تعیین میزان انکپسولاسیون توکسوئید کزاز در سامانه های دارورسانی میکروسفری و لیپوزومی به دو روش اسپکتروسکوپی مختلف

*محسن تفقدی، فرزین هادیزاده، فهیمه فرهمند

دانشکده داروسازی مشهد و مرکز تحقیقات علوم دارویی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

تاریخ دریافت: ۸۶/۶/۱۷ ، تاریخ پذیرش: ۸۷/۱/۲۱

Determination of encapsulation efficiency of tetanus toxoid in microsphere and liposome drug delivery systems by two different spectroscopic methods

Tafaghodi M.*, Hadizadeh F., Farahmand F.

Mashhad School of Pharmacy and Pharmaceutical Research Center, Mashhad University of Medical Sciences

Received: 2007/9/8 , Accepted: 2008/4/9

Objectives: Spectrophotometric methods are amongst the most important methods used for determination of encapsulated proteins in particulate drug delivery systems. In Bradford method, which is used frequently, some interfering agents could affect the precise determination of proteins. In such a conditions, other methods with less interactions, such as spectrofluorimetry, can be used. **Methods:** Tetanus toxoid (TT) was conjugated with fluorceinisothiocianate (FITC), as a fluorescent agent. Buffer salts and unconjugated FITC were separated by dialysis and ultrafiltration. Alginate microspheres and liposomes encapsulated with fluorescent TT were prepared by emulsification-internal phase gelation and solvent evaporation, respectively. encapsulated TT in microspheres and liposomes was determined by Bradford and spectroflourimetric methods**. Results:** Mean encapsulation efficiency of FITC-TT in microspheres was obtained to be 38.33 ± 6.11 and 21.33 ± 2.1, by Bradford and fluorimetry methods, respectively (P<0.01). In Bradford method, the blank microspheres showed high absorbances which could be caused by interaction from sodium alginate polymer. But in the fluorimetric method the blank microspheres showed little absorbances, so this method is more reliable. Mean encapsulation efficiency of FITC-TT in liposomes was determined by indirect method, as 46.33 ± 6.23 and 56 ± 3, by Bradford and fluorimetry methods (P<0.05). In Bradford method, supernatant of blank liposomes showed high absorbances which could be rooted from interaction of free lipids. But in the fluorimetry method supernatant of the blank liposomes showed little emission, so this method is more reliable. Conclusion: In determination of encapsulation efficiencies of proteins in microspheres and liposomes, when spectrophotometric methods due to interfering agents, could not be utilized precisely, spectrofluorimetric method can be preferred.

Keywords: *encapsulation efficiency, spectrofluorimetry, spectrophotometry, alginate microsphere, liposome, FITC-TT.*

زمینه و هدف: از مهم ترین روش های تعیین مقدار پروتئین های انکپسوله در سامانه های دارورسانی ذره ای، روشهای اسپکتروفتومتری هستند. در روش برادفورد، که یکی از روشهای پر استفاده است، برخی از عوامل تداخل کننده، روی تعیین مقدار دقیق پروتئین اثر می گذارند. در چنین مواقعی می توان از روشهایی مانند اسپکتروفلوریمتری که تداخل کمتری دارند، استفاده نمود. **روشها:** ابتدا توکسوئید کزاز (TT) با فلورسئین ایزوتیوسیانات (FITC) به عنوان ماده فلورسنت، کنژوگه شد. برای جداسازی نمک های بافر و FITC آزاد از روش دیالیز و اولترافیلتراسیون استفاده شد. میکروسفرهای آلژینات و لیپوزومهای حاوی توکسوئید فلورسنت به ترتیب به روش امولسیون سازی- ژل کردن فاز داخلی و تبخیر حلال تهیه شدند. مقدار توکسوئید انکپسوله شده در میکروسفرها و لیپوزومها به دو روش برادفورد و فلوریمتری اندازه گیری شد. **یافته ها :** میانگین درصد انکپسولاسیون FITC–TT در میکروسفرها با روش برادفورد ۶/۱۱ ± ۳۸/۳۳٪ و به روش فلوریمتری ۲/۱ ± ۲۱/۳۳٪ به دست آمد (P<۰/۰۱). در روش برادفورد میکروسفرهای بدون پروتئین جذب بالائی نشان دادند که ناشی از تداخل پلیمر سدیم آلژینات با این روش می باشد. ولی در روش اسپکتروفلوریمتری، جذب محلول میکروسفر بدون پروتئین ناچیز بود و نتایج حاصل از آن قابل اطمینان تر است. علاوه بر این، متوسط درصد انکپسولاسیون FITC–TT در لیپوزومها، به صورت غیر مستقیم با روش برادفورد ۶/۲ ± ۴۶/۳٪ و به روش فلوریمتری ۳±۵۶٪ محاسبه شد (P<۰/۰۵). سوپرناتانت لیپوزوم بدون پروتئین نیز در روش برادفورد جذب بالائی نشان می دهد که می تواند ناشی از تداخل لیپیدهای آزاد باشد ولی در روش فلوریمتری سوپرناتانت لیپوزوم فاقد پروتئین جذب کمی نشان می دهد و نتایج حاصل از آن قابل اطمینان تر است. **نتیجه گیری :** در هنگام تعیین درصد انکپسولاسیون پروتئینها در میکروسفرها و لیپوزومها، در مواقعی که روش های اسپکتروفتومتری به دلیل مواد تداخل کننده قابل استفاده نیستند، می توان روشهای اسپکتروفلوریمتری را جایگزین آنها نمود.

واژه های کلیدی : *درصد انکپسولاسیون، اسپکتروفلوریمتری، اسپکتروفتومتری، میکروسفر آلژینات، لیپوزوم، FITC–TT*

*نویسنده مسؤول: دکتر محسن تفقدی، استادیار، دانشکده داروسازی مشهد، تلفن: ۸۸۲۳۲۵۵ – ۰۵۱۱، نمابر: ۸۸۲۳۲۵–۰۵۱۱

Corresponding Author: Dr Mohsen Tafaghodi, Assistant Professor, Faculty of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Tel: 0511-8823255, Fax: 0511-8823251; E-mail: tafaghodim@mums.ac.ir

Archive of SID

www.SID.ir

۱- مقدمه

در بسیاری از مطالعات ایمن سازی جهت افزایش پاسخ ایمنی، محافظت آنتی ژن ها و کنترل رهش آنها، آنتی ژنها را درون سامانه های دارورسانی مانند میکروسفر و لیپوزوم محصور می سازند (۱-۳). در این موارد یکی از مهمترین مراحل تحقیق اندازه گیری مقدار آنتی ژن محصور شده در این سامانه هاست. معمولترین روش در تعیین مقدار پروتئین های انکپسوله، استفاده از روش اسپکتروفتومتری می باشد که از معمولترین آنها روش های اسپکترومتومتری مانند بیسینکونینیک اسید، برادفورد، لوری و جذب UV می باشد (٤).

روش برادفورد روشی سریع و دقیق برای تخمین غلظت پروتئین می باشد. روشی که توسط برادفورد شرح داده شده است روشی ساده تر، سریع تر و با حساسیت بیشتر نسبت به روش لوری است . علاوه بر این در مقایسه با روش لوری، این روش تداخل کمتری با واکنش گرهای عمومی و اجزای غیرپروتئین نمونه های بیولوژیکی دارد . روش برادفورد بر پایه اتصال رنگ کوماسی بلو G – 250 به پروتئین انجام می شود. سنجشها با افزودن واکنشگر برادفورد به محلول پروتئین و اندازه گیری جذب محلول در طول موج ۵۹۵ nm انجام می شود (۵).

از مزایای این روش ثابت بودن ضریب خاموشی محلول کمپلکس رنگ – آلبومین (پروتئین استاندارد) در محدوده یک تا ده برابر حداقل غلظت است (٤، ۵). روش برادفورد تداخل کمی با واکنش گرهای شیمیایی دارد. با این حال تعداد کمی از عوامل شیمیایی ممکن است جذب بلانک را تغییر دهند و یا روی پاسخ پروتئین به رنگ تأثیر بگذارند. مواردی که بیشتر باعث مشکل می شوند معمولاً درجنتها و آمفولیت ها هستند. روش برادفورد پاسخ های متفاوتی برای پروتئین ها نشان می دهد که برای غلبه بر این مشکل اصلاحاتی پیشنهاد شده که معمولاً بر مبنای افزایش میزان رنگ یا pH محلول است. رنگ کوماسی بلو ظاهراً به قسمتهای آرژنین و لایزین پروتئین ها وصل می شود این خصوصیت می تواند منجر به انحراف در پاسخ آزمایش به پروتئین ها شود که محدودیت بزرگ روش است. این محدودیت ها و انحرافات باعث می شوند روش دقت و صحت کمتری داشته باشد. در نهایت روش اصلی که بوسیله برادفورد شرح داده شد باز هم معمولترین و مناسب ترین روش اسپکتروفتومتری است اما در بسیاری از موارد برخی از مواد موجود در محیط مزاحم تعیین درصد انکپسولاسیون به این روش می باشند (٤، ٦).

روش مطلوب دیگر برای تعیین مقدار پروتئین، تهیه مشتق فلورسنت از پروتئین مورد نظر و اندازه گیری میزان انکپسولاسیون به روش اسپکتروفلوریمتری می باشد (۱، ۲). فلوریمتری از روش هایی است که بدلیل حساسیت بیشتر روش نسبت به روش های اسپکتروفتومتری و تداخل کمتر آن با نمونه های مورد سنجش مورد استفاده قرار می گیرد. بیشتر بیومولکولها شامل پروتئین ها، اسیدهای نوکلوئیک، داروهای آنالوگ، هورمون ها و فاکتورهای رشد انتشار ذاتی کمی در ناحیه مرئی دارند به همین دلیل از فلوروفورها برای نشاندار کردن آنها و ایجاد نشر استفاده می شود. فلوروفورها به شکل کووالانسی به بیومولکولها متصل می شوند که این فرایند به دلیل حساسیت این مواد به نور در تاریکی انجام می شود. بنابراین از اتصال پروتئین به فلوروفور در تعیین مقدار ایمنوفلوریمتریک و فلوریمتریک استفاده می شود (۷).

فلورسئین ایزوتیوسیانات (FITC) نوع شیمیایی خاصی از فلورسئین است که به آسانی در pH قلیایی با اسید آمینه لایزین و بنیانهای آمین انتهای مولکول پروتئین بطور کووالان پیوند می دهد. FITC به عنوان یک ماده فلورسنت در تعیین مقدار پروتئین به روش اسپکتروفلوریمتری استفاده می شود. گروه ایزوتیوسیانات از طریق اتصالات کووالانسی به گروههای آمین نوع اول و دوم بیومولکولها پیوند می شود. این ماده در اندازه گیری های ایمنوفلورسانس نیز به بیومولکولها متصل می شود (۷، ۸).

هدف از این تحقیق مقایسه یک روش اسپکتروفتومتری متداول (روش سنجش پروتئین Bradford) با روش اسپکتروفلوریمتری جهت تعیین مقدار توکسوئیدکزاز در دو سامانه دارورسانی میکروسفر و لیپوزوم می باشد.

۲- مواد و روش ها

۲-۱: مواد

نمک سدیم آلژینیک اسید از شرکت Sigma (آمریکا) خریداری شد. اسپان ۸۵، آلبومین سرم گاوی (BSA)، فلورسئین ایزوتیوسیانات (ایزومر I) از Fluka (سوئیس) خریداری شدند. متانول، لسیتین، ایزوپروپیل الکل، کلسترول، سدیم سیترات، کلروفرم، کلرید کلسیم، سدیم کربنات، n- اکتانول، اتیلن دی آمین تترااستیک اسید (EDTA)، کوماسی بریلیانت بلو محصول Merck (آلمان) بودند. توکسوئیدکزاز ۱۵٦۰ Lf/ml از موسسه سرم سازی رازی، حصارک کرج تهیه شد. واحد سنجش توکسوئید کزاز limit of flocculation (Lf) است که بر اساس ایجاد کدورت

Archive of SID

www.SID.ir

در مجاور سازی رقتهای مختلف توکسوئید کزاز با آنتی بادی آن محاسبه می شود.

۲-۲: کنژوگاسیون FITC با توکسوئید کزاز (TT) (به عنوان پروتئین مدل)

بیست میلی گرم FITC در ml ۱۰ بافرکربنات با pH ۹/۷ حل شد و ml ۱۰ TT با غلظت Lf/ml ۱۵۶۰ به آن اضافه گردید. این محلول در ^{o}C ٤ در تاریکی به مدت ۱۸ ساعت توسط همزن مغناطیسی همزده شد. نمک های بافر و FITC متصل نشده، به روش اولترافیلتراسیون یا دیالیز با استفاده از کیسه دیالیز با cut off ۱۲۰۰۰ دالتون در طی ۵ روز، حذف شدند. در این cut off نمکهای بافری و FITC به راحتی از کیسه خارج می شوند ولی FITC-TT باقی می ماند (۱، ۲، ۹).

۲-۳: تهیه میکروسفر آلژینات حاوی FITC-TT به روش امولسیون سازی (w/o)- ژل کردن فاز داخلی

به محلول ۲٪ سدیم آلژینات مقدار لازم FITC-TT اضافه و کاملا مخلوط شد. سپس ml ۲ از این محلول آبی w/v ۲٪ به ml ۱۰ اسپان ۸۵ w/v ۲٪ در n- اکتانول افزوده شد. امولسیون آلژینات در اکتانول با استفاده از هموژنایزر (rpm ۲٦۰۰۰ به مدت ۳ دقیقه) تهیه شد و سپس یکجا و سریع به ml ٦۰ محلول کلرید کلسیم w/v ۰/۳۳٪ در n- اکتانول اضافه شد و به مدت ۱۰ دقیقه تحت چرخش آرام همزن مغناطیسی قرار گرفت. در انتها نمونه از صافی غشایی µm ۰/٤۵ عبور داده شد و مطابق روش ذکر شده در نمونه های قبلی جداسازی و خشک شد. به دلیل استفاده از FITC تمام مراحل آزمایش در تاریکی انجام شد (۳).

۲-٤: تهیه لیپوزوم حاوی FITC–TT به روش تبخیر حلال

برای تهیه این لیپوزوم ها، mg ۱۰ کلسترول و mg ۳۰ لسیتین در ml ۱ مخلوط کلروفرم و متانول به نسبت حجمی (۲ : ۱) حل گردید. حدود ۳۰ عدد سنگ جوش به بالن ته گرد اضافه شد و حلال آلی تحت خلاء در دمای ۳۰ درجه توسط دستگاه تقطیر حلال خارج گردید. به غشاء لیپیدی خشک شده، ml ۱ بافر PBS حاوی FITC–TT اضافه شد و مخلوط به مدت نیم ساعت ورتکس شد. تمامی مراحل کار در تاریکی انجام شد (۱۰).

۲-۵: بررسی خصوصیات ظاهری میکروسفرها و لیپوزومها

به منظور بررسی خصوصیات ظاهری میکروسفرها و لیپوزومها از میکروسکوپ نوری مجهز به میکرومتر و دوربین استفاده شد (۳).

۲-٦: تعیین درصد انکپسولاسیون

دو میلی گرم میکروسفر آلژینات حاوی FITC-TT در ml ۱سیترات سدیم M ۰/۱ با pH ۷/٤ حل شد. پس از حل شدن کامل و تشکیل یک مایع شفاف و یکنواخت، میزان FITC-TT توسط یک روش اسپکتروفتومتری تعیین مقدار پروتئین (برادفورد) و روش اسپکتروفلوریمتری اندازه گیری شد. میزان نشر نمونه های مجهول در دستگاه اسپکتروفلوریمتر در λ_{em} = ۵۲۰ nm به دنبال تحریک در λ_{ex} = ٤۹۰ nm خوانده شد و مقدار پروتئین با استفاده از نمودار استاندارد (شدت فلورسانس- غلظت FITC-TT) محاسبه شد. از آنجا که در روش های تعیین مقدار پروتئین، آلژینات با پروتئین تداخل نشان می دهد، به این منظور از محلول میکروسفر آلژینات فاقد پروتئین که با روش مشابه ساخته و حل شده بود به عنوان شاهد استفاده شد و نشر محلول میکروسفر بدون پروتئین از محلول میکروسفر حاوی پروتئین کسر شد (۱۱). در مورد میکروسفرهای حاوی FITC-TT تمام مراحل کار در تاریکی انجام شد. در مورد لیپوزومها پس از سانتریفوژ کردن سوسپانسیون لیپوزومی، مقدار پروتئین در مایع رویی (لیپوزوم های بدون پروتئین، حاوی TT و حاوی FITC-TT) به روش برادفورد اندازه گیری شد. جذب تمام نمونه ها در طول موج nm ٦۰۰ با دستگاه الایزا ریدر خوانده شد. لازم بذکر است که جهت افزایش صحت و دقت برای نمونه های استاندارد و مجهول از هر غلظت ۳ بار نمونه گذاری شد (۳).

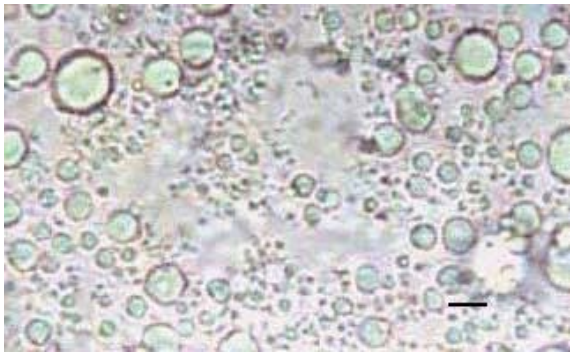
۳: نتایج

۳-۱: بررسی خواص ظاهری میکروسفر آلژینات با میکروسکوپ نوری

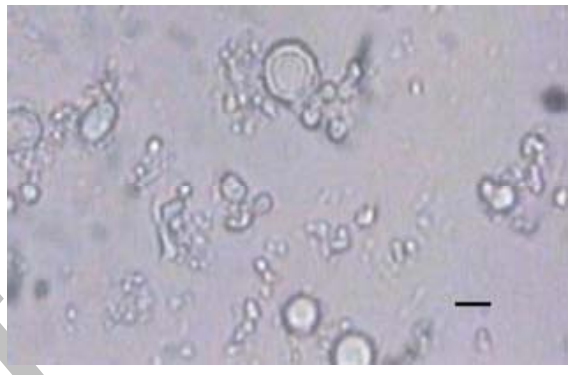
نمونه های تولید شده نسبتاً کروی بودند و عدم چسبندگی مناسبی داشتند. نمونه های میکروسفر دارای پروتئین و بدون پروتئین تفاوتی از نظر خواص ظاهری نداشتند. میکروسفرهای بدست آمده اندازه ذره ای در محدوده µm ۲۰- ۱ داشتند (شکل ۱). لیپوزوم های MLV تهیه شده به روش تبخیر حلال بخوبی قابل تشخیص بودند و در اکثر موارد لایه های متعدد آنها در زیر میکروسکوپ نوری مشخص بود. توزیع اندازه ذره ای برای لیپوزوم ها µm ۲۰- ۵ بود (شکل ۲).

Archive of SID

www.SID.ir



شکل ۱. میکروسفرهای آلژینات حاوی FITC –TT تهیه شده با میکروسکوپ نوری (خط تیره نشانگر ۱۰ میکرون می باشد)

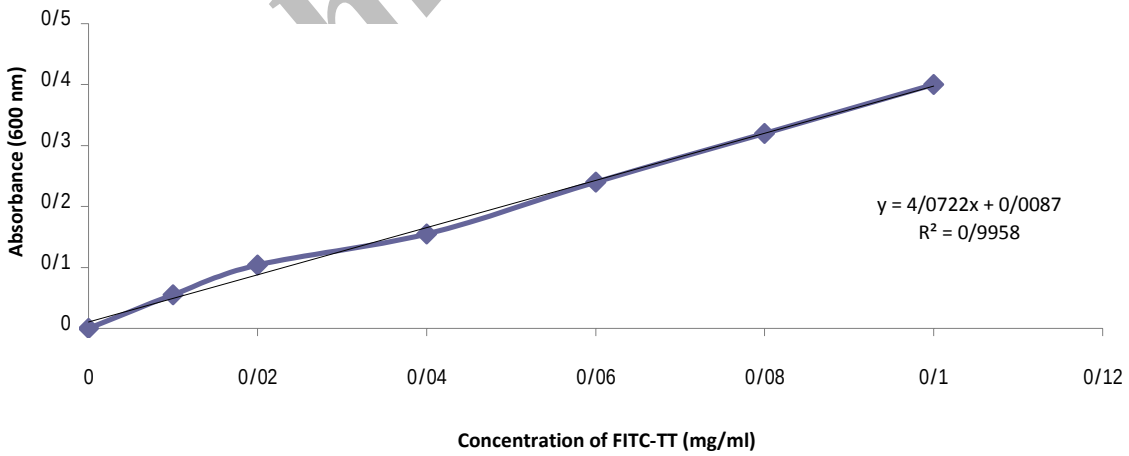


شکل ۲. لیپوزوم لسیتین – کلسترول حاویTT (خط تیره نشانگر ۱۰ میکرون است)

۳-۲: تعیین درصد انکپسولاسیون FITC-TT در میکروسفر

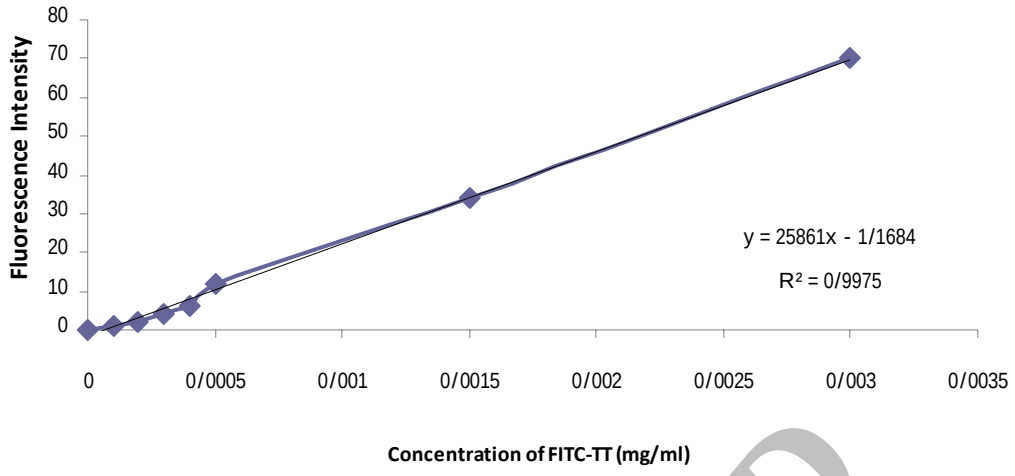
با استفاده از منحنی استاندارد جذب – غلظت FITC-TT در روش برادفورد (شکل ۳) و منحنی استاندارد نشر فلورسانس– غلظت FITC-TT در روش اسپکتروفلوریمتری (شکل ٤)، متوسط درصد انکپسولاسیون برای میکروسفرهای حاوی FITC-TT به روش فلوریمتری ۲/۱ ± ۲۱/۳٪ و به روش برادفورد ٦/۱ ± ۳۸/۳٪ بدست آمد. به منظور مقایسه درصد انکپسولاسیون FITC-TT در میکروسفر آلژینات به دو روش برادفورد و فلوریمتری از آزمون t –test استفاده شد. نتایج آزمون تفاوت معنی داری بین دو روش فلوریمتری و برادفورد نشان می دهد (P < ۰/۰۱) (شکل ۵).

طبق نتایج بدست آمده متوسط درصد انکپسولاسیون برای لیپوزوم های حاوی FITC-TT به روش فلوریمتری ۳ ± ٥٦٪ و به روش برادفورد ٦/۲ ± ٤٦/۳٪ می باشد. به منظور مقایسه درصد انکپسولاسیون FITC-TT در لیپوزوم لسیتین – کلسترول به دو روش برادفورد و فلوریمتری، از آزمون t-test استفاده شد. نتایج آزمون تفاوت معنی داری بین دو روش فلوریمتری و برادفورد نشان می دهد (P <۰/۰۵) (شکل ٦).

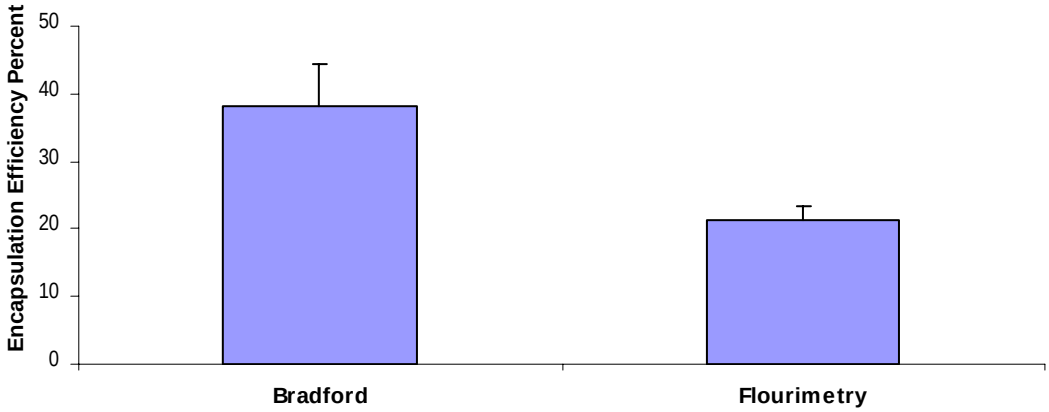


شکل ۳. منحنی استاندارد خطی جذب – غلظت (BSA) به روش برادفورد

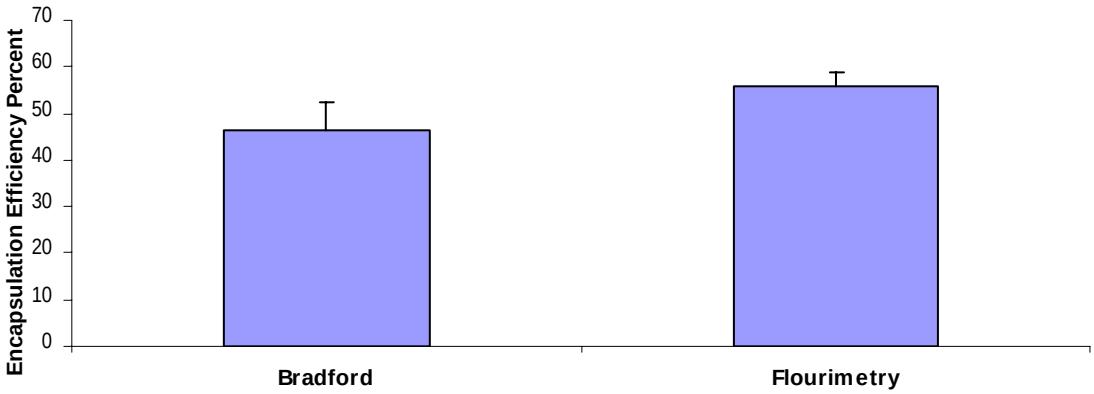
www.SID.ir



شکل ٤. منحنی استاندارد نشر فلورسانس- غلظت FITC-TT به روش اسپکتروفلوریمتری



شکل ٥. مقایسه درصد محصور سازی در میکروسفر آلژینات به دو روش اسپکتروفتومتری (برادفورد) و اسپکتروفلوریمتری. مقادیر محاسبه شده به دو روش نشان دهنده اختلاف معنی داری بین دو روش می باشد ($P<0.01$)



شکل ٦. مقایسه درصد محصور سازی در لیپوزوم به دو روش اسپکتروفتومتری (برادفورد) و اسپکتروفلوریمتری. مقادیر محاسبه شده به دو روش نشان دهنده اختلاف معنی داری بین دو روش می باشد ($P<0.05$)

www.SID.ir

٤- بحث

یکی از مشکلات میکروسفر آلژینات وجود تداخل جذبی بین سدیم آلژینات و پروتئین ها در روش های مختلف تعیین مقدار پروتئین می باشد. هنگام اندازه گیری میزان پروتئین محصور شده در میکروسفرهای آلژینات، به دلیل این که این پلیمر جذب دارد، همواره جوابهای مربوط به میزان انکپسولاسیون بیشتر از مقدار واقعی بدست می آید. برای رفع این مشکل در مطالعات مختلف علاوه بر میکروسفرهای حاوی پروتئین، میکروسفرهای خالی نیز تهیه می شود و با حل نمودن این میکروسفرها به روش مشابه با میکروسفرهای حاوی پروتئین، جذب محلول میکروسفر خالی از محلول میکروسفر حاوی پروتئین کسر می شود (۱۱). پلیمر سدیم آلژینات در اکثر روش های تعیین مقدار پروتئین تداخل نشان می دهد ولی میزان این تداخل در بین روش ها متفاوت است، به این ترتیب که کمترین تداخل جذبی با روش سنجش پروتئین بیسینکونینیک اسید (BCA) دیده می شود و در روش های برادفورد و لوری تداخل بیشتری دیده می شود (٤). علاوه بر تداخل های معمول، در روش برادفورد با مشکل دیگری در کار با میکروسفر آلژینات روبرو هستیم. نمک سدیم اسید آلژینیک محلول در آب می باشد، اما نمک های فلزات دو ظرفیتی و سه ظرفیتی مانند کلسیم، باریم، آلومینیوم و... و همچنین خود اسید آلژینیک در آب نامحلول می باشند. هنگام تعیین مقدار پروتئین انکپسوله در میکروسفر آلژینات (آلژینات کلسیم) میکروسفرها در محلول سدیم سیترات حل می شوند. در روش های لوری و BCA واکنشگر مورد استفاده pH قلیایی دارد (۱۲، ۱۳) و آلژینات سدیم در آن پایدار می ماند، اما در روش برادفورد، واکنشگر مورد استفاده pH اسیدی دارد (٦). در این محیط سدیم آلژینات محلول تبدیل به اسید آلژینیک نامحلول می شود و رسوب می نماید لذا در استفاده از روش برادفورد برای تعیین مقدار پروتئین انکپسوله در میکروسفر آلژینات، باید غلظت سدیم آلژینات در محیط واکنشگر پایین نگه داشته شود تا ایجاد اسید آلژینیک مشکل زا نباشد.

با توجه به مشکلات بالا و نیز با توجه به اینکه میکروسفرآلژینات قابلیت های مثبت زیادی در محصور نمودن و تجویز داروهای پروتئینی دارد، یافتن روش جایگزین برای روش های متداول تعیین مقدارپروتئین می تواند مفید باشد. به این منظور در این تحقیق سعی بر این است که با کنژوگه کردن یک پروتئین مدل (توکسوئید کزاز) با FITC، قابلیت روش اسپکتروفلوریمتری برای تعیین درصد انکپسولاسیون مواد در میکروسفرها ارزیابی شود. نشر محلول میکروسفر خالی در روش اسپکتروفلوریمتری به طور متوسط ۰/۲۰ می باشد که در مقایسه با میکروسفرهای حاوی پروتئین که به طور متوسط نشر فلورسانس در حدود ۱٦/۲ دارند، اندک و قابل صرف نظر است و از این نظر این روش قابلیت های مثبتی را نشان می دهد. تفاضل میزان دو نشر میکروسفرهای حاوی پروتئین و خالی در روش اسپکتروفلوریمتری در مقایسه با روش برادفورد کمتر می باشد. به نظر می رسد با توجه به این که تفاضل جذب میکروسفر خالی در روش های سنجش پروتئین یکی از پرکاربردترین روشها برای افزایش صحت نتایج است (۱۱)، اما روشی است که در آن احتمال خطا وجود دارد. حال آنکه در روش اسپکتروفلوریمتری با توجه به عدم نشر فلورسانس میکروسفر خالی، نتایج قابل اطمینان تر هستند. می توان درصد انکپسولاسیون بالاتر بدست آمده در روش برادفورد را تا حدی به عدم حذف کامل برخی عوامل تداخل کننده، حتی پس از حذف عدد جذب میکروسفرهای خالی، نسبت داد.

در مورد لیپوزوم برای تعیین درصد انکپسولاسیون پروتئینها در اغلب مطالعات از روش غیرمستقیم استفاده می شود. به این ترتیب که میزان پروتئین محصور نشده در مایع رویی سوسپانسیون لیپوزوم های تهیه شده محاسبه می شود و با کسر کردن آن از مقدار پروتئین افزوده شده اولیه، مقدار پروتئین محصور محاسبه می شود (١٤، ١٥). دلیل استفاده زیاد از این روش این است که به طور معمول در مایع رویی لیپوزوم ها عوامل تداخل کننده کمتر هستند. حال آن که در روش مستقیم باید ابتدا لیپوزوم در حلالهای آلی و یا با کمک بعضی از سورفکتانت ها حل شده و سپس داروی آزاد شده تعیین مقدار شود. این احتمال وجود دارد که بسیاری از سورفکتانتها، لیپیدهای حل شده جداره لیپوزوم و یا حتی برخی از حلالهای مورد استفاده، در روشهای تعیین مقدار پروتئین تداخل نشان دهند (٦، ١٥). در هنگام تهیه لیپوزوم ها با استفاده از فسفولیپیدهای خالص، معمولاً مایع رویی لیپوزوم تداخل کمی نشان می دهد و لذا می توان به روش غیرمستقیم و با کمک روش های اسپکتروفتومتری درصد محصورسازی را محاسبه کرد. در بسیاری از مطالعات به ویژه هنگامی که هدف تهیه فرمولاسیونهای لیپوزومی ارزان قیمت باشد، از فسفولیپیدهای با خلوص کمتر یا مخلوط های چند جزئی مانند لسیتین تخم مرغ، سویا و ... استفاده می شود که این ترکیبات در مقایسه با فسفولیپیدهای خالص بسیار ارزان تر هستند. اما این ترکیبات مخلوط پیچیده ای از چندین فسفولیپید و همچنین ترکیبات لیپیدی و ... هستند. هنگام استفاده از این مخلوطها

Archive of SID

www.SID.ir

مانند لسیتین، معمولاً سوپرناتانت در روش های اسپکتروفتومتری تداخل زیادی نشان می دهد (۱۵). وجود تداخل و افزایش جذب مایع رویی لیپوزوم ها به طور کاذب مقدار پروتئین محصور نشده را بالا نشان می دهد و باعث می شود که مقدار پروتئین محصور شده کمتر از مقدار واقعی محاسبه شود.

۵- نتیجه گیری

همانگونه که نتایج نشان می دهند، در روش برادفورد مایع رویی لیپوزوم فاقد پروتئین، نشر فلورسانس زیادی نشان می دهد که حاکی از تداخل می باشد. در روش اسپکتروفلوریمتری به دلیل اینکه مایع رویی لیپوزوم فاقد پروتئین در مقایسه با مایع رویی لیپوزوم حاوی پروتئین جذب خیلی کمی نشان می دهد که قابل چشم پوشی است، درصد محصور سازی بیشتر بدست می آید. بنابراین با توجه به نتایج به دست آمده، می توان از روش اسپکتروفلوریمتری به دلیل داشتن خطای کمتر به عنوان جایگزینی برای روش برادفورد در تعیین مقدار پروتئین استفاده کرد.

٦-تقدیر و تشکر

هزینه این پژوهش، در قالب یک طرح پژوهشی، توسط معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی مشهد تامین شده است.

7- References

1. Copland M.J., Baird M.A., Rades T., McKenzie J.L., Becker B., Reck F., Tyler P.C., Davies N.M. Liposomal delivery of antigen to human dendritic cells. Vaccine, 2003, 21: 883-90.
2. Konnings S., Copland M.J., Davies N.M., Rades T. A method for the incorporation of ovalbumin into immune stimulating complexes prepared by the hydration method. International Journal of Pharmaceutics, 2002, 241: 385-89.
3. Lemoine D., Wauters F., Bouchend'homme S., Preat V. Preparation and characterization of alginate microspheres containing a model antigen. International Journal of Pharmaceutics, 1998, 176: 9-19.
4. Coligan J.E., Short protocols in protein science John Willy & Sons, USA, 2003.
5. Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein – die binding. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-54.
6. Kruger N.J., The bradford method for protein quantitation in The protein protocols, J.M. Walker ed. Humana press, Ottawa, 2002, 15-21.
7. Gok E., Olgaz S. Binding of Fluorescein Isothiocyanate to insulin : a fluorimetric laeling study. J. Fluoresc., 2004, 14: 203-06.
8. Huang M., Ma Z., Khor E., Lim L.Y. Uptake of FITC-Chitosan nanoparticles by A549 cells. Pharmaceutical Research, 2002, 19: 1488-94.
9. Coligan J.E., Preparation of cells and reagents for flowcytometry in Immuno–fluorescence and cell Sorting, K. Holmes ed. John Willy & Sons, USA, 2001, 1-24.
10. Gregoriadis G., da Silva H., Florence A.T. A procedure for the efficient entrapment of drugs in dehydration-rehydration liposomes (DRVs). International Journal of Pharmaceutics, 1990, 65: 235-42.
11. Amidi M., Romeijn S.G., Borchard G., Junginger H.E., Hennink W.E., Jiskoot W. Preparation and characterization of protein-loaded N-trimethyl chitosan nanoparticles as nasal delivery system. Journal Of Controlled Release, 2006, 111: 107-16.
12. Waterborg J.H., The lowry method for protein quantitation in The protein protocols, J.M. Walker ed. Humana Press, Ottawa, 2002, 7-9.
13. Walker J.H., The bicinchoninic acid (BCA) assay for protein quantitation in The protein protocols, J.M. Walker ed. Humana Press, Ottawa, 2002, 11-14.
14. Alpar H.O., Bowen J.C., Brown M.R.W. Effectiveness of liposomes as adjuvants of orally and nasally administered tetanus toxoid. International Journal of Pharmaceutics, 1992, 88: 335-44.
15. Memoli A., Cristina Annesini M., Petralito S. Surfactant-induced leakage from liposomes: a comparison among different lecithin vesicles. International Journal of Pharmaceutics, 1999, 184: 227-35.

Archive of SID

www.SID.ir