و منجر به رهاسازی مواد محصور شده، به سمت محیط خارج می‌شوند. بنابراین استفاده از کریستال‌های α ، جهت انتقال و حمل ترکیبات آب‌گریز در محصولات مایع و نوشیدنی‌ها مناسب‌تر گزارش شده است [۲۵]. با افزایش انحنای سطحی، توانایی مولکول‌های چربی در ایجاد و تشکیل یک کریستال کامل و منظم محدود می‌شود و در نتیجه تقریباً ذرات کوچک‌تر دارای غلظت‌های بیشتری از کریستال‌های α و β هستند، در حالی که ذرات لیپیدی بزرگ‌تر تمایل بیشتری به تشکیل کریستال‌های β دارند. کریستال‌های کوچک لیپیدی نسبت به اندازه‌های بزرگ‌تر، خودشان را بهتر با لایه سطحی می‌توانند منطبق کرده و تعداد مولکول‌های هر ذره که به طور فعال با مولکول‌های موجود در بین سطح (یعنی سورفاکتانت‌ها) واکنش می‌دهند، افزایش یافته و در نتیجه سورفاکتانت‌ها از بلورینگی مجدد و تبدیل کریستال‌های α و β به β' جلوگیری می‌کنند. با افزایش اندازه‌ی ذرات که می‌تواند در نتیجه درهم‌آمیختگی جزئی یا تجمع ذرات باشد، لیپید رفتاری شبیه به رفتار توده لیپید

1. Polymorphism

می‌شود و در فرمولاسیون‌های حاوی غلظت بالاتر از روغن مایع، حین سرد کردن امتزاج پذیری روغن مایع در ساختار لیپید جامد کاهش یافته و جدایی فاز رخ می‌دهد و اندازه و توزیع ذرات افزایش می‌یابد. هیو و همکاران [۲۷]، به تولید حامل‌های لیپیدی نانوساختار با استفاده از نسبت‌های مختلف اسید استئاریک (لیپید جامد) و اسید اولئیک به عنوان روغن مایع پرداختند. نتایج آن‌ها نشان داد اندازه ذرات و مورفولوژی آن‌ها تحت تأثیر غلظت روغن مایع در سیستم است. با افزایش غلظت اسید اولئیک تا ۳۰٪ وزنی لیپید جامد، ذرات کروی شکل با سطح صاف و اندازه کوچک‌تر حاصل شد. همچنین گزارش کردند کارایی درونپوشانی سیستم نانوحامل با افزایش غلظت اسید اولئیک بیش‌تر می‌شود. اضافه کردن اسید اولئیک منجر به تشکیل ساختار کریستالی با نظم کم‌تر و افزایش بارگیری ترکیب فعال می‌شد و با کنترل محتوی اسید اولئیک می‌توان سرعت آزاد شدن دارو از ساختار نانوحامل را کنترل نمود. یانگ و همکاران [۳] نیز تأثیر انواع روغن‌های مایع (تری اولئین، پنتادکان، اسید اولئیک، روغن زیتون و روغن پالم) را در ساختار حامل‌های لیپیدی نانوساختار (با استفاده از لیپید جامد تری استئارین و سورفاکтанت غیریونی تویین ۶۰) مورد مطالعه قرار دادند. آن‌ها گزارش کردند پایداری NLC تا حد زیادی به نوع و میزان روغن حامل بستگی دارد. با

تأثیر نسبت لیپید جامد به روغن مایع: از نسبت‌های مختلف (۲، ۴، ۶ و ۱۰ به ۱) لیپید جامد (پیرسروول AT05) به روغن مایع حامل ویتامین A پالمیتان (اکتیل اکتانیت) با غلظت ۶٪ (وزنی/حجمی) پلوکسامر ۴۰۷ به عنوان سورفاکتانت فاز آبی استفاده شد تا بتوان نسبت بهینه از لیپید و روغن مایع در تولید نانوذرات با پایداری بالا را به دست آورد. نتایج مربوط به اندازه ذرات در شکل ۳ نشان داده شده است. استفاده از نسبت ۱:۱ لیپید جامد به روغن مایع نسبت به سایر نسبت‌ها، موجب تولید اندازه ذرات کوچک‌تر و پایدارتر گردید. در مقابل، با افزایش میزان روغن مایع (نسبت‌های ۲ و ۴ لیپید جامد به روغن مایع) اندازه ذرات افزایش قابل توجهی داشت.

روغن‌های حامل ترکیبات فعال از جمله میگلیول ۸۱۲، اسید اولئیک، و اکتیل اکتانیت تأثیر بسزایی در خصوصیات NLC تولید شده دارند. در تولید NLC نیز که از مخلوط لیپید جامد و روغن مایع استفاده می‌شود ساختار کریستالی نامنظم و بیش‌تر کریستال‌های کروی شکل آلفا تشکیل می‌شود. البته همان‌طور که نشان داده شد انتخاب نسبت مناسب از لیپید و روغن نیز در اندازه ذرات، ساختار کریستالی و پایداری سیستم نقش بسزایی دارد [۲۶]. مطابق نتایج، در نسبت ۱:۱ لیپید جامد (پیرسروول) به روغن مایع (اکتیل اکتانیت) کم‌ترین اندازه ذرات و بیش‌ترین پایداری به دست آمد. در غلظت پایین روغن مایع، مولکول‌های روغن بین ماتریکس لیپید جامد پخش شده و NLC دارای ساختار ناقصی متشکل از مخلوط لیپید و روغن



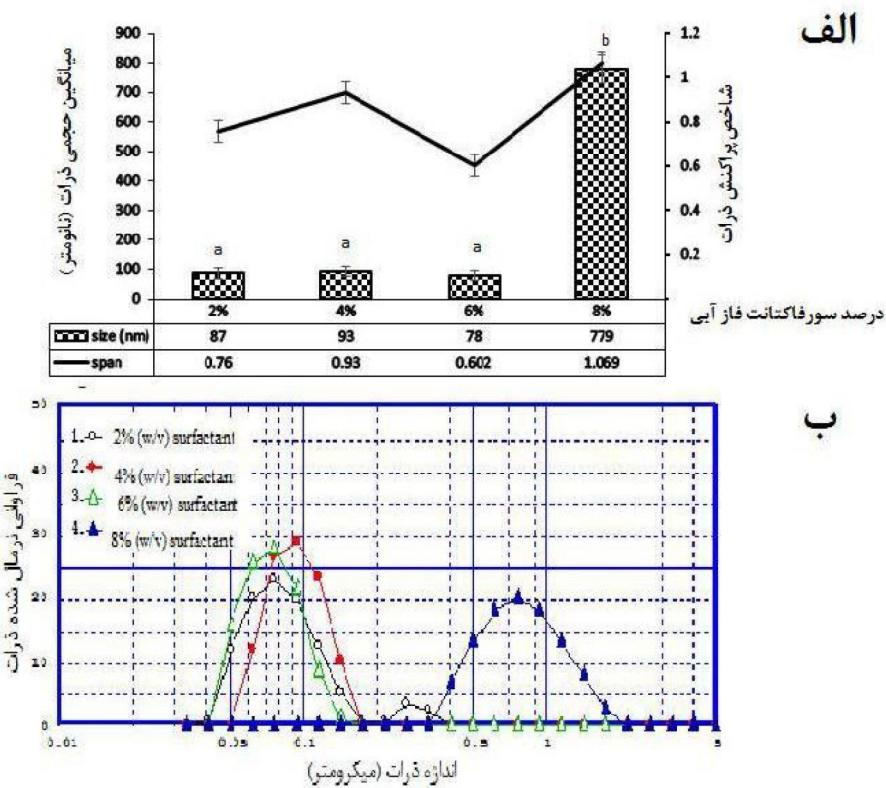
شکل (۳) اثر نسبت‌های مختلف لیپید جامد (پیرسروول) به روغن مایع (اکتیل اکتانیت) بر اندازه ذرات NLC با غلظت سورفاکتانت ۶٪ (وزنی/حجمی) (حرروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ آزمون دانکن)

باعث کاهش کارآیی هوموزنیزاسیون (غلظت تر شدن سیستم، عدم پخش و توزیع یکنواخت نیرو به خوبی و در نتیجه تولید کمتر ذرات (در مقیاس نانو) با توزیع یکنواخت) و افزایش اندازه ذرات تا ۷۷۹ نانومتر گردید. اولین نقش سورفاکتانت پایدارکردن نانوذرات در یک حالت کلوئیدی و ممانعت از بزرگ‌تر شدن اندازه ذرهای در طول نگهداری است. انتخاب مناسب سورفاکتانت فاکتور مهم کلیدی در تهیه هرگونه نانو ذره، جهت کنترل اندازه ذرات و پایداری آن‌ها در محلول و کنترل فرایند کریستالیزاسیون است [۲۸]. می‌توان از انواع مختلف امولسیفایرها و ترکیبات فعل سطحی (بر اساس بار و وزن مولکولی) جهت پایدار کردن پراکندگی لیپید در سیستم‌های حامل لیپیدی نانوساختار استفاده کرد. اهمیت نوع و غلظت سورفاکتانت در تولید قطره‌های کوچک در نانومولسیون و تنظیم فرایند کریستالیزاسیون است که موجب تولید کریستال‌های α و β بیش‌تری می‌شود. با توجه به اندازه کوچک ذرات حاصله، تعداد مولکول‌های لیپیدی که با گروه هیدروفوب سورفاکتانت جهت تعديل و تنظیم فرایند کریستالیزاسیون وارد واکنش می‌شوند، به اندازه کافی موجود است. از طرف دیگر امکان اتصال ماده فعل به سورفاکتانت بیش‌تر می‌شود. هم‌چنین با اتصال و انطباق بهتر سورفاکتانت به لیپید، از تجمع و بلورینگی مجدد جلوگیری شده و پایداری سینتیکی بلورها بیش‌تر می‌شود [۳۰ و ۳۱]. امولسیفایرها مناسب، کشش بین‌سطحی را کاهش داده و در طول فرایند هوموزنیزاسیون، پراکنده‌سازی قطرات را تسهیل می‌کنند [۱۲]. تشکیل ژل در فرمولاسیون NLC می‌تواند در اثر ایجاد شبکه و اتصال میان ذرات لیپیدی به علت ناکافی بودن میزان سورفاکتانت باشد. به طور مثال ساختارهای کریستالی α که از نظر ترمودینامیکی نامطلوب هستند، به فرم β تغییر پیدا می‌کنند. این انتقال همراه با تغییرات مورفولوژیکی است؛ یعنی کریستال‌های β می‌توانند تحت رشد مستقیم و تشکیل ساختارهای سوزنی‌شکل واقع شوند و منجر به افزایش سطوح در تماس می‌شود. اگر این سطوح جدید به وجود آمده با مولکول‌های سورفاکتانت پایدار نشوند و ادغام دو ذره سریع‌تر از سرعت جذب مولکول‌های سورفاکتانت جهت پوشش‌دهی سطوح و نواحی هیدروفوبیک جدید باشد [۳۱]. برهم‌کنش‌های آب‌گریز می‌تواند منجر به

افزایش غلظت روغن مایع تری اولئین، کریستالیزاسیون و نقطه ذوب NLC کاهش می‌یابد. ذرات کروی‌شکل بیش‌تری تولید و پایداری سوسپانسیون افزایش می‌یابد. روغن مایع محبوس در داخل ماتریکس کریستالی، سرعت انتقالات پلی‌مورفیسم را تسريع، اما تغییر شکل به کریستال‌هایی با اندازه درشت‌تر را به تأخیر می‌اندازد و نواحی آب‌گریز سطحی کمتری از لیپیدها که باستی توسط سورفاکتانت پوشانده شوند، به وجود می‌آید. بنابراین میزان سورفاکتانت کمتری جهت پایدارسازی NLC نیاز است.

تأثیر غلظت سورفاکتانت: شکل ۴-الف و ۴-ب منحنی‌های اندازه و توزیع اندازه ذرات نمونه‌های NLC بر پایه نسبت $1:1$ لیپید جامد (پیرسروول AT05) به روغن مایع حامل ویتامین A پالمیتات (اکتیل اکتانیت) در غلظت‌های مختلف سورفاکتانت فاز آبی ($W/V = 2, 4, 6, 8\%$) را نشان می‌دهد که توسط دستگاه آنالیز اندازه ذرات به دست آمده است. میزان سورفاکتانت تأثیر بسزایی بر پایداری شیمیایی نانوحامل تولید شده دارد. متوجه قطر حجمی و توزیع اندازه ذرات (اسپین) به ترتیب در محدوده $78-779$ نانومتر و $1/0.69-1/0.76$ قرار دارند. هم‌چنین اثر متغیر مستقل (غلظت‌های مختلف سورفاکتانت فاز آبی) بر روی اندازه ذرات بررسی شده است و نشان می‌دهد که بین اندازه ذرات نمونه‌ها به جز استفاده از غلظت ($W/V = 8\%$) سورفاکتانت، در سطح 5% اختلاف معنی‌داری وجود ندارد ($p < 0.05$). هرچقدر توزیع اندازه ذرات تک‌پخش و باریک‌تر باشد سیستم کلوئیدی همگن‌تر خواهد بود. توزیع اندازه ذرات برای تمام نمونه‌ها با غلظت‌های متفاوت سورفاکتانت فاز آبی تک‌پخش بود.

در فرمولاسیون NLC تهیه شده با استفاده از نسبت $1:10$ به ۱ لیپید جامد (پیرسروول) به روغن مایع (اکتیل اکتانیت) و استفاده از پلوكسامر ۴۰۷ به عنوان سورفاکتانت، با افزایش غلظت سورفاکتانت از 2% به 6% (وزنی/حجمی) اندازه ذره روندی کاهشی نشان داد که البته این کاهش اندازه معنی‌دار نبود. کاهش در اندازه ذرات به علت پایدار شدن قطرات کوچک لیپید (نانومولسیون) در غلظت‌های بالا و کافی سورفاکتانت است. غلظت بالای سورفاکتانت منجر به کاهش کشش سطحی و پایدارسازی سطوح جدید به وجود آمده و تولید ذرات کوچک‌تر می‌شود. البته غلظت بسیار بالای سورفاکتانت ($W/V = 8\%$) هم



شکل (۴) а) تأثیر غلظت‌های مختلف سورفاکتانت غیر یونی فاز آبی (پلوکسامر ۴۰۷) بر اندازه و توزیع اندازه ذرات در فرمولاسیون‌های تهیه شده با استفاده از نسبت ۱:۱۰ لیپید جامد (پیرسروول) به رogen مایع (اکتیل اکتانیت). (حروف متفاوت نشان‌دهنده اختلاف در سطح ۷/۵ در آزمون دانکن) و
б) تأثیر غلظت‌های مختلف سورفاکتانت فاز آبی (۴، ۲، ۶ و ۸٪ وزنی/حجمی) بر توزیع اندازه ذرات NLC.

جمع و ناپایدار شدن حامل‌های لیپیدی نانوساختار شوند و به وجود می‌آید که جهت پوشش‌دهی این سطوح نیاز به مقادیر زیاد سورفاکتانت است [۳۳]. بنابراین در صورت استفاده از غلظت‌های پایین سورفاکتانت، در طول مدت نگهداری اندازه ذرات افزایش و پس از دو ماه، ژل تشکیل می‌شود. بلوغوی و همکاران [۳۴] در تحقیقی روی فاکتورهای موثر در تولید NLC با استفاده از روش هموژنیزاسیون گرم، از غلظت (w/v) ۱۰٪ پیرسروول ATO5 و (w/v) ۰.۱٪ میگرول ۸۱۲ به عنوان فاز لیپیدی و غلظت (w/v) ۰.۲٪ تویین ۸۰ و ۰.۱٪ پلوکسامر ۱۸۸ به عنوان سورفاکتانت فاز آبی استفاده کردند و اندازه ذرات ۱۵۰ نانومتر با توزیع اندازه ۰/۲ و پتانسیل زتا -۲۰- میلیولت تولید کردند. با جایگزینی ستیل تری متیل آمونیوم بروماید (CTAB) با پلوکسامر ۱۸۸، اندازه ذرات به ۱۸۰ نانومتر افزایش یافت. لاقاتوسا و همکاران [۱۰] نشان دادند NLC‌های تولید شده بر پایه رogen هسته انگور و همچنین اسکوآلن به کمک تویین ۲۰ کوچکتر از NLC‌های تولید شده با تویین ۸۰ هستند.

تجمع ذرات گسترش‌های نانوساختار شوند و تجمع ذرات گسترش‌های نانوذرات ایجاد کند. در ساختار پلوکسامر، کوپلیمرهای پلی‌اتیلن اکساید (PEO) و پروپیلن اکساید (PPO) بلوکه شده‌اند. زنجیره‌های آب‌گریز PPO در سطح ذره جذب شده و زنجیره آب‌دوست PEO از سطح ذره لیپیدی به سمت محیط آبی کشیده می‌شود و یک لایه پایدار کننده به وجود می‌آورد [۳۲]. با تغییر شکل ذرات حین کریستالیزاسیون و در نتیجه تجمع آن‌ها از سمت نواحی غیر قطبی، سطوح آب‌گریز جدید

با غلظت‌های سورفاکтанت فاز آبی ۲، ۴ و ۶(w/v) با محاسبه سطح زیرمنحنی پیک‌های حاصله از HPLC (شکل ۶-ب) اندازه‌گیری و با استفاده از معادله درصد کارایی (معادله ۳) محاسبه گردید.

همان‌طور که در شکل ۷ مشاهده می‌شود در تمامی غلظت‌های سورفاکтанت فاز آبی، کارایی درون‌پوشانی بالاتر از ۸۴٪ به دست آمد. استفاده از غلظت سورفاکتانت (w/v) ۶٪ بیشترین کارایی درون‌پوشانی (۹۸/۶۵٪) را حاصل نمود.

کارایی درون‌پوشانی زیاد به دست آمده در این تحقیق را می‌توان به ماهیت لیپوفیل ویتامین A پالمیتات نسبت داد. مواد لیپوفیل بعد از درون‌پوشانی در فاز لیپیدی حامل قرار می‌گیرند و لیپید حامل محیط مناسبی برای آن‌ها فراهم می‌کند و از اکسیداسیون و تجزیه هیدرولیکی در امان خواهد بود و در نتیجه به علت کم بودن پدیده انتشار، ماده فعال لیپوفیل از ساختار حامل‌های لیپیدی نانوساختار نشست پیدا نمی‌کند. هم‌چنین لیپید مورد استفاده در این تحقیق (پیرسروول) مخلوطی از دی و تری گلیسریدها است و در ساختار ماتریکس لیپیدی خود دارای فضاهای خالی زیادی است و می‌تواند ترکیب فعال را در خود جای دهد. این امر نیز می‌تواند دلیلی بر کارایی بالای این سیستم باشد. با افزایش غلظت سورفاکتانت

۲-۳- میکروسکوپی الکترونی عبوری(TEM)

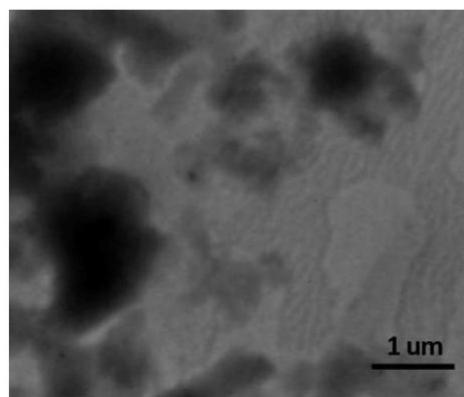
تصاویر مربوط به میکروسکوپ الکترونی عبوری، وجود ذرات تقریباً کروی تا بیضی با اندازه نانومتری را نشان داد که تأییدی بر نتایج به دست آمده از دستگاه اندازه‌گیری اندازه و توزیع ذرات بود (شکل ۵). لاکاتوسا و همکاران [۱۰] در تصاویر حاصله از حامل‌های لیپیدی نانوساختار حاوی بتاکاروتن با استفاده از میکروسکوپ الکترونی TEM، نانوذرات کروی شکل با متوسط اندازه ذرات کمتر از ۱۰۰ نانومتر با مناطق کریستالی نامنظم سوزنی‌شکل مشاهده کردند که بیانگر تشکیل کریستال‌های نامنظم آلفا نسبت به کریستال‌های منظم بتا بود. با تشکیل این فرم از کریستال‌ها مقدار بیشتری از ترکیب فعال در ساختار ماتریکس لیپیدی باقی می‌ماند.

۳-۳- کارایی درون‌پوشانی

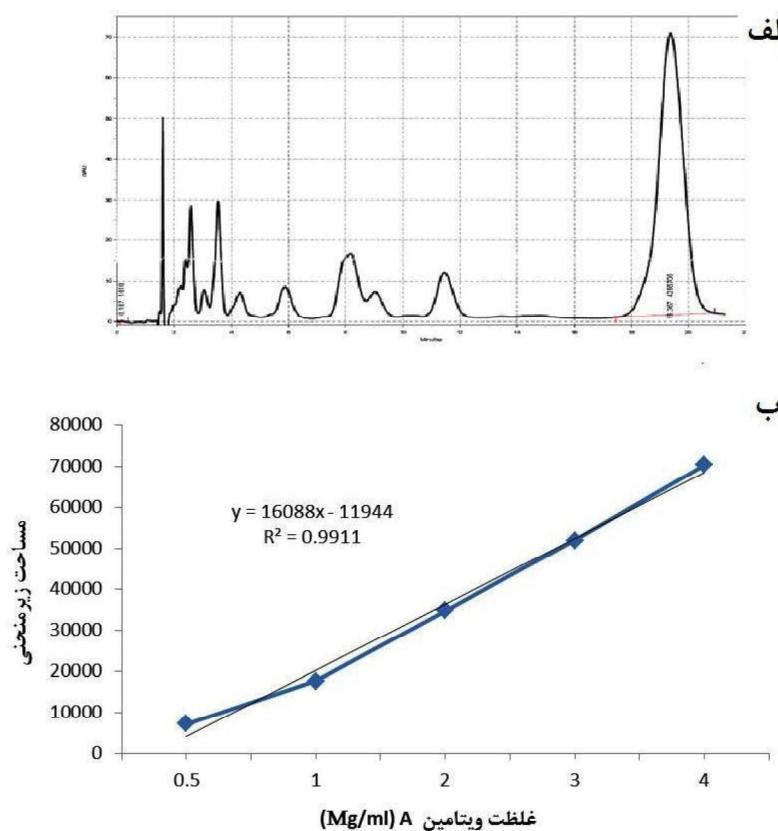
در این تحقیق جهت محاسبه مقدار ویتامین A پالمیتات درون‌پوشانی شده در نانوحامل‌های لیپیدی از دستگاه HPLC استفاده شد.

شکل ۶-الف منحنی استانداردی که غلظت ویتامین بارگذاری شده از روی آن محاسبه شد را نشان می‌دهد و در شکل ۶-ب پیک حاصل از ویتامین A پالمیتات به دست آمده از دستگاه HPLC نشان داده شده است.

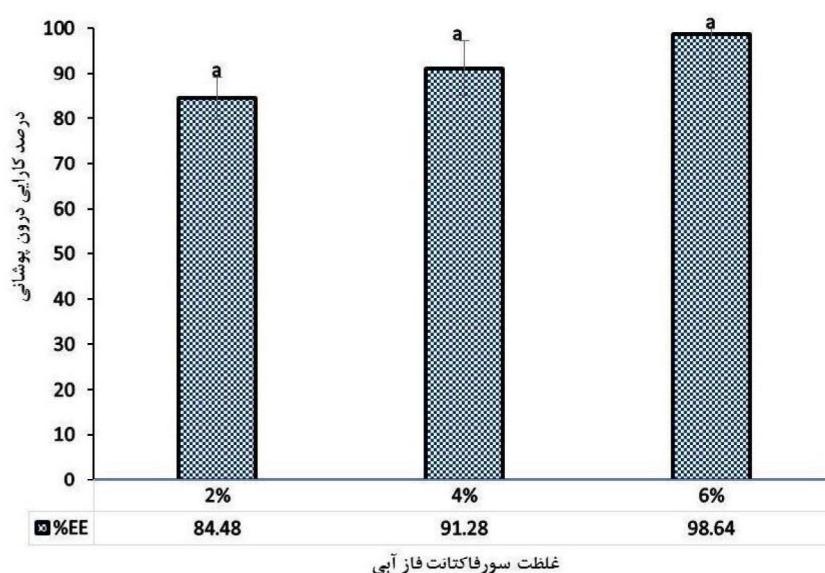
کارایی درون‌پوشانی سیستم NLC، یک روز پس از تولید نمونه‌های NLC مختلف بر پایه نسبت ۱:۱ لیپید جامد (پیرسروول) به روغن مایع حامل ویتامین A پالمیتات (اکتیل اکتانیت) (ATO5)



شکل (۵) تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری NLC بهینه (غلظت (w/v) ۶٪ سورفاکتانت غیر یونی (پلوکسامر ۴۰/۷) + نسبت ۱:۱ لیپید جامد (پیرسروول) به روغن مایع (اکتیل اکتانیت))



شکل (۶) الف- پیک کارایی درون پوشانی NLC حاوی ویتامین A پالمیتات با غله‌ت سورفاکتانت فاز آبی (W/V) و استفاده از نسبت ۱:۱۰ لیپید جامد (پیرسروول) به روغن مایع (اکتیل اکتانیت) به و ب- منحنی کالیبراسیون ویتامین A پالمیتات



شکل (۷) کارایی درون پوشانی NLC در فرمولاسیون‌های مختلف حاوی مختلف غله‌تهای مختلف سورفاکتانت فاز آبی با استفاده از نسبت ۱:۱۰ لیپید جامد (پیرسروول) به روغن مایع (اکتیل اکتانیت) به (حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح ۵٪ آزمون دانکن)

در ساختارهای SLN تهیه شده از لیپید جامد تری کاپرین، در فرمولاسیون‌های حاوی مقادیر بالای سورفاکtant زیاد است. نتیجه تحقیق آن‌ها نشان داد متصل شدن رتینوئیک اسید به لایه سورفاکtant، بیشتر از الحق آن به ماتریکس لیپیدی است.

۴-۳- پایداری درون‌پوشانی

در شکل ۸ نتایج حاصل از مساحت زیر سطح منحنی پیک‌های حاصل از HPLC در محاسبه میزان پایداری ویتامین A پالمیتات فرمولاسیون‌های تهیه شده NLC بر پایه نسبت ۱:۱ لیپید جامد (پیرسروول ATO5) به روغن مایع حامل ویتامین A پالمیتات (اکتیل اکتانیت) با استفاده از غلظت‌های مختلف سورفاکtant فاز آبی (۰.۶٪ w/v و ۰.۴٪) در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد طی بازه‌های زمانی (۱۵، ۳۰ و ۶۰ روز پس از تولید) نشان داده است. نتایج نشان داد با گذشت زمان کاهش مقدار ویتامین A رخ داده است و در حامل‌های حاوی مقادیر سورفاکtant بالاتر مقدار این کاهش کمتر است (۰.۱۶٪ کاهش در غلظت ۰.۶٪ سورفاکtant در مقابل ۰.۴٪ در غلظت ۰.۶٪ سورفاکtant).

پایداری درون‌پوشانی نانوحامل‌های لیپیدی به تعادل میان امولسیفایرها و ترکیبات فعال سطحی در سطح روغن - آب و همچنین ماهیت فاز لیپیدی بستگی دارد حفظ ترکیب درون‌پوشانی شده طی فرایند انتقال به ماده غذایی و همچنین در طی مدت نگهداری، بایستی در بیشترین حد باشد؛ در مقابل میزان رهایش آن در مکان جذب بایستی به صورت اپتیمم باشد [۲۶]. با افزایش مقادیر سورفاکtant پایداری و حفظ ویتامین A پالمیتات در حامل‌ها در طی نگهداری افزایش یافت که می‌توان آن را به دو عامل زیر نسبت داد: سورفاکtant در اتصال ویتامین و حفظ آن در ساختار نانوحامل نقش اساسی ایفا کرده است.

سورفاکtant در جلوگیری از ایجاد کریستال‌های کامل و ساختار منظم و فشرده نقش داشته است و بنابراین امکان نشت و رهایش آن از ساختار نانوحامل کمتر می‌شود.

برای غلبه بر خروج ترکیب فعال در طول مدت زمان نگهداری، استفاده از مخلوط لیپیدها که کریستال‌های خیلی منظم را تشکیل ندهند، می‌تواند مفید باشد. خصوصیات

کارایی درون‌پوشانی نیز افزایش پیدا کرد که می‌توان این طور توجیه کرد با حضور سورفاکtant به میزان کافی در محیط، سطح کپسول‌های نانوحامل به خوبی توسط سورفاکtant پوشانده شده و در نتیجه از تجمع و درهم‌آمیختگی جزئی ذرات جلوگیری می‌شود، بنابراین طی فرایند کریستالیزاسیون، خروج ماده فعال کمتر اتفاق می‌افتد. علاوه بر این، امکان تمایل بیش‌تر ماده فعال به سورفاکtant نسبت به لیپید حامل وجود دارد که با افزایش یافتن غلظت سورفاکtant، ماده فعال بیش‌تری به نانوحامل‌های لیپیدی متصل شده و کارایی درون‌پوشانی افزایش می‌یابد. با درون‌پوشانی رتینوئیدها درون NLC، نسبت به ساختارهای نانوکریستال لیپیدی (SLN)، کارایی و بازده انکپسولاسیون آن‌ها افزایش می‌یابد. چون اضافه نمودن روغن مایع به ساختار نانوحامل، میزان کریستالیزه شدن مجدد لیپید و در نتیجه خروج ترکیبات فعال را کمتر می‌کند و در نتیجه کارایی بالاتری از درون‌پوشانی و محافظت ترکیب فعال دارد. این نوع از ساختار نانوحامل می‌تواند جایگزین مناسبی برای لیپوزوم‌ها نیز باشد [۹].

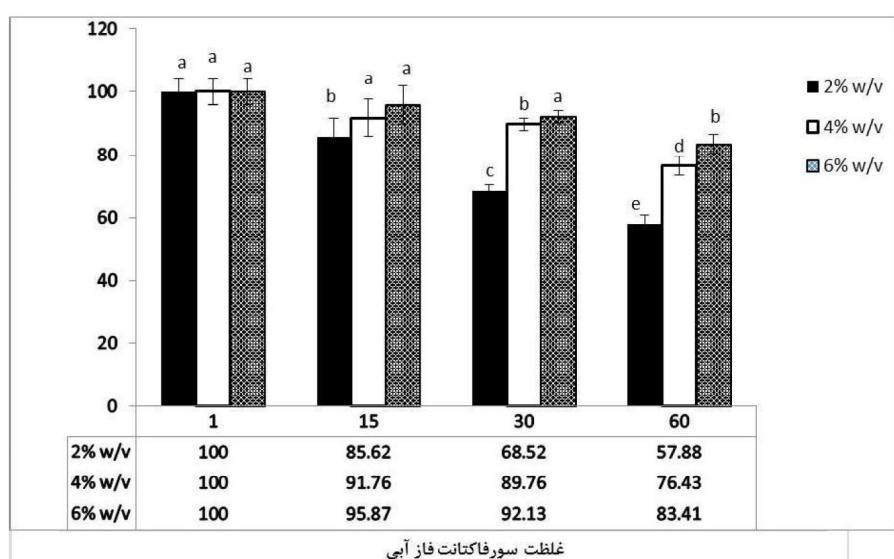
هیو و همکاران [۳۵] به تولید NLC حاوی داروی کلوبیتاسول پروپیونات با استفاده از منواستئارین و میگلیول ۸۱۲ (تری گلسریrid کاپریلیک/کاپریک اسید) پرداختند. آنان نشان دادند با افزایش غلظت میگلیول ۸۱۲، کارایی درون‌پوشانی دارو در ساختار NLC افزایش می‌یابد. داس و همکاران [۲۱] در مطالعه خود بر روی سیستم‌های SLN و NLC حاوی داروی کلوتریمازول تهیه شده از کامپریتول ATO888 و همچنین پیرسروول ATO5 و تویین ۲۰ و تویین ۸۰ به عنوان سورفاکtant فاز آبی، کارایی درون‌پوشانی بیش‌تر از ۸۰٪ حاصل نمودند و نشان دادند با افزایش غلظت سورفاکtant، کارایی درون‌پوشانی سیستم نانوحامل افزایش پیدا می‌کند. این امر می‌تواند به علت بارگیری کافی و حفظ ترکیب زیست فعال در ساختار یا بر روی سطح نانوحامل در استفاده از مقادیر بالای سورفاکtant باشد که با نتایج لیو و همکاران [۲۶] مطابقت داشت. همچنین در فرمولاسیون‌هایی که از مقادیر زیاد لیپید استفاده شده باشد به علت در دسترس بودن لیپید کافی و فراوان برای درون‌پوشانی ترکیب فعال، کارایی درون‌پوشانی بالا است [۲۱]. لیم و کیم [۶] نیز در مطالعه خود بر روی درون‌پوشانی رتینوئیک اسید

SLN ۶۰٪/رنتیول فعال باقی ماند و پایداری رتینوئیدهای مختلف در ها به ترتیب قطبیت آنها بود. به این گونه که هر اندازه قطبیت مولکول کمتر، پایداری آن بیشتر بود.

۴- نتیجه‌گیری

نوع لیپید جامد و نسبت لیپید جامد به مایع اثر قابل ملاحظه‌ای در اندازه ذرات NLC حاوی ویتامین A پالمیتان داشت و غلظت سورفاکتانت به جز در مقادیر بالا (۸٪) تأثیر چشم‌گیری را نشان نداد. اگرچه افزایش غلظت سورفاکتانت موجب افزایش کارایی انکیسولاسیون شد. همچنین افزایش غلظت سورفاکتانت موجب افزایش پایداری درون‌پوشانی طی ۶۰ روز نگهداری گردید که نشان‌دهنده اثر آن در افزایش اتصال ویتامین A پالمیتان یا بهینه‌سازی ساختار بلوری حاصل است. فرمولاسیون حاوی ۶٪ (وزنی/حجمی) پلوکسامر ۷۰٪ و نسبت ۱:۱۰ پیرسروول ATO5 (فاز لیپیدی) و فاز روغنی اکتیل اکتانیت حاوی ۳٪ ویتامین A پالمیتان به عنوان فرمولاسیون بهینه شناخته شد و دارای کمترین اندازه ذرات (۷۸ نانومتر با ضریب پراکنش ۲/۶۰)، پایدار در طی مدت ۷۰ روز نگهداری و کارایی درون‌پوشانی در پس از ۱۶۰ روز نگهداری در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد،

لیپید مورد استفاده از جمله نقطه ذوب، ویسکوزیته، شکل کربستالی و میزان آب‌گریزی آن بر پایداری ساختارهای NLC تأثیرگذار است [۱۲]. در ساختارهای NLC مخلوطی از لیپیدهای جامد و روغن‌های مایع تواًماً استفاده می‌شود که به علت ایجاد ناهمگونی از ایجاد کربستالهای منظم و فشرده جلوگیری می‌کند. رهایش آهسته ماده فعال درون‌پوشانی شده از درون ساختار آن و پایداری بیشتر طی نگهداری، از مزایای آن نسبت به SLN است. تیراناچیدیوکول و همکاران [۳۷] در درون‌پوشانی اسکوربیل پالمیتان درون ساختارهای حامل‌های لیپیدی نانوساختار، پایداری بیشتر از ۸۵٪ طی مدت ۹۰ روز نگهداری هم در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و هم در دمای محیط حاصل کردند. آن‌ها گزارش کردند کارایی درون‌پوشانی و حفظ ترکیب فعال در ساختار نانوحامل به نوع لیپید، نوع سورفاکتانت و همچنین شرایط محیطی از جمله دما بستگی دارد. لیم و کیم [۳۶] گزارش نمودند پایداری و تجمع SLN‌های حاوی رتینوئیک اسید را می‌توان با تعییر دادن تعادل موجود میان سورفاکتانت‌ها اپتیمم‌سازی نمود. در مطالعه‌ای که توسط جنینگ و گوهلا [۳۸] روی تهیه SLN رتینوئیدهای مختلف با استفاده از گلسریل بهینات صورت پذیرفت؛ نشان داده شد که پس از ۱۶۰ روز نگهداری در دمای ۴۰ درجه سانتی‌گراد،



شکل (۸) میزان ویتامین A پالمیتان باقی مانده در حامل‌های NLC در غلظت‌های مختلف سورفاکتانت فاز آبی با استفاده از نسبت ۱:۱۰ لیپید جامد (پیرسروول به روغن مایع (اکتیل اکتانیت) بعد از گذشت ۶۰ روز نگهداری در دمای ۴۰°C. حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی دار در سطح ۵٪ آزمون دانکن).

منابع

- loaded nanocarriers for food fortification: Production and characterization. *J. Funct. Foods*, 5, 1382-1391.
- [12] Liu, C.H., Wu, C.T. (2010). Optimization of nanostructured lipid carriers for lutein delivery. *Colloids Surf. A*; 353, 149–156.
- [13] Müller, R.H., Radtke, M., Wissing, S.A. (2002). Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Adv.Drug Deliv. Rev.*, 54, 131-155.
- [14] Carlotti, M.E., Sapino, S., Trotta, M., Battaglia, L., Vione ,D., Pelizzetti, E. (2005). Photostability and stability over time of retinyl palmitate in an O/W emulsion and in SLN introduced in the emulsion. *J. Disper. Sci. Technol.*, 26(2), 125-138.
- [15] Pardeike, J., Hommoss, A., Müller, R.H. (2009). Lipid nanoparticles (SLN, NLC) in cosmetic and pharmaceutical dermal products. *Int. J. Pharm.*, 366(1–2), 170–184.
- [16] Hentschel, Test, G.S. (2008). Beta-carotene-loaded nanostructured lipid carriers. *J. Food Sci.*, 73 (2), N1–N6.
- [17] Weiss, J., Decker, E.A., McClements, D.J., Kristbergsson, K., Helgason, T., Awad, T. (2008). Solid Lipid Nanoparticles as Delivery Systems for Bioactive Food Components. *Food Biophys.*, 3, 146–154.
- [18] Teeranachaideekul, V., Souto, E., Junyaprasert, V., Muller, R. (2007). Cetyl palmitate-based NLC for topical delivery of Coenzyme Q10 – Development, physicochemical characterization and in vitro release studies. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 67, 141-148.
- [19] hamishehkar, H., Emami, J., Rouholamini Nafajabadi, A., Gilani, K., Minaiyan, M., Mahdavi, H., Nokhodchi, A. (2009). The effect of formulation variables on the characteristics of insulin-loaded poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres prepared by a single phase oil in oil solvent evaporation method. *Colloid Surface B*, 74, 340–349.
- [1] Champagne, C.P., Fustier, P. (2007). Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds in to foods. *Curr.Opin. Biotechnol.*;18(2), 184–190.
- [2] Fathi, M., Mozafari ,M.R., Mohebbi, M. (2012). Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends. Food Sci. Technol.*, 1-15.
- [3] Yang, Y., Corona III, A., Schubert, B., Reeder, R., Henson, M.A. (2014). The effect of oil type on the aggregation stability of nanostructured lipid carriers. *J. of Colloid and Interface Sci.*, 418,261–272.
- [4] McClements, D.J., Decker, E.A., Weiss, J. (2007). Emulsion-based delivery systems for lipophilic bioactive components. *AAPS Pharm. Sci. Tech.*, 12, 62–76.
- [5] Loveday, S.M., Singh, H. (2008). Recent advances in technologies for vitamin A protection in foods. *Trends in Food Sci. & Tech.*, 19, 657-668.
- [6] Yurdugul, S., Mozafari, M.R. (2004). Recent advances in micro- and nanoencapsulation of food ingredients. *Cell. . Mol.Biology Lett.*, 9, 64–65.
- [7] Das, S., Chaudhury, A. (2011). Recent advances in lipid nanoparticle formulations with solid matrix for oral drug delivery.
- [8] Xia, Q., Hao, X., Lu, Y., Xu, W., Wei, H., Ma, Q., et al. (2008). Production of drug-loaded lipid nanoparticles based on phase behaviors of special hot microemulsions. *Colloids Surf. A*; 27-30.
- [9] Gonnet, M., Lethuaut, L., Boury, F. (2010). New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. *J. Controlled Release*, 146, 276-290.
- [10] Lacatusu, I., Badea, N., Ovidiu, O., Bojin, D., Meghea, A. (2012). Highly antioxidant carotene-lipid nanocarriers: synthesis and antibacterial activity. *J. Nanopart. Res.*; 14, 902-918.
- [11] Fathi, M., Varshosaz, J. (2013). Novel hesperetin

- fects of surfactants on the crystallization and polymorphism of lipid nanoparticles. *Prog. Colloid Polym. Sci.*, 121, 7–10.
- [30] Hu, F.Q., Jiang, S.P., Du, Y.Z., Yuan, H., Ye, Y.Q., Zeng, S. (2006). Preparation and characteristics of monostearin nanostructured lipid carriers. *Int. J. Pharm.*, 314(1), 83-9.
- [31] Ghosh, I., Bose, S., Vippagunta, R., Harmon, F. (2011). Nanosuspension for improving the bioavailability of a poorly soluble drug and screening of stabilizing agents to inhibit crystal growth. *Int. J. Pharm.*, 409, 260-268.
- [32] Qian, C.H., Decker, E.A., Xiao, H., McClements, D.J. (2013). Impact of lipid nanoparticle physical state on particle aggregation and β -carotene degradation: Potential limitations of solid lipid nanoparticles. *Food Res. Int.*, 52, 342-349.
- [33] Beloqui, A., Solinis, M.A., Delgado, A., Évora, C., Pozo-Rodríguez, A.D., Gascón, A.R. (2013). Biodistribution of Nanostructured Lipid Carriers (NLCs) after intravenous administration to rats: Influence of technological factors. *Eur. J. Pharm. and Biopharm.*
- [34] Helgason, T., Awad, T., Decker, E.A., Kristbergsson, K., McClements, D.J., Weiss, J. (2008). Influence of polymorphic transformations on gelation of tripalmitin solid lipid nanoparticle suspensions. *J. Am. Oil Chem. Soc.*, 85(6), 501-511.
- [35] Lim, S.J., Kim, C.K. (2002). Formulation parameters determining the physicochemical characteristics of solid lipid nanoparticles loaded with all-trans retinoic acid. *Int. J. Pharm.*, 243(1-2), 135-146.
- [36] Teeranachaideekul, V.I., Müller, R.H., Junyaprasert, V.B. (2007). Encapsulation of ascorbyl palmitate in nanostructured lipid carriers (NLC) -effects of formulation parameters on physicochemical stability. *Int. J. Pharm.*, 340(1-2), 198-206.
- [37] Jenning, V., Gohla, S.H. (2001). Encapsulation of retinoids in solid lipid nanoparticles (SLN). *J. Microencapsulation*, 18(2), 149-158.
- [20] Klang, V., Matsko, N.B., Valenta, C., Hofer, F. (2012). Electron microscopy of nanoemulsions: An essential tool for characterisation and stability assessment. *Micron*, 43(2-3), 85–103.
- [21] Das, S., Ng, W.K., Tan, R.B.H. (2012). Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): Development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs? *Eur. J. Pharm. Sci.*, 47(1), 139-151.
- [22] Wu, L., Zhang, J., Watanabe, W. (2011). Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 63, 456–469.
- [23] Kovacevic, A., Savic, S., Vučeta, G., Müller, R.H., Keck, C.M. (2011). Polyhydroxy surfactants for the formulation of lipid nanoparticles (SLN and NLC): Effects on size, physical stability and particle matrix structure. *Int. J. Pharm.*, 406, 163–172.
- [24] Saupe, A., et al. (2005). Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) -structural investigations on two different carrier systems. *Biomed. Mater. Eng.*, 15(5), 393–402.
- [25] Sagalowicz, L., Leser, M.E. (2010). Delivery systems for liquid food products. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.*, 15(1-2), 61–72.
- [26] Liu, J., Hu, W., Chen, H., Ni, Q., Ni, H., Yang, H. (2007). Isotretinoin-loaded solid lipid nanoparticles with skin targeting for topical delivery. *Int. J. Pharm.*, 328, 191-195.
- [27] Hu, F.Q., Jiang, S.P., Du, Y.Z., Yuan, H., Ye, Y.Q., Zeng, S. (2005). Preparation and characterization of stearic acid nanostructured lipid carriers by solvent diffusion method in an aqueous system. *Colloids Surf. B.*, 45(3-4), 167-173.
- [28] Trotta, M., Debernardi, F., Caputo, O. (2003). Preparation of solid lipid nanoparticles by a solvent emulsification-diffusion technique. *Int. J. Pharm.*, 257, 153-160.
- [29] Bunjes, H., Koch, M.H., Westesen, K. (2002). Ef-