

اثر غلظت‌های مختلف لستین - کلسترول بر خصوصیات اندازه ذرات، پتانسیل زتا، کارایی و

پایداری درون‌پوشانی نانولیپوزوم‌های حامل ویتامین A پالمیتات

بابک قنبرزاده^{*}، اکرم پزشکی^۲، حامد همیشه کار^۳، محمد مقدم^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۵/۲۶

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۲/۱۳

چکیده

درون پوشانی ترکیبات آب‌گریز از جمله ویتامین‌های محلول در چربی در ساختارهای لیپوزومی، روشی بالقوه مؤثر جهت حفظ آنها در برابر واکنش‌های مخرب در طی دوره‌ی نگهداری، معرفی شده است. از جمله مزایای بالقوه‌ی لیپوزوم‌ها، امکان درون پوشانی هر سه دسته مواد محلول در آب، محلول در چربی و ترکیبات آمفی‌فیل و به‌کارگیری مواد طبیعی غذایی با اثرات مفید درمانی مانند لستین در تولید آنهاست. در این پژوهش، به تعیین ویژگی‌های نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین A پالمیتات تولید شده به روش هیدراسیون لایه‌ی نازک و به کمک امواج فراصوت و با استفاده از غلظت‌های متفاوت لستین-کلسترول (شامل ۶۰-، ۵۰-، ۴۰-، ۳۰- و ۳۰- میلی‌گرم) پرداخته شده است. بمنظور تعیین خواص کاربردی نمونه‌ها، آزمون‌های تعیین اندازه و توزیع اندازه‌ذرات، پتانسیل زتا، بررسی ریزساختار، کارایی درون پوشانی و پایداری نانولیپوزوم‌ها در طی مدت نگهداری انجام گردیدند. اندازه‌ی ذرات در محدوده ۷۶-۱۱۵ نانومتر و توزیع اندازه‌ی ذرات باریک و تک‌مد (اسپن = ۰/۸۸ - ۰/۶) بود. افزودن کلسترول اثر معنی‌داری بر اندازه‌ی ذرات نشان نداد ولی مقادیر زیاد کلسترول موجب کاهش کارایی درون پوشانی گردید. با ورود کلسترول و هم‌چنین ویتامین به ساختار نانولیپوزوم، پتانسیل زتا از ۲۹- به ۵۸- میلی‌ولت افزایش یافت که نشان‌دهنده‌ی بهبود پایداری الکترواستاتیک نانولیپوزوم‌ها بود. در کل، غلظت ۵۰ به ۱۰ میلی‌گرم لستین به کلسترول، به‌عنوان غلظت مناسب در تولید فرمولاسیون بهینه نانولیپوزوم‌ها با توزیع ذره یکنواخت و تک‌مد (اسپن = ۰/۷۴) و کارایی درون پوشانی ۱۵/۸٪ شناخته شد.

واژه‌های کلیدی: نانولیپوزوم، ویتامین A پالمیتات، درون‌پوشانی، پایداری فیزیکی

مقدمه

و همکاران، ۲۰۱۰؛ فتحی و همکاران، ۲۰۱۲). حالیت بسیار پایین ویتامین‌های محلول در چربی از جمله ویتامین A، در محیط‌های آبی مانند نوشیدنی‌ها و ناپایداری آنها در حضور عوامل مخرب محیطی (مانند ترکیبات اکسید کننده، فلزات سنگین، ترکیبات تولید کننده رادیکال آزاد و نور) مهمترین موانع در غنی‌سازی مواد غذایی با این گروه از ویتامین‌ها است. در سال‌های اخیر، استفاده از نانوانکپسولاسیون راهکاری مفید در رفع بسیاری از دشواریهای غنی‌سازی مواد غذایی تشخیص داده شده است و می‌توان با وارد کردن این اجزاء در نانو حامل‌ها، قابلیت پخش‌پذیری، پایداری در مواد غذایی و بدن، کنترل رهایش در ماده غذایی و هم‌چنین دسترسی زیستی ترکیبات آب‌گریز را بهبود بخشید. (یانگ و همکاران، ۲۰۱۲؛ روآ و مکلمنتز، ۲۰۱۲). از مهم‌ترین نانوحامل‌های بر پایه‌ی لیپید، می‌توان به نانوامولسیون، نانولیپوزوم، نیوزوم، فیتوزوم، نانوکریستال‌های چربی (SLN)^۶ و حامل لیپیدی نانو ساختار (NLC)^۷ اشاره کرد

امروزه کاهش چربی در رژیم غذایی سبب کمبود مواد مغذی ضروری مورد نیاز بدن مانند انواع ویتامین‌های محلول در چربی، اسیدهای چرب ضروری و آنتی‌اکسیدان‌ها شده و این موضوع، لزوم غنی‌سازی محصولات غذایی کم چرب را با مواد مغذی چربی دوست نشان می‌دهد. از طرفی طی سال‌های اخیر، علاقه‌مندی مصرف کنندگان و تولیدکنندگان برای توسعه غذاهای فراسودمند حاوی مواد غذا-دارو (نوتریسیوتیکال)^۵ و زیست فعال افزایش یافته است (دووست

۱- دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۲- دانشجوی دکتری، مهندسی علوم و صنایع غذایی، گرایش شیمی مواد غذایی، دانشگاه تبریز

۳- دانشیار، مرکز تحقیقات دارویی، دانشگاه علوم پزشکی، تبریز

۴- استاد، گروه زراعت و اصلاح نباتات، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
(* - نویسنده مسئول: Email: Ghanbarzadeh@tabrizu.ac.ir)

(Lipoid) (Sigma، آلمان)، کلسترول با خلوص ۹۵٪ و سایر مواد شیمیایی از شرکت مواد شیمیایی مرک (Chemical Co. Merck Darmstadt, Germany) تهیه شدند.

روش‌ها

روش تهیه نانولیپوزوم حاوی ویتامین A پالمیتات

تهیه نانولیپوزوم ویتامین A پالمیتات، با استفاده از روش ترکیبی هیدراسیون لایه نازک و امواج فراصوت و غلظت‌های مناسب لستین- کلسترول انجام شد. ابتدا لستین و کلسترول، در الکل ۹۹٪ حل شده و سپس توسط اواپراتور خشک شد. لایه لیپیدی خشک شده در محیط آبی مجدداً آبدی شده و سوسپانسیون ایجاد شده مدتی هم زده شد (آبگیری-آبدی)^۲. به دلیل حضور آب در لایه فسفولیپید، فشار اسمزی ایجاد شده آب را به درون هریک از غشاء‌های دو لایه‌ای رانده و باعث جداسازی فیلم لیپیدی و در نهایت تولید لیپوزوم‌ها گشت. در این روش مخلوطی از انواع لیپوزوم‌های نوع MLVs^۳ و SUVs^۴ تولید شد و در ادامه کاهش اندازه‌ی ذرات با استفاده از هموژنیزاتور با نیروی برشی بالا و انرژی فراصوت با استفاده از اولتراسوند پروب صورت گرفت که در مرحله‌ی کاهش اندازه با استفاده از پروب سونیکاتور، نمونه‌ها در حمام یخ قرار گرفتند تا انرژی بیش از حد تولید شده امواج صوتی، منجر به سیالیت غشای لیپوزومی و تخریب آن نگردد. همچنین جهت جلوگیری از شکستن غشای لیپوزوم‌ها از ۱۰ سیکل یک دقیقه‌ای با فاصله استراحت یک دقیقه ما بین سیکل‌ها استفاده شد تا نانوذرات به‌وجود آمده فرصت شکل‌گیری مجدد داشته باشند. موقعیت پروب در داخل محلول نیز که از دیگر پارامترهای موثر است؛ نزدیک به سطح محلول قرار داشت تا تمامی ذرات بطور یکنواخت تحت تأثیر امواج فراصوت قرار گرفته و در مقیاس نانو کوچک شوند، همچنین توزیع اندازه ذرات نیز همگن و تک کوهانه گردد (جوسرکا و اوروار، ۲۰۰۸).

تعیین اندازه و توزیع اندازه ذرات

توزیع اندازه‌ی ذرات و قطر متوسط آن‌ها در دستگاه سنجش اندازه‌ی ذرات (با محدوده‌ی اندازه ذرات ۵۰ نانومتر تا ۵۰ میکرومتر) (SHIMADZO مدل SALD 2101 ساخت ژاپن) بر اساس روش پراش استاتیک پرتو لیزر (روش SLS^۵) اندازه‌گیری شدند. آزمون پایداری ذرات نیز با اندازه‌گیری میانگین اندازه‌ی ذرات در طی نگره-داری به مدت ۳۰ روز صورت پذیرفت. متوسط اندازه ذرات بر اساس میانگین قطر حجمی توسط معادله (۱) محاسبه شد و کلیه نمونه‌ها در

(یوردوگول و مظفری، ۲۰۰۴؛ داس و چودهری، ۲۰۱۱). ساختار اصلی لیپوزوم‌ها از لیپیدهای قطبی به ویژه فسفولیپیدها تشکیل می‌شود، اگرچه مواد پایدار کننده مانند استرول‌ها نیز معمولاً در ساختار آن‌ها حضور دارند. فسفولیپیدها به محض واکنش با آب بصورت سازمان یافته و به فرم غشاهای دو لایه ای تجمع می‌یابند و در اثر نیروی برشی به شکل کروی (وزیکول) در می‌آیند. نانولیپوزوم‌ها می‌توانند هر سه گروه ترکیبات آب‌دوست، آبگریز و دوگانه دوست را درون پوشانی کنند و به دلیل سازگاری، زیست تخریب پذیری و عدم حضور ترکیبات سمی، کاربردهای گوناگون در تحویل هدفمند دارو، لوازم آرایشی و صنایع غذایی دارند (کلر، ۲۰۰۱؛ تیلور و همکاران، ۲۰۰۵). در سالهای اخیر تحقیقات گسترده‌ای برای استفاده از نانو لیپوزوم‌ها در صنعت غذا بمنظور غنی سازی اجزای زیست فعال و توسعه‌ی غذاهای فراسودمند صورت گرفته است. از جمله مطالعات صورت گرفته می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: تولید نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین E و C (تولید شده به روش هیدراسیون لایه نازک) با کارایی درون پوشانی ۸۶٪ برای ویتامین C و ۹۹٪ برای ویتامین E (مارسنسکو و همکاران، ۲۰۱۱)، تولید لیپوزوم‌های بر پایه لستین سویا، سالمون و فسفولیپیدهای حاوی اسید چرب دکوزا هگزائوئیک اسید (PL-DHA) جهت درون پوشانی سینامیک اسید (به روش سونیکاسیون و اکستروژن) (بوراب و همکاران، ۲۰۱۴)، نانولیپوزوم‌های چند لایه‌ی حاوی عصاره پلی فنولی و آنتوسیانین هیبیسکوس بر پایه‌ی لستین سویا (به روش هموژنیزاسیون فشار بالا یا میکرو فلودایزر) (گیبیس و همکاران، ۲۰۱۴)، درون پوشانی عصاره‌ی رنگی زردچوبه در نانولیپوزوم‌های تولید شده با استفاده از لستین سویا، سالمون و شلغم روغنی (حسن و همکاران، ۲۰۱۴)، درون پوشانی ویتامین D₃ در نانولیپوزوم‌های بر پایه لستین- کلسترول (تولید شده به روش هیدراسیون لایه نازک و سونیکاسیون) (محمدی و همکاران، ۱۳۹۲)، درون پوشانی رتینول (لی و همکاران، ۲۰۰۲) و لوتئین (ایکیسا و همکاران، ۲۰۱۰). با توجه به تحقیقات انجام شده نانولیپوزوم‌ها، حامل مناسبی برای غنی‌سازی مواد غذایی با ترکیبات زیست فعال آب‌گریز گزارش شده اند. بنابراین در این کار تحقیقی، به تولید نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین A پالمیتات و بررسی ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی و کارایی درون پوشانی و همچنین پایداری آنها پرداخته شده است.

مواد و روش

مواد

ویتامین A پالمیتات، فسفولیپید (بتا استیل -وای -او - آلکیل - ال - آلفا - فسفاتیدیل کولین) با درجه خلوص بیشتر از ۹۹٪ با نام

2 Hydration-dehydration

3 Multilamellar vesicles

4 Small unilamellar vesicles

5 Static Light Scattering

1 Docosaehaenoic acid

سه تکرار اندازه‌گیری شدند. میانگین قطر حجمی (میانگین حجم معادل) یا DeBroukere mean (چاندا و همکاران، ۲۰۱۱):

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

n_i : تعداد ذرات
 d_i : قطر میانگین ذرات

شاخص پراکنش ذرات نیز با استفاده از معادله زیر محاسبه شد (همیشه‌کار و همکاران، ۲۰۰۹):

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

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

سه تکرار اندازه‌گیری شدند.

میانگین قطر حجمی (میانگین حجم معادل) یا DeBroukere mean (چاندا و همکاران، ۲۰۱۱):

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

n_i : تعداد ذرات

d_i : قطر میانگین ذرات

شاخص پراکنش ذرات نیز با استفاده از معادله زیر محاسبه شد (همیشه‌کار و همکاران، ۲۰۰۹):

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

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

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

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

میکروسکوپی الکترونی عبوری (TEM)^۱

بمنظور بررسی ریزساختار نانولیپوزوم و تایید اندازه در مقیاس نانو (کوچک‌تر از ۱۰۰ نانومتر) از دستگاه میکروسکوپ الکترونی عبوری (Leo 906 مدل Zeiss 100 KV، ساخت آلمان) استفاده شد. در ابتدا یک قطره از نمونه‌ی نانولیپوزوم بهینه بر روی گرید فیلم کربنی قرار داده شد و پس از خشک شدن آن در دمای آزمایشگاه با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی عبوری تصویربرداری شد (کلنگ و همکاران، ۲۰۱۲).

پتانسیل زتا

برای تعیین پتانسیل زتا نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین A، از دستگاه زتاسایزر (Malvern-Nano-ZS انگلستان) استفاده شد. برای این منظور، هریک از نمونه‌ها نخست با استفاده از آب مقطر ۵۰ برابر رقیق شدند. سپس نمونه‌ها توسط سرنگی داخل لوله موئین منتقل و لوله موئین در محل مخصوص در داخل دستگاه قرار گرفت. اندازه‌گیری پتانسیل زتا در pH=۷/۴ و در دمای ۲۵°C و توان ۱۴۹ وات انجام شد (فاتوروس و آنتیمیسیاریس، ۲۰۰۲).

کارایی درون پوشانی

بمنظور استخراج ویتامین A پالمیتات از نانولیپوزوم جهت بررسی کارایی درون پوشانی ویتامین، ابتدا نمونه‌ها تحت سانتریفوژ ملایم

۳۲۵nm؛ تزریق و سطح زیر منحنی محاسبه گردید. سطح زیر منحنی حاصل از پیک نمونه، در معادله‌ی به‌دست آمده از منحنی استاندارد گذاشته شد و غلظت ویتامین کپسوله شده به‌دست آمد. بعد از روی معادله کارایی درون پوشانی (معادله ۳) درصد ویتامین درون پوشانی شده به‌دست آمد (محمدی و همکاران، ۱۳۹۲).

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

تعیین پایداری درون پوشانی نانولیپوزوم

پایداری بلند مدت نانولیپوزوم‌ها با اندازه‌گیری میانگین اندازه‌ی ذرات و میزان باقی ماندن ویتامین بارگذاری شده در داخل نانوحامل در طی نگاه‌داری ۳۰ روز در دمای یخچال بود. آزمون تعیین میزان ویتامین باقی‌مانده در نانو حامل آزمایشی در دمای ۴°C با محاسبه سطح زیرمنحنی پیک‌های حاصله از HPLC صورت پذیرفت و میزان پایداری ویتامین با استفاده از معادله‌ی ۴ محاسبه گردید (چاندا و همکاران، ۲۰۱۱).

$$\text{پایداری} = \frac{(\text{مقدار ویتامین A باقیمانده در نانوحامل})}{(\text{مقدار ویتامین A درون پوشانی شده اولیه})} \times 100 \quad (4)$$

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

آزمون‌ها در سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شدند. تحلیل و ارزیابی (ANOVA) با استفاده از مدل خطی (G.L.M) نرم افزار آماری SPSS (version 16.0 for Windows, SPSS Inc) در

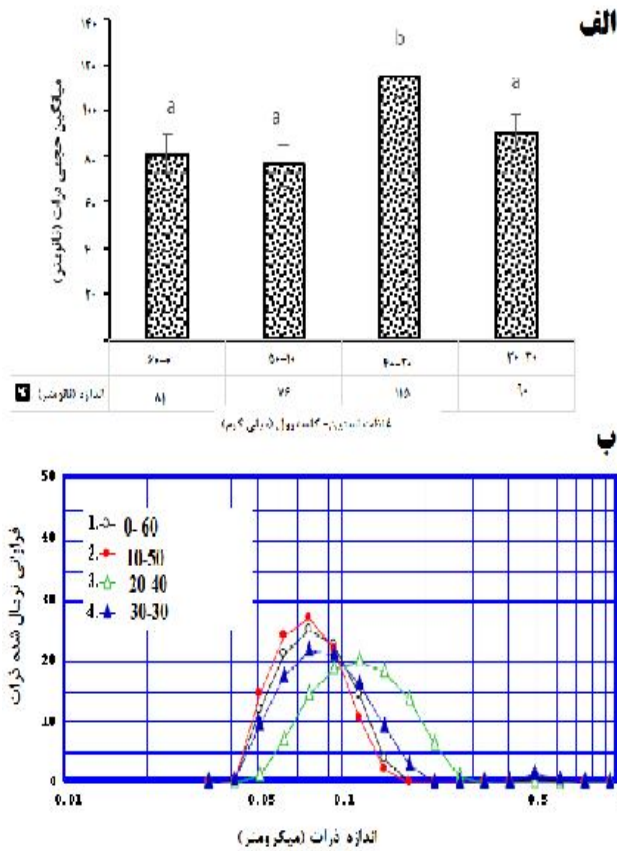
شود و مقادیر کلسترول بالاتر یا کمتر، موجب افزایش اندازه ذرات می‌شود. الکساندر و همکاران (۲۰۱۲) در تولید نانولیپوزوم‌های حاوی فسفاتیدیل کولین سویا و فیتواسترول جهت درون‌پوشانی آسکوربیک اسید، گزارش کردند که افزایش غلظت فسفولیپید سویا (۱۰۰۱، ۱۵۰ و ۲۰۰)، موجب افزایش جزئی اندازه‌ی ذرات نانولیپوزوم (به ترتیب ۱۰۳، ۱۱۵ و ۱۳۶ نانومتر) شد. آنها همچنین گزارش کردند افزودن استرول‌های گیاهی به فرمولاسیون لیپوزوم‌ها بر اندازه ذرات تأثیری نداشت ولی منجر به توزیع اندازه‌ی ذرات باریک و تک‌مد در سیستم شد.

سطح احتمال ۵٪ ($P < 0.05$) و آزمون چنددامنه‌ای دانکن برای تأیید وجود اختلاف بین میانگین‌ها انجام گرفت.

نتایج و بحث

تعیین اندازه و توزیع اندازه‌ی ذرات

اثر متغیر مستقل (غلظت‌های مختلف لسیتین به کلسترول) بر اندازه ذرات در قالب طرح کاملاً تصادفی بررسی شد. نتایج نشان داد که غلظت‌های مختلف لسیتین به کلسترول به‌جز غلظت ۲۰-۴۰ میلی‌گرم اثر معنی‌داری بر اندازه ذرات ندارد و افزودن کلسترول نیز تغییر معنی‌داری را در اندازه‌ی ذرات ایجاد نکرد ($p < 0.05$) (شکل ۱ الف). احتمالاً کلسترول در هنگام تبدیل ساختارهای لایه‌ای به وزیکول‌ها، در بین حفره‌های مولکولی تشکیل شده قرار می‌گیرد، در نتیجه باعث افزایش معنی‌دار در اندازه‌ی وزیکول‌ها نمی‌گردد. البته تأثیر کلسترول بر روی اندازه‌ی ذرات به روش تولید و نوع فسفولیپید مورد استفاده نیز بستگی دارد. شکل (ب) منحنی‌های توزیع اندازه‌ی ذرات نمونه‌ها در غلظت‌های مختلف لسیتین- کلسترول را نشان می‌دهد. در تمامی غلظت‌های لسیتین/ کلسترول، توزیع نانوذرات بصورت یکنواخت و تک مد بود. نمونه‌های با توزیع اندازه باریک (اسپن کمتر) در برابر پدیده‌ی ناپایداری رسیدگی استوالت مقاوم‌تر هستند. از غلظت ۵۰-۱۰ میلی‌گرم لسیتین به کلسترول بعنوان نسبت مناسب از لسیتین و کلسترول برای تولید نانولیپوزوم بهینه در سایر آزمایش‌ها استفاده شد. لسیتین به‌عنوان اسکلت اصلی لیپوزوم‌ها عمل می‌کند و کلسترول باعث پایداری و تثبیت لیپوزوم‌های تشکیل یافته می‌گردد. در غشاهای لیپوزومی که غنی از لسیتین هستند، آرایش یافتن زنجیره‌های آسپیل در یک جهت، موجب کاهش فضاهای بوجود آمده‌ی در اثر گروه‌های قطبی حجیم موجود در سر لیپید، می‌شود و در نتیجه تماس و برهم‌کنش بین زنجیره‌ها بیشتر می‌شود. کلسترول، زنجیره‌های آسپیلی که به یک سمت کج شده‌اند را بصورت مستقیم و مرتب نگه می‌دارد و فضاهای ایجاد شده بین آنها را پر می‌کند (نگل و تیربستر، ۲۰۰۰). بنابراین قرار گرفتن کلسترول در ساختار دولایه‌ای منجر به افزایش تراکم چیدمان مولکول‌های فسفولیپیدی می‌شود. گزارش‌های متفاوتی در مورد اثر کلسترول بر اندازه‌ی ذرات لیپوزومی منتشر شده است که به نظر می‌رسد روش تهیه لیپوزوم در آن بسیار موثر بوده است. محمدی و همکاران (۱۳۹۲) در تولید نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین D₃ به‌این نتیجه رسیدند که افزایش غلظت کلسترول تأثیر معنی‌داری روی اندازه و توزیع اندازه ذرات نداشت. از طرف دیگر لیو و پارک (۲۰۱۰) در مطالعه‌ای که بر روی نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین C، پوشش‌دار شده توسط کیتوزان انجام دادند به‌این نتیجه رسیدند که با استفاده از نسبت‌های ۴۰:۶۰ و ۴۰:۴۰ لسیتین/کلسترول، نانولیپوزوم‌هایی با اندازه‌های کوچک ۹۷/۴ و ۹۵/۸ نانومتر تولید می‌-



شکل ۱- تأثیر تغییر غلظت لسیتین به کلسترول (میلی‌گرم) الف: بر اندازه ذرات و ب: توزیع اندازه‌ی ذرات نانولیپوزوم حاوی ۲/۴ میلی‌گرم ویتامین A پالمیتات (حروف متفاوت نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح ۵٪ آزمون دانکن).

محمدحسینی و همکاران (۱۳۹۲) نیز در تحقیق بر روی تولید نانولیپوزوم‌های حاوی گاما‌اوریزانول (استرول گیاهی) گزارش کردند افزایش غلظت لسیتین در دامنه ۳، ۵، ۱۰ و ۲۰٪ تفاوتی در اندازه‌ی ذرات نانولیپوزوم‌های حاوی گاما‌اوریزانول ایجاد نکرد و افزودن گاما‌اوریزانول به عنوان یک ترکیب آگریز احتمالاً به دلیل تغییر در

بدون کلسترول و ویتامین ۲۹۷m - بود که این ممکن است به دلیل حضور فسفاتیدیل کولین و موقعیت قرارگیری اسیدچرب آن و یونیزاسیون گروه‌های فسفات و کربوکسیل باشد. تمامی لیپوزوم‌های حاوی ویتامین دارای پتانسیل زتای بالای ۴۰ v m - هستند که بیان‌گر نقش نیروی دافعه‌ی الکترواستاتیک در پایداری نانولیپوزوم‌ها و جلوگیری از تجمع آنها در طول زمان است. وقتی بار کلی روی ذرات افزایش می‌یابد، ذرات همدیگر را دفع کرده و بر توده ای شدن غلبه می‌کنند. اندازه‌گیری پتانسیل زتا در کنترل توده‌ای شدن و رسوب نانولیپوزوم‌ها که فاکتورهای مهم در پایداری نانولیپوزوم‌ها هستند، مفید است (مظفری و همکاران، ۲۰۰۶).

جدول ۱ - پتانسیل زتای نانولیپوزوم‌های بدون ویتامین و با ویتامین A پالمیتات

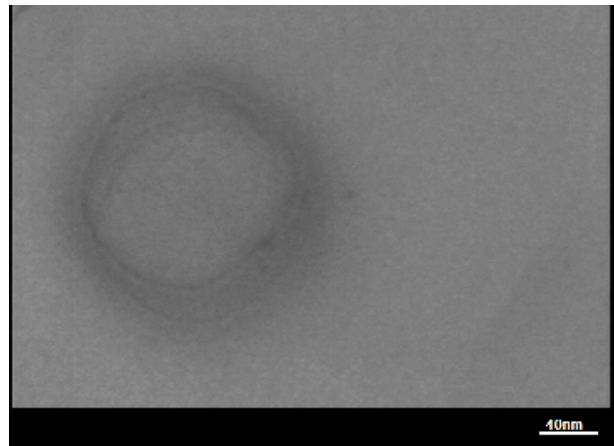
پتانسیل زتا (vm)		ترکیبات تشکیل دهنده لیپوزوم لستین به کلسترول (mg)
بدون ویتامین	با ویتامین	
-۴۵/۶	-۲۹	۰ به ۶۰
-۴۴/۵	-۳۵	۱۰ به ۵۰
-۵۸/۶	-۳۹/۷	۲۰ به ۴۰
-۴۶/۱	-۴۲/۸	۳۰ به ۳۰

از عوامل موثر بر پتانسیل زتای لیپوزوم می‌توان به نوع و مقدار فسفولیپید؛ نوع و غلظت پایدارکننده مانند کلسترول؛ نوع و غلظت ماده‌ی فعال؛ قدرت یونی محیط و دما اشاره کرد. طبق نتایج بدست آمده در این تحقیق، با افزایش میزان کلسترول (مولکول خنثی و بدون بار)، پتانسیل زتا در نانولیپوزوم‌های بدون ویتامین آ، افزایش می‌یابد. بر اساس مکانیسم پیشنهاد شده توسط برخی از محققین گروه هیدروکسیل موجود در سر کلسترول با گروه کولین موجود در سر قطبی فسفاتیدیل کولین پیوند هیدروژنی برقرار می‌کند و گروه کولین با بار مثبت به داخل غشا کشیده می‌شود و گروه فسفاتیدیل که دارای بار منفی است به سطح غشا رانده می‌شود و بنابراین بار منفی افزایش و باعث دفع الکترواستاتیک ذرات می‌شود (میلر، ۲۰۰۷). در ارتباط با تأثیر کلسترول بر پتانسیل زتا نتایج مشابهی توسط سایر محققین گزارش شده است. محمدی و همکاران (۱۳۹۲) در نتایج خود در تولید نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین D₃ با استفاده از غلظت‌های متفاوت لستین و کلسترول بیان کردند که با افزایش مقدار کلسترول، پتانسیل زتا بطور تدریجی افزایش می‌یابد. ایکسیا و ایکسو (۲۰۰۵) نیز گزارش کردند با اضافه کردن کلسترول تا غلظت ۱۰٪ مولی، بار منفی روی ذرات نانولیپوزوم و دافعه‌ی الکترواستاتیک آنها افزایش می‌یابد که دلیل آن را به برقراری پیوند بین گروه هیدروکسیل کلسترول و کولین

غشاء دولایه‌ای لیپیدی، منجر به کاهش اندازه‌ی ذرات نانولیپوزوم‌ها شد. ویریاروج و همکاران (۲۰۰۹) نیز گزارش نمودند با استفاده از کلسترول در ساختار لستین، اندازه‌ی ذرات از ۷۲ نانومتر به ۶۳ نانومتر کاهش می‌یابد. به‌طور کلی بر اساس نتایج تحقیقات مختلف می‌توان به این نتیجه رسید که کلسترول بیشتر بر پایداری فیزیکی (پایداری اندازه ذرات) در طول زمان موثر است و تنها تأثیر اندکی بر اندازه ذرات هنگام تشکیل لیپوزوم دارد.

مورفولوژی نانولیپوزوم با استفاده از میکروسکوپ الکترونی عبوری

بررسی ریزساختار نانو لیپوزوم و تأیید اندازه آن در مقیاس نانو (کوچک‌تر از ۱۰۰ نانومتر) در شکل ۲ نشان داده شده است. پس از اعمال فرایند فراصوت، اندازه وزیکول‌ها در حد نانومتر کاهش پیدا می‌کند و می‌توان از طریق میکروسکوپ الکترونی عبوری (TEM) تصاویر نانولیپوزوم‌ها را به‌صورت وزیکول‌های دایره‌ای شکل منظم با قطر متوسط حدود ۸۰ نانومتر مشاهده نمود. هم‌چنین حضور غشاء دولایه در اطراف وزیکول به خوبی مشخص است. تصاویر میکروسکوپی حاصله تأییدی بر نتایج به‌دست آمده از اندازه‌گیری میانگین حجمی ذرات در دستگاه سنجش اندازه ذرات بود. کولاس و همکاران (۲۰۰۷) در بررسی مورفولوژی و ریزساختار نانولیپوزوم‌های حاوی نایسین تهیه شده به روش حرارتی بوسیله‌ی میکروسکوپ الکترونی TEM، گزارش کردند که با استفاده از این روش می‌توان نانولیپوزوم‌هایی با توزیع اندازه ذره‌ی باریک و اندازه‌ی کوچک تولید کرد



شکل ۲ - تصویر میکروسکوپ الکترونی عبوری نانولیپوزوم بر پایه‌ی ۱۰-۵۰ میلی‌گرم لستین - کلسترول حاوی ۲/۴ میلی‌گرم ویتامین A پالمیتات.

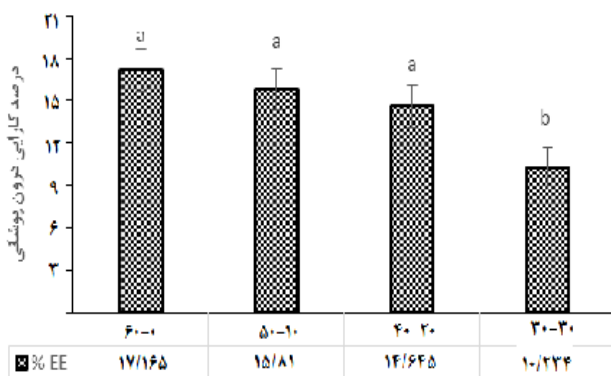
پتانسیل زتا

نتایج حاصل از پتانسیل زتای نانولیپوزوم‌های بدون ویتامین و با ویتامین در جدول (۱) نشان داده شده است. پتانسیل زتای نانولیپوزوم

ندرت تحت تأثیر ترکیب درون‌پوشانی شده در حامل، غلظت و شرایط افزودن ترکیب فعال در طول آماده سازی وزیکول‌ها قرار می‌گیرد.

کارایی درون‌پوشانی

در این تحقیق جهت محاسبه‌ی مقدار ویتامین A پالمیتات درون‌پوشانی شده در نانولیپوزوم‌ها، از دستگاه HPLC استفاده شد. کارایی درون‌پوشانی سیستم نانولیپوزوم، یک روز پس از تولید نمونه‌های لیپوزومی مختلف حاوی غلظت‌های لستین به کلاسترول متفاوت با محاسبه سطح زیرمنحنی پیک‌های حاصله از HPLC اندازه‌گیری و با استفاده از معادله درصد کارایی (معادله ۳) محاسبه گردید. همان‌طور که در شکل ۳ مشاهده می‌شود در تمامی غلظت‌های لستین - فسفولیپید، کارایی درون‌پوشانی نسبتاً پایینی بدست آمد. با افزایش نسبت لستین به کلاسترول، کارایی درون‌پوشانی نانولیپوزوم‌ها افزایش یافت و استفاده از غلظت لستین به کلاسترول ۶۰-۰۰ بیشترین کارایی درون‌پوشانی (۱۷/۶۵٪) را حاصل نمود. فسفولیپید به عنوان اسکلت اصلی وزیکول‌های تشکیل یافته عمل می‌کند و با افزایش نسبت لستین به ماده فعال و کلاسترول که منجر به افزایش تعداد وزیکول‌ها و همچنین حجم داخلی لیپوزوم و تمرکز بیشتر ماده فعال بر روی سطح لیپید می‌شود، درصد بارگیری ترکیب فعال در ساختار لیپوزوم افزایش یافت. از طرفی، سفت شدن غشا توسط کلاسترول می‌تواند باعث جلوگیری از باز شدن غشای لیپوزومی و در نتیجه جا گرفتن کمتر مواد فعال آبریز در آن گردد. همچنین، احتمالاً حضور کلاسترول در غشای لیپوزومی، نزدیکی و مجاورت ویتامین A پالمیتات با غشای لیپوزومی را کاهش می‌دهد.



شکل ۳- کارایی درون‌پوشانی نانولیپوزوم حاوی ۲/۴ میلی‌گرم ویتامین A پالمیتات با غلظت‌های مختلف لستین به کلاسترول (۶۰-۰، ۵۰-۱۰، ۴۰-۲۰، ۳۰-۳۰) (حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی دار در سطح ۵٪ آزمون دانکن).

در همین راستا نتایج لیو و پارک (۲۰۱۰) در تحقیق بر روی نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین C پوشش‌دار شده توسط کیتوزان نشان

لستین و ایجاد کشش دو قطبی بین آنها نسبت دادند. در پژوهش دیگری لیو و همکاران (۲۰۰۰)، بر تأثیر کلاسترول بر پایداری فیزیکی لیپوزوم‌های متشکله از لستین به این نتیجه رسیدند که پتانسیل زتا و دفع الکترواستاتیک بین لیپوزوم‌های فسفاتیدیل کولین با افزودن کلاسترول افزایش می‌یابد. حضور ترکیب فعال در ساختار نانوحامل یکی دیگر از فاکتورهای مؤثر بر پتانسیل زتا است. نتایج این تحقیق نشان داد در مقایسه‌ی هر تیمار با نوع بدون ویتامین، درون‌پوشانی ویتامین، پتانسیل زتا را به مقدار زیادی افزایش داد (جدول ۱) که مطابق با یافته‌های محمدی و همکاران (۱۳۹۲) در ارتباط با درون‌پوشانی ویتامین D₃ در نانولیپوزوم‌های متشکل از غلظت‌های متفاوت لستین و کلاسترول بود. برهم‌کنش بین پوشش لیپیدی و ماده‌ی فعال هسته‌ای نیز تأثیر به‌سزایی بر پتانسیل زتا و پایداری وزیکول‌ها دارد. احتمالاً ساختار ترکیب فعال با تغییر دادن ساختار سطحی لیپوزوم‌ها، موجب منفی‌تر شدن پتانسیل زتای سطحی آنها می‌شود. این تغییرات منجر به تغییر در آرایش و جهت‌گیری گروه‌های سر فسفاتیدیل کولین در سطح لیپوزوم‌ها می‌شود. وقتی ویتامین در ترکیب لستین-کلاسترول حل می‌شود و در داخل دولایه‌ی لیپیدی قرار می‌گیرد، زنجیره‌های آسیل فسفولیپیدی محیط مناسبی برای مولکول‌های ویتامین فراهم می‌کنند. ویتامین می‌تواند با غشای فسفولیپیدی واکنش دهد و باعث دوباره قرارگیری و آرایش مجدد ساختارهای لیپیدی غشا شود و از این طریق پتانسیل زتا، پایداری و دیگر خصوصیات غشا را تحت تأثیر قرار دهد. ویتامین در شرایط آزمایش یونیزه نمی‌شود و تأثیر آن در پتانسیل زتا از طریق تغییر ریزساختارهای غشاست. نتایج تحقیقات نشان داده است وقتی وزیکول‌های فسفولیپیدی یونی لاملار توسط روش سونیکاسیون آماده می‌شوند، ویتامین با غشای فسفولیپیدی پیوند برقرار می‌کند. ویتامین A نسبت به کلاسترول با سرعت بالاتری می‌تواند بین غشاهای فسفولیپیدی مبادله شود به دلیل اینکه ویتامین A نسبت به کلاسترول پیوند ضعیف‌تری با غشا ایجاد می‌کند و بنابراین پتانسیل زتا را تحت تأثیر قرار می‌دهد (میلر، ۲۰۰۷). در تطابق با این تحقیق، پاداموار و پوخارکار (۲۰۰۶) با کپسوله کردن ویتامین E در لیپوزوم‌های لستین-کلاسترول، مشاهده کردند پتانسیل زتای وزیکول‌های تولید شده افزایش یافت. محمدحسینی و همکاران (۱۳۹۲) نیز در مطالعه خود بر روی نانولیپوزوم‌های حاوی گاما‌اوریزانول نشان دادند که افزودن گاما‌اوریزانول باعث افزایش جزئی پتانسیل زتای منفی از ۱۹/۴- به ۲۰/۴- میلی‌ولت می‌شود. البته برخی دیگر از محققین نقش ماده فعال را در افزایش مقدار پتانسیل زتا بدون تأثیر دانستند. در این راستا مورا و همکاران (۲۰۰۷)، افزایش پتانسیل زتای نانولیپوزوم‌های لستین-کلاسترول حاوی بنزوکینون را به یونیزاسیون گروه‌های فسفات فسفولیپید نسبت دادند و نقش ترکیب فعال را در بار منفی ذرات خنثی اعلام کردند. آنها براین عقیده بودند که پتانسیل زتا به-

به روش تزریق اتانول، نشان داد کارایی کپسول‌سیون در مقادیر کم کلاسترول افزایش می‌یابد، ولی با افزایش کلاسترول، کارایی از ۴۵٪ به ۳۶٪ و ۳۲٪ کاهش پیدا می‌کند. آنها افزایش راندمان در مقادیر کم کلاسترول را به افزایش پایداری غشای لیپوزومی به دلیل اثر کلاسترول بر کاهش سیالیت غشا نسبت دادند و کاهش کارایی در مقادیر زیاد کلاسترول را به گسیخته شدن غشای لیپوزومی در مقادیر زیاد کلاسترول نسبت دادند. همچنین، کارایی درون‌پوشانی تحت تأثیر نوع فسفولیپید نیز می‌باشد. بوراب و همکاران (۲۰۱۴) در تولید لیپوزوم‌هایی بر پایه‌ی لستین سویا، سالمون و فسفولیپیدهای دکوزا هگزائوئیک اسید (PL-DHA۱) جهت درون‌پوشانی سینامیک اسید، تأثیر نوع و ترکیب فسفولیپید مصرفی را در کارایی درون‌پوشانی و نفوذپذیری غشاء و زیکول نسبت به ترکیب هیدروفوب سینامیک اسید بررسی کردند. نتایج آنها نشان داد در استفاده از لستین سالمون، بیشترین کارایی درون‌پوشانی حاصل شد. آنها پیشنهاد دادند که به علت حضور اسیدهای چرب اشباع در ساختار فسفولیپید، این وزیکول‌ها از پایداری بالا و استحکام زیاد غشاء، برخوردار بودند. همچنین آنها گزارش کردند که ارتباط مستقیمی بین افزایش اندازه‌ی وزیکول نانولیپوزوم و کاهش کارایی درون‌پوشانی وجود دارد.

بررسی پایداری فیزیکی

عدم تغییر پارامترهایی از قبیل اندازه‌ی ذرات و توزیع اندازه‌ی ذرات در طی یک دوره‌ی زمانی طولانی نشان‌دهنده‌ی پایداری بودن نانوحامل تولیدی است. جهت بررسی پایداری فیزیکی از دو پارامتر اندازه‌ی ذرات و میزان باقی ماندن ویتامین بارگذاری شده در داخل نانولیپوزوم طی مدت ماندگاری ۳۰ روز استفاده شد.

بررسی پایداری اندازه‌ی ذرات نانولیپوزوم

شکل (۴ الف) اندازه‌ی ذرات بعد از مدت یک ماه در دمای ۴۰°C را نشان می‌دهد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود در نمونه‌های لستین-کلاسترول با نسبت‌های ۰-۶۰ و ۰-۴۰ و ۲۰-۳۰ بین روزهای نگهداری در سطح ۵٪ تفاوت معنی‌دار وجود دارد و در نمونه‌ی ۳۰-۳۰ میلی‌گرم لستین-کلاسترول نسبت به بقیه‌ی تیمارها، افزایش بیشتری در اندازه‌ی ذرات بعد از گذشت ۳۰ روز ملاحظه می‌شود. با این وجود، هم‌چنان اندازه‌ی ذرات نزدیک به مقیاس نانو (nm) (۳۴۸) باقی ماند. در نمونه‌ی لستین-کلاسترول با نسبت ۵۰ به ۱۰ بین هیچ کدام از روزها تفاوت معنی‌دار ملاحظه نشد و نسبت به تیمارهای دیگر اندازه‌ی ذرات بعد از گذشت ۳۰ روز تقریباً بدون تغییر ماند.

ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و پایداری نانولیپوزوم‌ها به فاکتورهای متعدد از قبیل ماهیت و غلظت فسفولیپید در سیستم؛ روش تولید

داد لیپوزوم‌های با اندازه‌ی کوچک قادر به بارگیری بیشتر ویتامین C درون خود هستند که این می‌تواند به علت حضور مقدار بیشتر نانوحامل در سیستم آنها باشد و مقادیر بهینه‌ی نسبت فسفولیپید به کلاسترول برای حداکثر بارگذاری ۶۰ به ۴۰ بود و در کمتر و بیشتر از این نسبت، مقادیر کارایی بارگذاری کاهش یافت. محمدحسینی و همکاران (۱۳۹۲) نیز در تولید نانولیپوزوم‌های حاوی گاما‌اوریزانول گزارش کردند با افزایش میزان غلظت لستین و یا کاهش نسبت ترکیب فعال به لستین، کارایی درون‌پوشانی در نانولیپوزوم‌ها از ۶۰٪ تا ۸۴/۳٪ افزایش می‌یابد.

از عوامل موثر بر کارایی درون‌پوشانی لیپوزوم‌ها می‌توان به ماهیت ماده‌ی فعال (لیوفیل یا هیدروفیل بودن آن)؛ ماهیت فسفولیپید (از نظر نوع و آرایش اسیدهای چرب)؛ نسبت فسفولیپید به ماده‌ی فعال؛ روش تولید نانولیپوزوم؛ غلظت و نوع پایدارکننده مانند کلاسترول و شرایط محیطی از قبیل دما، pH و قدرت یونی اشاره کرد. گونت و همکاران در سال ۲۰۱۰، ماکزیمم غلظت ترکیبات فعال درون‌پوشانی شده در لیپوزوم‌ها را تا حد زیادی به قطبیت آنها مرتبط دانستند که موقعیت قرارگیری آنها را در غشای دو لایه‌ای مشخص می‌کرد. کاروتنوئیدهای با قطبیت کمتر، مانند بتاکاروتن و لیکوپن، در مرکز غشای دو لایه‌ای تجمع پیدا می‌کنند؛ بنابراین غلظت کمتری از این گونه ترکیبات به نانولیپوزوم‌ها ملحق می‌شود. در این تحقیق به احتمال زیاد ویتامین A پالمیتات با وزن مولکولی (۵۲۴/۹ gr/mole) به علت حضور استر پالمیتیک در ساختار خود نسبت به سایر مشتقات ویتامین A غیر قطبی‌تر بوده و همانند بتاکاروتن در مرکز غشاء فسفولیپیدی قرار می‌گیرد. بنابراین با توجه به وزن مولکولی بالا و ساختار بزرگ ویتامین A پالمیتات، تعداد مولکول کمتری از این ترکیب می‌تواند در ساختار غشای دو لایه‌ی لیپوزوم قرار گرفته و هم‌چنین به دلیل حساسیت بیش از حد ویتامین A پالمیتات به نور و اکسیژن و هم‌چنین حلال‌های آلی امکان تجزیه و تخریب آن در طی مراحل تهیه‌ی سیستم نانولیپوزوم وجود دارد که این عوامل را می‌توان توجیهی بر کارایی پایین به دست آمده در این تحقیق در نظر داشت. در همین راستا نیز نتایج سینگ و داس (۱۹۹۸) در بررسی تولید لیپوزوم‌های حاوی رتینول و رتینیل پالمیتات نشان داد این ترکیبات به غشا دو لایه‌ای وزیکول‌ها (فسفاتیدیل کولین) متصل شده و رتینیل پالمیتات با توجه به دارا بودن استر غیر قطبی توانایی کمتری جهت ترکیب شدن با عوامل قطبی فسفولیپید موجود در غشاء دارد.

در مطالعه‌ی انجام گرفته توسط لاریدی و همکاران (۲۰۰۳)، بر روی انکپسوله کردن نایسین در سیستم نانولیپوزوم نشان داده شد استفاده از کلاسترول در ساختار لیپوزوم، مانع گسیختن و تغییر غشای لیپوزومی توسط نایسین و هم‌چنین باعث کاهش کارایی کپسول‌سیون نایسین در لیپوزوم گردید. نتایج فان و همکاران (۲۰۰۸) در مورد تأثیر کلاسترول بر کارایی کپسول‌سیون نانولیپوزوم‌های حاوی سالیروسید

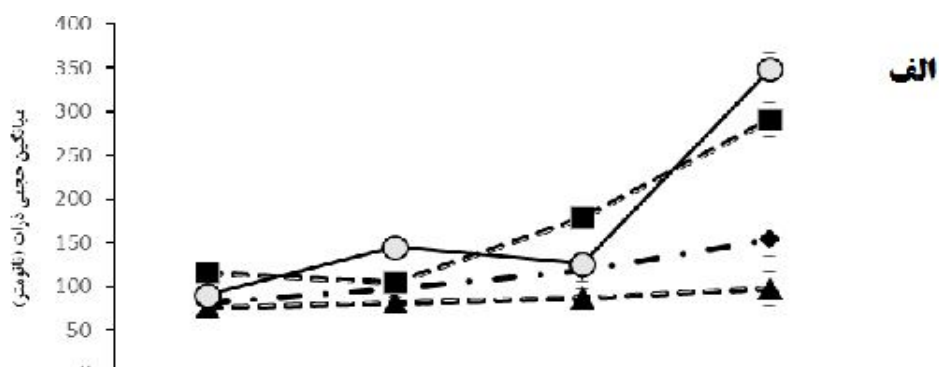
لیپوزومی می‌شود و با تضعیف پیوندهای واندرالس بین زنجیره‌های هیدروکربنی اسیدهای چرب از کریستالیزاسیون لیپوزوم جلوگیری می‌کند. درحالی‌که در فاز مایع افزودن کلسترول سیالیت و تحرک زنجیره‌های آسیل را محدود می‌سازد (لیانگ و همکاران، ۲۰۰۴).

یکی دیگر از علل پایدار بودن نسبی نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین A بعد از مدت یک ماه را می‌توان به نگهداری آنها در شرایط مطلوب و مناسب نگهداری (دمای پایین 4°C) و در تاریکی نسبت داد. دما و نور منجر به تغییر در ساختار کریستالی لیپید، نرم شدن غشا و کاهش پتانسیل زتا می‌شوند و در نتیجه منجر به کاهش نیروی دفعی بین ذرات و توده‌ای شدن ذرات می‌شوند. ماده تشکیل‌دهنده غشای لیپوزومی نیز می‌تواند در پایداری فیزیکی لیپوزوم‌ها دخیل باشد. محمدحسینی و همکاران (۱۳۹۲)، بر روی پایداری نانولیپوزوم-های حاوی گامااوریزانول تولید شده به روش گرمایی از لحاظ تغییر در اندازه ذرات و میزان ماده‌ی کپسوله شده‌ی باقیمانده طی مدت ۶۰ روز در دمای 4°C و 25°C مطالعاتی را انجام دادند. نتایج آنها نشان داد که تفاوت چشمگیری در اندازه ذرات بعد از دو ماه نگهداری در دمای 4°C مشاهده نشد و توزیع اندازه ذرات برای تمام نمونه‌ها با غلظت-های متفاوت لستین، باریک و تک مد بوده و سیستم حاوی ذرات نانولیپوزومی با گذشت زمان پایدار بود. همچنین از لحاظ ماده کپسوله شده باقیمانده طی مدت ۶۰ روز، نتایج نشان داد که تمامی نمونه‌های نگهداری شده در دمای 4°C با گذشت زمان پایدار ماندند. ولی در دمای 25°C هم اندازه‌ی ذرات و هم میزان نشت ماده‌ی فعال از داخل لیپوزوم‌ها افزایش یافت. در دمای 25°C لیپوزوم‌ها به دلیل سیالیت بالای غشاء، تغییر شکل داده و لخته تشکیل می‌دهند که افزایش اندازه‌ی ذرات با توزیع اندازه ذره‌ای گسترده را در پی خواهد داشت. نوع لیپید حاصل نیز بر پایداری ذرات تأثیرگذار است. در پژوهشی تامسون و همکاران (۲۰۰۶)، پایداری فیزیکی لیپوزوم‌های تشکیل شده از غشای فسفولیپیدی گلبول‌های چربی و فسفولیپید سویا را مقایسه کردند. نتایج نشان داد لیپوزوم‌های تشکیل شده از غشای گلبول‌های چربی پایداری بیشتری (از لحاظ اندازه‌ی ذرات) در گستره‌ی دمایی $4-35^{\circ}\text{C}$ ، در مقایسه با لیپوزوم‌های تولید شده از فسفولیپید سویا ایجاد می‌کند. آنها نتایج خود را این‌گونه توجیه کردند که اسفنگومیلین که جزء اصلی تشکیل‌دهنده‌ی غشای گلبول‌های چربی است در مقایسه با فسفاتیدیل کولین، محافظت بیشتری از لیپوزوم‌ها در برابر تنش‌های محیطی به عمل می‌آورد.

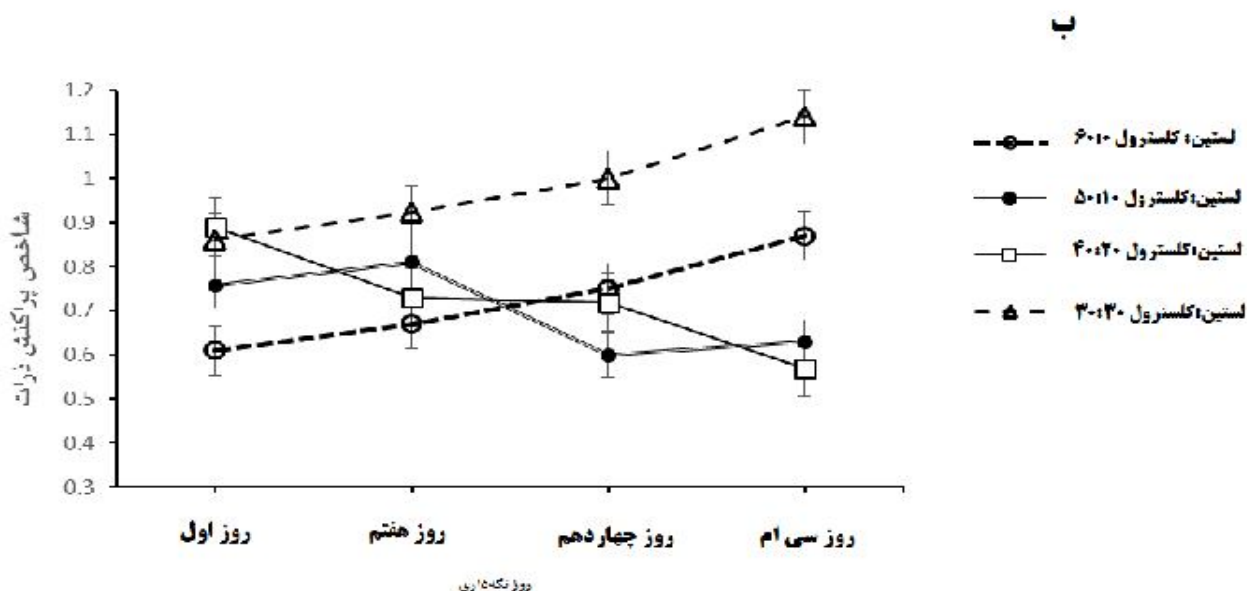
نانولیپوزوم؛ غلظت و نوع پایدارکننده (مانند کلسترول)؛ شرایط محیطی از قبیل دما، pH و قدرت یونی بستگی دارد. همچنین پایداری نانولیپوزوم‌ها تا حد زیادی وابسته به سیالیت غشاء لیپیدی است. نانولیپوزوم‌ها به دلیل تفاوت ناچیز دانسیته آن‌ها با فاز پیوسته ته‌نشین و شناور نمی‌شوند (کمتر دچار تفکیک گرانشی می‌شوند) و حرکات براونی، لیپوزوم‌ها را به صورت معلق نگه می‌دارد. در مقابل، انبوهش (فلوکولاسیون) و سپس درهم‌آمیختگی^۱ عامل اصلی ناپایداری و افزایش اندازه ذرات است. بنابراین یکی از فرایندهایی که باعث ناپایداری سیستم‌های کلوتیدی می‌شود، انبوهش ذرات طی زمان نگهداری است. نیروهای جذبی بین ذرات باعث چسبیدن آنها به هم و تشکیل ساختارهای بزرگتر می‌شود و اگر فرایندهای ته‌نشینی و شناور شدن ذرات نانولیپوزومی در زمان نگهداری سیستم لیپوزومی رخ دهد، نشان‌گر توده شدن ذرات است. در دمای محیط، لیپوزوم‌ها به دلیل سیالیت بالای غشاء، تغییر شکل داده و لخته تشکیل می‌دهند که افزایش اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات گسترده و ناهمگون را در پی خواهد داشت.

در مطالعه‌ی صورت گرفته، همه‌ی تیمارها طی ۳۰ روز نگهداری، توزیع ذرات باریک و همگن داشتند اما توزیع اندازه‌ی ذرات تیمار آخر (غلظت ۳۰-۳۰ میلی‌گرم لستین به کلسترول) در طی مدت نگهداری بصورت ناهمگون بوده و همین تیمار نیز بیشترین افزایش اندازه را نسبت به سایر تیمارها داشت. شکل (۴ ب) شاخص پراکنش ذرات (اسپن) نمونه‌های با غلظت‌های مختلف لستین به کلسترول را بعد از گذشت ۳۰ روز نشان می‌دهد.

در ارتباط با تأثیر کلسترول در پایداری ذرات می‌توان این‌طور بیان کرد که کلسترول در مقادیر بهینه با افزایش سفتی غشاء و افزایش پتانسیل زتا، موجب افزایش دفع الکترواستاتیک بین ذرات شده و از فرایند به هم‌آمیخته‌شدن جلوگیری می‌کند و موجب افزایش پایداری اندازه ذرات می‌گردد و در مقادیر بالا احتمالاً موجب گسیختگی غشاء می‌شود (بنگ و همکاران، ۲۰۱۱). گروه هیدروکسیل واقع در سر کلسترول در مجاورت گروه‌های کربونیل استر لیپیدی قرار گرفته و حلقه آگریز کلسترول، موازی با زنجیره‌های آسیل لستین قرار می‌گیرد. افزایش کلسترول منجر به افزایش سفتی ساختار و کاهش سیالیت غشا و کاهش توده‌ای شدن وزیکول‌ها می‌شود. همین عامل ممکن است منجر به افزایش دمای انتقال فاز شود (تسنگ و همکاران، ۲۰۰۷). هرچه پیوندهای هیدروژنی بین گروه هیدروکسیل کلسترول و گروه کربونیل فسفولیپید افزایش یابد، پایداری دو لایه‌ای لیپیدی افزایش خواهد یافت. در فاز ژلی، افزودن کلسترول تحرک زنجیره‌های آسیل را افزایش داده و منجر به افزایش سیالیت غشای



روز نگهداری	روز اول	روز هفتم	روز چهاردهم	روز سی‌ام
لستین:کلاسترول ۶۰:۴۰ (میلی‌گرم)	81	97	118	154
لستین:کلاسترول ۵۰:۵۰ (میلی‌گرم)	76	81	86	97
غلظت ۴۰:۶۰ لستین:کلاسترول	115	104	178	290
غلظت ۳۰:۷۰ لستین:کلاسترول	90	145	126	348



شکل ۴-الف): تأثیر زمان نگهداری بر اندازه‌ی ذرات در غلظت‌های مختلف لستین به کلاسترول نانولیپوزوم‌های حاوی ۲/۴ میلی‌گرم ویتامین A پالمیتات (حروف غیر مشابه نشان دهنده‌ی وجود اختلاف در سطح ۵٪ در آزمون دانکن است) و ب): شاخص پراکنش ذرات در غلظت‌های مختلف لستین به کلاسترول نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین A پالمیتات بعد از گذشت ۳۰ روز.

نشان داد پس از گذشت ۳۰ روز نگهداری، کاهش ۳۲ درصدی ویتامین A پالمیتات در نانولیپوزوم‌ها رخ داد. علت کاهش ویتامین در طی مدت زمان می‌تواند مربوط به انتشار و خروج ترکیب فعال از ساختار نانوحامل و همچنین تجزیه‌ی هیدرولیتیکی و اکسیداسیون آن باشد. از جمله عوامل موثر بر پایداری درون‌پوشانی نانولیپوزوم‌ها می‌توان به ماهیت ماده‌ی فعال؛ ماهیت و مقدار فسفولیپید مورد استفاده؛ ماهیت و مقدار پایدارکننده؛ شرایط محیطی و دما اشاره کرد. در ارتباط

بررسی پایداری درون‌پوشانی (پایداری ویتامین A پالمیتات) بررسی میزان پایداری ویتامین کپسوله شده در نانولیپوزوم بهینه (غلظت ۵۰-۱۰ میلی‌گرم لستین به کلاسترول) در دمای ۴°C طی مدت یک ماه و در بازه‌های زمانی توسط دستگاه HPLC انجام شد. در جدول ۲ پایداری درون‌پوشانی محلول لیپوزومی بهینه در طی روزهای اول، دهم، بیستم و سی‌ام نگهداری ارائه شده است. نتایج

اسیدهای چرب غیر اشباع، تثبیت زنجیره‌های فسفولیپیدی را کاهش داده و تا حدی سبب هیدراسیون و حضور آب در دولایه‌ی وزیکول می‌شود و در نتیجه منجر به سیالیت و انعطاف‌پذیری غشاء می‌شود (لیکومجورن و همکاران، ۲۰۰۹؛ بوراب و همکاران، ۲۰۱۴؛ حسن و همکاران، ۲۰۱۴).

یکی دیگر از عوامل پایداری ویتامین کپسوله شده در مدت نگهداری، نگهداری فرمولاسیون در تاریکی و دور از نور و در دمای پایین است. به‌طور کلی، وزیکول‌های لیپیدی نفوذپذیری کمی نسبت به مواد محصور شده دارند. اما در دماهای بالاتر، آن‌ها متحمل تغییر فاز شده و خصوصیات نفوذپذیری آن‌ها تغییر می‌کند (فتیحی و همکاران، ۲۰۱۲). هم‌چنین افزایش دما باعث افزایش حرکات براونی لیپیدها در وزیکول‌ها شده و منجر به آرایش مجدد گروه‌های سر لیپیدی شده و به‌طور افزایشی گروه‌های فسفاتیدیل لیپوزوم‌ها در معرض محیط قرار می‌گیرند (تیلور و همکاران، ۲۰۰۵؛ تیلور و همکاران، ۲۰۰۷). محمدحسینی و همکاران (۱۳۹۲) نیز در ارتباط با تأثیر دما بر پایداری نانولیپوزوم‌ها بیان کردند نشت بیشتر ماده‌ی فعال از وزیکول‌های نگهداری شده در دماهای بالاتر به اثر دما بر تغییر فاز ساختار دولایه‌ی لیپیدی از حالت ژل به کریستال مایع (مزوفاز) مربوط است که منجر به تجزیه‌ی شیمیایی فسفولیپیدها و نقص در چیدمان غشاء می‌شود.

کو و لی (۲۰۱۰)، بر روی پایداری نانولیپوزوم‌های حاوی رتینول تحت شرایط تاریکی و نور UV و در دماهای (۳۷، ۲۵ و ۴) تحقیقاتی انجام دادند. نتایج آن‌ها نشان داد که پایداری نانولیپوزوم‌های حاوی رتینول، تحت شرایط تاریکی افزایش می‌یابد. در رابطه با دماهای نگهداری، رتینول در دماهای بالاتر سریع‌تر تجزیه شده و بیشترین حفاظت نانولیپوزوم حاوی رتینول در دمای ۴°C و تحت شرایط تاریکی به‌دست آمد که احتمالاً به دلیل کاهش نفوذپذیری غشا نسبت به اکسیژن، نور و کاهش اکسیداسیون و هیدرولیز فسفولیپید است.

در مورد تأثیر افزودن کلسترول بر پایداری لیپوزوم‌ها نیز لیو و همکاران (۲۰۰۰) به این نتیجه رسیدند که کلسترول از طریق سفت کردن ساختار غشا و افزایش پتانسیل زتا و دفع الکتروستاتیک بین ذرات باعث پایداری لیپوزوم‌ها می‌شود.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق اثر غلظت لستین - کلسترول بر تولید و خصوصیات فیزیکی شیمیایی نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین A پالمیتات تولید شده به روش تشکیل لایه نازک و با استفاده از امواج فراصوت بررسی شد. نتایج نشان داد، استفاده از امواج فراصوت در تکمیل روش لایه نازک، منجر به تشکیل نانولیپوزوم‌هایی با توزیع یکنواخت و

با تأثیر ماهیت ماده‌ی فعال می‌توان گفت که مواد لیپوفیل بعد از کپسوله شدن در دو لایه‌ی فسفولیپیدی قرار می‌گیرند و زنجیره‌های آسیل فسفولیپید محیط مناسبی برای آن‌ها فراهم می‌کنند و از اکسیداسیون و تجزیه‌ی هیدرولیکی در امان خواهند ماند. سه مزیت اصلی برای درون‌پوشانی ترکیبات چربی‌دوست در نانولیپوزوم‌ها عبارت است از پایداری شیمیایی بالا، سرعت رهایش پایین و کارایی درون‌پوشانی بالا (ایکسا و ایکسو، ۲۰۰۵).

جدول ۲- پایداری فیزیکی محلول ساختار لیپوزومی بهینه (غلظت ۱۰-۵۰ میلی گرم کلسترول - لستین) در طی روزهای اول،

دهم، بیستم و سی نهمه‌داری	
روز نگهداری	درصد پایداری
اول	۱۰۰٪
هفتم	۷۸/۸۲٪
پانزدهم	۷۳/۷۲٪
سی ام	۶۸/۰۹٪

در پژوهش‌های پیشین گزارش شده است که درون‌پوشانی رتینیل پالمیتات با استفاده از نانولیپوزوم‌های تهیه شده از یک فراکسیون خالص فسفولیپید به همراه ۹۰٪ فسفاتیدیل کولین، از تجزیه‌ی رتینیل پالمیتات در برابر اکسیداسیون ناشی از تابش اشعه خورشید جلوگیری می‌کند (آرسیک و وولتا، ۱۹۹۹). پاداموار و پوخارکار (۲۰۰۶)، نیز کارایی کپسولاسیون ۹۸٪ برای نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین E به دست آوردند که آن‌ها نیز نتایج به‌دست آمده را به لیپوفیل بودن ماده کپسوله شده نسبت دادند. علی‌رغم مطالعات پیشین، احتمالاً در این تحقیق، کاهش ویتامین A پالمیتات درون‌پوشانی شده در طی مدت نگهداری به علت حضور ویتامین در دو لایه فسفولیپید و افزایش سیالیت غشا به دلیل بی‌نظمی بیشتر و نظم‌گیری مجدد زنجیره‌های فسفولیپید بوده و این امر منجر به خروج ترکیب فعال می‌شود. در این راستا بوراب و همکاران (۲۰۱۴) نیز گزارش کردند حضور ترکیب درون‌پوشانی شده در دولایه‌ی غشاء فسفولیپید، موجب افزایش سیالیت غشاء و هم‌چنین کاهش دانسیته‌ی این ناحیه از غشاء نسبت به سایر مناطق دو لایه می‌شود.

کالاگتو و همکاران (۲۰۰۷) تفاوت مهم موجود در پروفایل رهاسازی ترکیب فعال محبوس در ساختار نانوحامل را به دو فاکتور مهم نسبت دادند: ۱- قدرت و میزان برهم‌کنش‌ها میان ترکیب فعال و لیپید. ۲- سیالیت و نفوذپذیری دولایه‌ی وزیکول. بدین ترتیب که با افزایش سیالیت دولایه، نشت و خروج ترکیب فعال به محیط آبی در اطراف وزیکول‌ها افزایش می‌یابد. حضور اسیدهای چرب اشباع موجب تثبیت لایه‌های فسفولیپید و دفع آب و کشانده شدن آن به مجاورت سطح دو لایه وزیکول و کاهش سیالیت غشاء می‌شود. از طرف دیگر

مناسب در تولید فرمولاسیون بهینه نانولیپوزوم با کارایی درون پوشانی ۱۵ /۸ درصد شناخته شد و می‌توان این‌طور نتیجه‌گیری کرد که با اینکه استفاده از روش هیدراسیون لایه نازک به کمک امواج فراصوت، روشی موفق در تولید نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین A پالمیتات و کاهش ذراتی پایدار در مقیاس نانو در طول زمان بوده است، ولی با توجه به کارایی و پایداری درون‌پوشانی پایین، استفاده از سایر نانوحامل‌ها در درون‌پوشانی ویتامین A پالمیتات پیشنهاد می‌شود.

تک‌مد گردید. ارتباط مستقیم بین غلظت لستین و کارایی درون پوشانی وجود دارد، به طوری که با افزایش غلظت لستین با حفظ حالت نانولیپوزومی تک‌لایه، درصد بارگیری ویتامین A پالمیتات افزایش یافت. همچنین افزودن کلاسترول بیشتر بر پایداری اندازه ذرات در طول زمان موثر بود و تغییر معنی‌داری را در اندازه‌ی ذرات هنگام تشکیل لیپوزوم ایجاد نکرد. پایداری الکترواستاتیک نانولیپوزوم‌ها نیز با ورود کلاسترول و همچنین ویتامین به ساختار نانولیپوزوم افزایش یافت. غلظت ۵۰ به ۱۰ میلی‌گرم لستین به کلاسترول بعنوان غلظت

منابع

- Alexander, M., Lopez, A.A., Fang, Y. and Corredig, M. (2012). Incorporation of phytosterols in soy phospholipids nanoliposomes: Encapsulation efficiency and stability. *LWT- Food Science and Technology*, 47, 427-436.
- Arsic, I., and Vuleta, G. (1999). Influence of liposomes on the stability of vitamin a incorporated in polyacrylate hydrogel. *International Journal of Cosmetic Science*, 21(4), 219-225.
- Bang, S.H., Hwang, I.C., Yu, Y.M., Kwon, H.R., Kim, D.H., and Park H.J. (2011). Influence of chitosan coating on the liposomal surface on physicochemical properties and the release profile of nanocarrier systems. *Journal of Microencapsulation*, 28(7), 595-604.
- Bouarab, L., Maherani, B., Kheirloom, A., Hasan, M., Aliakbarian, B., Linder, M., Arab-Tehrany, E. (2014). Influence of lecithin-lipid composition on physico-chemical properties of nanoliposomes loaded with a hydrophobic molecule. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 115, 197-204.
- Calvagno, M.G., Celia, C., Paolino, D., Cosco, D., Iannone, M., Castelli, F., Doldo, P., and Fresta, M. 2007. Effects of lipid composition and preparation conditions on physical-chemical properties, technological parameters and in vitro biological activity of gemcitabine-loaded liposomes. *Current Drug Delivery*, 4, 89-101.
- Chanda, H., Das, P., Chakraborty, H. and Ghosh, A. (2011). Development and evaluation of liposomes of fluconazole. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Sciences*, 5, 2230-7885.
- Colas, J.C., Shi, W.L., Rao, V.S.N.M., Omri, A., Mozafari, M.R., and Singh, H. (2007). Microscopical investigations of nisin-loaded nanoliposomes prepared by Mozafari method and their bacterial targeting. *Micron*, 38, 841-847.
- Das, S., Chaudhury, A. (2011). Recent advances in lipid nanoparticle formulations with solid matrix for oral drug delivery. *American Association of Pharmaceutical Scientists (AAPS)*, 12(1), 62-76
- De Vost, P., Faas, M. M., Spasojevic, M., & Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20(4), 292-302.
- Fan, M., Xu, Sh., Xia, Sh. And Zhang, X. (2008). Preparation of salidroside nano-liposomes by ethanol injection method and in vitro release study. *European Food Research and Technology*, 227, 167-174.
- Fathi, M., Mozafari, M.R. & Mohebbi, M. (2012). Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*, 1-15.
- Fatouros, D.G., and Antimisariis, S.G. (2002). Effect of amphiphilic drugs on the stability and zeta-potential of their liposome formulations: A study with prednisolone, diazepam, and griseofulvin. *Journal of Colloid and Interface Science*, 251, 271-277.
- Gibis, M., Zeeb, B., Weiss, J. (2014). Formation, characterization, and stability of hibiscus extract in multilayered liposomes. *Food Hydrocolloids*, 38, 28-39.
- Gonnet, M., Lethuaut, L., and Boury, F. (2010). New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. *Journal of Controlled Release*, 146, 276-290.
- Hasan, M., Belhaj, N., Benachour, H., Barberi-Heyobb, M., Kahn, C.J.F., Jabbari, E. Linder, M., Arab-Tehrany, E. (2014). Liposome encapsulation of curcumin: Physico-chemical characterizations and effects on MCF7 cancer cell proliferation. *International Journal of Pharmaceutics*, 461, 519- 528
- Hamishehkar, H., Emami, J., Rouholamini Najafabadi A., Gilani, K., Minaian 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.
- Jesorka, A. and Orwar, O. (2008). Liposomes: technologies and analytical applications. *Annual Review of Analytical Chemistry*, 1, 801-832.
- Keller, B.C. (2001). Liposomes in nutrition. *Trends in Food Science and Technology*, 12, 25-31.
- Klang, V., Matsko, N.B., Valenta, C., and Hofer, F. 2012. Electron microscopy of nanoemulsions: *An essential tool for*

- characterisation and stability assessment. Micron*, 43, 43(2-3), 85–103.
- Ko, S., and Lee, S.-ch. (2010). Effect of nanoliposomes on the stabilization of incorporated retinol. *African Journal of Biotechnology*, 9, 6158-6161.
- Laridi, R., Kheadr, E.E., Benech, R. O., Vuilleumard, J. C., Lacroix, C. and Fliss, I. (2003). Liposome encapsulated nisin Z: optimization, stability, and release during milk fermentation. *International Dairy Journal*, 13, 325–336.
- Lee, S. C., Yuk, H. G., Lee, D. H., Lee, K. E., Hwang, Y. I., & Ludescher, R. D. (2002). Stabilization of retinol through incorporation into liposomes. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 35(4), 358-363.
- Leekumjorn, S., Cho, H.G., Wu, Y., Wright, N.T., Sum, A.K., and Chan, C. (2009). The Role of Fatty Acid Unsaturation in Minimizing Biophysical Changes on the Structure and Local Effects of Bilayer Membranes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)*, 1788, 1508–1516.
- Liang, X., Mao, G., and Ng, K.Y.S. (2004). Mechanical properties and stability measurement of cholesterol-containing liposome on mica by atomic force microscopy. *Journal of Colloid and Interface Science*, 278, 53-62.
- Liu, D.Z., Chen, W.Y., Tasi, L.M., and Yang, S.P. (2000). Microcalorimetric and shear studies on the effects of cholesterol on the physical stability of lipid vesicles. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering*, 172, 57–67.
- Liu, N., Park, H.J. (2010). Factors effect on the loading efficiency of Vitamin C loaded chitosan-coated nanoliposomes. *Colloids and Surfaces B, Biointerfaces*, 76(1), 9-16.
- Marsanasco, M., Marquez, A. L., Wagner, J.R., Alonso, S. V. & Chiamoni, N.S. (2011). Liposomes as vehicles for vitamins E and C: An alternative to fortify orange juice and offer vitamin C protection after heat treatment. *Food Research International*, 1-35.
- Miller, W.L. (2007). Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1771, 663–76.
- Mohammadhasani, Z., Ghanbarzadeh, B., Hamishehkar, H., RezaieMokaram, R. and Yaerhosseini, M. 2013. Gamma Oryzanol Bearing Nanoliposome Produced by Modified Thermal Method: Thermal Property, Encapsulation Efficiency, Oscillatory Rheometry. *Iranian Journal of Polymer Science and Technology*, 26 (5): 413-425.
- MohammadiM., Ghanbarzadeh B., Hamishehkar, H., RezayiMokarram R, Mohammadifar, MA. Physical properties of vitamin D3 loaded nanoliposomes prepared by thin layer hydration – sonication 2013. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 8(4): 175-188.
- Mozafari, M.R., Flanagan, J., Matia-Merino, L., Awati, A., Omri, A., Suntres, Z. and Singh, H. (2006). Recent trends in the lipid-based nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 86, 2038–2045.
- Mura, P., Maestrelli, F., González-Rodríguez, M.L., Michelacci, I., Ghelardini, C., and Rabasco, A.M. (2007). Development, characterization and in vivo evaluation of benzocaine-loaded liposomes. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 67, 86-95.
- Nagle, J. F. and Tristram-Nagle, S. (2000). Structure of lipid bilayers. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1469, 159-195.
- Padamwar, M. N., and Pokharkar, V. B. (2006). Development of vitamin loaded topical liposomal formulation using factorial design approach: drug deposition and stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 320, 37-44.
- Rao, R. and McClements, D.J. (2012). Food-grade microemulsions and nanoemulsions: Role of oil phase composition on formation and stability. *Food Hydrocolloids*. 29: 326-334.
- Rasti, B., Jinap, S., Mozafari, M. R. and Yazid, A. M. (2012). Comparative study of the oxidative and physical stability of liposomal and nanoliposomal polyunsaturated fatty acids prepared with conventional and Mozafari methods. *Food Chemistry, in press paper*.
- Singh, A.K., and Das, J., (1998). Liposome encapsulated vitamin A compounds exhibit greater stability and diminished toxicity. *Biophysical Chemistry*, 73, 155-162.
- Talor, T. M., Gaysinsky, S., Davidson, P. M., Bruce, B. D. and Weiss, J. (2007). Characterization of antimicrobial bearing liposomes by zeta-potential, vesicle size and encapsulation efficiency. *Food Biophysics*, 2: 1–9.
- Taylor, T.M., Davidson, P.M., Bruce, B., and Weiss, J. (2005). Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 587–605.
- Teseng, L.P., Liang, H.J., Chung, T.W., and Liu, T. Z. (2007). Liposome incorporated with cholesterol for drug release triggered by magnetic field. *Journal of Medical and Biological Engineering*, 27, 29-34.
- Thompson, A., Haisman, D., and Singh, H. (2006). Physical stability of liposomes prepared from milk fat globule membrane and soya phospholipids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 6390-6397
- Viriyaraj, A., Ngawhirunpat, T., Sukma, M., Akkaramongkolporn, P., Ruktanonchai, U. & Opanasopit, P. (2009). Physicochemical properties and antioxidant activity of gamma-oryzanol-loaded liposome formulations for topical use. *Pharmaceutical development and technology*, 6, 665–671.

- Xia, F., Hu, D., Jin, H., Zhao, Y. and Liang, J. (2010). Preparation of lutein proliposomes by supercritical anti-solvent technique. *Food Hydrocolloids*, 26, 456-463.
- Xia, S., and Xu, S. (2005). Ferrous sulfate liposomes: preparation, stability and application in fluid milk. *Food Research International*, 38, 289-296.
- Yang, Y., C., Marshal-Breton, M., Leser, A., Sher, and D.J., McClements, (2012). Fabrication of ultrafine edible emulsions: comparison of high-energy and low-energy homogenization methods. *Food Hydrocolloids*. 29, 398- 406.
- Yurdugul, S. & Mozafari, M.R. (2004). Recent advances in micro- and nanoencapsulation of food ingredients. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 9, 64-65.

Vitamin A palmitate-loaded nanoliposomes: study of particle size, zeta potential, efficiency and stability of encapsulation

B. Ghanbarzadeh^{1*}, A. Pezeshky², H. Hamishehkar³, M. Moghadam⁴

Received: 2014.08.17

Accepted: 2015.05.03

Introduction: The encapsulation of hydrophobic nutraceutical compounds such as fat soluble vitamins in nanoliposomes is a potentially effective way to protect them from light, oxygen and chemical degradation during the maintenance. One of the potential benefits of liposomal structures is encapsulation of three water-soluble, fat-soluble and amphiphilic compounds and use of natural food ingredients such as lecithin with beneficial effects, in their production. In this study, the effect of lecithin-cholesterol concentrations on particle size, particle size distribution, encapsulation efficiency (EE) and physical stability of vitamin A palmitate loaded nanoliposome during the storage time were explored to get the optimized formulation

Materials and method:

Materials:

Phospholipid (L- α -granular Lecithin) with purity of 99% was obtained from Across (USA). Cholesterol with 95% purity was supplied by Merck (Germany). Other chemicals were analytical grade and procured from Sigma (Merck Chemical Co. Darmstadt, Germany).

Methods:

Nanoliposomes were prepared from different concentrations of lecithin-cholesterol (60:0, 50:10, 40:20 and 30:30 mg) by thin-film hydration-sonication method. Lecithin and cholesterol were dissolved in absolute ethanol and then dried with vacuum evaporator. Prepared dried lipid film hydrated by aqueous phase. The resultant suspension was mixed for some time (Hydration-dehydration). Due to existence of water inside the lipid film, osmotic pressure runs the water into bilayer membrane and causes separation of lipid film and then liposomes were produced. In this method, mixture of Multilamellar Vesicles (MLVs) and Small Unilamellar Vesicles (SUVs) liposomes were produced. Reduction in particle sizes of prepared liposomes was done by ultra sound probe sonicator. The average diameter and span value of the particles were determined using particle size analyzer (Wing SALD 2101, Shimadzo, Japan), at 25°C and was calculated according to the DeBroukere mean in the Equation (1):

$$\bar{D}[4,3] = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3}$$

The span value is an index helpful to evaluate the particle size distribution and calculated applying the following Equation:

$$Span = \frac{D_{90\%} - D_{10\%}}{D_{50\%}}$$

Morphology of the nano-carriers was observed using trans- mission electron microscopy (Zeiss-Leo 906 TEM (Germany). To determine the zeta potential of nano liposomes loaded vitamin A, Zeta sizer device (Nano-ZS -Malvern England) was used at 25°C temperature. Estimation of encapsulated vitamin in nanoliposomes (%EE) was carried out using HPLC (Knauer, Germany) equipped with a UV detector, C-18(10 mm 25mm 4.6 mm) column and acetonitrile- methanol (70:30%,v/v) as mobile phase and was calculated using the below equation

- 1- Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
 - 2- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
 - 3- Associated Professor, Pharmaceutical Sciences, Pharmaceutical Technology Laboratory, Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences
 - 4- Professor of Crop Production and Plant breeding, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.
- (*Corresponding author: Ghanbarzadeh@tabrizu.ac.ir)

$$\%EE = \frac{\text{Encapsulated Vitamin A}}{\text{Total Vitamin A}} \times 100$$

The stability of vitamin A loaded-nanoliposomes was assessed by determining the average particle size at 4 °C over storage time and studying the leak out of the vitamin from the nanoliposomes after one month (1, 7, 15 and 30 days) of storage at 4 °C by the below equation

$$\%Stability = \frac{\text{Remained Vitamin A}}{\text{Initial encapsulated Vitamin A}} \times 100$$

Results and Discussion: Results showed use of sonication in completion thin-film hydration method, induced production of monomodal nanoliposomes with uniform distribution. The particle size was in the range of 76-115 nm and particle size distribution was monomodal (span= 0.6- 0.88). In agreement with particle size results, TEM image showed that the vesicles are in the form of small unilamellar vesicles by bilayer nature. In all concentrations of lecithin-cholesterol, obtained EE was low and by increasing the lecithin concentration, loading capacity of nano liposomes increased. By increasing the lecithin concentration, more vesicles are produced which causes increase in internal volume of liposomes and bio actives concentrate, consequently loading capacity of nano liposomes increased. By tightening of the membrane by cholesterol, entrapment efficiency of hydrophobic active compounds such as vitamin A palmitate reduces. Also probably existence of cholesterol in liposome membrane inhibits of rupture and changes in liposome membrane. Overall, increasing the ratio of cholesterol /lecithin had no significant effect on particle size but decreased encapsulation efficiency of vitamin A palmitate to 10.23%. Addition of cholesterol effected on stability of the particle size of nanoliposomes and also led to reduction encapsulation efficiency of vitamin A palmitate. Incorporation of cholesterol and vitamin A palmitate into the liposome structure was increased the zeta potential from -29 to -58 mv and improved electrostatic stability. 50-10 mg ratio of lecithin-cholesterol concentration was used for preparation of optimum formulation of nanoliposome by monomodal and small size distribution (76 nm, span=0.74) and encapsulation efficiency (15.8%). Stability of vitamin A in nano liposome with 50-10 mg lecithin-cholesterol, was almost low (32% reduction during storage time), may be due to increasing fluidity of membrane. Permeability of vitamin A into phospholipid chains causes reorientation of acyl chains which leads to fluidity of membrane and exit active compound from nano carrier and more its hydrolytic degradation and oxidation. While the use of thin film hydration method using ultrasonic waves, is successful way in producing nanoscale particles of vitamin A palmitate nanoliposomes that are stable and decrease over time, but due to low efficiency and low sustainability of encapsulation, use of other nanocarriers for encapsulating of vitamin A palmitate is recommended

Keywords: Nanoliposome, Vitamin A Palmitate, Encapsulation, Physical Stability.