Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services
Vol. 36, No. 4, Oct. – Nov. 2014, Pages: 102-111

Study of Stability, Zeta-potential, and Steady Rheological Properties of Nanoliposomes Containing Vitamin D_3

Maryam Mohammadi[1,2], Babak Ghanbarzadeh[2], Reza Rezaei Mokarram[2], Mohammad Yar Hoseini[3], Hamed Hamishehkar[4]*

[1]Biotechnology Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran
[2]Department of Food Science and Technology, School of Agriculture, Tabriz University, Tabriz, Iran
[3] Department of Food Science and Technology, School of Agriculture, University of Ilam, Iran
[4] Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Received: 12 Oct, 2013 Accepted: 15 Dec, 2013

Abstract

Background and Objectives: Vitamin D is a group of sterol compounds and a liposoluble vitamin that has major role in the matrix of cartilage and bones. Food fortification with liposoluble vitamin is not straightforward, because of this vitamins is poorly dispersible in aqueous systems such as beverages. The encapsulation of nutraceutical compounds in lipid-based carrier systems, like nanoliposomes, is effective in the preservation of their native properties during storage. The objective of the present study was to prepare vitamin D_3 nanoliposomes, characterization, and stability studies of prepared formulation.

Materials & Methods: In this experimental study, the nanoliposomes containing vitamin D_3 were prepared from various quantities of lecithin and cholesterol (60-0), (50-10), (40-20), (30-30) by thin-film hydration-sonication method. Various testes such as zeta-potential, turbidity and rheology were carried out to determine physicochemical properties of liposomes. The physical stability of the prepared formulations, evaluated by measuring the average particle size and the remaining vitamin D_3 in nanoliposomes during storage, over 30 days at 4˚C.

Results: Zeta-potential results showed that inclusion of cholesterol in liposome caused to increase of negative zeta-potential from -29 to -42.9 mv. The samples containing cholesterol showed no significant changes in mean diameter volume and the amount of vitamin loaded liposome, during this period. The incorporation of cholesterol into the phospholipid bilayer increased the turbidity. All liposome samples showed Newtonian behavior at all concentration of lecithin- cholesterol.

Conclusions: The applied method in this study has been efficient method for encapsulation of vitamin D_3, reduction of size in the nonometric range, a narrow size distribution, physical stability and else properties.

Keywords: Nanoparticles, Liposome, Cholecalciferol, Zeta potential, Rheology

*Corresponding author:
E-mail: hamishehkar.hamed@gmail.com

مقاله پژوهشی

بررسی ویژگی های پایداری، پتانسیل زتا و رئولوژی نانولیپوزومهای حامل ویتامین D_3

مریم محمدی[۱،۲]، بابک قنبرزاده[۲]، رضا رضایی مکرم[۲]، محمد یار حسینی[۳]، حامد همیشه کار*[۴]

[۱]مرکز تحقیقات بیوتکنولوژی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران
[۲]گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، تبریز، ایران
[۳] گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ایلام، ایلام، ایران
[۴] مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

دریافت: ۹۲/۷/۲۰ پذیرش: ۹۲/۹/۲۴

چکیده

زمینه و اهداف: ویتامین D یک ترکیب با ساختار استرولی و یک ویتامین محلول در چربی است که نقش مهمی را در ماتریکس غضروف و استخوانها ایفا می‌کند. غنی سازی مواد غذایی با ویتامینهای محلول در چربی آسان نیست. چون این ویتامینها، در محلولهای آبی مثل نوشیدنیها، قابلیت پخش‌شدن کمی دارند. درون پوشانی ترکیبات غذا- دارو توسط حاملهای لیپیدی مانند لیپوزومها، یک روش مؤثر برای حفاظت ویژگیهای ذاتی آنها در طی دوره نگهداری است. هدف این کار تحقیقی، تولید و آماده‌سازی نانولیپوزومهای حاوی ویتامین D_3، تعیین ویژگیهای مختلف آنها و مطالعه بر روی پایداری فرمولاسیون آماده سازی شده است.

مواد و روش ها: نانولیپوزومهای حاوی ویتامین D_3، با استفاده از غلظتهای متفاوت لسیتین-کلسترول (۶۰-۰، ۵۰-۱۰، ۲۰-۴۰ و۳۰-۳۰) و توسط روش هیدراسیون لایهٔ نازک- سونیکاسیون تهیه شدند. آزمون‌های پتانسیل زتا، کدورت و خواص رئولوژیکی برای تعیین خواص فیزیکوشیمیایی نمونه‌ها انجام گرفت. پایداری فیزیکی توسط اندازه‌گیری اندازهٔ ذرات و مقدار ویتامین باقیمانده در طی مدت نگهداری به مدت یک ماه در$4^{\circ}C$ تعیین شدند.

یافته‌ها: نتایج پتانسل زتا نشان داد که با ورود کلسترول به ساختار، پتانسیل زتا از ۲۹- به ۴۲/۸- افزایش یافت. نمونه‌های دارای کلسترول طی نگهداری از نظر اندازه و مقدار ویتامین لود شده، دچار تغییرات چندانی نگردیدند. با ورود کلسترول به دولایه‌ای فسفولیپیدی، کدورت سیستم افزایش یافت. همچنین، محلول‌های لیپوزومی در تمامی غلظت‌های لسیتین- کلسترول دارای رفتار نیوتنی بودند.

نتیجه گیری: روش مورد استفاده در این تحقیق، از نظر انکپسولاسیون ویتامین D_3، کاهش ذرات در مقیاس نانو و توزیع اندازهٔ ذرات باریک و تک مد، ایجاد پایداری در طول زمان و دیگر خصوصیات مورد انتظار روش مناسبی بوده است.

کلید واژه ها: نانوذرات، لیپوزوم، ویتامین D_3، پتانسیل زتا، رئولوژی

* ایمیل نویسنده رابط: hamishehkar.hamed@gmail.com

مقدمه

ویتامینD، 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) می باشند. نقش اصلی ویتامین D در بدن، افزایش جذب کلسیم و فسفر در روده و بازجذب آن در کلیه می باشد (۲ و ۱). منبع اصلی ویتامین D مورد نیاز انسان، ۷ دهیدروکلسترول موجود در سلولهای پوست است که در اثر تابش نور فرابنفش، به ویتامین D_3 تبدیل می‌شود. ویتامین D بیشتر در منابع حیوانی (تخم مرغ، شیر، کره، روغن کبد ماهی) یافت می شود و منابع گیاهی منابع فقیری از نظر آن هستند. کارشناسان علم تغذیه معتقدند که تعداد بسیار کمی از افراد، ویتامین D خود را از طریق غذا تأمین می‌کنند و به منظور تأمین ویتامین D مورد نیاز، افراد باید در معرض نور آفتاب قرار بگیرند. اما قرارگرفتن بیش از اندازه در مقابل آفتاب، بدلیل اثرات مضر پرتو فرابنفش، زیان‌آور است. درون پوشانی ویتامین D در حاملهای

کلوئیدی و غنی‌سازی مواد غذایی و بویژه نوشیدنی‌ها می تواند راه حل مناسبی برای تأمین آن باشد (۳). انکپسولاسیون (درون-پوشانی)، تکنیکی است که طی آن، ذرات کوچک جامد و قطرات مایع، درون یک پوشش نازک قرار می‌گیرند و در نتیجه، انتشار آنها کنترل شده و در برابر تخریب و تجزیه محافظت می شوند (۴). بر حسب اندازهٔ ذرات تولید شده، می توان درون پوشانی را به دو نوع میکرو و نانو تقسیم بندی کرد. ذرات دارای اندازه نانو، دارای مزایای متعددی نسبت به ذرات میکرو هستند. از جمله اینکه، با کاهش اندازه ذرات به مقیاس نانو و در نتیجه افزایش نسبت سطح به حجم، ویژگی‌های مختلف مواد از جمله قابلیت دسترسی زیستی، حلالیت در آب، پایداری کلوئیدی و شفافیت محلول‌های حاوی نانوذره، افزایش می‌یابد (۵). نانوحامل‌های مورد استفاده در صنایع غذایی و دارویی را می‌توان به دو دستهٔ نانوکپسول‌های بیوپلیمری و نانوکپسول‌های لیپیدی تقسیم کرد. اگرچه نانوحامل‌های بیوپلیمری فواید بسیار دارند اما امکان صنعتی شدن کامل آنها به علت به کارگیری فرآیندهای گرمایی یا شیمیایی پیچیدهٔ مختلف که به طور کامل قابل کنترل نیستند، مشکل است. ولی نانوحامل‌های لیپیدی، امکان تولید در مقیاس صنعتی را دارند و دارای کارایی انکپسولاسیون بالا و سمیت پایین هستند. نانوحامل‌های بر پایه لیپیدی شامل نانو لیپوزومها، نانونیوزومها، نانوامولسیونها، میسلهای سورفاکتانت ها (میکرو امولسیون ها) و ذرات لیپیدی جامد می باشند (۶). نانولیپوزومها، ذرات کروی تشکیل شده از لیپیدهای قطبی (فسفولیپیدها و گلیکولیپیدها) هستند. فسفولیپیدها، آمفی فیل (دارای هر دو گروه آبدوست و آبگریز) هستند و به محض واکنش با آب به صورت سازمان یافته و به شکل غشاهای دو لایه‌ای تجمع می‌یابند و در اثر وارد شدن انرژی و نیروی برشی (هموژنیزاسیون، سونیکاسیون) بصورت کروی (وزیکول) در می‌آیند (۷). علاوه بر مولکول‌های فسفولیپیدی، نانولیپوزومها ممکن است حاوی مولکول‌های دیگر مثل استرول‌ها در ساختار خود باشند. استرول‌ها یکی از اجزای مهم در ساختار غشاهای طبیعی هستند و وارد کردن آنها در ساختار نانولیپوزومها باعث تغییرات مهمی در خصوصیات آنها می‌شود. کلسترول، استرولی است که به طور گسترده در ساختار وزیکول‌های لیپیدی استفاده می‌شود و با تعدیل کردن سیالیت دو لایه‌های لیپیدی باعث افزایش پایداری وزیکول‌های لیپیدی می‌شود (۸). لیپوزومها می‌توانند مواد فعال آب دوست را در درون و سطح و مواد آبگریز را در میان غشا، انکپسوله کنند (۹). در سالهای اخیر، تحقیقات متعددی برای توسعه کاربرد لیپوزومها در غنی‌سازی مواد غذایی با ویتامین‌ها و ترکیبات غذا- دارو (نوتریسیتیکال) صورت گرفته است. در پژوهشی مارساناسکو و همکاران (۱۰)، بر روی لیپوزومهای حاوی ویتامین E و C (تولید شده به روش هیدراسیون لایهٔ نازک) جهت کاربرد در غنی سازی آب پرتقال مطالعه کردند. 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 ۳۷ روز و در دمای $4^{\circ}C$) نشان داد. آنها همچنین اعلام کردند که اسید استئاریک می‌تواند جایگزین خوبی برای کلسترول در فرمولاسیون لیپوزومی باشد. کو و همکاران (۱۱)، بر روی پایداری نانولیپوزومهای حاوی رتینول (تولید شده به روش هیدراسیون لایه نازک- اکستروژن) تحت شرایط تاریکی و نور UV و در دماهای (۴، ۲۵، ۳۷ و ۵۰ درجهٔ سانتیگراد) تحقیقاتی انجام دادند. نتایج نشان داد که پایداری نانو-لیپوزومهای حاوی رتینول تحت شرایط تاریکی و نور UV افزایش یافت. رتینول در دماهای بالاتر سریعتر تجزیه شد و بیشترین حفاظت نانولیپوزوم در دمای $4^{\circ}C$ و تحت شرایط تاریکی به دست آمد که احتمالاً به دلیل کاهش نفوذ پذیری غشا نسبت به اکسیژن، نور و کاهش اکسیداسیون و هیدرولیز فسفولیپید بود. با توجه به مطالعات انجام شده، نانولیپوزومها پتانسیل خوبی را برای غنی سازی مواد غذایی با ترکیبات زیست فعال آبگریز دارا هستند. هدف کار تحقیقی حاضر، آماده سازی نانولیپوزومهای حاوی ویتامین D_3 با استفاده از روش هیدراسیون لایهٔ نازک- سونیکاسیون و بررسی پایداری کلوئیدی و قابلیت حفاظت کنندگی آنها از ویتامین D_3 می باشد.

مواد و روش‌ها

فسفولیپید (ال- آلفا- لسیتین گرانولار با درجهٔ خلوص ۹۸٪، شرکت Across آمریکا)، کلسترول (با درجهٔ خلوص ۹۵٪، - شرکت Merck آلمان)، ویتامین D_3 (شرکت DSM، فرانسه)، سایر مواد از شرکت مواد شیمیایی مرک (Chemical Co. Merck Darmstadt, Germany) تهیه شدند.

تولید و آماده‌سازی نانولیپوزومهای حاوی ویتامین D_3

ابتدا غلظتهای متفاوت از لسیتین-کلسترول (۳۰-۳۰، ۴۰-۲۰، ۵۰-۱۰ و ۶۰-۰) در حلالهای ترکیبی از کلروفرم- متانول با نسبت ۱:۲ حل شد. بعد ویتامین D_3 به مخلوط لسیتین-کلسترول در یک فلاسک ته گرد ۵۰ ml اضافه شد. حلال در یک اواپراتور روتاری (شرکت Heidolph، کشور آلمان) در $30^{\circ}C$ تبخیر شد. بعد لایهٔ نازک تشکیل شده با ۱۰ میلی لیتر آب مقطر استریل هیدراته شد و دانکهای شیشه‌ای برای کمک به هیدراته شدن لایهٔ نازک لیپیدی اضافه شد. در این مرحله لیپوزومهای مولتی لاملار (Multilamellar) میکرومتری تولید شدند. در ادامه نمونه‌ها در هموژنایزر (شرکت Heidolph، کشور آلمان) با سرعت ۲۰۰۰۰ rpm در دمای بالای انتقال فاز لیپوزومها به مدت ۱۰ 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 (Materials & Sonics vibracell، کشور انگلستان) منتقل شد و ۵ سیکل ۱ دقیقه‌ای با ۳ دقیقه استراحت ما بین سیکلها بر روی نمونه‌ها اعمال شد. در این مرحله نانولیپوزومهای یونی‌لاملار (Unilamellar) تولید شدند.

روش‌های آزمون

پتانسیل زتا

برای تعیین پتانسیل زتای لیپوزومها و نمونه‌های حاوی ویتامین D_3، از دستگاه زتا سایزر (Nano-ZS ساخت شرکت Malvern کشور انگلستان) استفاده شد. نمونه‌ها نخست با استفاده از آب مقطر ۵۰ برابر رقیق شدند. 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 محلول لیپوزومی در pH =۷/۴ و در دمای ۲۵ ^{o}C و توان ۱۴۹ وات انجام شد (۱۲).

پایداری

به منظور بررسی پایداری فیزیکی سیستم، محلول‌های لیپوزومی تهیه شده در تیوپهای ۵۰cc ریخته شده و در دمای ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شدند. اندازهٔ ذرات در بازه‌های زمانی (۱، ۱۵ و- ۳۰ روز)، توسط دستگاه آنالیز کنندهٔ ذرات (مدل SALD 2101 ساخت ژاپن) بر اساس روش تفرق نور لیزر اندازه‌گیری شدند.

تعیین پایداری ویتامین D_3 در لیپوزوم ها طی نگهداری

به منظور بررسی میزان پایداری و حفظ ویتامین D طی نگهداری ، محلول‌های لیپوزومی تهیه شده در تیوپهای ۵۰cc ریخته شده و در دمای$4^{o}C$ نگهداری شدند. در بازه‌های ۱، ۱۵و ۳۰ روز، مقدار ویتامین باقیمانده در حامل لیپوزومی بعد از استخراج با کلروفرم با استفاده از دستگاه HPLC (مدلKnauer، ساخت کشورآلمان) تعیین شد. به این ترتیب که ابتدا غلظتهای ۲/۵، ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰ ماکرولیتر در هر میلی لیتر از ویتامین D_3 تهیه شد و به دستگاه HPLC تزریق شد. 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 معادلهٔ به دست آمده از منحنی استاندارد گذاشته شد و غلظت ویتامین باقیمانده از رابطهٔ (۱) محاسبه شد (معادله ۱) (۱۳).

اندازه‌گیری کدورت

کدورت نانولیپوزومهای حاوی ویتامین، در دستگاه اسپکتوفتومتر نور مرئی مدل Ultrospec 2000 ساخت انگلیس و در عدد موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شدند. ابتدا یک میلی لیتر از نمونه با ۲ میلی لیتر آب مقطر رقیق شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. بعد نمونه ها در سل مربوط به اسپکتوفتومتر ریخته شد و کدورت نمونه ها در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه گیری شدند (۱۴).

آزمون رئولوژیکی

اندازه‌گیری ویژگی‌های رئولوژیکی نمونه‌های کمپلکس، یک روز پس از آماده سازی نمونه‌ها، در دمای $25^{o}C$ و با استفاده از دستگاه رئومتر Physica Anton Paar (مدل MCR 301، ساخت اتریش)، مجهز به رئومتری استوانه‌ای هم مرکز با قطر پروب‌های ۲/۵ سانتیمتر برای استوانه داخلی و ۲/۷ سانتیمتر برای استوانه خارجی انجام شد. برای اندازه‌گیری تنش برشی و گرانروی به صورت تابعی از سرعت برشی و تعیین نوع رفتار جریانی نمونه‌ها، در یک فاصله زمانی ۱۰ دقیقه، سرعت برشی از $2S^{-1}$ به $100S^{-1}$ 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 در سطح احتمال ۵٪ (P<۰/۰۵) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای تأیید وجود اختلاف بین میانگین‌ها انجام گرفت.

نتایج

پتانسیل زتا

پتانسیل الکتریکی در لایه سطحی (Interfacial) بین لایهٔ باردار غیرمتحرک (ساکن یا استرن) و لایهٔ متحرک اطراف ذرات و قطرات کلوئیدی، پتانسیل زتا نامیده می‌شود. به عبارت دیگر، پتانسیل زتا، اختلاف پتانسیل بین لایهٔ باردار ساکن و بقیه فاز پیوسته است. پتانسیل زتا بهترین شاخص برای تعیین وضعیت الکتریکی سطحی سیستم های کلوئیدی است چون نشاندهندهٔ میزان تجمع بار در لایهٔ غیرمتحرک و شدت جذب یون های مخالف به سطح ذره و در نتیجه میزان پایداری الکترواستاتیک است. پتانسیل زتا بصورت مستقیم قابل اندازه‌گیری نیست و از روی تحرک الکتروفورتیک تعیین می‌شود. کاهش اختلاف پتانسیل زتا به زیر مقدار بحرانی، موجب درهم ریختن لایهٔ دو گانه باردار اطراف ذرات و تجمع ذرات می‌شود. مقادیر پتانسیل زتا حدود ۲۵ میلی ولت (بصورت مثبت یا منفی) معمولاً به عنوان معیاری برای تفکیک سطوح ذرات با بار الکتریکی بالا و پایین در نظر گرفته می شود.

$$\text{میزان پایداری} = \frac{\text{مقدار ویتامین } D_3 \text{ باقیمانده در لیپوزوم}}{\text{مقدار ویتامین } D_3 \text{ کپسوله شدهٔ اولیه}} \times 100$$

کلوئیدهای حاوی ذرات با پتانسیل زتای پایین (مثبت یا منفی)، در صورت عدم وجود فاکتورهای بازدارنده دیگر مانند ویسکوزیته بالا و ممانعت فضایی، استعداد زیادی به لخته و توده شدن خواهند داشت (۱۵). در این پژوهش، برای مشخص شدن میزان نیروهای دافعه الکترواستاتیک بین نانولیپوزومهای بدون ویتامین و نانولیپوزومهای حاوی ویتامین و همچنین میزان پایداری فرمولاسیون ناشی از آن، از نتایج تحرک الکتروفورتیک و پتانسیل زتا استفاده شد. نتایج حاصل از پتانسیل زتا نانولیپوزومهای بدون ویتامین و با ویتامین در جدول ۱ آمده است. همان طور که مشاهده می‌شود تمامی لیپوزومها دارای پتانسیل زتای بالای ۲۵ mv- هستند که مطلوب است. پتانسیل زتای نانولیپوزوم بدون کلسترول و ویتامین ۲۹ mv- بود که عمدتاً به دلیل یونیزاسیون گروه‌های فسفات موجود در لسیتین می‌باشد. با افزودن کلسترول به ساختار، پتانسیل زتا افزایش یافت. با کپسوله شدن ویتامین در نانولیپوزوم ودر مقایسهٔ هر تیمار با نوع بدون ویتامین آن، پتانسیل زتا یا بدون تغییر ماند یا افزایش جزئی داشت.

جدول۱: پتانسیل زتا و پارامترهای رئولوژیک مدل قانون توان نانولیپوزومها

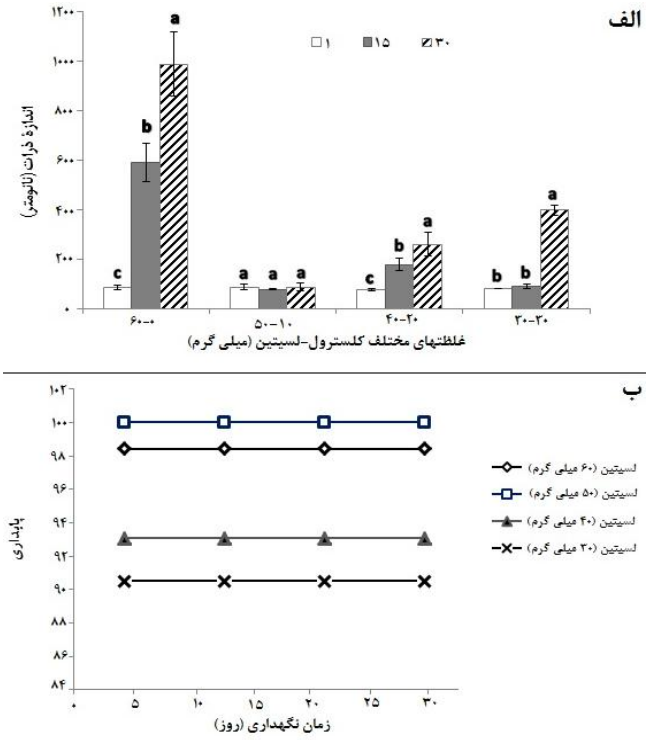
ترکیبات تشکیل دهنده لیپوزوم	پتانسیل زتا (mv)		پارامترهای رئولوژیک مدل قانون توان		
لسیتین به کلسترول (mg)	با ویتامین	بدون ویتامین	شاخص جریان (n)	ضریب قوام (K) (Pa.s)	R^2
۶۰ به ۰	−۲۹/۶	−۲۹	۰/۹۶	۰/۲۶	۰/۹۹۵۳
۵۰ به ۱۰	−۴۰/۵	−۳۵	۰/۸۷	۱/۶۶	۰/۹۹۶
۴۰ به ۲۰	−۴۱/۶	−۳۹/۷	۰/۸۷	۱/۶۰	۰/۹۹۶۶
۳۰ به ۳۰	−۴۲/۹	−۴۲/۸	۱/۳۳	۱/۱۶	۰/۹۹۶

بررسی پایداری

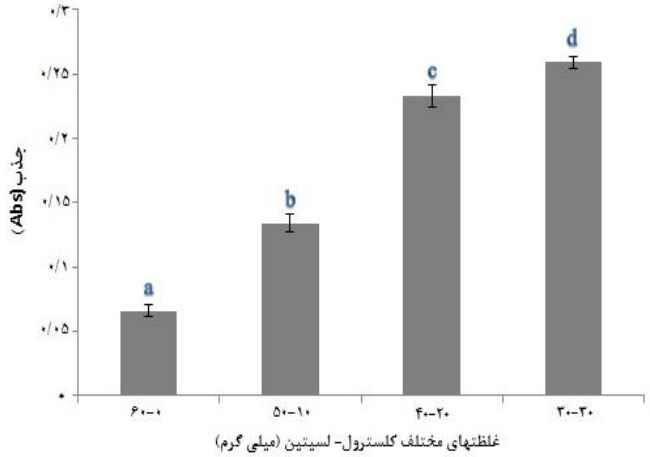
شکل ۱- الف اندازهٔ ذرات بعد از مدت یک ماه در دمای ۴°C را نشان می دهد. همان طور که ملاحظه می شود در نمونهٔ بدون کلسترول بین روزهای (۱، ۱۵، ۳۰) در سطح ٪۵ تفاوت معنی دار وجود داشت و نسبت به بقیهٔ تیمارها، افزایش بیشتری در اندازهٔ ذرات بعد از گذشت ۳۰ روز ملاحظه شد. در نمونهٔ لسیتین- کلسترول با نسبت ۵۰ به۱۰ بین هیچ کدام از روزها تفاوت معنی دار ملاحظه نشد و نسبت به تیمارهای دیگر اندازهٔ ذرات بعد از گذشت ۳۰ روز تقریباً بدون تغییر ماند. در نمونهٔ لسیتین- کلسترول با نسبت ۴۰ به۲۰ نیز مانند تیمار اول بین روزهای (۱، ۱۵، ۳۰) در سطح ٪۵ تفاوت معنی دار وجود داشت ولی نسبت به تیمار اول بعد از گذشت یک ماه افزایش زیادی در اندازهٔ ذرات ملاحظه نشد و ذرات همچنان اندازه های نزدیک به مقیاس نانو (۲۶۲ nm) داشتند. در نمونهٔ آخر یعنی لسیتین- کلسترول با نسبت ۳۰ به۳۰ بین روزهای ۱ و ۷ در سطح ٪۵ تفاوت معنی دار وجود نداشت ولی بین این روزها و روز سی ام تفاوت معنی دار ملاحظه شد. با این وجود، همچنان ذرات نزدیک به مقیاس نانو (۳۹۹ nm) باقی ماندند. در کل به غیر از تیمار اول، سه تیمار دیگر بعد از گذشت ۳۰ روز و در دمای ۴°C اندازهٔ قابل قبول و در حد نانومتری داشتند. بررسی میزان پایداری ویتامین درون پوشانی شده در نانولیپوزومها طی مدت یک ماه و در بازهٔ زمانی (۱، ۷، ۱۵و ۳۰ روز) توسط دستگاه HPLC انجام شد (شکل۱-ب). نتایج نشان داد که با گذشت زمان در همهٔ فرمولاسیونها، تغییر معنی‌داری در مقدار ویتامین D_3 درون پوشانی شده ایجاد نشد.

کدورت

شکل ۲ مقادیر کدورت برای ۴ غلظت متفاوت لسیتین- کلسترول نشان می‌دهد. همان‌طور که ملاحظه می‌شود با افزایش میزان کلسترول، کدورت به طور معنی داری افزایش یافته است.



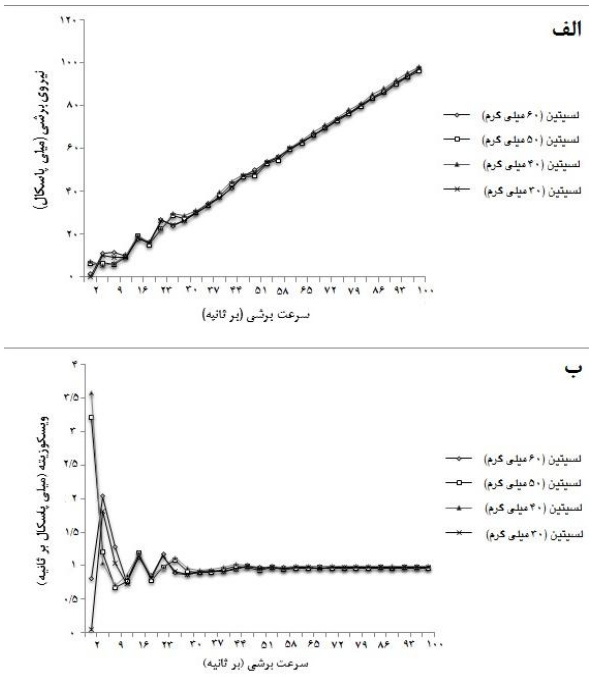
شکل ۱-الف: تأثیر زمان نگهداری (۱، ۱۵، ۳۰ روز) بر اندازه ذرات و ب: پایداری درون پوشانی ویتامین D_3 در غلظت‌های مختلف لسیتین - کلسترول (حروف متفاوت نشان دهندهٔ وجود اختلاف معنی دار در سطح ٪۵ در آزمون دانکن است)



شکل ۲ : مقادیر کدورت اندازه‌گیری شده برای ۴ غلظت متفاوت لسیتین- کلسترول (حروف غیر مشابه نشان دهندهٔ وجود اختلاف در سطح ۵٪ در آزمون دانکن است).

آزمون های رئولوژیکی پایا

در آزمون رئولوژیکی پایا، رفتار جریانی غلظت‌های مختلف لسیتین- کلسترول (۶۰- ۰، ۵۰- ۱۰، ۴۰- ۲۰، ۳۰- ۳۰ میلی‌گرم) مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای این منظور، ارتباط تنش برشی و ویسکوزیته به صورت تابعی از سرعت برشی، برای تعیین نوع رفتار جریانی نمونه‌ها در فاصله زمانی ۱۰ دقیقه و سرعت برشی (S^{-1})۱۰۰-۲ اندازه‌گیری شد. همانطور که در شکل ۳-الف مشاهده می‌شود، بین تنش برشی و سرعت برشی در غلظت‌های مختلف لسیتین- کلسترول 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 ویسکوزیته محلول، شیب منحنی نیز افزایش می‌یابد. شکل ۳-ب اثر غلظت‌های مختلف لسیتین- کلسترول را بر ویسکوزیته، در سرعتهای برشی متفاوت نشان می‌دهد. با توجه به شکل مشاهده می‌شود که ویسکوزیتهٔ همهٔ نمونه‌ها در یک گستره بوده و در غلظتهای (۴۰- ۲۰ و ۵۰- ۱۰) 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. نمودارهای ویسکوزیته- سرعت برشی نشان داد که ویسکوزیته به سرعت برشی وابسته نیست و افزایش سرعت برشی، تأثیر چندانی بر ویسکوزیته محلول‌ها ندارد. همچنین، نمونه ها از نظر ویسکوزیته تفاوت چندانی نداشتند.



شکل ۳- الف: نمودار تنش برشی- سرعت برشی و ب: ویسکوزیته- سرعت برشی نانولیپوزومهای لسیتین- کلسترول حاوی ویتامین D_3 در غلظتهای مختلف (۶۰ به ۰، ۵۰ به ۱۰، ۴۰ به ۲۰، ۳۰ به ۳۰ میلی‌گرم)

برای بررسی بیشتر رفتار رئولوژیکی از مدل قانون توان استفاده شد. در جدول ۱، مقادیر شاخص 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٪ بود که نشان دهنده مناسب بودن مدل قانون توان برای توصیف خصوصیات جریانی نانولیپوزومها می‌باشد. در این رابطه، هر چه n به عدد یک نزدیک‌تر باشد، نشانه تمایل سیال به رفتارهای نیوتنی و هر چه به صفر نزدیک‌تر باشد، نشانه تمایل سیال به رفتار سودوپلاستیک است. با توجه به جدول۱، مشاهده می‌شود که مقادیر شاخص رفتار جریانی برای تمام نمونه‌ها، بالاتر از ۰/۸ است که دلالت بر نزدیکی به رفتار نیوتنی و رفتار ضعیف سودوپلاستیک دارد.

بحث

پتانسیل زتا

با افزودن کلسترول به ساختار، پتانسیل زتا افزایش یافت. با توجه به اینکه کلسترول یک مولکول خنثی است بار منفی روی ذرات احتمالاً به این دلیل افزایش یافته است که با ورود کلسترول در ساختار لیپوزوم، گروه هیدروکسیل موجود در سر کلسترول با گروه کولین موجود در سر قطبی فسفاتیدیل کولین پیوند هیدروژنی برقرار می‌کند و گروه کولین که دارای بار مثبت می‌باشد به داخل غشا و گروه فسفاتیدیل که دارای بار منفی است، به سطح غشا کشیده می‌شود و باعث افزایش بار منفی و دفع الکترواستاتیک ذرات می‌شود (۱۶). در پژوهشی مشابه لیو و همکاران (۱۷)، بر روی تأثیر کلسترول بر پایداری فیزیکی لیپوزومهای متشکله از لسیتین مطالعاتی را انجام دادند. نتایج آنها نشان داد که پتانسیل زتا و دفع الکترواستاتیک بین لیپوزومهای فسفاتیدیل کولین با افزودن کلسترول افزایش یافت. در تحقیقی دیگر ایکسیا و همکاران (۱۴)، بر روی تأثیر کلسترول بر پایداری الکترواستاتیک نانولیپوزومهای بدون مادهٔ فعال (فروسولفات) مطالعاتی را انجام دادند. نتایج آنها نشان داد که وقتی کلسترول تا غلظت ٪۱۰ مولی اضافه می‌شود بار منفی روی ذرات و دافعهٔ الکترواستاتیک افزایش می‌یابد که دلیل آن را به برقراری پیوند بین گروه هیدروکسیل کلسترول و کولین لستین وایجاد کشش دو قطبی بین آنها نسبت دادند ولی وقتی غلظت کلسترول از ٪۱۰ بیشتر شد پتانسیل زتا کاهش یافت که دلیلی برای آن ارائه نشده بود.

با کپسوله شدن ویتامین در نانولیپوزوم ودر مقایسهٔ هر تیمار با نوع بدون ویتامین آن، پتانسیل زتا یا بدون تغییر ماند یا افزایش جزئی داشت. وقتی ویتامین در ترکیب لسیتین- کلسترول حل می‌شود و در داخل دولایهٔ لیپیدی قرار می گیرد، زنجیره‌های آسیل فسفولیپیدی یک محیط مطلوب برای مولکولهای ویتامین فراهم می‌کنند. به هر حال قرارگیری ویتامین در دو لایه‌های فسفولیپیدی ممکن است ریز ساختارهای دو لایهٔ فسفولیپیدی را تغییر دهد. به عبارتی 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 و گرنه ویتامین در شرایط آزمایش یونیزه نمی‌شود و تأثیر آن در پتانسیل زتا از طریق تغییر ریزساختارهای غشاست. در تحقیق انجام گرفته در مواردی که پتانسیل زتا افزایش یافته است احتمالاً به این دلیل بوده است که با حضور ویتامین در غشا و به دلیل شباهت داشتن ساختار آن به کلسترول، گروه هیدروکسیل ویتامین با گروه کولین فسفولیپید پیوند هیدروژنی تشکیل داده و به داخل غشا کشیده شده است و گروه فسفاتیدیل به سطح غشا آمده و باعث افزایش پتانسیل زتا شده است. از طرفی دیگر مطالعات نشان داده است که ویتامین D_3 نسبت به کلسترول پیوند ضعیفتری با غشا ایجاد می‌کند، بنابراین نسبت به کلسترول با سرعت بالاتری می‌تواند بین غشاهای فسفولیپیدی مبادله شود (۱۸). بنابراین نسبت به کلسترول به مقدار کمتری پتانسیل زتا را تحت تأثیر قرار داده است. در پژوهشی محمدحسنی و همکاران (۱۹)، شاخص پتانسیل زتای لیپوزوم‌های حاوی گاماوریزانول و بدون آن را مقایسه کردند، تا تأثیر ماده فعال بر بار سطحی نانولیپوزوم‌ها مشخص شود. نتایج نشان داد که افزودن گاماوریزانول باعث افزایش جزئی پتانسیل زتای منفی از ۱۹/۴- به ۲۰/۴- میلی ولت شد. پاداموار و همکاران (۲۰)، با کپسوله کردن ویتامین E در لیپوزومهای لسیتین- کلسترول، مشاهده کردند که پتانسیل زتای وزیکولهای تولید شده افزایش یافت. در پژوهشی دیگر مورا و همکاران (۲۱)، افزایش پتانسیل زتای نانولیپوزومهای لسیتین-کلسترول حاوی داروی بنزوکینون را به یونیزاسیون گروه های فسفات فسفولیپید نسبت دادند. آنها بر این عقیده بودند که پتانسیل زتا به ندرت تحت تأثیر داروی درون پوشانی شده در حامل، غلظت دارو و شرایط افزودن دارو در طول آماده سازی وزیکولها قرار می‌گیرد.

بررسی پایداری اندازهٔ ذرات طی نگهداری

علاوه بر پتانسیل زتا، یکی از معیارهای پایداری سیستمهای کلوئیدی از جمله لیپوزوم‌ها، پایداری اندازهٔ ذرات با گذشت زمان می‌باشد. افزایش اندازهٔ ذرات به بیش از یک میکرومتر و کاهش در تعداد ذرات در طول زمان می‌تواند نشانگر ناپایداری فیزیکی باشد. به علت اینکه چگالی لیپیدهای قطبی (که مادهٔ اصلی تشکیل دهندهٔ لیپوزوم‌ها هستند)، به چگالی آب نزدیک است، پدیدهٔ تفکیک گرانشی (رونشینی) که عامل مهمی در ناپایداری فیزیکی امولسیون‌ها به شمار می‌آید، در لیپوزومها کمتر دیده می‌شود. پدیده انبوهش (Flocculation) و هم‌آمیختگی (Coalescence) مکانیسم‌های اصلی ناپایداری در لیپوزوم‌ها محسوب می‌گردند. در طی انبوهش، نیروهای جذبی(واندروالس) وزیکولها باعث چسبیدن آنها به هم و تشکیل واحدهای بزرگتر می‌شود. در واقع این فرایند با وارد کردن نیروهای ملایم برگشت پذیر است. در صورت پیشرفت فرایند انبوهش، لیپوزومها باهم آمیخته شده (کوالسنس) و لیپوزومهای بزرگتر را ایجاد می‌نمایند (۲۲).

به نظر می‌رسد که سه عامل کلسترول، ویتامین D_3 و دمای پایین موجب پایداری اندازهٔ وزیکولها شده است. با توجه به نتایج به دست آمده در این تحقیق، پتانسیل زتای نانولیپوزوم بدون کلسترول نقریباً ۲۹ mv- است ولی نمونهٔ لسیتین بدون کلسترول با وجود داشتن خاصیت سورفکتانتی و با وجود داشتن بار منفی و دافعهٔ الکترواستاتیک بین ذرات نتوانست پایداری کاملی که در این تحقیق مورد انتظار بود به دست آورد. در این تحقیق، به منظور افزایش پایداری سیستم، از کلسترول در ساختار نانولیپوزومها استفاده شد. همان طور که گفته شد کلسترول باعث افزایش دافعهٔ الکترواستاتیک شده و از انبوهش جلوگیری می‌کند و از طرف دیگر با افزایش سفتی غشا از فرایند به هم‌آمیخته‌شدن (کوالسنس) جلوگیری می کند. یک دلیل دیگر جهت پایدار بودن نسبی اندازهٔ نانولیپوزومهای حاوی ویتامین بعد از مدت یک ماه را می توان به دمای نگهداری ($4^{\circ}C$) و نگهداری نمونه ها در تاریکی نسبت داد. افزایش دما منجر به تغییر در ساختار کریستالین لیپید، نرم شدن غشا و کاهش پتانسیل زتا می‌شوند که منجر به کاهش نیروی دفعی بین ذرات و توده‌ای شدن ذرات می‌شود. در واقع رابطهٔ خطی بین لگاریتم سرعت هیدرولیز فسفولیپید و عکس دمای تشکیل لیپوزوم از فسفاتیدیل کولین وجود دارد (۲۳). دلیل دیگر پایدار ماندن فرمولاسیونها، حضور مادهٔ فعال ویتامین D_3 در ساختار نانولیپوزومهاست. همان طور که قبلاً گفته شد ویتامین D_3 به علت شبیه بودن به کلسترول و داشتن هیدروکسیل آزاد در ساختار خود می‌تواند مانند کلسترول با گروه کولین موجود در فسفاتیدیل کولین پیوند برقرار کند ولی پیوندهای هیدروژنی ایجاد شده توسط ویتامین نسبت به کلسترول ضعیفتر می‌باشد و ویتامین نمی‌تواند به تنهایی پایداری ایجاد شده توسط کلسترول را باعث شود. نتایج حاصل از پتانسیل زتا نیز نشان داد که ویتامین به مقدار جزئی باعث افزایش پتانسیل زتا شد که این ممکن است هم به دلیل ضعیف بودن پیوندهای ایجاد شده توسط ویتامین و هم به دلیل کم بودن غلظت ویتامین مورد استفاده نسبت به مقدار کلی لیپید در فرمولاسیون نانولیپوزومها باشد. به هر حال می توان گفت که در این تحقیق ویتامین D_3 در کنار کلسترول (هر چند به طور جزئی) باعث افزایش پایداری ساختار نانولیپوزومها شود ولی در فرمولاسیون نانولیپوزوم بدون کلسترول احتمالاً به دلیل دلایل گفته شده نتوانست پایداری مورد انتظار را به دست بیاورد.

بررسی پایداری ویتامین D_3 در نانولیپوزومها طی نگهداری

همان طور که گفته شد لیپوزومها از نظر ترمودینامیکی ناپایدار هستند و در طی زمان نگهداری، وزیکول‌ها تمایل دارند با هم ترکیب شده، لخته و توده تشکیل دهند و رسوب کنند و در نتیجه مواد درون پوشانی شده از وزیکول‌ها نشت کنند. میزان و سرعت نشت ماده فعال هسته ای به ماهیت ترکیب فعال (از نظر قطبیت و اندازهٔ مولکولی)، ماهیت فسفولیپید (نوع اسید چرب و الکل در ساختار)، نسبت فسفولیپید به مادهٔ فعال، روش تولید لیپوزوم و شرایط محیطی بستگی دارد. اگر ماده فعال تمایل زیادی به خروج از ساختار غشایی لیپوزومی داشته باشد، اصلاح غشاء ساختار دولایه‌ای و سفت شدن آن منجر به حفظ آن‌ها در لیپوزومها می‌شود (۲۴).

با گذشت زمان در همهٔ فرمولاسیونها، تغییر معنی داری در مقدار ویتامین D_3 درون پوشانی‌شده ایجاد نشد که می توان به دلایل زیر نسبت داد:

۱- با افزودن کلسترول، وزیکولها به علت برقراری پیوند کلسترول با گروه کولین فسفولیپید و پر کردن فضاهای ایجاد شده توسط زنجیره‌های آسیل فسفاتیدیل کولین ساختار سفت‌تر و پایداری بیشتری را در برابر تنشهای برشی وارد شده خواهند داشت. همچنین، افزودن کلسترول به ساختار، منجر به کاهش نفوذ پذیری غشای لیپوزومی و افزایش ماندگاری ویتامین درون پوشانی شده می‌گردد.

۲- دلیل دیگر پایداری مادهٔ درون پوشانی شده طی مدت یک ماه، ماهیت لیپوفیلی مادهٔ درون پوشانی شده است که موجب قرارگیری آن در دو لایهٔ فسفولیپیدی می‌شود (بر خلاف ترکیبات آبدوست). با قرارگیری ویتامین در دولایهٔ فسفولیپیدی، زنجیره‌های آسیل فسفولیپید محیط مناسبی برای آن فراهم می‌کنند و از اکسیداسیون و تجزیهٔ هیدرولیکی در امان خواهند بود. همچنین همان طور که گفته شد وقتی مادهٔ آبگریز در دولایهٔ لیپیدی قرار می‌گیرد، بسیاری از ویژگیهای لیپوزوم از جمله پایداری آن تحت تأثیر قرار می‌گیرد که در مورد تحقیق انجام گرفته، با توجه به شبیه بودن به ساختار کلسترول احتمالاً تا حدودی باعث افزایش پایداری شده است. فاتروس و همکاران (۲۵)، نشان دادند که دو داروی آبگریز هیدروکاروتیازید و کلروتیزید به دلیل نوع ساختار و چیدمانشان، سفتی غشاء لیپوزوم را تحت تأثیر قرار دادند و منجر به حفظ ماده فعال انکپسوله در لیپوزومها شدند. راستی و همکاران (۲۶)، پایداری لیپوزومها و نانولیپوزومهای حاوی امگا سه تولید شده به روش هیدراسیون لایهٔ نازک- سونیکاسیون در طی زمان نگهداری ۳۰۰-۷ روز در دمای را بررسی کردند و نشان دادند که تغییر ناچیزی در اندازه ذرات و درصد انکپسولاسیون امگاسه در زمان نگهداری دیده شد.

۳- یک دلیل دیگر پایداری ویتامین درون پوشانی شده طی مدت نگهداری را می‌توان به نگهداری فرمولاسیون در تاریکی و دور از نور اشاره کرد. نور و اکسیژن نفوذپذیری غشا را افزایش داده و باعث افزایش رهاسازی ویتامین درون پوشانی شده می شود.

در پژوهشی دیگر محمدحسنی و همکاران (۱۹)، بر روی پایداری نانولیپوزومهای حاوی گاماوریزانول نگهداری شده به مدت ۶۰ روز در $4^{\circ}C$ مطالعاتی را انجام دادند. نتایج آنها نشان داد که تفاوت چشمگیری در اندازه ذرات بعد از دو ماه نگهداری در دمای $4^{\circ}C$ مشاهده نشد. همچنین مقادیر مادهٔ کپسوله‌شدهٔ باقیمانده طی این مدت تغییر چندانی نکرد. آنها پایداری ایجاد شده را به دو عامل حضور گاما اوریزانول در دولایهٔ لیپیدی غشا و ایجاد تعادل در سیالیت غشا (به دلیل داشتن ساختار شبیه به کلسترول) و ممانعت فضایی ایجاد شده توسط پلی اتیلن گلیکول ۴۰۰ نسبت دادند.

کدورت

کدورت توسط مقادیر نور پخش شده توسط ذرات موجود در محیط سوسپانسیون تعیین می‌شود و به تعداد و اندازهٔ ذرات موجود در فاز مایع، تفاوت در ضریب انعکاس ذرات و محیط سوسپانسیون و توزیع اندازهٔ ذرات بستگی دارد. با توجه به اینکه بین غلظتهای مختلف لسیتین- کلسترول از لحاظ اندازهٔ ذرات تفاوت معنی دار وجود ندارد افزایش میزان کدورت را می‌توان به ایجاد پیوندهای جدید بین گروه کولین لسیتین و گروه هیدروکسیل کلسترول نسبت داد. با افزایش میزان کلسترول پیوندهای ایجاد شده نیز بیشتر می‌شود که همین پیوندهای جدید باعث افزایش کدورت می‌شود. همچنین قرار گرفتن کلسترول در ساختار دولایه-ای منجر به افزایش دانسیته ظاهری چیدمان مولکول‌های فسفولیپیدی می‌شود. این مولکول در هنگام تبدیل ساختارهای لاملار به وزیکول‌ها، در بین شکافهای ایجاد شده توسط زنجیره-های آسیل قرار می‌گیرد (۲۷). افزایش دانسیتهٔ ظاهری ممکن است باعث افزایش میزان نور پخش‌شده توسط ذرات و افزایش کدورت شده باشد. همچنین افزایش کدورت ممکن است به ماهیت خود کلسترول مربوط باشد یعنی احتمالاً کلسترول بیشتر از لسیتین نور را منحرف می کند.

آزمون های رئولوژیکی پایا

آب که جزء غالب دیسپرسیون‌های نانولیپوزومی را تشکیل می‌دهد، دارای ویسکوزیته پایینی است و ویسکوزیته این نوع سیستم‌ها تحت تأثیر 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 می-باشد. انواع سیستم‌های حامل کلوئیدی رفتار رئولوژیکی متفاوتی از خود نشان می‌دهند. معمولاً با افزایش نظم میکروساختار کریستال-های مایع، ویسکوزیته افزایش می‌یابد. ویسکوزیته دینامیک رفتار جریانی برای کریستالهای مایع لاملار مانند لیپوزوم‌ها نسبتاً پایین است، ولی برای کریستال‌های مایع هگزاگونال و مکعبی نسبتاً بالا می‌باشد (۲۸). 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. همچنین ویژگیهای رئولوژیکی نوشیدنی‌های مورد استفاده را تحت تاثیر قرار نخواهد نداد. در پژوهشی، ویسکوزیته دیسپرسیون نانوحامل‌های لیپیدی حامل تاکرولیموس (متابولیت قارچی با خواص دارویی) مورد ارزیابی قرار گرفت. منحنی تنش برشی- سرعت برشی خط مستقیمی بود که از مبدا می‌گذشت و بنابراین رفتار نیوتنی سیستم را نشان داد (۲۹). گراسی و همکاران (۳۰)، ویژگی‌های رئولوژیکی سیستم‌های آبی آلژینات (پلی اورونیک) حاوی لیپوزوم‌ها را مورد بررسی قرار دادند. آنها بیان کردند که در غلظت ۲۰٪ پلی اورونیک، سیستم در دمای ۲۱ درجه سانتی گراد رفتار نیوتنی از خود نشان داد. در یک بررسی دیگر رفتار رئولوژیکی دیسپرسیون لیپوزومی در درون یک ژل ترموپلاستیک ساخته شده از اکسید اتیلن و اکسید پروپیلن مورد ارزیابی قرار گرفت. در دمای $10^{\circ}C$ سیستم حامل به حالت سل تبدیل شده و رفتار نیوتنی داشته و رابطه خطی بین تنش برشی- سرعت برشی وجود داشت.

نتیجه‌گیری

نتایج این پژوهش نشان داد که کلسترول نقش مهمی در افزایش پتانسیل زتا و پایداری طولانی مدت لیپوزوم دارد بطوریکه به غیر از نمونهٔ بدون کلسترول، اندازهٔ وزیکولهای سه تیمار حاوی کلسترول، بعد از گذشت ۳۰ روز در دمای $4^{\circ}C$ در حد مقیاس نانو حفظ گردید. همچنین با گذشت زمان در هیچ کدام از فرمولاسیونها تغییر معنی‌داری در مقدار ویتامین D_3 درون پوشانی شده ایجاد نشد که به افزایش پتانسیل زتا و افزایش سفتی غشا توسط کلسترول نسبت داده شد. با افزایش میزان کلسترول، کدورت به طور معنی داری افزایش یافت که احتمالاً به دلیل ایجاد پیوندهای جدید بین گروه کولین لسیتین و گروه هیدروکسیل کلسترول بوده است و همچنین محلول‌های لیپوزومی در تمامی غلظت‌های لسیتین- کلسترول دارای رفتار نیوتنی بودند. درمجموع نتایج این پژوهش نشان داد که روش تولید مورد استفاده در این تحقیق از نظر ایجاد پایداری در اندازهٔ ذرات و حفظ مادهٔ درون پوشانی شده در طول زمان و دیگر خصوصیات مورد انتظار روش مناسبی بوده است.

تقدیر و تشکر

بدین وسیله از مرکز تحقیقات کاربردی دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز به دلیل تأمین قسمتی از هزینه های مالی و برخی از امکانات دستگاهی و آزمایشگاهی و مرکز تحقیقات و توسعه شرکت تکدانه به دلیل پشتیبانی فنی در انجام آزمایشهای رئولوژیکی تشکر و قدردانی می‌شود.

References

1. Ovesen L, Andersen R, Jakobsen J. Geographical differences in vitamin D status, with particular reference to European countries. *P Nutr Soc* 2003; **62**: 813–821.

2. 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**: 107–113.

3. 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**: 1270-1280.
4. Bedie GK, Turgeon SL, Makhlouf J. Formation of native whey protein isolate-low methoxyl pectin complexes as a matrix for hydro-soluble food ingredient entrapment in acidic foods. *Food Hydrocolloid* 2008; **22**: 836-844.
5. Weiss J, Takhistov P, Mcclement J. Functional materials in food nanotechnology. *J Food Sci* 2006; **71**: 107-116.
6. Fathi M, Mozafari MR, Mohebbi M. Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trend Food Sci Technol* 2011; **23**: 13-27.
7. Bowtle W. Lipid formulations for oral drug delivery. *Pharm Technol Eur* 2000; **12**: 20–30.
8. Mozafari MR. Micro and nano carrier technologies: high quality production within pharmaceutical standards. *Cell Mol Biol Lett* 2004; **9**: 44- 45.
9. Keller BC. Liposomes in nutrition. *Trend Food Sci Technol* 2001; **12**: 25–31.
10. 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**: 3039-3046.
11. Ko S, Lee S-ch. Effect of nanoliposomes on the stabilization of incorporate retinol. *Afr J Biotechnology* 2010; **9**: 6158-6161.
12. Fatouros DG, Antimisiaris SG. Effect of amphiphilic drugs on the stability and zeta-potential of their liposome formulations: A study with prednisolone, diazepam, and griseofulvin. *J Colloid Interface Sci* 2002; **251**: 271–277.
13. Chanda H, Das P, Chakraborty H, Ghosh A. Development and evaluation of liposomes of fluconazole. *J Biomed Pharma Sci* 2011; **5**: 2230-7885.
14. Xia S, Xu S. Ferrous sulfate liposomes: preparation, stability and application in fluid milk. *Food Res Int* 2005; **38**: 289-296.
15. Ghanbarzadeh B. *Principles of Food and Food Biopolymer Rheology*. Tehran University Press, 2009; PP: 292-294.
16. Makino K, Yamada T, Kimura M, Oka T, Ohshima H, Kondo T. Temperature and ionic strength-induced conformational changes in the lipid head group region of liposomes as suggested by zeta potential data. *Biophys Chem* 1991; **41**: 75-183.
17. Liu Z, Jiao Y, Wang Y, Zhou C, Zhang Z. Polysaccharides-based nanoparticles as drug delivery systems. *Adv Drug Deliv Rev* 2008; **60**: 1650-1662.
18. Miller WL. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter. *Biochim Biophys Acta* 2007; **1771**: 663–676.
19. Mohammadhassani Z. Preparation and Evaluation of Nanoliposomes Containing γ -Oryzanol (a Nutraceutical Compound) Properties, MSc thesis, Aras International Campus, Department of Food Science and Technology, October 2012.
20. 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.
21. Mura P, Maestrelli F, González-Rodríguez ML, Michelacci I, Ghelardini C, Rabasco AM. Development, characterization and in vivo evaluation of benzocaine-loaded liposomes. *Eur J Pharm Biopharm* 2007; **67**: 86-95.
22. Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE, Benoit JP. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials* 2003; **24**: 4283-4300.
23. Freitas CM, uller RH. Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLN) dispersions. *Int J Pharm* 1998; **168**: 221–229.
24. Brandl M. Lipsomes as drug carriers: A technological approach. *Biotechnology Annu Rev* 2001; **7**: 59-85.
25. Fatouros DG, Hatzidimitriou K, Antimisiaris SG. Liposomes encapsulating prednisolone and prednisolone-cyclodextrin complexes: Comparison of membrane integrity and drug release. *Eur J Pharm Sci* 2001; **13**: 287-296.
26. 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**: 2761-2770.
27. Mohammed AR, Weston N, Coombes AGA, Fitzgerald M, Perrie Y. Liposome formulation of poorly water soluble drugs: Optimization of drug loading and ESEM analysis of stability. *Int J Pharm* 2004; **285**: 23–34.
28. Muller-Goymann CC. Physicochemical characterization of colloidal drug delivery systems such as reverse micelles, vesicles, liquid crystals and nanoparticles for topical administration. *Eur J Pharm Biopharm* 2004; **58**: 343–356.
29. Pople PV, Sing KK. Development and evaluation of colloidal modified nanolipid carrier: Application to topical delivery of tacrolimus. *Eur J Pharm Biopharm* 2011; **79**: 82-94.
30. Grassi G, Crevatin A, Farra R, Guarnieri G, Pascotto A, Rehimers B, et.al. Rheological properties of aqueous Pluronic–alginate systems containing liposomes. *J Colloid Interface Sci* 2006; **301**: 282–290.