

## ارزیابی ویژگی‌های فیزیکی نانولیپوزوم‌های حامل ویتامین D<sub>3</sub> تولید شده به روش هیدراسیون لایه نازک - سونیکاسیون

مریم محمدی<sup>1</sup>، بابک قنبرزاده<sup>2</sup>، حامد همیشه کار<sup>3</sup>، رضا رضایی مکرم<sup>4</sup>، محمد امین محمدی<sup>5</sup> فر

- 1- دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران
- 2- نویسنده مسئول: دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران، پست الکترونیکی: Ghanbarzadeh@tabrizu.ac.ir
- 3- استادیار مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران
- 4- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران
- 5- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 92/6/12

تاریخ پذیرش: 92/10/30

### چکیده

**سابقه و هدف:** درون پوشانی ترکیبات غذا- دارو توسط حامل‌های لیپیدی مانند لیپوزوم‌ها، یک روش مؤثر برای حفاظت ویژگی‌های ذاتی آنها در طی دوره نگهداری است. لیپوزوم‌ها به دلیل داشتن مزایای متعدد از جمله امکان تولید در مقیاس صنعتی با استفاده از مواد طبیعی، امکان درون پوشانی مواد محلول در آب، محلول در چربی و آمفی‌فیل و همچنین زیست تخریب پذیری، قابلیت استفاده گسترده در صنایع غذایی را دارند. هدف این کار تحقیقی، تعیین ویژگی‌های نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین D<sub>3</sub> توسط گرماسنجی اسکنی افتراقی و میکروسکوپ الکترونی پویشی است.

**مواد و روش‌ها:** نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین D<sub>3</sub>، با استفاده از غلظت‌های متفاوت لسیتین-کلاسترول شامل (0-60، 10-50، 20-40 و 30-30 میلی‌گرم) معادل (0-8، 3-7، 5-5 و 8-4 میلی‌مولار) و توسط روش هیدراسیون لایه نازک و سونیکاسیون تهیه شدند. آزمون‌های گرماسنجی پویشی افتراقی (DSC)، تعیین اندازه ذرات، کارایی درون پوشانی و میکروسکوپ الکترونی پویشی برای تعیین خواص فیزیکوشیمیایی نمونه‌ها انجام گرفت.

**یافته‌ها:** اندازه ذرات و توزیع اندازه ذرات به ترتیب در محدوده 78-89 نانومتر و 0/77-0/84 بود. در همه فرمولاسیون‌ها کارایی درون پوشانی ویتامین D<sub>3</sub> بیش از 90% بود. در منحنی‌های DSC مربوط به نانولیپوزوم حاوی ویتامین D<sub>3</sub>، پیک مربوط به ویتامین حذف شده بود که نشان دهنده این است که ویتامین تشکیل کمپلکس داده و به صورت کامل در ساختار نانولیپوزوم‌ها قرار گرفته است. در بررسی تصاویر به دست آمده از SEM، درون پوشانی ویتامین D توسط همه نمونه‌های لیپوزومی ساختار متخلخل داشتند.

**نتیجه گیری:** در این مطالعه نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین D<sub>3</sub>، به طور موفقیت آمیزی با روش هیدراسیون لایه نازک- سونیکاسیون تولید شدند و تمام ویژگی‌های مورد انتظار تحقق یافت.

**واژگان کلیدی:** درون پوشانی، نانولیپوزوم، ویتامین D<sub>3</sub>، ویژگی‌های حرارتی

### • مقدمه

در برابر تخریب و تجزیه می‌باشد. درون پوشانی در صنایع غذایی و دارویی، می‌تواند مزایای بالقوه زیر را داشته باشد:  
-افزایش پایداری مواد انکپسوله شده توسط حفاظت آنها از تغییرات محیطی، آنزیمی و شیمیایی

درون پوشانی یک فرآیند مهم صنعتی برای پوشش دادن فیزیکی مایعات، جامدات یا گازها با یک لایه نازک محافظ به منظور جلوگیری از افت آنها در اثر فراریت و محافظت از آنها

- بازدارندگی در مقابل pH، تغییرات قدرت یونی و درجه حرارت شدید

- پوشش دادن طعم‌ها یا بوهای نامطلوب؛ (3)

بر حسب اندازه ذرات تولید شده، می‌توان درون‌پوشانی را به دو نوع میکرو و نانو تقسیم‌بندی کرد. تحویل اجرای فعال به مکان‌های هدف درون بدن و خصوصیات رهاسازی آنها مستقیماً تحت تأثیر اندازه آنهاست. در مقایسه با حامل‌های با سایز میکرون، نانوحامل‌ها ناحیه سطحی بیشتری را فراهم می‌کنند و باعث افزایش حلالیت، افزایش قابلیت دسترسی زیستی، رهاسازی کنترل‌شده و هدف‌گیری دقیق اجزای فعال به مکان‌های مورد نظر می‌شوند. همچنین وقتی ماده فعال در نانوحامل‌ها درون‌پوشانی می‌شود، مقدار ماده مورد نیاز جهت اثرگذاری مورد انتظار نسبت به حالت آزاد کاهش می‌یابد (4).

انواع مختلف نانو حامل‌ها در صنایع غذایی قابلیت تولید و کاربرد دارند و شامل نانوکپسول‌های بر پایه بیوپلیمرها و انواع لیپید (نانولیپوزوم‌ها، نانونیوزوم‌ها، نانومولسیون‌ها، میسل‌های سورفاکتانت‌ها (میکرومولسیون‌ها) و ذرات لیپیدی جامد) می‌باشند. نانولیپوزوم‌ها ذرات کلوتیدی تشکیل شده از مولکول‌های لیپیدی (عمدتاً فسفولیپیدها) هستند که به محض واکنش با آب به صورت سازمان یافته و به فرم غشاهای دولایه ای تجمع می‌یابند و در اثر وارد شدن انرژی و نیروی برشی (هموژنیزاسیون، سونیکاسیون) به صورت کروی (وزیکول) در می‌آیند. لیپوزوم‌ها می‌توانند مواد فعال آب دوست را در درون و سطح و مواد آبگریز را در میان غشا، انکپسوله کنند (5).

نوتریسیوتیکال یا مواد غذا- دارو (Nutraceutical) از ترکیب دو واژه تغذیه (Nutrition) و داروسازی (Pharmaceutics) تشکیل شده و به طور کلی به اجزایی از ماده غذایی گفته می‌شود که علاوه بر داشتن خواص تغذیه‌ای پایه، دارای فعالیت بیولوژیکی ارزشمند و سلامتی بخش هستند و باعث پیشگیری و یا درمان بیماری‌ها می‌شوند. مهم‌ترین آنها عبارتند از: ویتامین‌ها، کاروتنوئیدها، آنتوسیانین‌ها، فلاوونوئیدها، استرول‌ها و اسیدهای چرب ضروری. با تغییر شیوه زندگی و گرایش روز افزون مردم به غذاهای کم چرب و یا بدون چربی و عدم رعایت تنوع در استفاده از گروه‌های مختلف مواد غذایی و نابودی نوتریسیوتیکال‌ها طی فرآوری و نگهداری مواد غذایی، نگرانی‌ها در مورد بروز بیماری‌های ناشی از کمبود مواد مغذی و

زیست فعال آب‌گریز ضروری بدن رو به افزایش است (6). بنابراین، به منظور برآورده کردن نیاز بدن، می‌توان مواد غذایی کم چرب و بدون چربی را با این مواد ضروری غنی‌سازی کرد.

ویتامین D یک ویتامین محلول در چربی است و به شکل‌های متعددی در مواد غذایی وجود دارد. رایج‌ترین شکل‌ها، کولی کلسیفرول ( $D_3$ ) و ارگوکلسیفرول ( $D_2$ ) می‌باشند. کولی کلسیفرول از کلسترول و ارگوکلسیفرول از ارگسترول سنتز می‌شوند. نقش اصلی ویتامین D در بدن افزایش جذب کلسیم و فسفر در روده و باز جذب آن در کلیه می‌باشد (8). منبع اصلی تأمین آن در انسان، تابش پرتو فرا بنفش به پوست و تبدیل 7 دهیدرو کلسترول به ویتامین D است اما قرار گرفتن بیش از اندازه در مقابل آفتاب، به دلیل اثرات مضر پرتو فرا بنفش، زیان آور است. ویتامین D در منابع حیوانی (تخم مرغ، شیر، کره و روغن کبد ماهی) یافت می‌شود و منابع گیاهی منابع فقیری از نظر ویتامین D هستند از طرفی از آنجا که ویتامین D محلول در چربی می‌باشد در مواد غذایی کم‌چرب و بدون چربی وجود ندارد. از طرف دیگر ویتامین‌های محلول در چربی از جمله ویتامین D ترکیبات حساسی هستند که باید از عوامل پروکسیدان محافظت شوند. انکپسولاسیون ویتامین D در لیپوزوم‌ها، یک روش مؤثر برای حفاظت خصوصیات ذاتی ویتامین D در طی نگهداری و تولید مکمل‌های غنی‌سازی شده با این ویتامین است و یک مانع فیزیکی شیمیایی در مقابل عوامل پراکسیدان مثل رادیکال‌های آزاد، اکسیژن یا نور UV ایجاد می‌کنند، همچنین قابلیت پخش‌پذیری و پایداری ویتامین D توسط وارد کردن آن در حامل‌های کلوتیدی در مقیاس نانو بهبود بخشیده می‌شود (9).

در پژوهشی Marsanasco و همکاران (10)، بر روی لیپوزوم‌های حاوی ویتامین E و C (تولید شده به روش هیدراسیون لایه نازک) جهت کاربرد در غنی‌سازی آب پرتقال مطالعه کردند. کارایی درون‌پوشانی به دست آمده برای ویتامین C، 86% و برای ویتامین E در همه فرمولاسیون‌ها بیش از 99% بود. آنها به منظور افزایش پایداری لیپوزوم، از اسید استئاریک به جای کلسترول استفاده کردند. نتایج آنها نشان داد که افزودن فرمولاسیون لیپوزومی به آب پرتقال، تغییری در خصوصیات ارگانولپتیکی محصول ایجاد نکرد و آب پرتقال پایداری میکروبی خوبی (طی مدت 37 روز و در دمای  $4^{\circ}\text{C}$ ) نشان داد. آنها

روتاری (شرکت Heidolph، کشور آلمان) در  $30^{\circ}\text{C}$  تبخیر شد. بعد لایه نازک تشکیل شده با 10 میلی لیتر آب مقطر استریل هیدراته شد و دانک‌های شیشه ای برای کمک به هیدراته شدن لایه نازک لیپیدی اضافه شد. در این مرحله لیپوزوم‌های چندلایه‌ای (Multilamellar) میکرومتری تولید شدند (13). در ادامه نمونه‌ها در هموژنایزر (شرکت Heidolph، کشور آلمان) با سرعت 20000 rpm در دمای بالای انتقال فاز لیپوزوم‌ها به مدت 10 دقیقه هموژنایز شدند. بعد مخلوط لیپوزومی در داخل حمام یخ (جهت جلوگیری از اعمال انرژی زیاد به داخل محلول و جلوگیری از هیدرولیز و اکسیداسیون لیپید) به سونیکاتور پروب مدل (vibracell Sonics & Materials، کشور انگلستان) منتقل شد و 5 سیکل 1 دقیقه‌ای با 3 دقیقه استراحت ما بین سیکل‌ها بر روی نمونه‌ها اعمال شد. در این مرحله نانو لیپوزوم‌های تک-لایه‌ای (Unilamellar) تولید شدند (14).

**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 (1) محاسبه شد و کلیه نمونه‌ها در سه تکرار اندازه‌گیری شدند.

میانگین قطر حجمی (میانگین حجم معادل) یا DeBroukere mean (15):

معادله (1)

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

$n_i$ : تعداد ذرات

$d_i$ : قطر میانگین ذرات

توزیع اندازه ذرات نیز با استفاده از معادله زیر محاسبه شد (16):

معادله (2)

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

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

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

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

همچنین اعلام کردند که اسید استئاریک می‌تواند جایگزین خوبی برای کلسترول در فرمولاسیون لیپوزومی باشد. در پژوهش دیگر Ko و همکاران (11)، روش هیدراسیون لایه نازک-اکستروژن را برای کپسوله کردن رتینول انتخاب کردند. اندازه ذرات تولید شده 90 نانومتر بود و کارایی درون‌پوشانی به دست آمده بیش از 99% بود. کارایی کپسولاسیون تحت تأثیر روش آماده سازی لیپوزوم، نسبت فسفولیپید به ماده فعال و سازمان دهی لیپوزوم قرار دارد. آنها در مورد کارایی کپسولاسیون به دست آمده این گونه نتیجه گرفتند که روش به کار رفته در این مطالعه، باعث افزایش کارایی کپسولاسیون رتینول شد.

در پژوهشی دیگر وفاخش و همکاران (12)، آنزیم فلیورزیم که نوعی پروتئاز است را در حامل لیپوزومی متشکله از فسفاتیدیل کولین و کلسترول با استفاده از روش مظفوری درون‌پوشانی کردند. کارایی درون‌پوشانی به دست آمده 21/9% بود. آنزیم کپسوله شده با آنزیم آزاد از لحاظ پروتئولیز تدریجی کارئین مقایسه شد. نتایج نشان داد که درون‌پوشانی آنزیم در حامل لیپوزومی به نسبت آنزیم آزاد، مشکلات ناشی از افزودن مستقیم آنزیم به شیر یا لخته (مانند پروتئولیز زودرس که منجر به استحکام نامطلوب لخته، تولید کم، از دست رفتن مقدار زیادی از آنزیم، افزایش قیمت محصول به علت نیاز به مقدار زیاد آنزیم و توزیع ضعیف آنزیم می‌شود) را در طول تولید پنیر کاهش می‌دهد.

هدف از این پژوهش تولید لیپوزوم‌های حاوی ویتامین D با روش هیدراسیون لایه نازک-سونیکاسیون در مقیاس‌های نانومتری و بررسی ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و کارایی درون‌پوشانی آن است.

## • مواد و روش‌ها

**مواد:** فسفولیپید (آل - آلفا - لسیتین گرانولار با درجه خلوص 99%، شرکت Across آمریکا)، کلسترول (با درجه خلوص 95%، شرکت Merck آلمان)، ویتامین D<sub>3</sub> با خلوص 99% (شرکت زهراوی ایران)، کلروفورم، متانول و سایر مواد از شرکت مواد شیمیایی مرک (Chemical Co. Merck Darmstadt, Germany) تهیه شدند.

**روش‌های تولید و آماده‌سازی:** ابتدا غلظت‌های متفاوت از لسیتین-کلسترول (30-30، 40-20، 50-10 و 60-0) در حلال‌های ترکیبی از کلروفورم-متانول با نسبت 1:2 حل شد. بعد ویتامین D<sub>3</sub> به مخلوط لسیتین-کلسترول در یک فلاسک ته گرد 50 ml اضافه شد. حلال در یک اواپراتور

نازکی از طلا و پالادیوم پوشش داده شده و برای آنالیز تصویر در دستگاه SEM با ولتاژ 15000 کیلو ولت قرار گرفت (18). گرماسنجی اسکنی افتراقی (DSC): اندازه‌گیری‌های DSC در دستگاه DSC (NETZSC مدل DSC 200 F 3 Maia، ساخت آلمان) در دانشگاه صنعتی سهند صورت گرفت. کالیبراسیون دستگاه توسط ایندیوم صورت گرفت. ظرف آلومینیومی خالی به عنوان مرجع مورد استفاده قرار گرفت. نمونه‌های پرولیپوزوم (لیپوزوم‌های خشک شده) با وزن تقریبی 4 میلی‌گرم با سرعت 30°C/min در گستره دمایی 25 تا 300 درجه سانتی‌گراد اسکن شدند. از روی گرمانگاشت حاصل، نقطه ذوب ترکیبات تعیین شدند (19). نحوه تهیه پودر خشک نانولیپوزوم جهت استفاده در دستگاه DSC بدین صورت بود که ابتدا به منظور انجماد، محلول نانولیپوزوم تهیه شده در فریزر با دمای 80- درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و سپس در دستگاه لیوفیلیزاتور (Christ مدل ALPHA 1-4، ساخت کشور آلمان)، تحت خلأ و به مدت 24 ساعت لیوفیلیزه شدند (20).

**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 (version 16.0 for Windows, SPSS Inc) در سطح احتمال 5% ( $P < 0/05$ ) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای تأیید وجود اختلاف بین میانگین‌ها انجام گرفت.

### • یافته‌ها

**تعیین اندازه و توزیع اندازه ذرات:** در این تحقیق به منظور یافتن فرمولاسیونی مناسب با اندازه ذرات در مقیاس نانومتری، از غلظت‌های مختلف لسیتین - کلسترول (60-0، 50-10، 40-20، 30-30 میلی‌گرم) برای ساخت لیپوزوم‌های حاوی ویتامین D<sub>3</sub> استفاده شد. نتایج مربوط به اندازه‌گیری قطر متوسط اندازه ذرات در غلظت‌های مختلف لسیتین در جدول (1) آورده شده است و نشان می‌دهد که متوسط قطر حجمی و توزیع اندازه ذرات (اسپن) به ترتیب در محدوده 78-89 و 0/77-0/84 نانومتر قرار دارند. همچنین اثر غلظت‌های مختلف لسیتین - کلسترول بر اندازه ذرات در سطح 5% معنی‌دار نبود.

**تعیین کارایی درون پوشانی:** ابتدا محلول لیپوزومی با سرعت 300 rpm سانتریفوژ شد. این کار باعث می‌شود که ویتامین آزاد با توجه به ماهیت لیوفیل خود به بالای محلول بیاید. بعد از قسمت شفاف میانی، که حاوی ویتامین کپسوله شده می‌باشد، 2 سی سی برداشته شد و یک سی سی کلروفرم جهت تخریب کپسول لیپوزومی به آن اضافه شد و به مدت 15 دقیقه در شیکر لوله آزمایش به هم زده شد. بعد با سرعت 10000 rpm سانتریفوژ شد. لایه بالایی (حاوی لیپوزوم تخریب شده) از محلول کلروفرمی حاوی ویتامین جدا شد. کلروفرم با استفاده از گاز ازت تبخیر شد، بعد یک سی سی موبایل فاز (متانول-استونیتریل) به آن اضافه شد و با استفاده از HPLC سطح زیر منحنی ویتامین کپسوله شده به دست آمد. جهت تعیین مقدار ویتامین درون پوشانی شده در نانولیپوزوم‌ها از دستگاه HPLC (مدل Knauer ساخت آلمان) استفاده شد. به این ترتیب که ابتدا غلظت‌های 2/5، 5، 10، 15، 20 ماکرولیتر در هر میلی لیتر از ویتامین D<sub>3</sub> تهیه شد و به دستگاه HPLC تزریق شد (17). سطح زیر منحنی آنها محاسبه شد و با استفاده از نرم افزار Excel منحنی استاندارد به دست آمد. بعد سطح زیر منحنی حاصل از پیک نمونه، در معادله به دست آمده از منحنی استاندارد گذاشته شد و غلظت ویتامین کپسوله شده به دست آمد. بعد از روی معادله کارایی درون پوشانی (11) درصد ویتامین درون پوشانی شده به دست آمد.

معادله (3)

$$\text{کارایی درون پوشانی} = \frac{\text{مقدار ویتامین D}_3 \text{ کپسوله شده در لیپوزوم}}{\text{مقدار کل ویتامین D}_3 \text{ اضافه شده}} \times 100$$

**آزمون میکروسکوپ الکترونی پویشی:** به منظور مطالعه ریزساختار نمونه لیپوزومی و اطمینان از درون پوشانی ویتامین D<sub>3</sub> در نانولیپوزوم‌ها از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی استفاده شد. برای انجام این آزمون از دستگاه SEM (Scanning electron microscope) مدل vp1430 (ساخت شرکت لئو کشور آلمان-انگلیس) واقع در دانشگاه محقق اردبیلی استفاده شد. در ابتدا مقداری از نمونه خشک شده حاوی ویتامین بر روی قطعاتی از گرید قرار گرفته و کل مجموعه گرید و نمونه با چسب دو طرفه نقره هادی پوشانده شد. سپس کل سطح آن‌ها با لایه بسیار

اندازه‌های نانومتری و توزیع اندازه ذرات یکنواخت، مناسب می‌باشد.

**گرماسنجی پویشی افتراقی (DSC):** آنالیز DSC به منظور بررسی ورود ویتامین D<sub>3</sub> به ساختار لیپوزوم و کپسولاسیون آن انجام گرفت. در جدول 2 دمای ذوب ترکیبات مختلف شامل مواد خالص و لیپوزومی ارائه شده است. شکل 2- الف، منحنی گرمایشی DSC مربوط به لسیتین و کلسترول پودری می‌باشد. همان طور که در شکل مشاهده می‌شود. در هر دو منحنی، پیک اندوترمیک ذوب مشاهده می‌شود و دمای ذوب لسیتین و کلسترول پودری به ترتیب 239 و 152/8 درجه سانتی‌گراد می‌باشد.

**جدول 2.** دمای ذوب و آنتالپی ذوب ترکیبات سازنده نانولیپوزوم‌ها و نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین و بدون آن

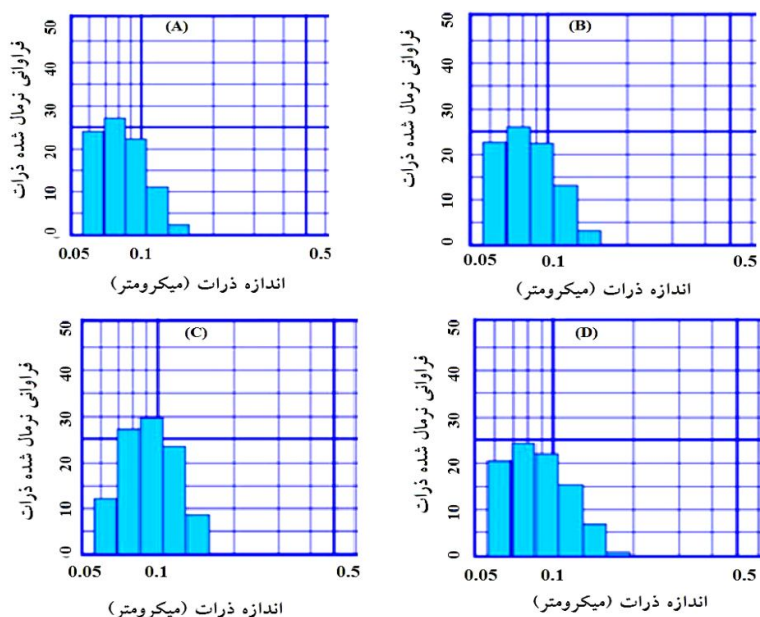
نمونه	دمای ذوب (°C)	آنتالپی ذوب (J/g)
لسیتین	239	-73/5
کلسترول	152/8	-83/66
ویتامین D <sub>3</sub>	-1/8	-
نانولیپوزوم لسیتین	230	-110
نانولیپوزوم لسیتین - کلسترول	234/2	-105/3
نانولیپوزوم لسیتین - کلسترول - ویتامین D <sub>3</sub>	227/2	-62/31

**جدول 1.** تأثیر غلظت‌های مختلف لسیتین: کلسترول بر اندازه و توزیع اندازه ذرات

غلظت لسیتین: کلسترول (میلی مولار)	میانگین قطر حجمی (نانومتر)	اسپن
0 : 8	86 ± 8/72 <sup>a</sup>	0/77 ± 0/094 <sup>a</sup>
3 : 7	89 ± 11/53 <sup>a</sup>	0/74 ± 0/053 <sup>a</sup>
5 : 5	78 ± 3/51 <sup>a</sup>	0/80 ± 0/054 <sup>a</sup>
8 : 4	82 ± 1 <sup>a</sup>	0/84 ± 0/040 <sup>a</sup>

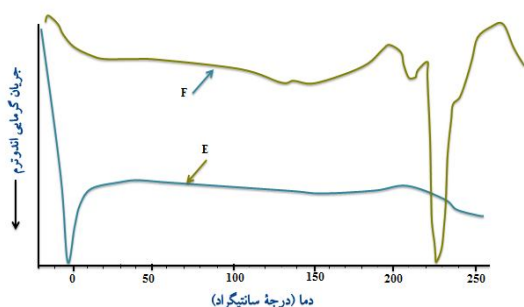
(حروف مشابه نشان دهنده عدم وجود اختلاف در سطح 5% در آزمون دانکن است). میانگین‌های به دست آمده حاصل 3 تکرار می‌باشد.

شکل 1، منحنی‌های توزیع اندازه ذرات نمونه در غلظت‌های مختلف لسیتین- کلسترول را نشان می‌دهد که توسط دستگاه آنالیز اندازه ذرات به دست آمده است. هرچقدر اسپن کمتر باشد، نشان دهنده توزیع اندازه ذرات باریک‌تر و سیستم کلوئیدی همگن‌تر خواهد بود. توزیع اندازه ذرات برای تمام نمونه‌ها با غلظت‌های متفاوت لسیتین - کلسترول باریک بود. یعنی در نمونه‌ها یکنواختی محتوا و تکرارپذیری مشاهده می‌شود. نمونه‌هایی با توزیع اندازه باریک یعنی  $PDI < 0/4$  در برابر پدیده ناپایداری از نوع رسیدگی اسوالد مقاوم‌تر هستند (21). با توجه به مطالب گفته شده می‌توان نتیجه گرفت که روش تولید مورد استفاده (هیدراسیون لایه نازک - سونیکاسیون)، مستقل از غلظت‌های متفاوت لسیتین- کلسترول، برای تولید لیپوزوم‌های پایدار در



شکل 1. توزیع اندازه ذرات در غلظت‌های مختلف لسیتین به کلسترول (میلی مولار): 8 به 0 (A)، 7 به 3 (B)، 5 به 5 (C) و 4 به 8 (D)

نمونه از دمای  $20^{\circ}\text{C}$  تا  $300^{\circ}\text{C}$  انجام شد. همان طور که در شکل مشاهده می‌شود در گرمانگاشت مربوط به نانولیپوزوم حاوی ویتامین  $\text{D}_3$  تنها یک پیک ذوب وجود دارد و پیک مربوط به ذوب ویتامین در آن دیده نمی‌شود و همچنین با کپسولاسیون ویتامین، دمای ذوب نانولیپوزوم حاوی ویتامین نسبت به نانولیپوزوم فاقد آن، کاهش یافته است.

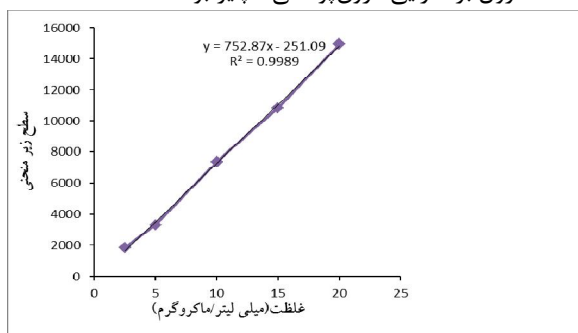


شکل 2 ج. منحنی‌های DSC: ویتامین  $\text{D}_3$  (E)، نانولیپوزوم لسیتین - کلاسترول به همراه ویتامین (F)

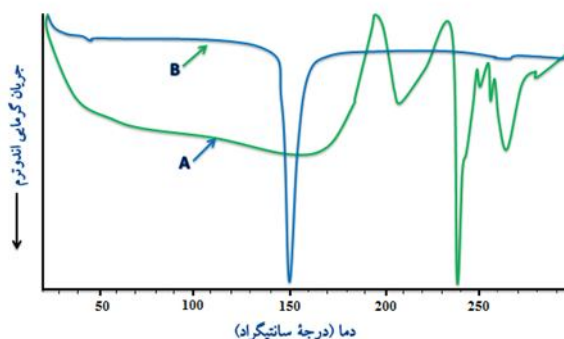
**کارایی درون‌پوشانی:** در این پژوهش جهت محاسبه مقدار ویتامین کپسوله شده در نانولیپوزوم‌ها از دستگاه HPLC استفاده شد. شکل 3-الف منحنی استاندارد که غلظت ویتامین بارگذاری شده از روی آن محاسبه شد را نشان می‌دهد.

شکل 3-ب پیک حاصل از ویتامین  $\text{D}_3$  را نشان می‌دهد که از دستگاه HPLC به دست آمده است.

شکل 4 کارایی کپسولاسیون 4 غلظت متفاوت لسیتین - کلاسترول را نشان می‌دهد. کارایی درون‌پوشانی برای تمام تیمارها بین 93 تا 100 درصد بود. مطابق نتایج تفاوت معنی‌داری بین نمونه‌ها در سطح 5% مشاهده نشد و اثر کلاسترول بر کارایی درون‌پوشانی ناچیز بود.



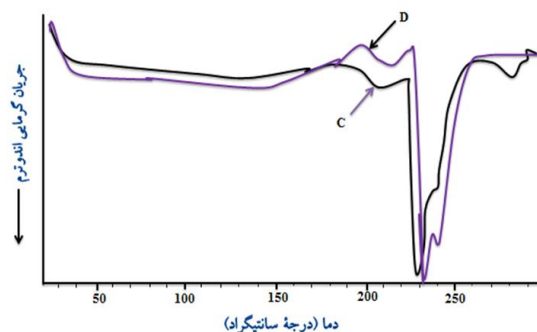
شکل 3 الف. منحنی استاندارد جهت تعیین غلظت ویتامین کپسوله شده



شکل 2 الف. منحنی‌های DSC مواد خالص: لسیتین (A)، کلاسترول (B)

شکل 2-ب، منحنی‌های گرمایشی DSC مربوط به پودرهای خشک شده نانولیپوزوم‌های خالص تولید شده از لسیتین و لسیتین - کلاسترول بدون ویتامین  $\text{D}_3$  (پرولیپوزوم‌ها) می‌باشد. هر دو منحنی دارای پیک اندوترمیک ذوب بوده. دمای ذوب نانولیپوزوم خالص تولید شده از لسیتین  $230^{\circ}\text{C}$  است که نسبت به دمای ذوب نوع پودری، 9 درجه سانتی‌گراد کاهش یافته ولی پهنای پیک یا انتالپی ذوب لیپوزوم بیشتر از پهنای پیک لسیتین پودری است.

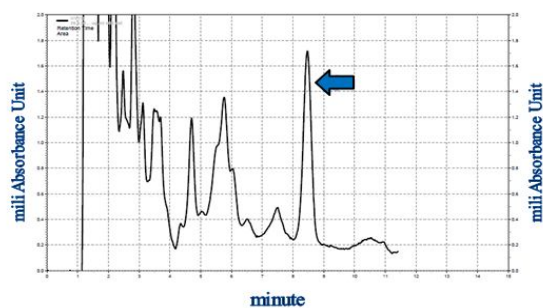
با ورود کلاسترول (10 میلی‌گرم) دمای ذوب لیپوزوم به مقدار کمی (4 درجه سانتی‌گراد) افزایش یافت و در منحنی DSC لیپوزوم تشکیل شده از لسیتین - کلاسترول، تنها یک پیک ذوب مشاهده می‌شود.



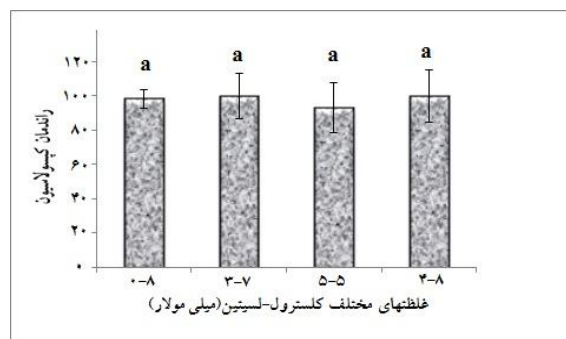
شکل 2 ب. منحنی‌های DSC: نانولیپوزوم بر پایه لسیتین (C)، نانولیپوزوم بر پایه لسیتین - کلاسترول بدون ویتامین (D)

شکل 2-ج منحنی‌های گرمایشی DSC مربوط به ویتامین  $\text{D}_3$  و پودرهای خشک شده نانولیپوزوم‌های لسیتین - کلاسترول حاوی ویتامین  $\text{D}_3$  می‌باشد. آنالیز DSC برای دو

میکروسکوپ الکترونی پوششی: شکل 5 تصویر به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی پوششی را نشان می‌دهد. در آنالیز تصاویر به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی، مورفولوژی ظاهری همه نمونه‌های لیپوزومی که به صورت انجمادی خشک شده بودند، ساختاری متخلخل و بهم چسبیده را نشان داد که در اثر قرارگیری مجدد سریع اجزای تشکیل دهنده در اثر فرایند خشک شدن انجمادی ایجاد شده بودند. بنابراین با استفاده از تصاویر میکروسکوپ الکترونی، اندازه نمونه‌های لیپوزومی به دلیل بهم چسبیدن اجزای لیپوزومی در اثر فرایند خشک شدن انجمادی، قابل تشخیص نبود ولی نقطه‌های سفید رنگی که در ساختار ملاحظه می‌شود، می‌تواند تأییدی بر درون‌پوشانی ویتامین در حامل لیپوزومی باشد.



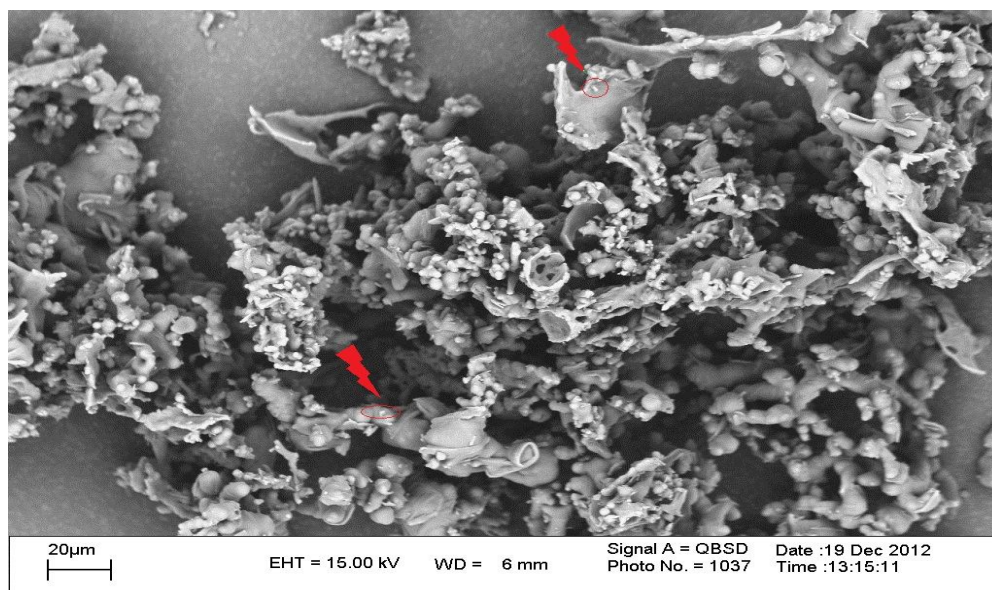
شکل 3 ب. پیک حاصل از ویتامین D<sub>3</sub>



شکل 4. تأثیر تغییر غلظت لسیتین به کلسترول بر کارایی

درون‌پوشانی

(حروف مشابه نشان دهنده عدم وجود اختلاف معنی‌دار در سطح 5% در آزمون دانکن است)



شکل 5. تصویر به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی پوششی

## • بحث

شد اما لیپوزوم‌های متشکله از کلسترول پایداری خوبی طی مدت نگهداری داشتند.

گرماسنجی پویشی افتراقی: در این تحقیق دمای ذوب لسیتین و کلسترول پودری به ترتیب 239 و 152/8 درجه سانتی‌گراد گزارش شد. Rudra و همکاران (26)، در پژوهشی دمای ذوب لسیتین و کلسترول پودری را به ترتیب 204 و 149 درجه سانتی‌گراد گزارش کردند. در پژوهشی دیگر محمد حسنی و همکاران (27)، دمای ذوب لسیتین پودری را 208 درجه سانتی‌گراد گزارش کردند که تفاوت ایجاد شده در دمای ذوب لسیتین پودری احتمالاً به تفاوت در اسیدهای چرب استری شده در ساختار آنها برمی‌گردد.

دمای ذوب نانولیپوزوم تولید شده از لسیتین 230 درجه سانتی‌گراد گزارش شد که تقریباً نزدیک دمای ذوب نوع پودری است ولی پهنای پیک یا آنتالپی ذوب لیپوزوم بیشتر از پهنای پیک لسیتین پودری بود که نشان دهنده کریستالی بودن نواحی وسیع‌تری از لیپوزوم و یا متنوع بودن نوع و اندازه کریستال‌ها در لیپوزوم‌ها است. علت کاهش دمای ذوب لیپوزوم نسبت به لسیتین پودری می‌تواند ناشی از این باشد که در اثر تشکیل لیپوزوم‌ها اندازه ذرات نسبت به حالت توده کاهش می‌یابد و کاهش اندازه ذرات موجب افزایش سطح و کاهش اندازه بلورها می‌گردد که به نوبه خود باعث کاهش دمای ذوب می‌گردد (28). همچنین ممکن است به علت حل شدن لسیتین در حلال و تبخیر سریع حلال و تشکیل لایه نازک، آرایش مولکولی منظمی ایجاد نشده باشد و خصوصیات بلورین لسیتین با تشکیل لیپوزوم تغییر کرده باشد و همین عامل یعنی ایجاد آرایش مولکولی نامنظم ممکن است باعث کاهش نقطه ذوب لیپوزوم تولید شده از لسیتین نسبت به لسیتین پودری شده باشد.

با ورود کلسترول دمای ذوب پرولیپوزوم کمی افزایش یافت و در منحنی DSC لیپوزوم تشکیل شده از لسیتین - کلسترول، تنها یک پیک ذوب مشاهده می‌شود. حذف پیک مربوط به کلسترول و مشاهده تنها یک پیک ذوب در منحنی لیپوزوم‌های حاوی کلسترول می‌تواند نشان دهنده هم بلوری شدن دو ترکیب و سازگاری خوب آن‌ها با هم باشد. افزایش ایجاد شده در نقطه ذوب در اثر ورود کلسترول ممکن است به علت افزایش پیوندهای هیدروژنی بین گروه هیدروکسیل و گروه استری لسیتین و پیوندهای آبریز و واندروالسی بین کلسترول و بخشهای غیر قطبی لیپوزوم در حالت کلئیدی

تعیین اندازه و توزیع اندازه ذرات: با بررسی تغییر اندازه ذرات مشاهده شد که افزودن کلسترول تغییر معنی‌داری در سطح احتمال 5% در اندازه وزیکول‌ها ایجاد نکرده است. در غشاهای لیپوزومی که غنی از فسفاتیدیل کولین هستند، به دلیل حضور گروه‌های قطبی بزرگ در سر فسفولیپید، فضاهای خالی در ساختار ایجاد می‌شود که در این شرایط گروه‌های آسیل که در دم قرار دارند، طوری جهت‌گیری می‌کنند که هم فضاهای خالی ایجاد شده را کمتر کنند و هم بیشترین تماس را با هم داشته باشند. حضور کلسترول، ساختار قرارگیری لیپید و جهت‌گیری زنجیره‌های آسیل در دو لایه لیپیدی را تغییر می‌دهد. به این صورت که گروه‌های هیدروکسیل کلسترول با ایجاد پیوند هیدروژنی با گروه‌های کربونیل استری، زنجیره‌های آسیلی که به یک سمت کج شده‌اند را به صورت مستقیم و مرتب نگه می‌دارد و فضاهای ایجاد شده بین آنها را پر می‌کند (22). قرار گرفتن کلسترول در ساختار دولایه‌ای منجر به افزایش تراکم چیدمان مولکول‌های فسفولیپیدی می‌شود. این مولکول در هنگام تبدیل ساختارهای لاملار به وزیکول‌ها، در بین حفره‌های مولکولی تشکیل شده توسط زنجیره‌های آسیل قرار می‌گیرد بنابراین باعث افزایش معنی‌دار در اندازه وزیکول‌ها نشده است. گزارش‌های مختلف و متضادی در مورد اثر کلسترول بر اندازه لیپوزوم‌ها ارائه شده‌اند. در پژوهشی افزودن کلسترول منجر به سفتی ساختار لیپوزومی و افزایش اندازه ذرات شد (23). طی تحقیقاتی دیگر دیده شد که استفاده از کلسترول در ساختار لسیتین منجر به کاهش اندازه ذرات از 72 نانومتر به 63 نانومتر شد (24). به نظر می‌رسد که تأثیر کلسترول بر روی اندازه ذرات بستگی به روش تولید و نوع فسفولیپید مورد استفاده دارد. Alexander و همکاران (25) از استرول‌های گیاهی برای تولید نانولیپوزوم با استفاده از روش تزریق اتانول - هموزناسیون فشار بالا استفاده کردند. نتایج آنها نشان داد که ذرات به دست آمده اندازه زیر 200 نانومتر و توزیع اندازه ذرات باریک و تک مد داشتند که در مقایسه با انواع بدون استرول و لیپوزوم‌های حاوی کلسترول اندازه ذرات افزایش یافته بود ولی کارایی کپسولاسیون مانند انواع با کلسترول افزایش یافت. پایداری لیپوزوم‌های متشکله از استرول‌های گیاهی در مقایسه با انواع با کلسترول کاهش یافت و فرمولاسیون تولیدی با گذشت زمان دچار جدایی فاز

نتیجه گرفتند که افزایش کلاسترول منجر به افزایش سفتی ساختار و کاهش سیالیت غشا می‌شود.

آنالیز DSC برای دو نمونه ویتامین D<sub>3</sub> و پودرهای خشک شده نانولیپوزوم‌های لیسیتین - کلاسترول به همراه ویتامین D<sub>3</sub> از دمای 20°C تا 300°C انجام شد. همان طور که در شکل مشاهده می‌شود در گرمانگاشت‌های مربوط به نانولیپوزوم حاوی ویتامین D<sub>3</sub> تنها یک پیک ذوب وجود دارد و پیک مربوط به ذوب ویتامین در آن دیده نمی‌شود و همچنین با کپسولاسیون ویتامین، دمای ذوب نانولیپوزوم حاوی ویتامین نسبت به نانولیپوزوم فاقد آن، کاهش یافته است. با توجه به این شواهد می‌توان گفت که ترکیب ویتامین وارد برهمکنش‌های هیدروژنی و آبگریز ضعیف با ترکیبات لیپیدی شده و خواص حرارتی آن تغییر کرده است. با توجه به ساختار ویتامین D<sub>3</sub> و وجود یک گروه هیدروکسیل آزاد، احتمالاً در غلظت استفاده شده، واکنش ویتامین با زنجیره‌های آسیل فسفولیپید نسبت به برهمکنش بین مولکول‌های فسفولیپید غالب است و با توجه به ضعیف بودن پیوندهای هیدروژنی جدید، دمای ذوب ترکیب جدید کاهش یافته است. همچنین کاهش دمای ذوب پرولیپوزوم حاوی ویتامین، نشان دهنده تشکیل بلورهای با نظم کمتر نسبت به پرولیپوزوم بدون ویتامین است. در مورد اثر ماده فعال بر خواص حرارتی لیپوزوم‌ها و پرولیپوزوم‌ها تحقیقات متعددی انجام شده است. Xia و همکاران (14)، پرولیپوزوم‌های حاوی لوتئین را تهیه کردند و رفتار کریستالی لوتئین فسفاتیدیل کولین هیدروژنه (HPC) شده، پرولیپوزوم‌ها و مخلوط فیزیکی آن‌ها را مورد ارزیابی قرار دادند. آنها بیان کردند که درجه کریستالی لوتئین و فسفاتیدیل کولین هیدروژنه شده در ساختار پرولیپوزوم بسیار کاهش یافته و پیک لوتئین کاملاً حذف شده است. همچنین، لوتئین کاملاً در ساختار HPC پخش شده است و پیک پرولیپوزوم متفاوت از مخلوط فیزیکی و HPC می‌باشد. همچنین نتیجه گرفتند که ساختار پرولیپوزوم متفاوت از ساختار مخلوط فیزیکی لوتئین و HPC می‌باشد. در پژوهشی دیگر که توسط Rudra و همکاران (26)، بر روی نانولیپوزوم‌های حاوی ماده دارویی دوکسوروبیسین اتصال یافته به فسفاتیدیل اتانول آمین صورت گرفت، مشاهده شد که پیک آندوترمیک فسفاتیدیل کولین سوپا از دمای 204°C شروع شده و پیک آندوترمیک ماده فعال در دمای 197°C قرار دارد. آن‌ها نتیجه گرفتند که حضور پیک‌های

(محلول) باشد. با افزودن کلاسترول، ساختار هندسی دولایه - ای فسفولیپیدی تغییر می‌کند. گروه هیدروکسیل واقع در سر کلاسترول در مجاورت گروه‌های کربونیل استر لیپیدی قرار گرفته و حلقه استروئید آبگریز، موازی با زنجیره‌های آسیل لیپیدی جهت‌گیری می‌کند. برهمکنش بین فسفولیپید و کلاسترول منجر به افزایش چسبندگی غشایی و افزایش سختی مکانیکی غشا می‌شود. هرچه باندهای هیدروژنی بین گروه هیدروکسیل کلاسترول و گروه کربونیل فسفولیپید افزایش یابد، پایداری دو لایه‌ای لیپیدی افزایش خواهد یافت (29). در حالی که در فاز کریستال مایع افزودن کلاسترول، سیالیت و تحرک زنجیره‌های آسیل را محدود می‌کند، برعکس، در زیر دمای کرافت (دمای مزوفاز) یعنی در فاز ژلی، افزودن کلاسترول تحرک زنجیره‌های آسیل را افزایش می‌دهد و منجر به افزایش سیالیت غشای لیپوزومی می‌شود. همچنین حضور کلاسترول در فاز ژلی، پیوندهای واندروالس بین زنجیره‌های هیدروکربنی اسیدهای چرب را تضعیف و از کریستالیزاسیون لیپوزوم جلوگیری می‌کند (30). همچنین در این خصوص Xu و همکاران (31)، این گونه اظهار نظر کردند که فاکتورهایی از قبیل تفاوت در طول زنجیره، آرایش مولکولی، تعداد و موقعیت باندهای دوگانه و تفاوت در وضعیت قرارگیری زنجیره‌ها نقش مهمی در تعیین ساختار دولایه لیپیدی دارند. بسیاری از این فاکتورها با قرار گیری کلاسترول در ساختار تغییر می‌کند. همچنین آنها معتقد بودند که حلقه تتراپیرولی کلاسترول تأثیر بی‌نظم‌کنندگی بر روی زنجیره‌های آسیل دارد.

مطالعات کالریمتریک انجام گرفته در مورد اثر کلاسترول بر ویژگی‌های حرارتی لیپوزوم‌ها، بیشتر در حالت دیسپرسیون انجام شده است که فسفولیپید حالت ساختار دو لایه ای لیپوزومی را داراست و بیشتر بر روی تأثیر کلاسترول بر روی دمای انتقال فاز از حالت ژلی به حالت کریستال مایع متمرکز گشته است. در این خصوص Teseng و همکاران (32)، مطالعات کالریمتریک بر روی تأثیر افزودن کلاسترول بر روی دمای انتقال فاز دی پالمیتوئیل فسفاتیدیل کولین (DPPC) انجام دادند. نتایج نشان داد که افزودن کلاسترول باعث افزایش دمای انتقال فاز DPPC شد. آنها نتیجه گرفتند که افزایش در دمای انتقال فاز به این معنی است که کلاسترول منجر به افزایش انرژی گرمایی می‌شود که برای جهت‌گیری دوباره لیپید در شکل غشای دولایه ای، طی تغییر از فاز جامد ژلی به فاز کریستال مایع لازم است. آنها

بلورهای لیپید کاهش یافته که این باعث تغییر در سیالیت ساختار غشایی می‌شود و در نتیجه مقادیر نقطه ذوب لیپوزوم‌های حاوی گاما اوریزانول در مقایسه با توده مواد کاهش یافت.

مطالعات کالریمتریک انجام گرفته در مورد ویتامین D<sub>3</sub>، بیشتر بر روی تأثیر ویتامین بر روی دمای انتقال فاز متمرکز بوده است. Kazanci و همکاران (36)، در مورد تأثیر غلظت‌های مختلف ویتامین D<sub>2</sub> بر روی رفتار فازی DPPC تحقیق کردند. نتایج آنها نشان داد که ویتامین D<sub>2</sub> در غلظت‌های کم (3 و 1 درصد مولی) تأثیر مشخصی بر روی شکل و دمای انتقال فاز DPPC ندارد ولی در غلظت‌های بالاتر (12 و 9 درصد مولی) منجر به پهن شدگی و کاهش دمای انتقال فاز می‌شود. آنها این گونه نتیجه گرفتند که احتمالاً ویتامین در غلظت‌های کم قادر نیست نظم قرار گیری زنجیره‌های آسیل در دو لایه ای فسفولیپیدی را به هم بزند ولی در غلظت‌های بالاتر احتمالاً برهمکنش بین ویتامین و زنجیره‌های آسیل به برهمکنش بین مولکول‌های فسفولیپید غالب است و دمای انتقال فاز کاهش یافته است. در پژوهش دیگر Bondar و همکاران (37)، مطالعات کالریمتریک بر روی تأثیر ویتامین D<sub>3</sub> روی رفتار فازی فسفاتیدیل کولین 14 تا 18 کربنه و دی پالمیتویل فسفاتیدیل کولین خالص انجام دادند. نتایج آنها به این صورت بود که ویتامین D<sub>3</sub> دمای انتقال فاز PC و DPPC را کاهش می‌دهد، پیک انتقال را پهن می‌کند، آنتالپی را کاهش می‌دهد و در مخلوط لیپیدهای مختلف، ویتامین D<sub>3</sub> بر روی خصوصیات ترکیبی آنها تأثیر می‌گذارد و تأثیر مهمی بر روی عملکرد غشا دارد.

کارایی درون‌پوشانی: با توجه به شکل 4، در تمامی نمونه‌ها مقادیر راندمان بالاست و کلسترول در زمان‌های اولیه، تأثیری بر کارایی درون‌پوشانی نداشته است. کارایی درون‌پوشانی در نانوحامل‌ها به عوامل مختلف شامل ماهیت ماده فعال (آبگریز یا آبدوست بودن و میزان تمایل به برهمکنش با غشای دو لایه ای)، ترکیب غشای دو لایه (فسفولیپیدی یا فسفولیپید-استرول)، نسبت فسفولیپید به ماده فعال، روش تولید لیپوزوم و ویژگی‌های فیزیکی غشا و شرایط محیطی (دما و pH) بستگی دارد.

کارایی کپسولاسیون بالای به دست آمده در این تحقیق را می‌توان به سه عامل نسبت داد:

مجزاء اجزاء، در منحنی گرمایشی نانولیپوزوم‌های حاوی ماده فعال، به دلیل عدم وجود برهم‌کنش‌های شیمیایی بین آنها می‌باشد.

Westesen و همکاران (33) و خردمندی و همکاران (34) نیز، طی تحقیقات خود بر روی نانوذرات لیپیدی و نانوذرات لیپیدی جامد حاوی کتوپروفن نتایج مشابهی را گزارش کردند. آنها بیان کردند حذف پیک ذوب ترکیب فعال به دلیل آن است که در حامل به صورت غیر کریستالی انکپسوله شده است. این نتیجه در تحقیقات Popel & singh (19)، نیز مشاهده شد. حذف پیک تاکرولیپوس در منحنی گرمایشی مربوط به حامل‌های لیپیدی نانو ساختار حاوی تاکرولیپوس نشان داد که این ماده فعال به طور کامل در ماتریس لیپیدی حل شده است و پیک آندوترمیک و دمای ذوب را نسبت به توده مواد لیپیدی کاهش داده است. آنها گزارش کردند که دلیل این نتایج کاهش اندازه ذرات و تشکیل آرایش جدیدی با نظم کمتر توسط لیپیدها است. همچنین قابلیت امتزاج پذیری لیپیدهای با ساختارهای مختلف با طول زنجیره‌های مختلف در نانو حامل‌های لیپیدی، مولکول‌های حل شده را در شبکه بلورین لیپید تثبیت می‌کند و از دوباره قرار گیری مولکول‌های حل شده به فرم قطرات چربی دوست کوچک انفرادی جلوگیری می‌کند. در پژوهشی دیگر Guan و همکاران (35)، حذف پیک مربوط به ماده دارویی نیمیدین در گرمانگاشت نانولیپوزوم‌های حاوی این ماده را این گونه توجیه کردند که یا غلظت نیمیدین بارگذاری شده در نانولیپوزوم خیلی کم بوده که بتوان آن را تعیین کرد و یا اینکه نیمیدین با فسفولیپید واکنش داده و تشکیل فرم کمپلکس داده است. در پژوهشی دیگر، محمد حسنی و همکاران (27)، گزارش کردند که با افزودن گاما اوریزانول به ترکیب نانولیپوزوم‌های تولید شده به روش گرمایی، نقطه ذوب کاهش یافت و پیک مربوط به گاما اوریزانول در منحنی گرمایشی مربوط به نانو-لیپوزوم‌های حاوی گاما اوریزانول حذف شده بود. آنها این گونه نتیجه گرفتند که مشاهده تنها یک پیک ذوب در منحنی لیپوزوم‌های حاوی گاما اوریزانول می‌تواند نشان دهنده هم بلوری شدن (Cocrystalization) دو ترکیب و سازگاری خوب آنها با هم باشد. همچنین آنها این گونه پیشنهاد کردند که ممکن است گاما اوریزانول به شکل آمورف در داخل لیپوزوم بلوری کپسوله شده باشد و با قرارگیری گاما اوریزانول در دو لایه‌های لیپیدی، درجه فشردگی و نظم

Lio و همکاران (40)، گزارش کردند که وارد شدن کلسترول در ساختار لیپوزوم‌های تشکیل شده از فسفاتیدیل کولین، باعث سفت شدن ساختار شده و وزیکول‌ها پایداری بیشتری را در مقابل نیروهای برشی اعمال شده نشان دادند. همچنین آنها گزارش کردند که استفاده از کلسترول در ساختار لیپوزومی منجر به کاهش نفوذ پذیری غشای لیپوزومی و بهبود ماندگاری ماده درون‌پوشانی شده می‌شود.

3- روش مورد استفاده در این تحقیق هیدراسیون لایه نازک می‌باشد که در آن لسیتین، کلسترول و ویتامین در داخل حلال آلی حل می‌شوند که بعد از تبخیر حلال و هیدراته کردن لایه تشکیل شده، ویتامین در داخل دو لایه فسفولیپیدی قرار می‌گیرد. با توجه به مطالعات انجام گرفته روش مورد استفاده کارایی کپسولاسیون بالای برای مواد لیپوفیل بارگذاری شده داراست (11).

در این تحقیق از روش هیدراسیون لایه نازک- سونیکاسیون جهت تولید نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین D<sub>3</sub> استفاده شد.

تمام تیمارها اندازه ذرات زیر 100 نانومتر و توزیع ذرات باریک داشتند و همچنین افزودن کلسترول تأثیر معنی‌داری در سطح 5% در اندازه ذرات ایجاد نکرد. ویتامین D<sub>3</sub> با توجه به ماهیت لیپوفیل خود و داشتن ساختاری شبیه به کلسترول (داشتن هیدروکسیل آزاد)، به طور کامل در ساختار لیپوزومی قرار گرفت و کارایی درون‌پوشانی برای تمام تیمارها بالای 90 درصد بود.

1- ماهیت آبگریز ویتامین D<sub>3</sub>، مواد آبگریز طی کپسوله شدن درمیان غشای دو لایه‌ای قرار می‌گیرند و زنجیره‌های آسیل فسفولیپید محیط مناسبی برای آنها فراهم می‌کنند و از اکسیداسیون و تجزیه هیدرولیکی در امان خواهند بود و در نتیجه به علت کم بودن پدیده انتشار، ماده فعال آبگریز از ساختار لیپوزوم نشت پیدا نمی‌کند. سه مزیت اصلی درون‌پوشانی ترکیبات آبگریز درمقایسه با ترکیبات آبدوست را می‌توان پایداری شیمیایی بالاتر در برابر هیدرولیز و اکسیداسیون، سرعت رهایش پایین‌تر و کارایی درون‌پوشانی بالاتر دانست (19). Padamwar و همکاران (38)، نیز کارایی درون‌پوشانی 98-101 درصد برای نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین E به دست آوردند که آنها نیز نتایج به دست آمده را به لیپوفیل بودن ماده کپسوله شده نسبت دادند. Montenegro و همکاران (39) نیز کارایی درون‌پوشانی بالای برای ترکیبات آبگریز در لیپوزوم‌های تشکیل شده از دی پالمیتویل فسفاتیدیل کولین به دست آوردند که نتایج آنها با نتایج به دست آمده در این تحقیق مطابقت داشت.

2- استفاده از کلسترول در ساختار نانولیپوزوم‌ها: همان طور که گفته شد سیالیت یا واکنش‌های بین وزیکول‌ها با افزودن کلسترول کاهش می‌یابد و ماده درون‌پوشانی شده نیز ماندگاری بیشتری در ساختار لیپوزومی خواهد داشت (23). البته در این تحقیق، نمونه بدون کلسترول نیز کارایی کپسولاسیون بالای داشت که به ماهیت لیپوفیل ماده کپسوله شده برمی‌گردد.

## • References

- Gonnet M, Lethuaut L, Boury F. New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. *J. Control. Release* 2010; 146: 276-90
- Belasco C, Pico Y. Determining nanomaterials in food. *Trends Anal. Chem* 2011; 30: 84-99.
- Sozer N, Kokini J L. Nanotechnology and its applications in the food sector. *Trends. Biotechnol* 2009; 27: 82-89.
- Mozafari MR, Khosravi-Darani K, Borazan GG, Cui J, Pardakhty, A, Yurdugul S. Encapsulation of Food Ingredients Using Nanoliposome Technology. *Int J Food Prop* 2008; 11: 833-44.
- Keller BC. Liposomes in nutrition. *Trend Food Sci Technol* 2001; 12: 25-31.
- Rajakumar K. Vitamin D, cod-liver oil, sunlight, and rickets: a historical perspective. *Pediatrics* 2003; 112: 132-35.
- Ovesen L, Andersen R, Jakobsen J. Geographical differences in vitamin D status, with particular reference to European countries. *P Nutr Soc* 2003; 62: 813-21.
- Ovesen L, Brot C, Jakobsen J. Food contents and biological activity of 25- hydroxyvitamin D: a vitamin D metabolite to be reckoned with. *Ann Nutr Metabol* 2003; 47: 107-13.
- Considine T, Patel HA, Singh H, Creamer LK. Influence of binding conjugated linoleic acid and myristic acid on the heat- and high-pressure-induced unfolding and aggregation of [beta]-lactoglobulin B. *Food Chem* 2007; 102: 1270-80

10. Rasti B, Jinap S, Mozafari MR, Yazid AM. Comparative study of the oxidative and physical stability of liposomal and nanoliposomal polyunsaturated fatty acids prepared with conventional and Mozafari methods. *Food Chem* 2012; 135, 2761-70.
11. Ko S, Lee S-ch. Effect of nanoliposomes on the stabilization of incorporated retinol. *Afr J Biotechnol* 2010; 9: 6158-61.
12. Vafabakhsh Z, Khosravi-Darani K, Khajeh Kh, Jahadi M, Komeili R, Mortazavian AM. Stability and catalytic kinetics of protease loaded liposomes. *Biochem Eng J* 2013; 72: 11-17.
13. Kirby CJ, Gregoriadis G. Dehydration-rehydration vesicles, a simple method for high yield drug entrapment in liposomes. *Biotechnology* 1984; 2: 979-84.
14. Xia S, Xu S. Ferrous sulfate liposomes: preparation, stability and application in fluid milk. *Food Res Int* 2005; 38: 289-96.
15. Marsanasco M, Márquez AL, Wagner JR, Alonso S, del V, Chiaramoni NS. Liposomes as vehicles for vitamins E and C: An alternative to fortify orange juice and offer vitamin C protection after heat treatment. *Food Res Int* 2011; 44: 3039-46.
16. Teeranachaideekul V, Souto E, Junyaprasert V, Muller, R. Cetyl palmitate-based NLC for topical delivery of Coenzyme Q10 – Development, physicochemical characterization and in vitro release studies. *Eur J Pharm Biopharm* 2007; 67:141-48.
17. Lio N, Park HJ. Chitosan-coated nanoliposome as vitamin E carrier. *J Microencapsul* 2009; 26: 235-42.
18. Seetapan N, Bejrappa P, Srinuanchai W, Ruktanonchai RU. Rheological and morphological characterizations on physical stability of gamma-oryzanol-loaded solid lipid nanoparticles (SLNs). *Micron* 2010; 41: 51-58.
19. Pople PV, Singh KK. Development and evaluation of colloidal modified nanolipid carrier: Application to topical delivery of tacrolimus. *Eur J Pharm. Biopharm* 2011; 79: 82-94.
20. Lee S, Lee J, Choi YV. Characterization and Evaluation of Freeze-dried Liposomes Loaded with Ascorbyl Palmitate Enabling Anti-aging Therapy of the Skin. *Bull Korean Chem Soc* 2007; 28: 99- 102.
21. Manconi M, Mura S, Sinco C, Fadda AM, Vila AO, Molina F. Development and characterization of liposomes containing glycols as carriers for diclofenac. *Colloids Surf A* 2009; 342: 53-58.
22. Nagle JF, Tristram-Nagle S. Structure of lipid bilayers. *Biochim Biophys Acta* 2000; 1469: 159-95.
23. Teseng LP, Liang HJ, Chung TW, Liu TZ. Liposome incorporated with cholesterol for drug release triggered by magnetic field. *J Med Eng Technol* 2007; 27: 29-34.
24. Viriyaroj A, Ngawhirunpat T, Sukma M, Akkaramongkolporn P, Ruktanonchai U, Opanasopit P. Physicochemical properties and antioxidant activity of gamma-oryzanol-loaded liposome formulations for topical use. *Pharm Dev Technol* 2009; 6: 665-71.
25. Alexander M, Lopez AA, Fang Y, Corredig M. Incorporation of phytosterols in soy phospholipids nanoliposomes: Encapsulation efficiency and stability. *LWT Food Sci Technol* 2012; 47: 427-36.
26. Rudra A, Deepa RM, Ghosh MK, Ghosh S, Mukherjee B. Doxorubicin-loaded phosphatidylethanolamine conjugated nanoliposomes: in vitro characterization and their accumulation in liver, kidneys, and lungs in rats. *Int J Nanomedicine* 2010; 5: 811-23.
27. Mohammadhassani Z. Preparation and Evaluation of Nanoliposomes Containing  $\gamma$ -Oryzanol (a Nutraceutical Compound) Properties. Tabriz: Tabriz University, M.S. Aras International Campus, Department of Food Science and Technology; 2013.
28. Bunjes H, Unruh T. Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59: 379-402.
29. Liang X, Mao G, Ng KYS. Mechanical properties and stability measurement of cholesterol-containing liposome on mica by atomic force microscopy. *J Colloid Interface Sci* 2004; 278: 53-62.
30. Brandl M. Liposomes as drug carriers : A technological approach. *Biotechnol Annu Rev* 2001; 7: 59-85.
31. Xu H, Huang C. Scanning calorimetry study of fully hydrated asymmetric phosphatidylcholines with one acyl chain twice as long as the other. *Biochem* 1987; 26: 1036-43.
32. Huang C, Levin IW. Effect of lipid chain length inequivalence on the packing characteristics of bilayer assemblies. *J Phys Chem* 1983; 87: 1509-13.
33. Westesen K, Siekmann B, Koch M. Investigations on the physical state of lipid nanoparticles by synchrotron radiation X-ray diffraction. *Int J Pharm* 1993; 93: 189-99.
34. Kheradmandnia S, Vasheghani-Farahani E, Nosrati M. The effect of process variables on the properties of ketoprofen loaded solid lipid nanoparticles of beeswax and carnauba wax. *Iran. J Chem Eng* 2010; 29: 181-87.
35. Guan T, Miao Y, Xu L, Yang Sh, Wang J, He H, et al. Injectable nimodipine-loaded nanoliposomes:

- Preparation, lyophilization and characteristics. *Int J Pharm* 2011; 410: 180-87.
36. Kazanci N, Toyran N, Haris PI, Severcan F. Vitamin D2 at high and low concentrations exert opposing effects on molecular order and dynamics of dipalmitoyl phosphatidylcholine membranes. *IOS. Press* 2001; 15: 47-55.
37. Bondar OP, Rowe ES. Differential scanning calorimetric study of the effect of vitamin D3 on the thermotropic phase behavior of lipids model systems. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1240: 125-32.
38. Montenegro L, Panico AM, Bonina F. Quantitative determination of hydrophobic compound entrapment in dipalmitoylphosphatidylcholine liposomes by differential scanning calorimetry. *Int J Pharm* 1996; 138: 191-97.
39. Padamwar MN, Pokharkar VB. Development of vitamin loaded topical liposomal formulation using factorial design approach: drug deposition and stability. *Int. J Pharm* 2006; 320: 37-44.
40. Lio DZ, Chen WY, Tasi LM, Yang SP. The effect of cholesterol on the release of free lipids and physical stability of lecithin liposomes. *J Chin Inst Chem Eng* 2000; 31: 269- 76.

## Physical properties of vitamin D<sub>3</sub>-loaded nanoliposomes prepared by thin layer hydration-sonication

Mohammadi M<sup>1</sup>, Ghanbarzadeh B<sup>2\*</sup>, Hamishehkar H<sup>3</sup>, Rezayi Mokarram R<sup>4</sup>, Mohammadifar MA<sup>5</sup>

1- M.Sc. in Food Sciences and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

2- \*Corresponding author: Associated Prof, Dept. of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran, E-mail: Ghanbarzadeh@tabrizu.ac.ir

3- Assistant Prof, Drug Applied Research Center, Medical Research and Development Complex, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

4- Assistant Prof, Dept. of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

5- Associate prof, Dept. of Food Sciences and Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

Received 3 Sept, 2013

Accepted 20 Jan, 2014

**Background and Objectives:** The encapsulation of nutraceutical compounds in lipid-based carrier systems, such as nanoliposomes, is effective in preserving their native properties throughout their shelf lives. Liposomes are widely used in food industries because of their benefits, which include possible large-scale production using natural ingredients, entrapment and release of water-soluble, lipid-soluble, and amphiphilic materials and biodegradability. The present study prepared vitamin D<sub>3</sub> nanoliposomes and characterized them using differential scanning calorimetry (DSC) and scanning electron microscopy.

**Materials and Methods:** Nanoliposomes containing vitamin D<sub>3</sub> were prepared using different quantities of phosphatidylcholine (PC) and cholesterol (60-0, 50-10, 40-20, 30-30 mg) equivalents (8-0, 7-3, 5-5, 4-8 mM) using thin-film hydration and sonication. DSC and determination of particle size and encapsulation efficiency were carried out to determine the physicochemical properties of the liposomes.

**Results:** The results shows that particle size was 78-89 nm and size distribution (span) was 0.77- 0.84 nm. In all formations, the encapsulation efficiency of vitamin D was >90%. The DSC thermogram of the vitamin-loaded liposome showed the disappearance of the melting endothermic peak of vitamin D<sub>3</sub> and a major endothermic peak at 227°C, indicating that vitamin D<sub>3</sub> complex formed with the bilayers and was completely encapsulated by the lipid matrix of the nanoliposomes. The lower melting temperature of proliposome over bulk lecithin can be attributed to its small particle size. SEM analysis showed that the surface morphology of all freeze-dried liposome samples had a porous structure.

**Conclusions:** Vitamin D<sub>3</sub> nanoliposomes were prepared successfully using the thin film hydration-sonication method that achieved all expected features.

**Keywords:** Encapsulation, Nanoliposomes, Vitamin D<sub>3</sub>, Thermal properties