

## تعیین ویژگی‌های نانولیپوزوم‌های حامل گاما اوریزانول توسط طیف سنجی فرو سرخ، اندازه وزیکول، پتانسیل زتا، پایداری فیزیکی و رئولوژی پایا

زهرا محمد حسنی<sup>۱</sup> - بابک قنبرزاده<sup>۲\*</sup> - حامد همیشه کار<sup>۳</sup> - رضا رضایی مکرّم<sup>۴</sup>

تاریخ دریافت: ۱۳۹۱/۱۰/۲۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۲/۴/۱۰

### چکیده

استفاده از حلال‌های آلی و نیروهای برشی بالا در تکنیک‌های متداول تولید نانولیپوزوم‌ها، کاربرد آن‌ها را به عنوان حامل مواد غذا-دارو (نوتریسیتیکال‌ها) در صنایع غذایی محدود کرده است. هدف از انجام این پژوهش، تولید سیستم نانولیپوزومی حاوی آنتی‌اکسیدان گاما اوریزانول با روش حرارتی اصلاح شده می‌باشد. نانولیپوزوم‌ها با استفاده از لسیتین و محلول گاما اوریزانول تهیه شدند. اندازه ذرات و پتانسیل زتا، با روش پراکنش نور لیزری تعیین شدند و نوع برهم‌کنش‌های ایجاد شده بین نانوحامل و گاما اوریزانول با آزمون طیف سنجی فرو سرخ بررسی شدند. آزمون‌های کدورت، پایداری و خواص رئولوژیکی نیز برای تعیین خواص فیزیکوشیمیایی نانولیپوزوم‌ها انجام گرفتند. طبق نتایج طیف سنجی، برهم‌کنش‌های ایجاد شده بین گاما اوریزانول و لسیتین از نوع فیزیکی ضعیف بودند. با توجه به نتایج آزمون اندازه گیری ذرات، متوسط قطر حجمی و توزیع اندازه ذرات (اسپن) به ترتیب در محدوده ۹۰-۱۱۰ نانومتر و ۰/۶۹-۰/۹۰ بودند. پتانسیل زتا و میزان بارگیری گاما اوریزانول  $mV$  ۴/۲۰- و ۱۵/۷٪ گزارش شدند. نمونه‌ها در طی مدت زمان نگهداری در دمای  $4^{\circ}C$  پایدار ماندند. با افزایش غلظت لسیتین کدورت سیستم افزایش یافت. ویسکوزیته محلول‌های لیپوزومی با افزایش سرعت برشی ثابت ماند (رفتار نیوتنی) که نشان دهنده حضور ذرات کوچک و عدم وجود ذرات لخته شده بالا و پایداری خوب محلول‌ها بود.

واژه‌های کلیدی: گاما اوریزانول، نانولیپوزوم، روش اصلاح یافته حرارتی، پایداری

### مقدمه

طبیعی، برای بهبود پایداری مواد غذایی بکار رود. همچنین ویژگی‌های درمانی نظیر بازدارندگی از انواع سرطان‌ها، بیماری‌های قلبی-عروقی، هیپرکلسترولمی، انسداد شرایین قلب و تجمع پلاکت‌های خون به آن نسبت داده شده است (Lin & Lai, 2001). گاما اوریزانول ترکیبی محلول در چربی، ناپایدار و قابل تجزیه در طی اکسیداسیون می‌باشد و بنابراین به آسانی دسترسی زیستی آن کاهش یافته و کاربرد آن در سیستم‌های غذایی محدود گردیده است. در نتیجه، بکارگیری راهکارهایی برای کنترل رهاش، جلوگیری از اثرات نامطلوب محیط و جذب بهتر آن ضروری می‌باشد. نانوانکپسولاسیون ترکیبات زیست فعال حساس، تکنیکی بسیار موثر برای مقابله با عوامل مخرب محیطی می‌باشد. انکپسولاسیون آنتی‌اکسیدان‌ها و دیگر ترکیبات نوتریسیتیکال در نانوحامل‌های لیپیدی، موجب افزایش دسترسی زیستی، رهاش کنترل شده و پایداری بالاتر آنها در مواد غذایی می‌گردد (Mozafari et al., 2011, Mozafari et al., 2006). لیپوزوم‌ها یا وزیکول‌های (گوپچه) لیپیدی نوعی حامل لیپیدی هستند که از تجمع مولکول‌های آمفی‌فیلیک مانند لیپیدهای قطبی در دیسپرسیون‌های آبی ساخته شده و تمایل به تولید غشاهای دو لایه-

ترکیبات غذا-دارو (نوتریسیتیکال) و فراسودمند طبیعی موجود در مواد غذایی، شامل انواع ویتامین‌ها، کاروتنوئیدها، آنتوسیانین‌ها و فلاوونوئیدها، آنتی‌اکسیدان‌ها، استرول‌ها، ترکیبات طعم‌دهنده و رنگ‌دهنده‌ها و مواد ضد میکروبی می‌باشند. آنتی‌اکسیدان‌های غذایی ترکیبات مغذی هستند که توانایی به تاخیر انداختن و یا جلوگیری از پیشرفت واکنش‌های تند شدگی و دیگر فسادهای طعمی ناشی از اکسیداسیون را دارا هستند (Mozafari et al., 2006). گاما اوریزانول ترکیبی غذا-دارو و شامل چندین نوع فرولات‌های فیتواسترول‌های موجود در پوسته برنج (مانند کامپسترول، بتا سیتو استرول و سیکلو آرتنول) بوده و می‌تواند به عنوان آنتی‌اکسیدانی

۱، ۲ و ۴- به ترتیب دانشجوی کارشناسی ارشد، دانشیار و استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز  
(\* - نویسنده مسئول: Email: babakg1359@yahoo.com)  
۳- استادیار مرکز تحقیقات داروئی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

فیزیکوشیمیایی ذرات در طی نگهداری در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  مشاهده نشد. نتایج مقایسه لیپوزومها (اندازه بالاتر از ۲۰۰ نانومتر) و نانولیپوزومها (اندازه ۲۰۰-۵۰ نانومتر) نشان داد که نانوذرات حاوی ماده فعال، بار سطحی، پایداری فیزیکی و اکسیداتیو بالاتری داشتند. استفاده از حلال های غیرآلی (آب و  $\text{CO}_2$ ) در تولید لیپوزومها باعث پایداری اکسیداتیوی اسید های چرب غیر اشباع کپسوله شده گردید. در اکثر روش های تولید لیپوزوم ها، کلسترول در ساختار نانولیپوزوم به منظور ایجاد تعادل در سیالیت لیپیدهای غشاء دو لایه ای و افزایش پایداری وزیکولها مورد استفاده قرار می گیرد. کلسترول نوعی استرول حیوانی محسوب می شود و مقادیری از طریق رژیم غذایی روزانه وارد بدن شده و مقادیری نیز توسط خود بدن ساخته می شود. بین بیماریهای قلبی-عروقی و سطح کلسترول خون رابطه نزدیکی وجود دارد و بنابراین استفاده از این ماده در تولید لیپوزوم ها چندان مناسب به نظر نمی رسد (Alexander et al., 2012). از طرفی، اکثر تکنیک های ساخت نانولیپوزومها (هیدراسیون لایه نازک بنگهام، اوپراسیون فاز معکوس، دفع دترجنت، سونیکاسیون، اکستروژن و هموژنیزاسیون تحت فشار بالا) شامل بکارگیری حلال های آلی سمی (کلرفرم، متانول، دی اتیل اتر و استون) یا نیروهای برشی بالا می باشند. باقیماندن این حلالها در فرمولاسیون نهایی لیپوزومها باعث ایجاد سمیت در محصول شده و بر پایداری وزیکول های لیپیدی تأثیر می گذارد (Mozafari et al., 2006, 2011). هدف از این پژوهش، تولید نانولیپوزوم های پایدار حاوی گاما اوریزانول با استفاده از روش حرارتی اصلاح یافته (بدون استفاده از کلسترول و حلال های آلی در فرمولاسیون لیپوزومی)، جهت کاربرد در بهبود پایداری اکسیداتیو و تولید مواد غذایی فراسودمند می باشد.

## مواد و روش ها

**مواد:** فسفاتیدیل کولین (لسیتین) از شرکت ACROS ORGANICS بلژیک و گاما اوریزانول از شرکت Tsuno Rice Chemicals co., Ltd ژاپن خریداری شدند. پلی اتیلن گلیکول ۴۰۰ (PEG<sub>400</sub>) و سایر مواد از شرکت مواد شیمیایی مرک (Merck Chemical Co. Darmstadt, Germany) تهیه شدند.

### تهیه محلول گاما اوریزانول و بررسی حالیت آن

۲۰ میلی گرم گاما اوریزانول به مقادیر مختلف پلی اتیلن گلیکول، پروپیلن گلیکول و گلیسرول در حجم های ۲، ۵ و ۱۰ cc افزوده شد. سپس به مدت دو ساعت توسط دستگاه همزن مغناطیسی در دمای  $40^{\circ}\text{C}$  و دور ۴۰۰ rpm هم زده شد. میزان حالیت و پایداری گاما اوریزانول در هر سه حلال با استفاده از آزمون پایداری در برابر میزان آب مقطر افزوده شده، مورد بررسی قرار گرفت.

ای دارند. این غشاها، نسبتاً انعطاف پذیرند و با بکارگیری انرژی کافی (سونیکاسیون، هموژنیزاسیون و حرارت دهی) و تحت نیروی برشی، شکل منحنی به خود می گیرند و تشکیل وزیکول هایی را می دهند. اندازه لیپوزومها از ۱۰ نانومتر تا ۱۰ میکرومتر، بسته به روش تولید آنها متفاوت است و بر اساس ساختارشان طبقه بندی می شوند: وزیکول های تک غشایی (ULVs)<sup>۱</sup> شامل یک پوسته غشایی دو لایه ای می باشند، وزیکول های چند غشایی (VsML)<sup>۲</sup> شامل غشاء های دو لایه متحدالمرکز می باشند و وزیکول های مولتی وزیکولار (VsMV)<sup>۳</sup> شامل لیپوزوم های کوچک با مرکزهای متفاوت که در یک غشاء لیپیدی دو لایه احاطه شده اند، می باشند (Mozafari et al., 2008, Mozafari et al., 2010). به دلیل حضور هر دو فاز لیپیدی و آبی در ساختار وزیکولهای لیپیدی، آنها می توانند در انکپسوله کردن، تحویل و رهاسازی ترکیبات آمفی فیلیک، آبدوست و آبگریز استفاده شوند، این در حالی است که اغلب سیستم های انکپسولاسیون، می توانند تنها یک نوع ترکیب را انکپسوله کنند. در لیپوزوم ها، ترکیبات چربی دوست، در میان غشای دو لایه ای و ترکیبات آبدوست نیز در داخل لیپوزوم، انکپسوله می شوند (Mozafari et al., 2008). پایداری فیزیکی لیپوزومها توسط فاکتورهایی نظیر کارایی انکپسولاسیون<sup>۴</sup> و توزیع اندازه ذرات<sup>۵</sup> تعیین می شود. فرایندهای فیزیکی مانند توده ای شدن<sup>۶</sup> و امتزاج<sup>۷</sup> بر ماندگاری سیستم های لیپوزومی اثر گذاشته که نتیجه این فرایندها نشأت بیشتر ماده فعال انکپسوله شده و تغییرات در اندازه ذرات می باشد. افزایش برهمکنش های دفعی بین ذرات مانند دافعه الکتروستاتیکی ناشی از بارهای همنام و ممانعت فضایی گروه های حجیم مانند پلی اتیلن گلیکول، پایداری لیپوزومها را بهبود می دهند (Mozafari et al., 2008, Alexander et al., 2012).

Liue و همکاران (۲۰۱۱) در مطالعه ای، ویژگی های فیزیکوشیمیایی لیپوزوم های حاوی پلی فنل چای (تهیه شده با روش اولتراسونیک لایه نازک) را مورد بررسی قرار دادند. آن ها میانگین اندازه ذرات و پتانسیل زتا را به ترتیب  $160/4$  نانومتر و  $-67/2$  میلی ولت گزارش کردند. Rasti و همکاران (۲۰۱۲) با استفاده از دو روش حرارتی و هیدراسیون لایه نازک، لیپوزومها و نانولیپوزوم های حاوی اسیدهای چرب امگا سه (اکوزاپنتنوئیک و دوکوزاهکزانوئیک اسید) را تولید کردند. آن ها بیان کردند که تغییر قابل توجهی در ویژگی های

- 1- Unilamellar vesicles
- 2- Multilamellar vesicles
- 3- Multivesicular vesicles
- 4- Encapsulation efficiency
- 5- Size distribution
- 6- Aggregation
- 7- Fusion

## روش تهیه لیپوزوم‌ها

ابتدا غلظت‌های مناسبی از لسیتین (۳، ۵، ۱۰ و ۲۰٪) هیدراته شده به محلول گامااوریزانول (۲۰ میلی گرم در ۵cc پلی اتیلن گلیکول ۴۰۰) افزوده و به بشر ۲۵۰cc مقاوم به حرارت حاوی بافل (ایجاد جریان توربولانت) منتقل شدند. سپس ۵cc حلال پلی اتیلن گلیکول ۴۰۰ نیز افزوده و با ۴۰cc آب دوبار تقطیر به حجم رسانده شد. در نهایت مخلوط حاصله به مدت یک ساعت با دور ۱۰۰۰ rpm در دمای ۷۰°C همزده شد (دستگاه بلندمدل RER شرکت IKA کشور آلمان). به منظور پایداری محلول لیپوزومی بدست آمده به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت و بعد در دمای ۴°C نگهداری شد (Mozafari et al., 2008, Alexander et al., 2010).

طیف سنجی فروسرخ (FT-IR)<sup>۱</sup>

نمونه‌های تهیه شده ابتدا به کیسه‌های دیالیز جهت حذف حلال منتقل شده و سپس توسط گاز نیتروژن منجمد شده و با استفاده از دستگاه خشک کن انجمادی در دمای ۵°C- و فشار ۰/۱ میلی بار خشک شدند (دستگاه لیوفیلیزاتور مدل Christ α ۱-۴ ساخت آلمان). سپس پودر لیوفیلیزه شده و برمید پتاسیم با نسبت‌های ۱ به ۱۰ مخلوط شده و آسیاب شدند. سپس در دستگاه تهیه قرص با استفاده از دستگاه پرس به مدت ۲ دقیقه و فشار ۶۰ کیلو نیوتن، به شکل قرص در آمدند. پس از آن قرص‌هایی حاصل از لسیتین، گامااوریزانول و پودرهای خشک شده لیپوزوم‌های حاوی گامااوریزانول و بدون آن، برای آنالیز در دستگاه FTIR قرار گرفتند (Lieu et al., 2011).

## تعیین اندازه و توزیع اندازه ذرات

توزیع اندازه ذرات و قطر متوسط آن‌ها در دستگاه آنالیز کننده اندازه ذرات (مدل SALD 2101 ساخت ژاپن) بر اساس روش تفرق نور لیزر 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:

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

$n_i$ : تعداد ذرات

$d_i$ : قطر میانگین ذرات

توزیع اندازه ذرات نیز با استفاده از معادله زیر محاسبه شد:

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

D(90%): قطری که حجم ذرات کوچکتر از آن، ۹۰٪ حجم کل ذرات موجود در سیستم را تشکیل می‌دهد.

D(50%): قطری که حجم ذرات کوچکتر از آن، ۵۰٪ حجم کل ذرات موجود در سیستم را تشکیل می‌دهد (قطر میانه).

D(10%): قطری که حجم ذرات کوچکتر از آن، ۱۰٪ حجم کل ذرات موجود در سیستم را تشکیل می‌دهد.

## پتانسیل زتا

برای تعیین پتانسیل زتای لیپوزوم‌ها و نمونه‌های حاوی گامااوریزانول، از دستگاه زتا سائزر (Nano-ZS ساخت شرکت Malvern کشور انگلستان) استفاده شد. نمونه‌ها نخست با استفاده از آب مقطر ۵۰ برابر رقیق شدند. اندازه‌گیری پتانسیل زتا محلول لیپوزومی در pH=۷/۴ و در دمای ۲۵°C و توان ۱۴۹ وات انجام شد (Fatouros & Antimisariis, 2002).

رتندمان بارگیری<sup>۲</sup>

جهت اندازه‌گیری میزان گامااوریزانول محصور شده در لیپوزوم‌ها از دستگاه اسپکتوفتومتر ماورای بنفش- مرئی (مدل Ultrospec 2000 ساخت انگلیس) استفاده شد. ابتدا گامااوریزانول آزاد در محلول لیپوزومی با استفاده از سانترفیوژ (مدل Hettich EBA 20 ساخت آلمان) با دور ۵۰۰rpm به مدت ۱۰ دقیقه جداسازی شد. ۱cc از آن را برداشته و روی آن ۵ میلی لیتر کلروفرم اضافه می‌کنیم و بعد جهت تکان دادن در شیکر انکوباتور در دمای ۴۰°C به مدت ۱۵ دقیقه قرار داده شد (این مرحله باعث انحلال غشاء لیپوزومی شده و گامااوریزانول‌های محصور شده آزاد شدند). در نهایت جذب فاز کلرفرمی توسط دستگاه در حداکثر شدت جذب گامااوریزانول (طول موج ۳۱۹ نانومتر) خوانده شد. شاخص بارگیری توسط معادله ۳ محاسبه شد (Viriyaraj et al., 2009).

$$\text{بارگیری لیپید} = \frac{\text{گاما اوریزانول اندازه گیری شده در لیپوزوم}}{\text{میزان اولیه لیپید}} \times 100 \quad (3)$$

## بررسی اثر دما بر پایداری فیزیکی

به منظور بررسی پایداری فیزیکی سیستم، محلول لیپوزومی تهیه شده در دو تیوپ ۱۵cc ریخته شده و در دماهای ۴ و ۲۵°C نگهداری و در بازه‌های زمانی ۷، ۱۵، ۳۰ و ۶۰ روز بررسی شدند. آزمون‌های تعیین درصد کارایی کپسولاسیون و اندازه ذرات در این دماهای نگهداری و بازه‌های زمانی، برای ارزیابی پایداری نمونه‌ها انجام گرفتند (Lieu et al., 2011). درصد انکپسولاسیون توسط دستگاه اسپکتوفتومتر همانند شاخص بارگیری اندازه‌گیری و توسط

معادله ۴ محاسبه شد (Viriyaraj *et al.*, 2009).

(۴)

$$100 \times \frac{\text{گاما اوریزانول اندازه گیری شده در لیپوزوم}}{\text{گاما اوریزانول افزوده شده}} = \text{درصد انکپسولاسیون}$$

### کدورت

کدورت لیپوزوم‌های حاوی گاما اوریزانول و بدون آن، در دستگاه کدورت سنخ Heydolp (مدل TN-100 ساخت آلمان) و در عدد موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شدند.

### آزمون رئولوژیکی پایا

هدف از ارزیابی خواص رئولوژیکی، دسترسی به اطلاعاتی راجع به ساختار نانوذرات و همچنین خواص حسی سیستم مدل و تأثیر دما (۴ و ۲۵ °C) و مدت زمان نگهداری بر پایداری سیستم نانولیپوزومی می‌باشد، زیرا به جهت تولید سیستمی پایدار باید از عدم تشکیل لخته و نامطلوب شدن خواص اورگانولپتیکی محصول، اطمینان حاصل کرد. اندازه‌گیری ویژگی‌های رئولوژیکی نمونه‌های نگهداری شده (۱ روز و ۱ ماه) در دمای ۲۵ °C با استفاده از دستگاه رئومتر Physica Anton Paar (مدل MCR 301 ساخت کشور اتریش) مجهز به رئومتری استوانه‌های هم مرکز انجام شد. برای اندازه‌گیری تنش برشی و ویسکوزیته به صورت تابعی از سرعت برشی و تعیین نوع رفتار جریان‌ی نمونه‌ها در یک فاصله زمانی ۱۰ دقیقه، سرعت برشی از  $2 \text{ s}^{-1}$  به  $100 \text{ s}^{-1}$  رسید.

### تجزیه و تحلیل آماری

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 SPSS (version 16.0 for Windows, Inc) در سطح احتمال ۵٪ ( $P < 0.05$ ) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای تأیید وجود اختلاف بین میانگین‌ها انجام گرفت.

### نتایج و بحث

#### بررسی حلالیت گاما اوریزانول

روش حرارتی بیشتر برای ترکیباتی مورد استفاده قرار می‌گیرد که محلول در آب هستند ولی گاما اوریزانول محلول در آب نمی‌باشد و بنابراین ابتدا استفاده از کمک حلال‌ها را مورد بررسی قرار دادیم که هم گاما اوریزانول در آن محلول باشد و هم با آب امتزاج پذیر باشد. نتایج آزمایشگاهی نشان داد که گاما اوریزانول در حلال PEG<sub>400</sub> نسبت به سایر حلال‌ها مانند پروپیلن گلیکول، پلی اتیلن گلیکول ۳۰۰ و گلیسرول، حلالیت بالاتری دارد و ظاهر محلول کاملاً شفاف است.

این نوع حلال‌ها قابلیت امتزاج با آب را نیز دارند. ولی گاما اوریزانول حل شده در ۱۰ cc حلال PEG<sub>400</sub>، هنگام افزودن آب مقاومت بالاتری نسبت به سایر حلال‌ها در برابر محلول شدن داشت و با اضافه کردن میزان آب بیشتر، حلالیت آن کاهش یافت. همان طور که گفته شد گاما اوریزانول ترکیبی با ماهیت آبگریز و در نتیجه کم محلول در آب می‌باشد. در اکثر روش‌های متداول تولید لیپوزوم‌ها، از حلال‌های آلی جهت محلول سازی و انکپسوله کردن ترکیبات چربی دوست استفاده می‌شود. حذف کامل این نوع حلال‌ها در سیستم نهایی تولید شده، امکان پذیر نمی‌باشد و در نتیجه بر پایداری لیپوزوم‌ها و کیفیت نهایی محصول اثر منفی می‌گذارند. روش حرارتی تکنیکی ساده جهت تولید لیپوزوم‌ها می‌باشد که از حلال‌های آلی سمی در فرمولاسیون لیپوزومی استفاده نمی‌شود. این روش با بکارگیری آب به عنوان حلال، بیشتر برای انکپسوله کردن ترکیبات آبدوست بکار می‌رود، ولی در این پژوهش با کمی تغییر در روش حرارتی توانستیم ترکیبات چربی دوست مانند گاما اوریزانول را بدون نیاز به حلال‌های آلی و با استفاده از کمک حلال PEG<sub>400</sub>، حل کرده و در یک سیستم آبی وارد ذرات لیپوزومی کنیم.

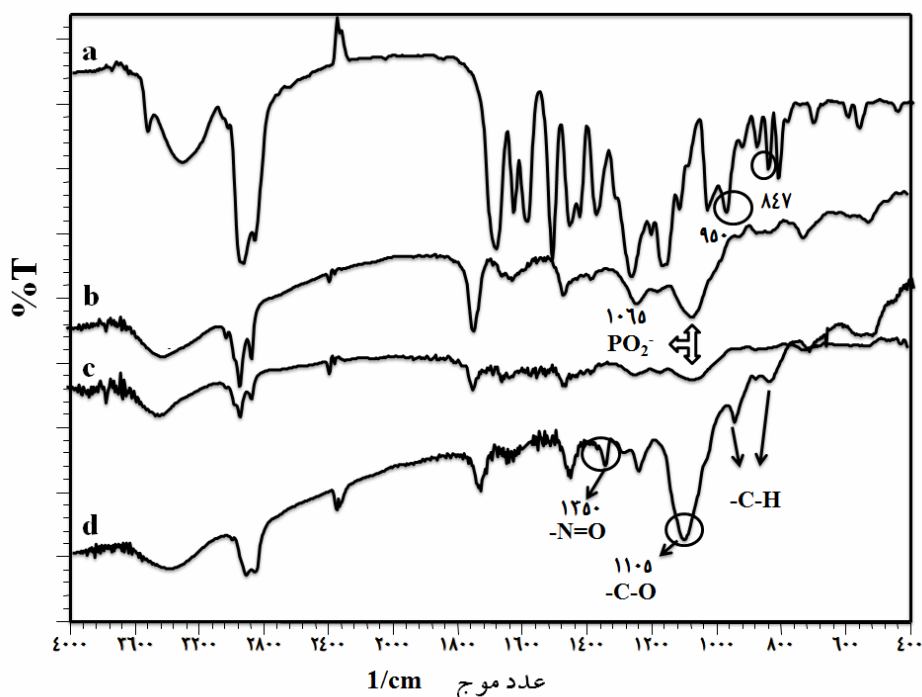
#### طیف سنجی فروسرخ (FT-IR)

آنالیز طیف‌سنجی فروسرخ، به منظور شناسایی گروه‌های شیمیایی لسیتین و گاما اوریزانول و تشخیص انکپسولاسیون گاما اوریزانول در لیپوزوم‌ها و شناسایی برهمکنش‌های احتمالی ایجاد شده بین آن‌ها، مورد ارزیابی قرار گرفت. در شکل ۱، طیف فروسرخ مربوط به نمونه‌های خالص گاما اوریزانول، لسیتین، نانولیپوزوم حاوی گاما اوریزانول و بدون آن نشان داده شده است. با توجه به شکل ۱-a پیک پهن کربونیلی مسطح در محدوده فرکانس  $1732-1654 \text{ cm}^{-1}$ ، حاکی از پیوند استری بین فرولیک اسید و فیتواسترول در ساختار گاما اوریزانول است و در عدد موجی  $3400 \text{ cm}^{-1}$  پیک پهنی مشاهده شد که پیوند هیدروژنی گروه OH- فرولیک اسید را نشان می‌دهد. ارتعاشات کششی مربوط به گروه‌های C-O- آن در عدد‌های موج  $1155 \text{ cm}^{-1}$  و  $1266 \text{ cm}^{-1}$ ، پیک‌های جذب را نشان دادند (Bucci *et al.*, 2003). شکل ۱-b طیف مربوط به لسیتین خالص را نشان می‌دهد. ارتعاشات کششی گروه عاملی C-H- (آلکان) در  $\text{CH}_2$  متقارن و  $\text{CH}_2$  نامتقارن و ارتعاش خمشی  $\text{CH}_2$  موجود در ساختار لسیتین به ترتیب در اعداد موج  $2858 \text{ cm}^{-1}$ ،  $2930 \text{ cm}^{-1}$  و  $1462 \text{ cm}^{-1}$  دیده می‌شوند. همچنین عدد موجی  $1740 \text{ cm}^{-1}$  مربوط به گروه استر آلیفاتیک (ارتعاش کششی گروه عاملی C=O-) است. ارتعاشات کششی گروه‌های عاملی  $\text{PO}_2^-$  و P-O-C موجود در ساختار لسیتین پیک‌هایی در فرکانس  $1200 \text{ cm}^{-1}$  و  $970 \text{ cm}^{-1}$  (ماکزیمم جذب در عدد موج ۱۰۶۵) نشان می‌دهند (Kuligowski *et al.*, 2008). با

حاوی گامااوریزانول با طیف IR لیپوزوم خالی و لسیتین، پیک تیزی در عدد موج  $847\text{ cm}^{-1}$  در طیف IR لیپوزوم حاوی گامااوریزانول دیده می‌شود. این دو پیک مربوط به ارتعاشات خمشی گروه‌های C-H- آلکن در ساختار گامااوریزانول می‌باشند که دلالت بر انکیسوله شدن آن دارند. پهن تر شدن پیک موجود در محدوده فرکانس  $3550\text{ cm}^{-1}$ -  $3100$  نشان می‌دهد که شدت پیوند هیدروژنی بوجود آمده ( احتمالاً بین گروه OH- فرولیک اسید گامااوریزانول و گروه‌های کربونیل - C=O در استرهای اسید چرب موقعیت‌های sn-1 و sn-2 ساختار لسیتین) (Hennalu et al., 2011)، در ساختار لیپوزوم حاوی گامااوریزانول افزایش یافته است.

در طیف IR مربوط به لیپوزوم حاوی گامااوریزانول، پیک موجود در عدد موج  $1065\text{ cm}^{-1}$  مربوط به گروه عاملی  $\text{PO}_2^-$  در ساختار لسیتین و پیک پهن در محدوده فرکانس  $1732\text{ cm}^{-1}$ -  $1654$  مربوط به گروه عاملی C=O- گامااوریزانول به فرکانس  $1105\text{ cm}^{-1}$  انتقال یافته اند و همچنین میزان جذب در این فرکانس افزایش یافته است. احتمالاً به دلیل وجود بار منفی موجود در گروه فسفات لسیتین، جفت الکترون آزاد آن به کربن الکترون دوست استر  $\text{R}_1\text{-C=O-R}_2$  حمله کرده و ایجاد برهم کنش ضعیفی بین  $\text{PO}_2^-$  و C=O- می‌کند که در نهایت موجب ایجاد پیکی با شدت جذب بیشتر در عدد موج  $1105\text{ cm}^{-1}$  شده که مربوط به ارتعاشات کششی C-O- است.

توجه به شکل ۱- b و c پیک‌های مربوط به لیپوزوم بدون گامااوریزانول (شکل ۱- c) شبیه به لسیتین خالص در اعداد موج  $3430$ ،  $2930$ ،  $2858$ ،  $2374$ ،  $1740$ ،  $1651$ ،  $1646$ ،  $1243$ ،  $1164$ ،  $1065$ ،  $1460$  و  $722\text{ cm}^{-1}$  هستند که نشان می‌دهد لیپوزوم‌ها از لسیتین تشکیل شده اند. با توجه به شکل ۱- c و d در فرکانس‌های  $2930$ ،  $2858$ ،  $2374$ ،  $1740$ ،  $1651$ ،  $1460$  و  $1105\text{ cm}^{-1}$  -  $1243$  پیک‌های مربوط به لیپوزوم حاوی گامااوریزانول (شکل ۱- d) و نانولیپوزوم‌های خالی مشابه هم هستند (Lieu et al., 2011). با مقایسه طیف‌های IR مربوط به لسیتین خالص و لیپوزوم‌های حاوی گامااوریزانول و بدون آن چهار تغییر (حضور پیک جدید و یا انتقال پیک‌های اصلی) در طیف لیپوزوم حاوی گامااوریزانول نسبت به طیف لیپوزوم خالص در اعداد موج  $847$ ،  $950$ ،  $1105$  و  $1350\text{ cm}^{-1}$  دیده می‌شود که دلالت بر حضور گامااوریزانول در ساختار لیپوزوم‌ها دارد. از آنجا که گروه‌های عاملی مختلف، دارای جذب در فرکانس‌های مشخصی هستند و تغییر در ساختار مواد سبب تغییر در فرکانس‌های جذبی می‌شود، اسپکتروسکوپی IR به عنوان وسیله‌ای مناسب در تشخیص و نمایش تغییرات ساختاری در مواد معرفی می‌شود. در شکل ۱ پیک مربوط به عدد موج  $978\text{ cm}^{-1}$  در طیف IR - گامااوریزانول به عدد موج  $950\text{ cm}^{-1}$  در طیف IR نانولیپوزوم حاوی گامااوریزانول انتقال یافته است. همچنین با مقایسه طیف IR لیپوزوم



شکل ۱- طیف‌های FTIR : گامااوریزانول (a)، لسیتین (b)، نانولیپوزوم (c)، نانولیپوزوم حاوی گامااوریزانول (d)

آمیختن (کوالسنس) آنها و کاهش اندازه ذرات می شود (Xu & Godber, 2011). قرار گرفتن گاما اوریزانول در ساختار دولایه ای منجر به افزایش دانسیته چیدمان مولکول های فسفولیپیدی می شود. این مولکول در هنگام تبدیل ساختارهای لاملار به وزیکول ها در بین حفره های مولکولی تشکیل شده توسط آنها قرار می گیرد. در پژوهشی با اندازه گیری فشار سطحی مشاهده شد که مساحت موثر هر مولکول فسفولیپید به ازای قرار گرفتن هر مولکول ترکیب فعال کاهش می یابد (محمد و همکاران، ۲۰۰۸). همچنین در پژوهش دیگری نشان داده شد که افزودن گاما اوریزانول باعث کاهش اندازه ذرات لیپوزوم های حاوی فسفاتیدیل کولین/۳-دی متیل آمینو-پروپان سولفات و فسفاتیدیل کولین/سدیم توروکولات شد (Viriyaroj et al., 2009). شکل ۲ منحنی های توزیع اندازه ذرات نمونه در غلظت های مختلف لسیتین (۳، ۵، ۱۰ و ۲۰٪) بدست آمده در دستگاه آنالیز اندازه ذرات را نشان می دهد. هرچه قدر اسپن کمتر باشد، پهنای نمودار توزیع اندازه ذرات کمتر و سیستم همگن تر خواهد بود. توزیع اندازه ذرات برای تمام نمونه ها با غلظت های متفاوت لسیتین تک مد بود. یعنی در نمونه ها یکنواختی محتوا و تکرارپذیری مشاهده می شود. نمونه هایی با توزیع اندازه باریک در برابر پدیده ناپایداری از نوع رسیدگی استوالد مقاوم تر هستند. می توان نتیجه گرفت که روش تولید مورد استفاده، مستقل از غلظت های متفاوت لسیتین، برای تولید لیپوزوم ها در اندازه های نانومتری و توزیع اندازه ذرات یکنواخت، مناسب می باشد.

### پتانسیل زتا

در این پژوهش برای مشخص شدن نحوه عمل نیروهای دافعه الکتروستاتیک بین ذرات نانولیپوزوم و میزان پایداری سیستم حاصل، از نتایج تحرک الکتروفوریتیک و پتانسیل زتا در جدول ۲ استفاده شد. فسفاتیدیل کولین و دیگر فسفولیپیدها تأثیر مهمی بر پتانسیل زتا وزیکول ها دارند. بار سطحی منفی (۶۱/۷ mV-) به دلیل یونیزاسیون گروه های آزاد موجود در سطح نانولیپوزوم ها است.

هنگامی که شاخص پتانسیل زتا در سیستم های کلئیدی، بالاتر از  $\pm 30$  میلی ولت باشد، ذرات از نظر نیروهای دافعه الکتروستاتیکی پایدار هستند. با توجه به جدول ۲، افزودن PEG<sub>400</sub> به لسیتین هیدراته شده در تهیه نانولیپوزوم ها، منجر به کاهش پتانسیل زتای منفی از ۶۱/۷- به ۱۹/۴- mV شد. کاهش پتانسیل زتا در اثر افزودن PEG را بدین صورت می توان توجیه کرد که احتمالاً زنجیره های PEG<sub>400</sub> به عنوان پوششی بر روی سطح لیپوزوم های با بار منفی قرار می گیرند و یا کشیده شدن و گسترش زنجیره های پلیمری از ساختارهای دولایه ای به محیط آبی، پتانسیل زتای منفی لیپوزوم ها را کاهش می دهد.

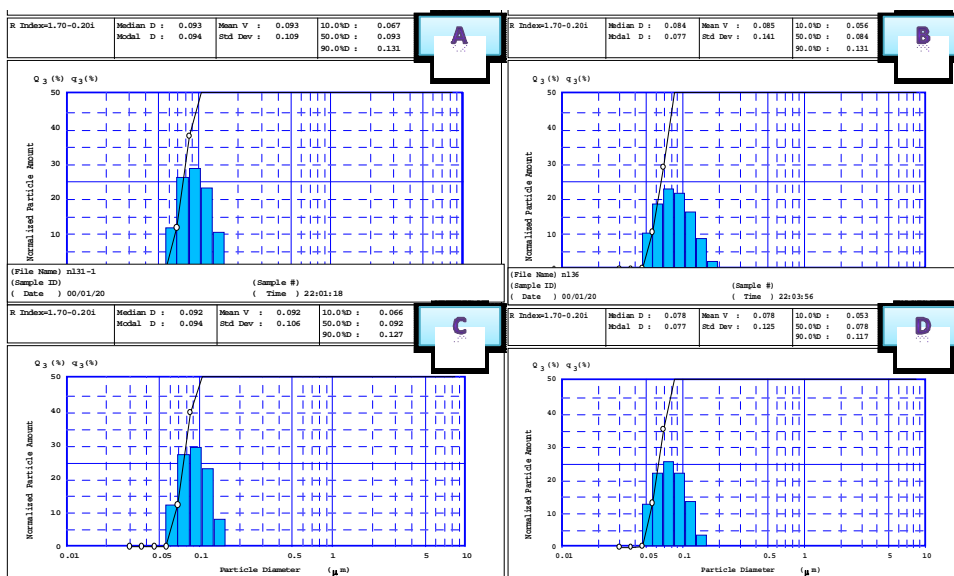
همان طور که در شکل ۱-d دیده شد در عدد موج  $1350 \text{ cm}^{-1}$  پیکی جدید با شدت جذب کم در ساختار لیپوزوم های حاوی گاما اوریزانول بوجود آمده است که مربوط به ارتعاشات کششی  $\text{N}=\text{O}$  می باشد. دلیل این امر را می توان به این صورت بیان کرد که احتمالاً گروه  $\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$  موجود در ساختار لسیتین حاوی اوریتال خالی است و به شدت الکترون دوست می باشد و با جفت الکترون آزاد گروه OH اسید فرولیک در ساختار گاما اوریزانول تشکیل پیوند ضعیف داتیو داده و در اثر رزونانس جفت الکترون های  $\pi$  حلقه بنزن به صورت موقت به پیوند ضعیف  $\text{N}=\text{O}$  تبدیل می شود و پیک جدیدی در فرکانس  $1350 \text{ cm}^{-1}$  ایجاد می کند. با توجه به اینکه برهمکنش های ایجاد شده بین گاما اوریزانول و لسیتین از نوع فیزیکی ضعیف هستند و هیچ برهمکنش شیمیایی مهمی در طیف IR دیده نمی شود، می توان نتیجه گرفت که این دو ترکیب در ساختار نانولیپوزوم های حاوی گاما اوریزانول سازگار با هم هستند و گاما اوریزانول در ساختار لیپوزوم قرار گرفته است. این برهمکنش ضعیف بر شکل و اندازه لیپوزوم ها و الگوی رهایش ماده فعال از آنها تأثیر مثبتی دارد. در پژوهشی محققان با مقایسه اسپکتروم IR لسیتین، کلسترول، پلی فنل چای، لیپوزوم حاوی پلی فنل و بدون آن بیان کردند که طیف IR لیپوزوم تنها حاوی پیک های مهم موجود در طیف های لسیتین و کلسترول بود. وجود چندین پیک اصلی پلی فنل چای در اسپکتروم IR لیپوزوم حاوی پلی فنل حاکی از قرار گرفتن آن در ساختار لیپوزوم ها بود. هیچ پیک دیگری در طیف لیپوزوم حاوی پلی فنل مشاهده نشد و نتیجه گرفتند که لسیتین، کلسترول و پلی فنل چای از طریق پیوند فیزیکی ضعیفی با هم ترکیب شده اند و هیچ برهمکنش شیمیایی قوی بین آنها صورت نگرفته است (Lu et al., 2011).

### اندازه و توزیع اندازه ذرات

نتایج مربوط به اندازه گیری قطر متوسط اندازه ذرات در غلظت های مختلف لسیتین در جدول ۱ آورده شده است و نشان می دهد که متوسط قطر حجمی و توزیع اندازه ذرات (اسپن) به ترتیب در محدوده ۹۰-۱۱۰ نانومتر و ۰/۶۹-۰/۹۰ قرار دارند. همچنین اثر غلظت های مختلف لسیتین بر اندازه ذرات در سطح ۵٪ معنی دار نیست. در نتیجه می توان بیان کرد که تغییر در غلظت لسیتین در دامنه ۱۰۰۰-۱۵۰ میلی گرم تفاوتی در اندازه ذرات نانولیپوزوم های حاوی گاما اوریزانول ایجاد نمی کند. در جدول ۱ مشاهده می شود که افزودن گاما اوریزانول به عنوان یک ترکیب آگریز فیتواسترولی، همانند کلسترول منجر به کاهش اندازه ذرات نانولیپوزوم ها در غلظت های ۳٪ و ۵٪ لسیتین از ۹۲ و ۱۰۲ نانومتر به ترتیب به ۷۴/۶۷ و ۹۰/۶۷ نانومتر گردید. ساختار ترکیب فعال و نوع چیدمان آن در غشاء دولایه ای لیپیدی، تأثیر بسزایی بر اندازه ذرات دارد. به علت شباهت ساختاری گاما اوریزانول با کلسترول، می توان گفت که افزودن آن منجر به افزایش سفتی دیواره وزیکول ها و در نتیجه کاهش میزان هم

جدول ۱- تأثیر تغییر غلظت لسیتین افزودن گاما اوریزانول بر اندازه و توزیع اندازه ذرات

غلظت لسیتین mg ml <sup>-1</sup>	میانگین قطر حجمی ± (nm) انحراف معیار	span
۱۵۰	۱۰۲ ± ۷/۶۴	۰/۹۶ ± ۰/۱۴
۲۵۰	۹۲/۰۰ ± ۵/۱۲	۰/۶۶ ± ۱۳/۶۵
گاما اوریزانول / ۱۵۰	۹۰/۶۷ ± ۱۳/۶۵	۰/۸۹ ± ۰/۲۲
گاما اوریزانول / ۲۵۰	۷۴/۶۷ ± ۲۳/۶۹	۰/۶۹ ± ۰/۰۹۵
گاما اوریزانول / ۵۰۰	۶۶/۰۰ ± ۸/۶۶	۰/۷۹ ± ۰/۰۸۲
گاما اوریزانول / ۱۰۰۰	۱۰۸/۰۰ ± ۱۹/۰۰	۰/۹۰ ± ۰/۱۱



شکل ۲- توزیع اندازه ذرات در غلظت‌های مختلف لسیتین: (A) ۳٪، (B) ۵٪، (C) ۱۰٪ و (D) ۲۰٪

گلیکول ۲۰۰۰ به ساختار دولایه‌ای فسفاتیدیل کولین باعث کاهش پتانسیل زتای منفی ذرات شد و از ۱۹- به ۸- میلی ولت رسید (liv *et al.*, 2003). همچنین شاخص پتانسیل زتا لیپوزوم‌های حاوی گاما اوریزانول و بدون آن نیز مقایسه شدند تا تأثیر ماده فعال بر بار سطحی نانولیپوزوم‌ها مشخص شود. افزودن گاما اوریزانول باعث افزایش جزئی پتانسیل زتای منفی از ۱۹/۴- به ۲۰/۴- mV شد. برهم کنش بین پوشش لیپیدی و ماده فعال هسته‌ای تأثیر بسزایی بر پتانسیل زتا و پایداری وزیکول‌ها دارد. ماده فعال در شرایط آزمایشگاهی یونیزه نمی‌شود، بنابراین تأثیر ماده فعال گاما اوریزانول بر پتانسیل زتا منفی وزیکول‌ها، احتمالاً به دلیل تغییر در ساختار سطحی لیپوزوم‌ها و مکان یابی آن در درون و یا بر روی ساختار دولایه‌ای لیپیدی می‌باشد. ساختار گاما اوریزانول شبیه به کلسترول، یکی از اجزاء مهم غشاء سلولی می‌باشد و به همین دلیل احتمالاً به خوبی در تماس با فسفاتیدیل کولین و ساختار غشاء قرار می‌گیرد (Fatouros & Antimisariis, 2002) و Sakulku و همکاران

جدول ۲- مقایسه پتانسیل زتا نانولیپوزوم‌هایی با اجزاء متفاوت

ترکیب	پتانسیل زتا (mV)
نانولیپوزوم (۳٪)	-۶۱/۷
نانولیپوزوم (۳٪) همراه با PEG	-۱۹/۴
نانولیپوزوم (۳٪) / گاما اوریزانول	-۲۰/۴

PEG<sub>400</sub> هم به عنوان حلال و هم سورفاکتانت غیر یونی عمل کرده و ایجاد ممانعت فضایی در سطح لیپوزوم‌ها می‌نماید. قرار گرفتن آن در سطح بیرونی غشاء نانولیپوزوم‌ها موجب می‌شود که آن به عنوان یک مانع استریک عمل کرده و از تماس مستقیم وزیکول‌ها جلوگیری می‌کند (Wu *et al.*, 2011) و به عبارت دیگر استفاده از PEG موجب می‌شود که نوع پایداری لیپوزوم‌ها از دافعه الکترواستاتیک به نوع استریک (ممانعت فضایی) تغییر یابد. در پژوهشی مشابه، محققان، گزارش کرده اند که افزودن پلی اتیلن

ناپایداری در آنها محسوب می گردد. همان طور که مشاهده شد اندازه ذرات در دماهای بالاتر نگهداری نسبت به دماهای پایین تر بیشتر بود که می توان آن را به ناپایداری لیپوزومها در اثر تصادم<sup>۵</sup> و سپس ادغام و آمیختن غشاءهای لیپوزومی دو یا چندین لیپوزوم نسبت داد (Taylor & Gaysinsky, 2007). برخوردها احتمالاً به دلیل حرکات تصادفی ذرات (براونی) در محلول و یا به دلیل جابه جایی های ذرات بر روی یکدیگر می باشند. افزایش دما باعث افزایش احتمال برخوردهای بین ذرات شده (افزایش حرکات براونی لیپیدها در وزیکولها)، ولی در مقابل افزایش برهم کنش های دفعی منجر به کاهش تعداد برخوردها می شود. از طرف دیگر در دمای  $25^{\circ}\text{C}$ ، لیپوزومها به دلیل سیالیت بالای غشاء، آسانتر آمیخته شده و لخته تشکیل می دهند که افزایش اندازه ذرات با توزیع اندازه گسترده را در پی خواهد داشت. اندازه ذرات کوچکتر، باعث افزایش پایداری فیزیکی در برابر مکانیسم های ناپایداری مختلف می شود (Uhumwangho & Okor, 2005).

در طی نگهداری، وزیکولها تمایل دارند با هم ترکیب شده، لخته و توده تشکیل دهند و مواد کپسوله شده از وزیکولها نشت کنند. زیرا بارهای الکتروستاتیکی بر روی لیپیدهای قطبی بسیار کوچک هستند و نمی توانند از برخورد ذرات جلوگیری کنند. علاوه بر اثر دما بر فراوانی تصادم ذرات، آن بر میزان سیالیت و سفتی غشای دو لایه ای لیپوزومها موثر است. نشت بیشتر ماده فعال از وزیکولهای نگهداری شده در دماهای بالاتر، مربوط به اثر دما بر تغییر فاز ساختار دولایه ای لیپیدی از حالت ژل به کریستال مایع (حالت مزو فاز) بوده که موجب افزایش سیالیت و ایجاد نقص در چیدمان غشاء می شود (Bhatia *et al.*, 2004).

در تحقیقی مشابه، Wechtersbach و همکاران (۲۰۱۱) با بررسی تأثیر دمای نگهداری بر میزان نشت آسکوربیک اسید از نانولیپوزومها نتیجه گرفتند که لیپوزومهای نگهداری شده در دمای  $25^{\circ}\text{C}$  به مدت ۱۴ روز، پایداری کمتری نسبت به لیپوزومهای تازه تهیه شده داشتند و سرعت رهایش ماده فعال بالاتر بود.

### کدورت

جدول ۳ اثر غلظت های متفاوت لسیتین و افزودن گاما اوریزانول را بر میزان کدورت سیستم نشان می دهد. با افزایش غلظت لسیتین (۱۰٪-۳٪) افزایش در میزان کدورت سیستم مشاهده شد (بالاتر از ۸۰۰ NTU). با توجه به نتایج جدول ۳ کدورت نانولیپوزومهای (غلظت ۳ درصد لسیتین) حاوی PEG<sub>400</sub> (۴۷۰ NTU) بالاتر از نمونه های تهیه شده از آب (بدون PEG<sub>400</sub>) بود (۲۱۰ NTU).

(۲۰۰۷) پتانسیل زتای نانوذرات لیپیدی جامد حاوی گاما اوریزانول را مورد بررسی قرار دادند و گزارش کردند که افزودن گاما اوریزانول به SLN ها موجب افزایش پتانسیل زتا از ۱۸- به ۲۶- میلی ولت گردید.

### کارایی بارگیری (بارگیری نسبت به لیپید)

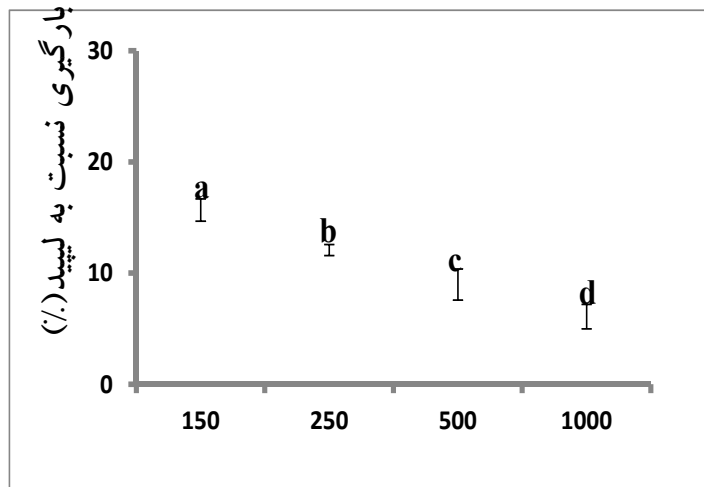
با استفاده از شاخص بارگیری نسبت به لیپید، میزان گاما اوریزانول انکپسوله شده در نانوحامل، در غلظت های متفاوت لیپید محاسبه شد. با توجه به شکل ۳ دیده می شود که با افزایش غلظت لسیتین میزان بارگیری نسبت به لیپید از ۱۵/۷ درصد به ۶/۱ درصد کاهش یافته است ( $P < 0.05$ ). افزایش مقادیر فسفولیپیدها اگرچه باعث بالا رفتن مقادیر کپسوله شده ماده فعال می شود ولی بارگیری ماده فعال (گاما اوریزانول) نسبت به لیپید را کاهش می دهد. اگرچه فسفولیپیدها به عنوان مواد زیستی غیر سمی تلقی می شوند، اما این نکته قابل توجه است که افزایش میزان لیپید بکار برده شده در حامل های لیپوزومی، کارایی بدن در هضم آن را کاهش می دهد. بنابراین توصیه می شود که میزان بارگیری نسبت به لیپید تا حد امکان بالا باشد و بهتر است که رهایش میزان معینی ترکیب فعال هسته ای در مکان هدف، با میزان کمتری لیپید به عنوان حامل صورت گیرد (Brandle, 2001). در نتیجه نمونه هایی با غلظت های پایین تر لیپید و کارایی انکپسولاسیون مناسب (غلظت های ۱۵۰ و ۲۵۰ میلی گرم لسیتین) به عنوان نمونه بهینه در نظر گرفته شدند.

### بررسی اثر دمای نگهداری بر پایداری فیزیکی

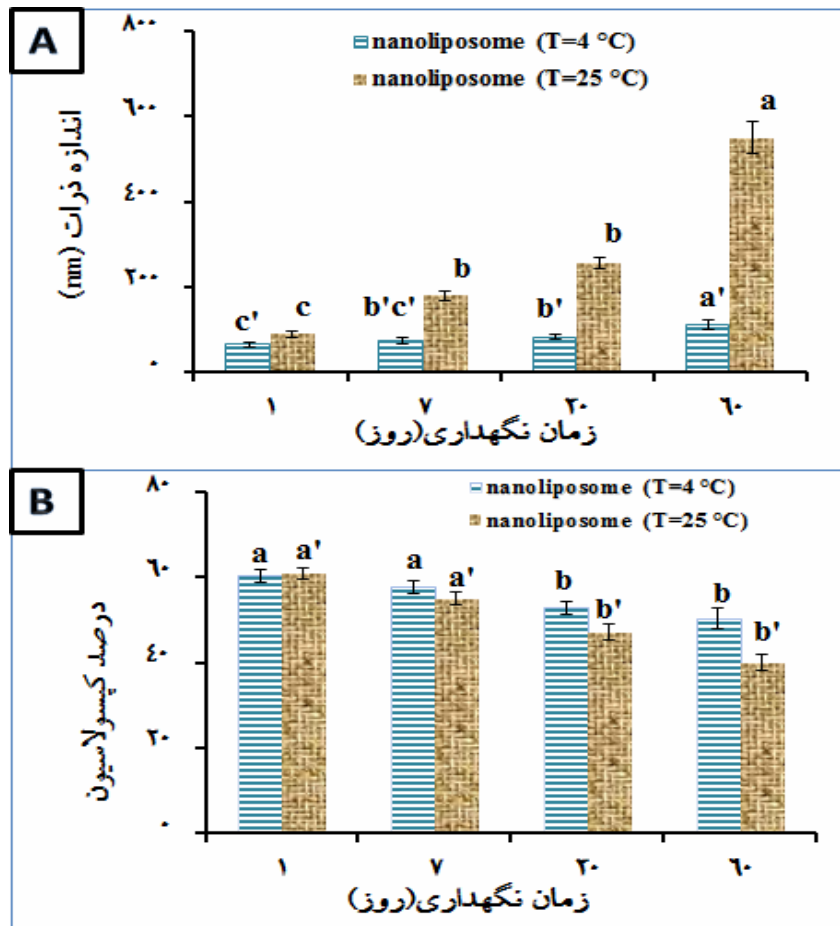
شکل ۴ تغییرات اندازه ذرات و درصد کپسولاسیون نمونه های (غلظت ۴ درصد لیپید) نگهداری شده در دو دمای  $4^{\circ}\text{C}$  و  $25^{\circ}\text{C}$  را بعد از دو ماه نشان می دهد. اندازه نمونه های نگهداری شده در دمای  $25^{\circ}\text{C}$  به مدت دو ماه بالاتر از دمای  $4^{\circ}\text{C}$  بوده و بطور معنی داری ( $P < 0.05$ ) از ۸۹ نانومتر به ۵۵۰ نانومتر افزایش یافت. با توجه به شکل ۴ درصد انکپسولاسیون نمونه های نگهداری شده در دمای  $25^{\circ}\text{C}$  کمتر از نمونه های نگهداری شده در دمای  $4^{\circ}\text{C}$  است و در طی نگهداری به مدت دو ماه بطور معنی داری از ۶۱ درصد به ۴۰ درصد کاهش یافت ( $P < 0.05$ ). به علت اینکه لیپوزومها از لیپیدهای قطبی ساخته می شوند و چگالی این لیپیدها نزدیک آب می باشد بر خلاف امولسیون ها، مکانیسم تفکیک گرانشی<sup>۱</sup> (رونشینی<sup>۲</sup>) عامل مهمی در ناپایداری فیزیکی آنها به شمار نمی رود ولی پدیده انبوهش<sup>۳</sup> (فلاکولاسیون) و هم آمیختگی<sup>۴</sup> (کوالسنس) مکانیسم های اصلی

- 1- Gravitational separation
- 2- Creaming
- 3- Flocculation
- 4- Coalescence





شکل ۳- تأثیر تغییر غلظت لسیتین بر بارگیری نسبت به لیپید (حروف غیر مشابه نشان دهنده وجود اختلاف در سطح ۵٪ در آزمون دانکن است)



شکل ۴- تأثیر همزمان دما (۴ و ۲۵ درجه سانتی گراد) و زمان نگهداری (۱، ۷، ۲۰ و ۶۰ روز) بر اندازه ذرات و درصد کپسولاسیون (حروف غیر مشابه نشان دهنده وجود اختلاف در سطح ۵٪ در آزمون دانکن است).

ویسکوزیته محلول، شیب منحنی نیز افزایش می‌یابد. آب جزء غالب دیسپرسیون های نانولیپوزومی را تشکیل می‌دهد و دارای ویسکوزیته پایینی است و ویسکوزیته این نوع سیستم‌ها تحت تاثیر ویسکوزیته فاز پراکنده است. با افزایش سرعت برشی، ویسکوزیته ثابت می‌ماند که نشان می‌دهد سیستم حاوی ذراتی است که لخته نشده‌اند و اندازه ذرات بسیار کم می‌باشد و این دلیل بر پایداری سیستم می‌باشد. شکل ۵ اثر غلظت‌های مختلف لسیترین (۵، ۱۰ و ۲۰ درصد) بر ویسکوزیته، در سرعت‌های برشی مختلف را نشان می‌دهد. با توجه به شکل مشاهده می‌شود که در سرعت‌های برشی پایین، یک افت شدید در مقدار ویسکوزیته وجود دارد، که می‌توان این مقدار افت اولیه را به کاهش اصطکاک در اثر هم مسیر شدن ذرات فاز پراکنده و غلبه نیروی برشی بر نیروی براونی نسبت داد. همچنین، نمودارهای ویسکوزیته-سرعت برشی نشان دادند که ویسکوزیته به سرعت برشی وابسته نیست و افزایش سرعت برشی، تأثیر چندانی بر ویسکوزیته محلول‌ها ندارد (شکل ۵). با توجه به شکل ۵، مشاهده می‌شود که محلول نانولیپوزوم با غلظت ۲۰ درصد لسیترین، نسبت به سایر غلظت‌ها دارای شیب و ویسکوزیته بیشتری است و با کاهش غلظت لسیترین، مقدار ویسکوزیته کاهش می‌یابد. به نظر می‌رسد که با افزایش غلظت فاز پراکنده، میزان افت انرژی ناشی از اصطکاک بین جریان فاز پیوسته و ذرات فاز پراکنده افزایش پیدا می‌کند و در نتیجه ویسکوزیته افزایش می‌یابد.

علاوه بر این، در دماهای ثابت، رابطه غیرخطی بین غلظت مواد محلول و ویسکوزیته وجود دارد و با افزایش غلظت مواد، ویسکوزیته افزایش می‌یابد. با توجه به نیوتنی بودن رفتار محلول‌های لیپوزومی در غلظت‌های مختلف انتخاب شده، می‌توان به این نتیجه رسید که محلول‌های فوق، محلول‌هایی رقیق بوده و هنوز به غلظت و کسر حجمی بحرانی نرسیده‌اند تا شاهد افزایش یکباره ویسکوزیته و ظهور رفتار سودوپلاستیک (روان شونده با برش) در آن باشیم. گراسی و همکاران (۲۰۰۶) ویژگی‌های رئولوژیکی سیستم‌های آبی آلژینات (پلی اورونیک) حاوی لیپوزوم‌ها را مورد بررسی قرار دادند. آن‌ها بیان کردند که در غلظت ۲۰ درصد پلی اورونیک و دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد، سیستم رفتار نیوتنی از خود نشان داد. در تحقیقی، تأثیر غلظت لیپید را بر ویژگی‌های رئولوژیکی نانوذرات لیپیدی جامد (SLN) حاوی گاما اوریزانول مورد بررسی قرار گرفت. نانوذرات کامپریترول حاوی گاما اوریزانول با محتوای لیپید ۵ درصد وزنی/وزنی، دیسپرسیون مایع با ویسکوزیته پایینی تولید کردند. در مقابل دیسپرسیون با غلظت ۱۰ درصد لیپید، ویسکوزیته بالاتر و حالت خامه ای و نیمه جامد داشتند (Seetapan et al., 2010). شکل ۶ نمودارهای ویسکوزیته-سرعت برشی نمونه (۲۰ درصد لسیترین) نگهداری شده در دو دمای ۴ و ۲۵ °C بعد از یک ماه را نشان می‌دهد.

همچنین کدورت سیستم‌های حاوی نانولیپوزوم‌های با گاما اوریزانول در غلظت ۳ درصد، بالاتر از نانولیپوزوم‌های بدون آن است. با توجه به جدول ۳، افزایش غلظت لسیترین، استفاده از پلی اتیلن گلیکول ۴۰۰ و افزودن گاما اوریزانول موجب افزایش کدورت محلول‌های لیپوزومی گردید.

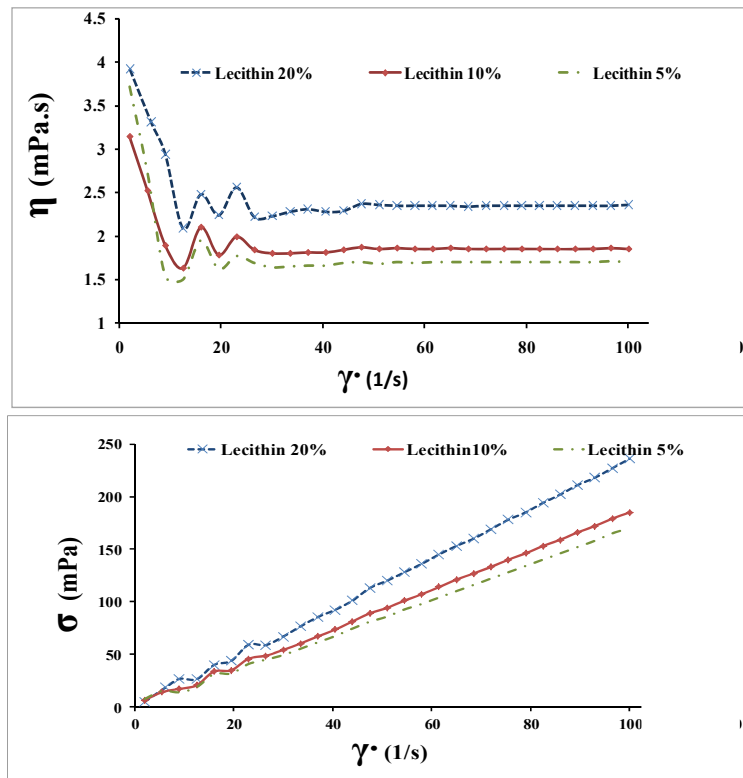
افزایش در میزان کدورت سیستم‌های کلوتیدی حاوی نانوذرات، به عوامل متعددی از جمله نوع ماده، تعداد و اندازه ذرات بستگی دارد. افزایش غلظت لسیترین منجر به افزایش تعداد وزیکول‌ها می‌شود. این عامل موجب پراکنش بیشتر نور و در نتیجه افزایش در کدورت سیستم می‌گردد. باید توجه کرد که غلظت لسیترین نباید از یک حد خاص (۵۰ میلی مولار) بالاتر رود، زیرا با اشباع شدن محلول، توده‌ای شدن رخ می‌دهد و مولکول‌های لسیترین تشکیل لیپوزوم نمی‌دهند و رسوب می‌کنند. با توجه به نتایج طیف‌سنجی فروسرخ، احتمالاً یکسری اتصالات جدید با ورود گاما اوریزانول به نانولیپوزوم‌ها تشکیل شده است. تشکیل اتصالات جدید کدورت سیستم را افزایش می‌دهد. همچنین وجود پلی اتیلن گلیکول هم در ساختار لیپوزوم‌ها و هم در محیط و نیز وجود ذرات گاما اوریزانول آزاد در محیط آبی و تغییر در ضریب شکست نور تابیده شده و پراکنده کردن آن، موجب افزایش کدورت سیستم می‌شود.

### جدول ۳ - تأثیر افزودن حلال، گاما اوریزانول و تغییر غلظت لسیترین

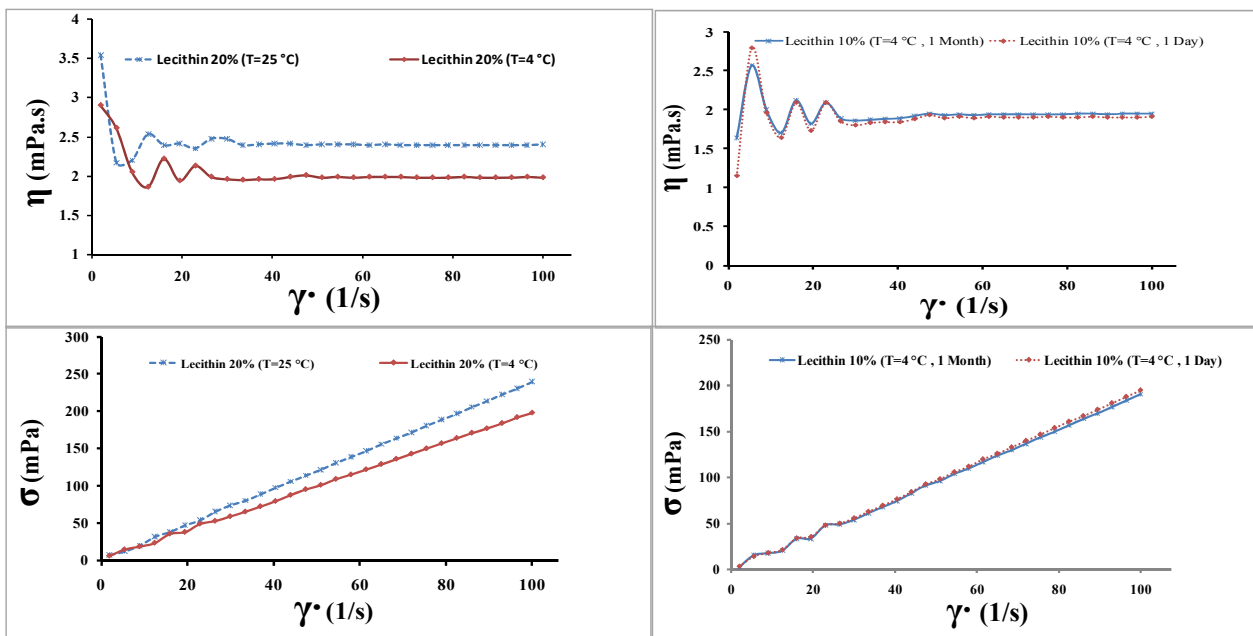
بر کدورت سیستم حاوی نانوذرات	
کدورت (NTU)	ترکیبات تشکیل دهنده لیپوزوم
۲۱۰	لسیتین ۳٪ (آب)
۴۷۰	لسیتین ۳٪ (حاوی ۴۰۰ PEG)
۸۰۰	لسیتین ۳٪ (حاوی GO و ۴۰۰ PEG)
۸۷۳	لسیتین ۵٪ (حاوی GO و ۴۰۰ PEG)
۹۱۰	لسیتین ۱۰٪ (حاوی GO و ۴۰۰ PEG)
Max	لسیتین ۲۰٪ (حاوی GO و ۴۰۰ PEG)

### آزمون های رئولوژیکی پایا

در آزمون رئولوژیکی پایا، رفتار جریان غلظت‌های مختلف لسیترین و همچنین تأثیر دمای نگهداری بر ویسکوزیته سیستم‌های حاوی نانولیپوزوم‌ها مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای این منظور، مقادیر تنش برشی و ویسکوزیته به صورت تابعی از سرعت برشی، در فاصله زمانی ۱۰ دقیقه و سرعت برشی  $(S^{-1})$  ۱۰۰-۲ اندازه‌گیری شد. همانطور که در شکل ۵ مشاهده می‌شود، بین تنش برشی و سرعت برشی در غلظت‌های مختلف لسیترین رابطه نسبتاً خطی وجود دارد و این رفتار نشان می‌دهد که محلول‌ها دارای ساده‌ترین رفتار جریانی، یعنی رفتار نزدیک به نیوتنی هستند. در این سیالات، شیب خط نمودار تنش برشی-سرعت برشی، ویسکوزیته را نشان می‌دهد، بطوریکه با افزایش



شکل ۵- نمودار ویسکوزیته-سرعت برشی و تنش برشی-سرعت برشی محلول‌های نانولیپوزومی در غلظت‌های مختلف لسیترین (۵، ۱۰ و ۲۰٪)



شکل ۶- نمودار ویسکوزیته-سرعت برشی و تنش برشی-سرعت برشی نانولیپوزوم‌ها (غلظت ۱۰٪ و ۲۰٪ لسیترین) نگهداری شده در دمای ۴ و ۲۵ °C به مدت ۱ روز و ۱ ماه

جدول ۴- پارامترهای محاسبه شده مربوط به مدل قانون توان برای نمونه‌ها، شامل اندیس جریان، اندیس قوام و  $R^2$

$R^2$	ضریب قوام (K) (Pa.s)	شاخص جریان (n)	زمان نگهداری (روز)	دما °C	غلظت لسیتین (%)
۰/۹۹۹۴	۱/۶۵۰۶	۱/۰۰۵۹	۱	۴	۵
۰/۹۹۸۰	۱/۸۵۰۷	۱/۰۰۵۸	۱	۴	۱۰
۰/۹۹۸۱	۲/۲۵۱	۱/۰۰۹۴	۱	۴	۲۰
۰/۹۹۸۷	۱/۸۶۴۱	۱/۰۰۹۲	۳۰	۴	۱۰
۰/۹۹۹۷	۲/۴۶۹۳	۰/۹۹۳۰	۳۰	۴	۲۰
۰/۹۹۳۶	۳/۷۴۰۹	۰/۸۶۱۵	۳۰	۲۵	۵
۰/۹۹۹۳	۲/۰۶۳۲	۰/۹۹۰۶	۳۰	۲۵	۲۰

جریان (n) و ضریب قوام (k) بدست آمده از مدل قانون توان و همچنین ضریب تبیین  $R^2$  برای تمام نمونه‌های آزمایشی با درصد‌های مختلف، نشان داده شده است. ضریب تبیین  $R^2$  برای اکثر نمونه‌های ارزیابی شده، بالای ۹۹ درصد بود که نشان‌دهنده مناسب بودن مدل قانون توان برای توصیف خصوصیات جریان سیستم‌های نانولیپوزومی می‌باشد. در این رابطه، هرچه n به عدد یک نزدیک‌تر باشد، نشانه تمایل سیال به رفتارهای نیوتنی و هرچه به صفر نزدیک‌تر باشد، نشانه تمایل سیال به رفتار سودوپلاستیک است. با توجه به جدول ۴، مشاهده می‌شود که مقادیر شاخص رفتار جریانی برای اکثر نمونه‌ها، بالاتر از ۰/۹ است که دلالت بر رفتار نزدیک به نیوتنی دارد. همچنین مشاهده شد که افزایش غلظت لسیتین، ضریب قوام را افزایش داده و بر شاخص جریان، تقریباً بی‌اثر است. با توجه به جدول ۴ مشاهده می‌شود که نمونه‌هایی با غلظت ۵ درصد و ۲۰ درصد و دمای  $25^\circ\text{C}$ ، دارای کمترین مقدار شاخص جریان و دارای رفتار روان شوندگی ضعیف هستند. این موضوع نشان می‌دهد که افزایش دمای نگهداری، موجب ایجاد لخته و افزایش اندازه و کسر حجمی مؤثر ذرات و رسیدن به مقدار بحرانی شده و در نتیجه جایگزینی رفتار نیوتنی با رفتار روان شونده با برش (سودوپلاستیک) می‌شود.

### نتیجه گیری

روش اصلاح شده حرارتی، روشی مؤثر در انکپسوله کردن گاما اوریزانول در نانولیپوزوم‌ها می‌باشد. در این روش با استفاده از پلی اتیلن گلیکول ۴۰۰ به عنوان کمک حلال و سورفکتانت غیر یونی و ایجاد کننده ممانعت فضایی، می‌توان سیستمی پایدار جهت کاربردهای گسترده تولید کرد. با توجه به نتایج FTIR، لسیتین و گاما اوریزانول در لیپوزوم سازگاری خوبی با هم دارند. نتایج آزمون های پایداری فیزیکی و رفتار رئولوژیکی این نتایج نشان دادند که دمای نگهداری بر ویژگی های فیزیکی دیسپرسیون های کلئیدی مؤثر است. پس می‌توان بیان کرد که دمای  $4^\circ\text{C}$  بهترین دما برای

با توجه به شکل، شیب و ویسکوزیته نمونه نگهداری شده در دمای  $25^\circ\text{C}$  بالاتر از نمونه‌های نگهداری شده در دمای  $4^\circ\text{C}$  است. همان طور که در بحث تأثیر دمای نگهداری بر پایداری سیستم نانولیپوزومی گفته شد، لیپوزوم‌ها در دمای  $25^\circ\text{C}$  به دلیل سیالیت بالای غشاء، توده تشکیل می‌دهند که موجب افزایش اندازه ذرات می‌شود. این توده‌ها به دلیل برهمکنش‌های هیدروژنی بین گروه‌های قطبی موجود در سطح لیپوزوم‌ها تشکیل می‌شوند (Muller-Goymann *et al.*, 2004). در غلظت یکسان فاز پراکنده، دیسپرسیون‌های رقیق حاوی ذرات لخته شده دارای ویسکوزیته بالاتری نسبت به دیسپرسیون‌های رقیق حاوی ذرات منفرد (لخته نشده) هستند. چون لخته‌ها بخشی از سیال فاز پیوسته را در درون خود گیر می‌اندازند و بنابراین دارای کسر حجمی مؤثر بالاتری از ذرات منفرد هستند. دلیل دیگر برای افزایش ویسکوزیته افزایش اندازه ذرات است. با افزایش اندازه ذرات، انتظار می‌رود که اتلاف انرژی حاصل از اصطکاک، که در اثر اعمال نیروی برشی ایجاد می‌شود، زیاد شده و در نتیجه ویسکوزیته مقدار بیشتری را نشان دهد (قنبرزاده، ۲۰۰۹). در نمودار ویسکوزیته-سرعت برشی و تنش برشی-سرعت برشی (شکل ۶) نیز مشاهده می‌شود که نمونه‌های (با غلظت ۱۰٪ لسیتین) نگهداری شده به مدت ۱ روز و ۱ ماه در دمای  $4^\circ\text{C}$ ، شیب و ویسکوزیته تقریباً یکسانی دارند که نشان می‌دهد سیستم‌های لیپوزومی بعد از نگهداری در دمای  $4^\circ\text{C}$  پایدار مانده و ذرات لخته نشده‌اند. دلیل آن را عدم تغییر در سیالیت غشاء در دماهای پایین می‌توان بیان کرد. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که باید شرایط نگهداری مناسبی برای نانوذرات تهیه شده در نظر گرفته شود تا بتوان پایداری سیستم حاوی نانوذرات را افزایش داد. نتایج مشابهی در مورد تأثیر دمای نگهداری بر روی ویسکوزیته دیسپرسیون آبی حاوی نانوذرات لیپیدی جامد توسط Souto و همکاران (۲۰۰۴) گزارش شده است. یکی از مدل‌هایی که برای تفسیر رفتار رئولوژیکی مورد استفاده قرار می‌گیرد، مدل قانون توان می‌باشد. در جدول ۴، مقادیر شاخص

## منابع

قتبرزاده، ب.، ۱۳۸۸، مبانی رئولوژی مواد و بیوپلیمرهای غذایی. چاپ اول. انتشارات دانشگاه تهران.

- 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.
- Bhatia, A., Kumar, R. and Katare, O. P., 2004, Tamoxifen in topical liposomes: development, characterization and in-vitro evaluation. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 7, 252-259.
- Brandl, M., 2001, Liposomes as drug carriers : A technological approach. *Biotechnology Annual Review*, 7, 59-85.
- Bucci, R., Magri, A. D., Magri, A. L. and Marini, F., 2003, Comparison of three spectrophotometric methods for the determination of  $\gamma$ -oryzanol in rice bran oil. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 375, 1254-1259.
- Fatouros, D. G. and Antimisiaris, 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.
- Grassi, G., Crevatin, A., Farra, R., Guarnieri, G., Pascotto, A., Rehimers, B., Lapasin, R. and Grassi, M., 2006, Rheological properties of aqueous Pluronic-alginate systems containing liposomes. *Journal of Colloid and Interface Science*, 301, 282-290.
- Henna lu, F. S., Nielsen, N. S., Timm-Heinrich, M. and Jacobsen, C., 2011, Oxidative stability of marine phospholipids in the liposomal form and their applications. *Lipids*, 46, 13-23.
- Kuligowski, J., Quintás, G., Garrigues, S. and Guardia, M., 2008, Determination of lecithin and soybean oil in dietary supplements using partial least squares-Fourier transform infrared spectroscopy. *Talanta*, 77, 229-234.
- Lin, Y. and Lai, H., 2011, Bioactive compounds in rice during grain development. *Food Chemistry*, 7, 86-93.
- Liu, D. Z., Hsieh, Y. L., Chang, S. Y. and Chen, W. Y., 2003, Microcalorimetric studies on the physical stability of polyethylene glycol-grafted liposome. *Colloids and Surfaces A*, 212, 227-234.
- Lu, Q., Li, D. C. and Jiang, J. G., 2011, Preparation of a tea polyphenol nanoliposome system and its physicochemical properties. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 59, 13004-13011.
- Mohammed, A. R., Weston, N., Coombes, A. G. A., Fitzgerald, M. and Perrie, Y., 2004, Liposome formulation of poorly water soluble drugs: Optimisation of drug loading and ESEM analysis of stability. *International Journal of Pharmaceutics*, 285, 23-34.
- 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*, 8, 2038-2045.
- Mozafari, M. R., Johnson, C., Hotziantoniou, S. and Demetzos, C., 2008, Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. *Journal of Liposome Research*, 18, 309-327.
- Mozafari, M. R., 2010, Nanoliposomes: preparation and analysis. In: Walker, J. M, ed. *Methods in molecular biology*. Springer. Pp. 29-50.
- Mozafari, M. R., Khosravi-Darani, K., Borazan, G. G., Cui, J., Pardakhty, A. and Yurdugul, S., 2011, Encapsulation of food ingredients using nanoliposome technology. *International Journal of Food Properties*, 1, 833-844.
- Muller-Goymann, C. C., 2004, Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 58, 343-356.
- 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.
- Rahimpour, R. and Hamishehkar, H., 2012, Liposomes in cosmeceutics. *Expert Opinion Drug Delivery*, 9, 443-455.
- Sakulkhu, U., Jarupaiboon, S., Trithong, A., Prathontep, S., Janyaprasert, V., Puttipatkhachorn, S. and Ruktanonchai, U., 2007, Production and characterization of rice bran extract encapsulated in solid lipid nanoparticles for dermal delivery. *Proceedings of The 2nd IEEE International Conference on Nano/Micro Engineered and Molecular Systems*, 2007 Jan. 16-19, Bangkok, Thailand.
- Seetapan, N., Bejrappa, P., Srinuanhai, W. and Ruktanonchai, R. U., 2010, Rheological and morphological characterizations on physical stability of gamma-oryzanol-loaded solid lipid nanoparticles (SLNs). *Micron*, 4, 51-58.
- Souto, E. B., Gohla, S. H. and Muller, R. H., 2005, Rheology of nanostructured lipid carriers (NLC) suspended in a viscoelastic medium. *Pharmazie*, 60, 1-3.
- Taylor, 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.
- Uhumwangho, M. U. and Okor, R. S., 2005, Current trends in the production and biomedical applications of

liposomes: A review. *Journal of Biomedical Sciences*, 4, 9-21.

Viriyaroj, A., Ngawhirunpat, T., Sukma, M., Akkaramongkolporn, P., Ruktanonchai, U. and Opanasopit, P., 2009, Physicochemical properties and antioxidant activity of gamma-oryzanol-loaded liposome formulations for topical use. *Pharmaceutical Development and Technology*, 6, 665–671.

Wechtersbach, L., Ulrich, N. and Cigi, B., 2011, Liposomal stabilization of ascorbic acid in model systems and in food matrices. *LWT - Food Science and Technology*, 45, 43-49.

Wu, L., Zhang, J. and Watanabe, W., 2011, Physical and chemical stability of drug nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 63, 456–469.

Xu, Z. and Godber, J. S., 2001, Antioxidant activities of major components of  $\gamma$ -oryzanol from rice bran using a linoleic acid model. *Journal of American Oil Chemistry Sciences*, 78, 465-469.