

# تولید نانوذرات تری استارین

محسن رادی<sup>1\*</sup>، صدیقه امیری<sup>1</sup>

1- عضو هیات علمی گروه صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد یاسوج، باشگاه پژوهشگران جوان، یاسوج، ایران

تاریخ پذیرش: 1392/8/5

تاریخ دریافت: 1392/1/25

## چکیده

هدف از این مطالعه تولید نانوذرات چربی با استفاده از تری استارین بود. به این ترتیب از ترکیب تری استارین در کنار سورفکتانت، حلال و آب برای تهیه نانوذرات چربی به روش میکرومولسیون استفاده گردید. سپس با استفاده از تکنیک پراکنش نوری ابعاد نانوذرات تولید شده اندازه گیری شد. نتایج حاصل از این تکنیک ابعادی حدود 100 نانومتر را برای ذرات نانویی نشان داد. نتایج حاصل از بررسی تاثیر سرعت به هم زدن بر اندازه نانوذرات چربی نشان داد که سرعت به هم زدن به طور معنی داری بر اندازه ذرات تاثیر می گذارد، به طوریکه با افزایش میزان دور هم زدن، اندازه ذرات کاهش می یابد. سپس ارتباط بین ابعاد ذرات و میزان جذب نوری آن ها مدل گردید. نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی نیز نتایج حاصل از تکنیک پراکنش نوری را تایید کرد، ضمن اینکه کروی بودن نانوذرات تولیدی را نیز نشان داد.

**واژه های کلیدی:** نانوذرات چربی، تری استارین، تکنیک پراکنش نوری

## 1- مقدمه

تریتین (ترانس-رتینوئیک اسید) را با استفاده از کیتوزان تولید کنند (11). وانگ و همکاران (2012) سوسپانسیون نانوذرات چربی حاوی نورفلوکساسین را به عنوان یک داروی جدید فرموله کردند (16). در غالب تحقیقات انجام شده از اسیدهای چرب آزاد برای تولید نانوذرات چربی استفاده شده است که با ناپایداری و واکنش پذیری این اسیدهای چرب در شرایط مختلف در مقایسه با تری گلیسیریدها مواجه هستیم. اسیدهای چرب آزاد تمایل بیشتری به واکنش های اکسیداسیون و تولید رادیکال های آزاد در بدن و یا در شرایط مختلف غذایی (مثل شرایط اسیدی) دارند، این در حالی است که استفاده از تری گلیسیریدها می تواند به ساختار نانوذرات تولید شده پایداری بیشتری از جنبه های مذکور ببخشد. به این ترتیب در این تحقیق تلاش شده است که نانوذرات تری استئارین تولید شود تا در گام بعدی از آنها به عنوان ساختارهایی پایدار برای پوشش دادن ترکیبات فرار و یا ناپایدار با اهمیت در صنایع غذایی و دارویی استفاده گردد.

## 2- مواد و روش ها

## 2-1- مواد لازم

تری استئارین و پروپانل از شرکت مرک<sup>1</sup> خریداری شدند. لسیتین از شرکت بهپاک (تهشهر، ایران) خریداری شد و با استفاده از اتانل و سپس استون (با درجه خلوص 65٪ فسفاتیدیل کولین) خلص سازی گردید.

## 2-2- تشکیل نانوذرات چربی

برای تشکیل نانوذرات چربی از روش میکرومولسیون استفاده گردید. این روش نیاز به انرژی کمی داشته و از این لحاظ می تواند هزینه کمی را متحمل گردد. برای این منظور، ابتدا میکرومولسیون تری گلیسیرید تری استئارین با استفاده از سورفاکتانت لسیتین و حلال پروپانل به عنوان کوسورفاکتانت تهیه گردید. برای این منظور، تری استئارین ذوب گردید و رقیق سازی نمونه های حاوی روغن، سورفاکتانت: حلال با استفاده از آب و یا نمونه های حاوی آب، سورفاکتانت: حلال با استفاده از روغن صورت گرفت. نسبت سورفاکتانت: حلال 3:1 انتخاب گردید. رقیق سازی نمونه ها ادامه یافت تا ظاهر آنها از حالت شفاف به حالت کدر تغییر یافت. مناطق میکرومولسیونی با

نانوذرات چربی در حقیقت ذرات چربی در ابعاد نانو هستند که دیسپرسیون آنها علاوه بر دارو و چربی، حاوی سورفاکتانت نیز می باشد. از آنجا که همه ترکیباتی که در فرمولاسیون نانوذرات چربی به کار می روند باید GRAS باشند، بنابراین طیف وسیعی از ترکیبات را می توان در فرمولاسیون آنها به کار برد. نانوذرات چربی از چربی هایی که در دمای اتاق و در بدن انسان حالت جامد دارند، تهیه می شوند و به وسیله سورفاکتانت ها پایدار می شوند. طبق تعریف، چربی می تواند یک تری گلیسیرید بسیار خالص، مخلوط پیچیده ای از چربی ها و یا حتی واکس باشد (1)، (17). نانوذرات چربی از سیستم هایی با پتانسیل بالا برای حمل دارو، مواد عطر و طعمی، ویتامین ها و ... و حتی تحویل آنها به بدن از طریق مصرف خوراکی محسوب می شوند. در عین حال آزادسازی کنترل شده ترکیبات مذکور در کنار مسمومیت زایی بسیار پایین به دلیل ساختار فیزیولوژیک آنها و سازگاری آنها با سیستم های بیولوژیک، قابلیت حمل مواد لیپوفیل و هیدروفیل از مزایای چنین نانوذراتی است که تمایل به استفاده از آنها را افزایش داده است. چنین سیستم هایی همچنین می توانند به خوبی از ترکیبات فعالی چون لیزوزیم در مقابل تجزیه شیمیایی متاثر از محیط محافظت کنند (3، 13). به نظر می رسد که دسترسی زیستی بدن به دارو و مواد مغذی با استفاده از نانوذرات چربی بسیار افزایش پیدا می کند. حتی تزریق وریدی این ذرات می تواند برای داروهایی که حلالیت ضعیفی در آب دارند راه گشا باشد. چنین خواصی تولید چنین نانوذراتی را از ارزش ویژه ای برخوردار می کند (7). بررسی امکان حمل انواع ترکیباتی چون پپتیدها و یا داروهایی چون کلوزاپین، استفاده از روش های مختلف مانند اولتراسونیک و یا هموزناسیون تحت برش بالا برای تولید چنین ذراتی، تعیین خصوصیات و بررسی پایداری این ذرات و یا بررسی سرعت تجزیه آنها در حضور آنزیم لیپاز، استفاده از ترکیباتی چون کره کاکائو به عنوان عامل پوشاننده از جمله تحقیقات صورت گرفته بر روی این ذرات می باشند (3، 4، 7، 9، 12، 15). میتری و همکاران (2011) لوتئین را به عنوان یک ترکیب آنتی اکسیدانی و ضد استرس که می تواند از پوست در برابر آسیب های نوری محافظت کند، در نانوحامل ها قرار دادند تا از طریق پوست قابلیت جذب آن را افزایش دهند (6). ریدولفی و همکاران (2013) تلاش کردند که نانوذرات چربی حاوی داروی

1- Darmstadt, Germany

گرفتند و سپس درصد عبور نور آن‌ها با استفاده از طیف‌سنج ماوراءبنفش-مرئی<sup>6</sup> در طول موج 600 نانومتر تعیین گردید.

**2-6- بررسی ارتباط بین اندازه ذرات و میزان عبور نور**  
برای بررسی ارتباط بین اندازه ذرات و میزان عبور نور آن‌ها، میزان عبور نور محلول‌های مختلف حاوی نانوذرات چربی در طول موج 600 نانومتر اندازه‌گیری شد (10). بعد از تعیین کدورت فرمولاسیون‌های انتخابی، اندازه نانوذرات تولیدی نیز از طریق تکنیک پراکنش دینامیک نوری مشخص گردید.

**2-7- تجزیه آماری داده‌ها**  
در این تحقیق از طرح آماری کاملاً تصادفی استفاده شد. کلیه آزمایشات در سه تکرار انجام شد و مقایسه میانگین‌ها در سطح احتمال 5 درصد با استفاده از آنالیز واریانس و به روش دانکن با نرم افزار SPSS<sup>7</sup> صورت گرفت.

**3- نتایج و بحث**  
نانوذرات چربی حاوی یک هسته مرکزی چربی جامد هستند که قادرند ملکول‌های لیپوفیل را حمل کنند. هسته چربی در این ساختارها به وسیله سورفاکتانت‌ها پایدار می‌شوند. امولسیفایر جهت پایدارسازی دیسپرسیون چربی به کار می‌رود. در حقیقت ملکول‌های آمفیفیلیک امولسیفایر در سیستم میکروامولسیون به گونه‌ای نظم پیدا می‌کنند که یک سطح را بین قسمت چربی و آبی ایجاد کنند به گونه‌ای که دو فاز قابلیت امتزاج نداشته باشند (1). دیسپرسیون حاوی نانوذرات چربی، سیستمی کاملاً هموزن با رنگ کمی شیری بود.

**3-1- اندازه‌گیری ابعاد ذرات با استفاده از تکنیک پراکنش دینامیک نوری**  
بعد از تهیه نانوذرات تری استتارین اندازه ذرات تعیین گردید. برای اندازه‌گیری ابعاد ذرات از تکنیک پراکنش دینامیک نوری استفاده گردید. شکل 1 نتایج حاصل از تکنیک پراکنش نوری را نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل 1 مشاهده می‌شود اندازه ذرات چربی 90/47 نانومتر بود. اگرچه ابعاد ذرات تولید شده در

استفاده از ظاهر شفاف نمونه‌ها تشخیص داده شدند. به این ترتیب 45٪ نسبت 3:1 لسیتین:پروپانل، 45٪ آب و 10٪ تری گلیسرید به عنوان فرمول نهایی انتخاب گردید. سپس میکروامولسیون تهیه شده سریعاً در آب سرد 2 الی 3 درجه سانتی‌گراد تحت شرایط هم‌زدن شدید پراکنده گردید. به این ترتیب ذرات چربی به شکل جامد درآمده و ذرات نانویی چربی شکل گرفتند (13).

**2-3- اندازه‌گیری ابعاد نانوذرات چربی**  
برای تعیین توزیع اندازه ذرات از تکنیک پراکنش دینامیک نوری<sup>1</sup> با منبع نوری لیزر هلیم-نئون با توان 4 میلی‌وات و طول موج 633 نانومتر، در دمای محیط، زاویه آشکارسازی 70 و 90 درجه و گرانیوی نمونه 8/76 میلی‌پاسکال. ثابته استفاده گردید. اندازه هیدرو دینامیک ذرات، توزیع اندازه ذرات و شاخص بس پاشیدگی<sup>2</sup> از طریق نرم افزار DTS<sup>3</sup> محاسبه شد.

**2-4- استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی<sup>4</sup> برای مشاهده نانوذرات**  
برای مشاهده میکروسکوپی، محلول حاوی نانوذرات رقیق گردید و مقدار کمی از مخلوط تهیه شده، بر روی اسلاید میکروسکوپی پخش گردید. سپس اسلاید بر روی یک قطعه فلزی دایره شکل از جنس آلومینیم چسبانده شد و سطح نمونه‌ها توسط دستگاه پوشش‌دهنده<sup>5</sup> و با عبور جریان گاز آرگن با یک لایه طلا پوشانیده شد. آن‌گاه نمونه‌ها توسط میکروسکوپ الکترونی با پتانسیل الکتریکی 20 کیلوولت مورد مطالعه قرار گرفتند.

**2-5- بررسی تاثیر سرعت به هم زدن بر اندازه ذرات**  
بعد از تعیین اندازه نانوذرات چربی، تاثیر سرعت به هم زدن بر اندازه ذرات از طریق اندازه‌گیری میزان عبور نور از محلول‌های حاوی نانوذرات بررسی شد. در این راستا مخلوط‌های فرموله شده حاوی نانوذرات چربی در سرعت‌های 100، 200، 400، 700، 1000 و 1200 دور در دقیقه برای مدت زمان یک دقیقه قرار

1- Zetasizer, Nano ZS, Malvern Instrument Ltd., UK

2- Polydispesity Index

3- 5.02 version, Malvern Instrument Ltd., UK

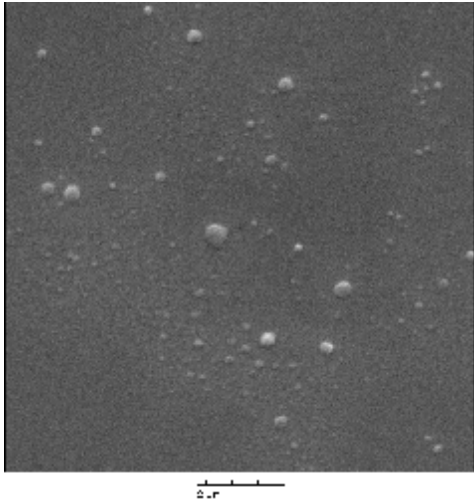
4- Scanning Electron Microscopy (SEM)

5- Sputter Coater

6- Perkin-Elmer Lambda 25, USA

7- Version 13 software, New Jersey, USA

چربی کره کاکائو برای پوشش دهی مواد دارویی و یوگازیو و همکاران (2002) در تولید نانوذرات چربی سیکلوپورین A<sup>+</sup> به خوبی تطابق داشت (5، 14).



شکل 2- عکس میکروسکوپ الکترونی روبشی نانوذرات چربی

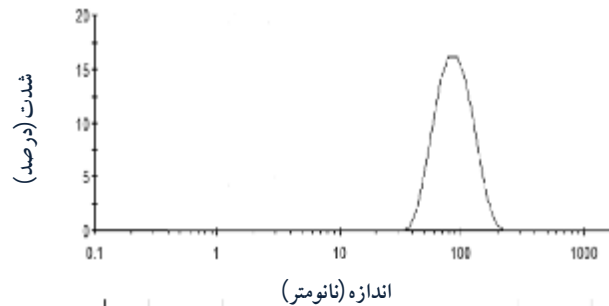


شکل 3- تاثیر سرعت به هم زدن بر درصد عبور نور از مخلوط حاوی نانوذرات چربی در دمای 25 درجه سانتی گراد. هر ستون متوسط سه تکرار می باشد

### 3-3- بررسی تاثیر سرعت به هم زدن

نتایج حاصل از بررسی تاثیر سرعت به هم زدن بر اندازه نانوذرات چربی نشان داد که سرعت به هم زدن به طور معنی داری بر میزان عبور نور تاثیر می گذارد ( $p < 0/05$ )، به طوری که با افزایش میزان دور هم زدن، درصد عبور نور نیز افزایش می یابد (شکل 3). این روند افزایشی از 100 تا 1200 دور در دقیقه مشهود بود، هر چند

این تحقیق کوچک تر از هاتزیانتونیو و همکاران (2007) که نانوذرات چربی با ابعادی حدود 188 و 232 نانومتر و یا ریدولفی و همکاران (2011) که ذراتی 162 و 284 نانومتر تولید کردند بود، اما اندازه ذرات تولید شده در این تحقیق مانند سایر تحقیقات انجام شده در محدوده نانو قرار داشت (2، 6، 11).

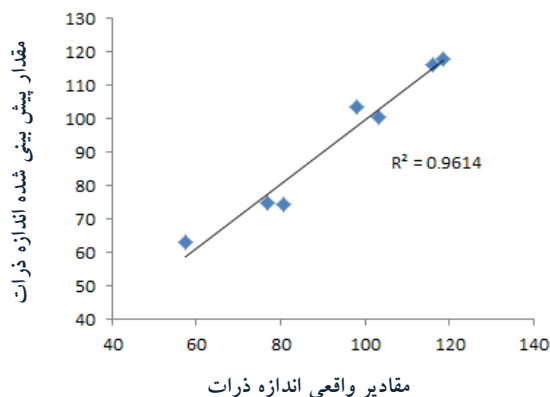


شکل 1- منحنی توزیع اندازه نانو ذرات چربی تری استئارین

تعداد پیک های ظاهر شده در شکل های حاصل از اندازه گیری ابعاد با استفاده از تکنیک پراکنش دینامیک نوری نشان از تعداد قطره های هیدرودینامیک موجود در محلول دارد. به این ترتیب ظاهر شدن یک و یا دو پیک حکایت از وجود یک و یا دو قطر هیدرودینامیک دارد. بنابراین وجود یک پیک در شکل 1 وجود یک قطر هیدرودینامیک در محلول را نشان می دهد. پیک ظاهر شده باریک است. باریک بودن پیک به معنی بس پاشیدگی کم و یا توزیع پایین اندازه ذرات و هموزن بودن نانوذرات تولید شده است (8).

### 3-2- استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی برای مشاهده نانوذرات

شکل 2 ابعاد نانوذرات چربی را در زیر میکروسکوپ الکترونی نشان می دهد. نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی ضمن اینکه ابعاد نانویی ذرات چربی را تأیید کرد، مورفولوژی این ذرات را نیز که کروی شکل و هموزن همراه با سطح صافی بودند نشان داد. بنابر نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی ابعاد ذرات تولیدی بین 70 تا 180 نانومتر تغییر می کرد که متوسط اندازه ذرات حدود 100 نانومتر بود. این نتایج با نتایج حاصل تکنیک پراکنش دینامیک نوری به خوبی مطابقت داشت. این نتایج با نتایج به دست آمده توسط کیو و همکاران (2011) در تولید نانوذرات



شکل 5- رابطه بین اندازه واقعی و پیش‌بینی شده نانوذرات چربی

همانطور که در شکل 5 نشان داده شده است میزان عبور نور با افزایش اندازه ذرات کاهش می‌یابد، که این به دلیل افزایش کدورت محلول با افزایش اندازه ذرات چربی است. برای مطالعه ارتباط بین اندازه ذرات و میزان عبور نور یک معادله درجه 2 ارائه گردید که با استفاده از آن می‌توان اندازه نانوذرات را در محلول‌های تهیه شده تحت شرایط یکسان از طریق اندازه‌گیری کدورت پیش‌بینی کرد. حداکثر اندازه ذرات 120 نانومتر بود که این موضوع از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است.

#### 4- نتیجه‌گیری

در این بررسی نانوذرات چربی با ابعادی حدود 100 نانومتر تولید گردید. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که سرعت به هم زدن محیط حاوی نانوذرات بر ابعاد ذرات تاثیر می‌گذارد و افزایش در سرعت به هم زدن باعث کاهش اندازه ذرات می‌شود. همچنین ارتباط معنی‌داری بین ابعاد نانوذرات چربی و میزان عبور نور از آن‌ها وجود داشت، به طوری که یک رابطه سهمی گون بین آن‌ها به دست آمد.

#### 5- سپاس‌گزاری

این اثر علمی از طرح پژوهشی اجرا شده از محل بودجه باشگاه پژوهشگران جوان واحد یاسوج استخراج گردیده است. بدینوسیله نویسندگان مقاله از باشگاه پژوهشگران جوان واحد یاسوج به دلیل تامین هزینه‌های مالی این تحقیق کمال تشکر را دارند.

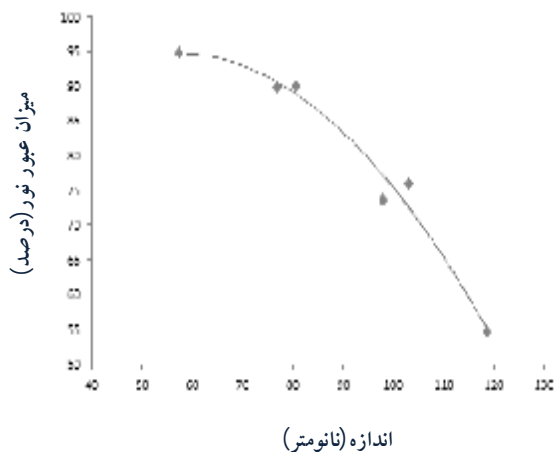
از 100 تا 400 دور در دقیقه و از 700 تا 1200 دور در دقیقه تفاوت معنی‌داری با هم نداشتند. افزایش میزان عبور نور نشان از کوچک شدن ابعاد نانوذرات چربی دارد. به این ترتیب افزایش دور به هم زدن می‌تواند بر اندازه ذرات چربی تاثیر بگذارد و از اندازه آن‌ها بکاهد.

#### 3-4- بررسی ارتباط بین اندازه ذرات و میزان عبور نور

نتایج حاصل از تکنیک پراکنش نوری نشان داد که بین اندازه نانوذرات چربی و میزان عبور نور از آن‌ها ارتباط معنی‌داری وجود دارد ( $p < 0/05$ ). این رابطه به شکل معادله زیر مدل گردید که ضریب همبستگی بسیار بالایی را نیز نشان داد:

مدل (1)

$$Y = -0/0104X^2 + 1/1844X + 61/046 \quad (R^2 = 0/9761)$$



شکل 4- رابطه بین اندازه نانوذرات چربی و درصد عبور نور در دمای 25 درجه سانتی‌گراد

برای بررسی صحت مدل، اندازه ذرات تعدادی محلول حاوی نانوذرات توسط تکنیک پراکنش نوری اندازه‌گیری شد و اعداد به دست آمده با نتایج به دست آمده در مدل 1 مقایسه گردید (شکل 5). به این ترتیب ضریب همبستگی بسیار بالایی (0/9614) مطابق شکل 5 به دست آمد که این امر نشان‌دهنده مناسب بودن مدل برای پیش‌بینی ابعاد نانوذرات چربی است، چراکه نتایج تجربی، نتایج پیش‌بینی شده را به خوبی تایید کرد.

- formation. *Food Hydrocolloids*, 26: 268-276.
11. Ridolfi, D. M., Marcato, P. D., Justo, G. Z., Cordi, L., Machado, D. and Dur'an, N. 2013. Chitosan-solid lipid nanoparticles as carriers for topical delivery of Tretinoin. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, In Press.
  12. Seetapan, N., Bejrappa, P., Srinuanchai, W. and Ruktanonchai, U. R. 2010. Rheological and morphological characterizations on physical stability of gamma-oryzanol-loaded solid lipid nanoparticles (SLNs). *Micron*, 41: 51-58.
  13. Tiyaboanochi, W., Tungpradit, W. and Plianbangchang, P. 2007. Formulation and characterization of curcuminoids loaded solid lipid nanoparticles. *International Journal of Pharmaceutics*, 337: 299-306.
  14. Ugazio, E., Cavalli, R. and Gasco, M. R. 2002. Incorporation of cyclosporin A in solid lipid nanoparticles (SLN). *International Journal of Pharmaceutics*, 241: 341-344.
  15. Venkateswarlu, V. and Manjunath, K. 2004. Preparation, characterization and in vitro release kinetics of clozapine solid lipid nanoparticles. *Journal of Controlled Release*, 95: 627- 638.
  16. Wang, Y., Zhu, L., Dong, Zh., Xie, Sh., Chen, X., Lu, M. et al. 2012. Preparation and stability study of norfloxacin-loaded solid lipid nanoparticle suspensions. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 98: 105-111.
  17. Wissinga, S. A., Kayserb, O. and Müller, R.H. 2004. Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 56: 1257- 1272.
- 6- منابع
1. Ekabmaram, P., Abdul Hasan Sathali, A. and Priyanka, K. 2012. Solid lipid nanoparticles: a review. *Scientific Reviews and Chemical Communications*, 2(1): 80-102.
  2. Hatziantoniou, S., Deli, G., Nikas, Y., Demetzos, C. and Papaioannou, G.Th. 2007. Scanning electron microscopy study on nanoemulsions and solid lipid nanoparticles containing high amounts of ceramides. *Micron*, 38: 819-823.
  3. Houa, D. Zh., Xieb, Ch. Sh., Huangb, K. and Zhuc, Ch. H. 2003. The production and characteristics of solid lipid nanoparticles (SLNs). *Biomaterials*, 24: 1781-1785.
  4. Hu, F. Q., Hong, Y. and Yuan, H. 2004. Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles containing peptide. *International Journal of Pharmaceutics*, 273: 29-35.
  5. Kuo, Y-Ch. And Chung, Ch-Y. 2011. Solid Solid lipid nanoparticles comprising internal Compritol 888 ATO, tripalmitin and cacao butter for encapsulating and releasing stavudine, delavirdine and saquinavir. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 88: 682- 690.
  6. Mitri, Kh., Shegokar, R., Gohla, S., Anselmi, C. and Müller, R. H. 2011. Lipid nanocarriers for dermal delivery of lutein: Preparation, characterization, stability and performance. *International Journal of Pharmaceutics*, 414: 267- 275.
  7. Muller, R. H., Ruhl, D. and Runge, S. A. 1996. Biodegradation of solid lipid nanoparticles as a function of lipase incubation time. *International Journal of Pharmaceutics*, 144: 115-121.
  8. Polizelli, M. A., Telis, V. R. N., Amaral, L. Q. and Feitosa, E. 2006. Formation and characterization of soy bean oil/surfactant/water microemulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemistry Engineering Aspects*, 281: 230-236.
  9. Radomska-Soukharev, A. 2007. Stability of lipid excipients in solid lipid nanoparticles. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 59: 411-418.
  10. Rao, J. and McClements, D. J. 2012. Lemon oil solubilization in mixed surfactant solutions: Rationalizing microemulsion & nanoemulsion