

## تولید و ارزیابی نانولیپوزوم‌های حاوی نایسین و ناتامایسین به روش مظفری

محسن ضیایی<sup>۱</sup>، محمود صوتی خیابانی<sup>۲\*</sup>، بابک قنبرزاده<sup>۳</sup>، حامد همیشه کار<sup>۴</sup>، رضا رضایی مکرّم<sup>۲</sup>، سمیرا تیزچنگ<sup>۱</sup>

۱. دانش‌آموخته کارشناسی ارشد، گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۲. استادیار، گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۳. دانشیار، گروه مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۴. استادیار، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

(تاریخ دریافت: 93/4/17، تاریخ پذیرش: 93/6/6)

### چکیده

در این تحقیق، نانولیپوزوم‌های حاوی نایسین و ناتامایسین به روش مظفری تولید شدند. مقدار نایسین و ناتامایسین درون‌پوشانی شده توسط اتوانالیزر و اسپکتوفتومتری اندازه‌گیری شد. سپس اندازه ذرات و پایداری لیپوزوم‌ها طی 70 روز در فرمولاسیون حاوی پلی اتیلن گلیکول و بدون پلی اتیلن گلیکول ارزیابی شد. نتایج نشان می‌دهد اندازه ذرات در محدوده 76 تا 90 نانومتر، توزیع اندازه ذرات 0/73 تا 0/9 و درصد درون‌پوشانی نایسین و ناتامایسین به ترتیب در محدوده 89 تا 96 و 89 تا 92 درصد است. بررسی پایداری اندازه ذرات نشان می‌دهد که فرمولاسیون‌های حاوی پلی اتیلن گلیکول طی 70 روز پایدار هستند. نتایج دلالت بر این دارند که برای پایداری سیستم لیپوزومی استفاده از پلی اتیلن گلیکول، می‌تواند کارآمد باشد.

واژه‌های کلیدی: لیپوزوم، روش حرارتی، پتانسیل زتا، پایداری، راندمان درون‌پوشانی.

\* نویسنده مسئول: m.sowti@tabrizu.ac.ir

## ۱- مقدمه

بین غشاء دو لایه نگهداری کنند [6]. روش‌های مختلفی برای تولید لیپوزوم‌ها وجود دارد. این روش‌ها شامل آب‌پوشانی لایه نازک<sup>1</sup>، دفع دترجنت<sup>2</sup>، تزریق اتر و اتانول<sup>3</sup>، تبخیر فاز معکوس<sup>4</sup>، روش امولسیون<sup>5</sup> و روش حرارتی یا روش مظفری<sup>6</sup> می‌باشند [6-7]. در بین روش‌های تولید لیپوزوم، روش حرارتی یا مظفری نسبت به سایر روش‌ها، دارای مزایایی هم‌چون کاربرد آسان، هزینه کم، زمان‌بر نبودن فرایند تولید، کنترل آسان و عدم استفاده از حلال‌های سمی می‌باشد. این روش در صنایع غذایی بسیار کاربرد دارد و جایگزین اکثر روش‌های تولید لیپوزوم شده است [6].

تحقیقات زیادی در رابطه با روش حرارتی و روش مظفری انجام شده است. تیزچنگ و همکاران با استفاده از روش حرارتی، نانولیپوزوم‌های حاوی نایسین تولید کردند. در این تحقیق مقادیر بهینه متغیرهای جرم فسفولیپید، سرعت فرایند و دمای فرایند در بهینه سازی ذرات براساس اندازه ذره‌ای به ترتیب 2/14 gr، 930 rpm و 90 min بود که در بررسی مورفولوژی ذرات با استفاده از میکروسکوپ الکترونی، و زیگول‌های کروی شکل، یونی لاملا با اندازه ذرات 180 nm گزارش شد. مقادیر کارایی درون‌پوشانی کپسول‌های لیپوزومی 30٪ بود [11]. هم‌چنین در تحقیقی دیگر، راستی و همکاران، با استفاده از روش مظفری و روش هیدراسیون لایه نازک، نانولیپوزوم‌هایی با استفاده از اسیدهای چرب دوکوزاهگزانوئیک<sup>7</sup> و ایکوزاپنتانوئیک<sup>8</sup> تولید کردند، نتایج حاصل از میکروسکوپ الکترونی عبوری نشان داد که در روش مظفری نانوذرات ساختار کروی دارند، در حالی که در روش لایه نازک به دلیل اعمال فشار و نیروی برشی زیاد نانوذرات ساختار کروی نداشتند. اندازه ذرات در نانولیپوزوم‌های تولید شده به روش لایه نازک و روش حرارتی به ترتیب، 200 و 362 nm بود و نمونه‌های حاصل از این دو روش طی زمان دو ماهه، اختلاف معنی‌داری از نظر اندازه ذرات نداشتند و نتایج حاصل از پتانسیل زتا در فرمولاسیون‌های لیپوزومی به روش هیدراسیون لایه نازک و روش مظفری به ترتیب 34/18- و

باکتریوسین‌ها ترکیبات ضد میکروبی هستند که توسط باکتری‌ها و قارچ‌ها در ریبوزوم تولید شده و موجب مرگ یا عدم رشد باکتری‌ها و کپک‌ها می‌شوند. باکتریوسین‌ها به‌عنوان نگه‌دارنده زیستی، سالم و طبیعی توسط آنزیم‌های پروتئاز دستگاه گوارش و روده، بدون هیچ‌گونه عوارض جانبی، سریع هضم و تجزیه می‌گردند. بنابراین می‌توان از این ترکیبات به‌عنوان یک مانع اصلی برای کنترل عوامل بیماری‌زای ناشی از مواد غذایی نام برد. شناخته شده ترین باکتریوسین‌هایی که به‌طور گسترده مورد مطالعه قرار می‌گیرد، نایسین و ناتامایسین هستند [1-2]. نایسین، پلی‌پپتیدی کاتیونی با خاصیت ضد میکروبی می‌باشد که توسط باکتری لاکتوکوکوس لاکتیس تولید می‌شود. نایسین با ایجاد شکاف در غشاء سلولی باکتری‌های گرم مثبت موجب ترشح مواد سیتوپلاسمی به خارج از سلول و در نهایت موجب از بین رفتن سلول باکتریایی می‌شود. هم‌چنین بر باکتری‌های گرم منفی که غشاء خارجی آن‌ها تحت شوک حرارتی یا تیمار با ترکیباتی نظیر EDTA تخریب شده‌اند، نیز اثر می‌گذارد [3]. از جمله باکتریوسین‌های مهم دیگر، ناتامایسین است که یک پلی‌ان می‌باشد و به‌طور گسترده در نوشیدنی‌ها و برخی مواد غذایی مانند پنیر، گوشت، آب‌میوه‌ها و غیره کاربرد دارد. ناتامایسین بر روی مخمرها و کپک‌ها به‌طور کامل موثر بوده، ولی بر روی باکتری‌ها اثری ندارد. ناتامایسین همانند سایر آنتی‌بیوتیک‌های پلی‌ان، از طریق اتصال به استرول‌های غشایی موجب اختلال در قابلیت نفوذپذیری انتخابی غشاء می‌گردد [4]. استفاده از باکتریوسین‌ها در فرم آزاد، در مواد غذایی به دلیل تمایل ترکیبات ضد میکروبی طبیعی با اجزای ماده غذایی نظیر چربی‌ها و پروتئین‌ها و هم‌چنین مداخله در رشد برخی استارترهای لاکتیکی، محدودیت‌هایی دارد. برای حل این مشکل، درون‌پوشانی این ترکیبات در گویچه‌های فسفولیپیدی، لیپوزوم، می‌تواند راهکار مناسبی باشد [5]. لیپوزوم‌ها، سیستم‌هایی کروی شکل، تشکیل شده از لیپیدهای قطبی هم‌چون فسفاتیدیل کولین و یا فسفاتیدیل اتانول آمین و یا مخلوطی از چربی‌های قطبی همراه با کلسترول یا ارگسترول هستند. لیپوزوم‌ها به دلیل ساختار آمفی‌فیلیک خود، قادرند ترکیبات آب‌دوست را در فضای درونی و ترکیبات آب‌گریز را در

1. Thin film hydration
2. Dewtergent depletion method
3. Injection method
4. Reverse phase evaporation method
5. Emulsion method
6. Heating or mozafari method
7. DHA (Docosa Hexaenoic Acid)
8. EPA (Eicosa Pentaenoic Acid)

48/33- بود [1، 8]. با توجه به معایب روش‌های پیشین، از جمله استفاده از حلال‌های شیمیایی، زمان‌بر بودن فرایند و استفاده از تجهیزات پیچیده و گران قیمت در تهیه لیپوزوم، در این تحقیق از روش مظفری جهت تولید لیپوزوم استفاده شد. همچنین به دلیل این‌که تاکنون از نایسین به همراه ناتامایسین در بررسی خصوصیات فیزیکی استفاده نشده است، از این‌رو در این تحقیق، تولید و ارزیابی نانولیپوزوم‌های حاوی نایسین و ناتامایسین به روش مظفری بررسی می‌شود.

## 2- مواد و روش‌ها

فسفولیپید با درجه خلوص 99٪ از شرکت آمریکایی Across، پلی اتیلن گلیکول 400 و گلیسرول با درجه خلوص 99٪ از شرکت آلمانی Merck، نایسین پودری با نام تجاری Valisin از شرکت Mayasan ترکیه، ناتامایسین از شرکت DSM دانمارک و دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات ( $K_2HPO_4$ ) به صورت نمک خشک و بدون آب جهت ساختن بافر فسفات از شرکت Merck آلمان، تهیه شدند.

## 2-1- تجهیزات مورد استفاده

تجهیزات مورد استفاده عبارتند از همزن مغناطیسی مدل Rer ساخت Ika، آلمان، دستگاه سنجش اندازه ذرات 1100، Sald، Shimadzu و Japan دستگاه زتا سایزر Nano-ZS ساخت شرکت Malvern کشور انگلستان، دستگاه اتوآنالیزر Labsoc مدل 6360-D ساخت شرکت آمریکا، اسپکتروفتومتر مدل Ultrospec 200 ساخت شرکت Pharmacia Biotech انگلیس، آمیکون، فالكون فیلتردار Millipore آلمان، سانتریفوژ مدل Avanti30 ساخت شرکت Beckman، آمریکا، میکروسکوپ الکترونی عبوری TEM، Leo، Zeiss 100 KV مدل 906 ساخت آلمان.

## 2-2- تهیه محلول بافر فسفات

جهت تهیه بافر فسفات 10 mM، حدود 1/7418 gr دی‌پتاسیم هیدروژن فسفات در یک لیتر آب دو بار تقطیر حل و سپس در مقادیر pH برابر 5/5، 6 و 7/4 برای فرمولاسیون‌های مختلف، روی همزن مغناطیسی تنظیم شد.

## 2-3- تهیه محلول نایسین و ناتامایسین

ابتدا 10 mg نایسین جهت تهیه محلول نایسین، 10 mg ناتامایسین جهت تهیه محلول ناتامایسین و 2/5 mg ناتامایسین با 5 mg نایسین جهت تهیه مخلوطی از ناتامایسین و نایسین با ترازی حساس توزین شد. سپس گلیسرول 3 v/v٪، پلی اتیلن گلیکول 3 v/v٪ و بافر فسفات با pH 5/5، 6 و 7/4 به ترتیب برای هر کدام از محلول‌های نایسین، ناتامایسین و مخلوط نایسین و ناتامایسین به میزان 5 ml اضافه و سپس مخلوط روی همزن مغناطیسی با سرعت 500 rpm در بن ماری در دمای 40°C گذاشته شد.

## 2-4- تهیه لیپوزوم

ابتدا فسفولیپید با 4 ml آب دو بار تقطیر در شیکرانکوباتور در دمای 37°C، دور همزن 70 rpm به مدت یک شبانه روز هیدراته شد [6]. نایسین و ناتامایسین (نایسین، ناتامایسین و مخلوط این دو) با فسفولیپید هیدراته شده، در بشر بافل‌دار ریخته و در دمای 60°C با دور 1500 rpm به مدت 10 min همزده شد. سپس 42 ml بافر فسفات با pH 5/5، 6 و 7/4 به ترتیب برای محلول‌های نایسین، ناتامایسین و مخلوط این دو اضافه شد و تا 90 min با هم مخلوط و تحت نیروی برشی دستگاه همزن مغناطیسی قرار گرفت. فرمولاسیون تولید شده به منظور پایداری، به مدت 30 min در دمای اتاق و بعد در یخچال در دمای 4°C نگهداری شد [9].

## 2-5- تاثیر میزان فسفولیپید بر درصد درون‌پوشانی

با توجه به این‌که میزان مناسب فسفولیپید بر ویژگی‌های سیستم لیپوزومی از نظر درصد درون‌پوشانی، پایداری اندازه ذرات و کدورت تاثیر دارد، بنابراین جهت تعیین اثر فسفولیپید بر درصد درون‌پوشانی، مقدار لیپید در سطوح 150، 250، 500 و 1000 mg انتخاب شد. سپس مقدار مناسب از لحاظ بیش‌ترین میزان درون‌پوشانی، کم‌ترین اندازه ذرات و پایداری فیزیکی بالا انتخاب شد.

## 2-6- تعیین اندازه ذرات و توزیع اندازه ذرات

تعیین و توزیع اندازه ذرات توسط دستگاه سنجش اندازه

(فالکون فیلتردار) ریخته و با استفاده از سانتریفوژ با سرعت 500 rpm به مدت 20 min، فاز حاوی مواد درون‌پوشانی شده در لیپوزوم‌ها از مایع شفاف که حاوی مواد غیر درون‌پوشانی شده بود، جدا شد. سپس درصد درون‌پوشانی نایسین و ناتامایسین به ترتیب توسط دستگاه‌های اتوآنالیزر و اسپکتروفوتومتر طبق معادله (3) محاسبه شد.

$$(3) \times 100 = \frac{\text{لیپوزوم}}{\text{مقدار کل نایسین و ناتامایسین اضافه شده}} \times 100 = \text{درصد درون‌پوشانی}$$

## 2-9- بررسی پایداری لیپوزوم‌های تولید شده طی مدت زمان نگهداری

برای سنجش پایداری لیپوزوم‌ها از نظر اندازه ذرات، طی مدت زمان نگهداری، لیپوزوم‌های تولید شده که اندازه کم‌تر از 100 nm داشتند انتخاب و طی 70 روز، هر 14 روز یک بار، اندازه ذرات با دستگاه پارتیکل سایز آنالایزر مورد بررسی قرار گرفتند. همچنین تاثیر افزودن گلیسرول و پلی اتیلن گلیکول بر پایداری اندازه ذرات سیستم نیز مورد بررسی قرار گرفت.

## 2-10- بررسی میزان رهاسازی مواد درون‌پوشانی شده در طی زمان نگهداری

یکی از ویژگی‌های منحصر به فرد لیپوزوم‌ها، توانایی در رهاسازی هدفمند مواد درون‌پوشانی شده است که باعث تداوم عمل مواد ضد میکروبی، حفظ ویژگی‌های اولیه مواد درون‌پوشانی شده برای مدت طولانی‌تر و استفاده از دوز پایین‌تری از ماده مورد نظر می‌شود. برای این منظور، طی 35 روز، هر هفت روز یک بار، میزان رهاسازی مواد درون‌پوشانی شده در فرمولاسیون‌ها محاسبه شد.

## 2-11- آزمون میکروسکوپ الکترونی عبوری، TEM

به منظور بررسی مورفولوژی نانو ذرات و تأیید اندازه ذرات یک قطره از نمونه سوسپانسیونی نانو ذرات لیپیدی بر روی گرید فیلم کربنی قرار داده شده و پس از خشک شدن آن در دمای آزمایشگاه با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی عبوری، TEM، تصویربرداری شد.

ذرات توسط دستگاه سنجش اندازه ذرات انجام شد. متوسط اندازه ذرات تهیه شده بر اساس قطر حجمی، بعد از یک ساعت نگهداری در دمای 4 °C توسط این دستگاه تعیین شد (معادله 1). این آزمون‌ها در سه تکرار انجام شدند [10].

$$(1) \bar{D}[4,3] = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3}$$

$d_i$ : قطر ذرات،

$\bar{D}[4,3]$ : میانگین قطر حجمی (میانگین حجم معادل)<sup>1</sup>.

توزیع اندازه ذرات نیز با استفاده از معادله زیر محاسبه شد [11]

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

## 2-7- پتانسیل زتا

برای تعیین پتانسیل زتای لیپوزوم‌ها و نمونه‌های حاوی نایسین و ناتامایسین، از دستگاه زتا سایزر استفاده شد. نمونه‌ها نخست با استفاده از آب مقطر 50 برابر رقیق شدند. اندازه‌گیری پتانسیل زتا محلول لیپوزومی در pH برابر با 7/4، دمای 25 °C و توان 149 W انجام شد [12].

## 2-8- درصد درون‌پوشانی

جهت اندازه‌گیری میزان نایسین، ناتامایسین و مخلوط نایسین و ناتامایسین، محصور شده در فرمولاسیون لیپوزومی، از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج 305 nm برای سنجش ناتامایسین و از دستگاه اتوآنالیزر برای سنجش نایسین استفاده شد. اساس آزمایش به این صورت است که پروتئین‌ها در حضور پیروگالول رد<sup>2</sup> و مولیبدات<sup>3</sup> تشکیل کمپلکس قرمز رنگ می‌دهند و رنگ ایجاد شده توسط دستگاه اتوآنالیزر قابل اندازه‌گیری است [1، 13]. از آنجایی که نایسین در دستگاه اسپکتروفوتومتر جذب ندارد و ناتامایسین در دستگاه اتوآنالیزر قابل تشخیص نیست، بنابراین به راحتی می‌توان میزان درون‌پوشانی را برای مخلوط نایسین و ناتامایسین محاسبه نمود. برای این منظور ابتدا فرمولاسیون لیپوزوم در آمیکون (فالکون فیلتردار) ریخته و با استفاده از سانتریفوژ با

1. Debroukere mean  
2. pyrogallol red  
3. molybdate

## 12-2 - طرح آماری

آزمون‌ها در سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. نرم افزار آماری SPSS16 در سطح احتمال 95% ( $P < 0/05$ ) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای تایید وجود اختلاف، بین میانگین‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

حاوی پلی اتیلن گلیکول (نمونه 2)، پلی اتیلن گلیکول به همراه نایسین (نمونه 3) و پلی اتیلن گلیکول به همراه ناتامایسین (نمونه 4)، نسبت به فرمولاسیون فسفاتیدیل خالص (نمونه 1) از نظر اندازه ذرات، اختلاف معنی‌داری وجود دارد ( $P < 0/05$ ). با افزودن پلی‌اتیلن گلیکول (نمونه 2)، اندازه ذرات افزایش یافته، سپس اندازه ذرات با افزودن نایسین و ناتامایسین کاهش یافته است. همچنین با توجه به جدول 1، توزیع اندازه ذرات، شاخص اسپن، در نمونه‌های 1 تا 5، تفاوت معنی‌داری مشاهده نشد ( $P < 0/05$ ). نتایج حاصل از شاخص اسپن نشان دهنده توزیع اندازه ذرات باریک‌تر و سیستم کلوئیدی همگن‌تر است. توزیع ذرات برای تمام نمونه‌ها باریک بوده یعنی در نمونه‌ها، یکنواختی محتوا و تکرارپذیری قابل مشاهده است. در تحقیقی که تیکسیرا و همکاران، بر روی نانوزیکول‌های فسفولیپیدی حاوی ترکیبات شبه باکتریوسین، پلی‌اتیلن گلیکول و گلیسرول در ممانعت از رشد لیستریا مونوسی‌توزنز انجام دادند، نتایج نشان داد که قطر متوسط وزیکول‌ها، با افزودن پلی اتیلن گلیکول و گلیسرول از 485 به 570 nm افزایش یافته است [14]. همچنین در تحقیقی که مهامد و همکاران، در خصوص اهمیت، نوع و چیدمان ماده فعال در ساختار لیپوزوم‌ها انجام دادند به این نتیجه رسیدند که مواد فعال آب‌گریز با قرار گرفتن در سطح و بین ساختار دو لایه‌ای منجر به افزایش چگالی چیدمان فسفولیپیدی می‌شوند. آن‌ها با اندازه‌گیری فشار سطحی مشاهده کردند که مساحت مؤثر هر مولکول فسفولیپید با افزودن ترکیبات فعال کاهش یافته

نتایج تاثیر میزان فسفولیپید بر درصد درون‌پوشانی، در شکل 1 آورده شده است. نتایج تجزیه و تحلیل آماری نشان داد، در نمونه‌های حاوی 150 و 250 mg فسفولیپید، از نظر درصد درون‌پوشانی اختلاف معنی‌داری وجود ندارد ( $P > 0/05$ )؛ ولی بین نمونه‌های حاوی 150، 250، 500 و 1000 mg فسفولیپید، اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). با توجه به نتایج، راندمان درون‌پوشانی در نمونه حاوی 1000 mg فسفولیپید، نسبت به سایر نمونه‌ها بیش‌ترین مقدار بود که جهت انجام آزمایشات از این مقدار لیپید استفاده شد.

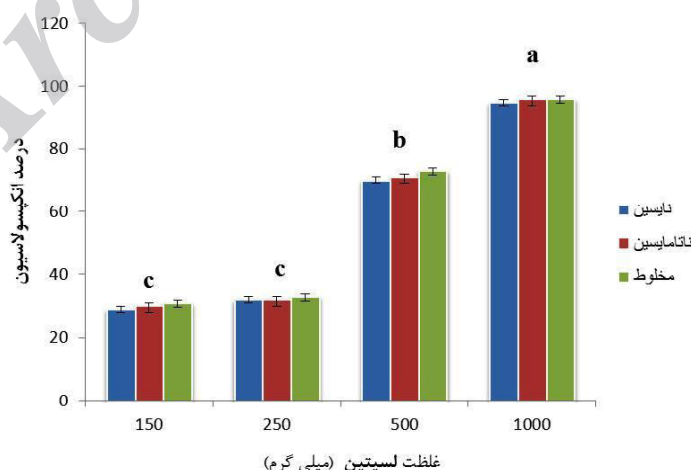
## 3- نتایج و بحث

### 1-3- تاثیر میزان فسفولیپید بر درصد درون‌پوشانی

نتایج تاثیر میزان فسفولیپید بر درصد درون‌پوشانی، در شکل 1 آورده شده است. نتایج تجزیه و تحلیل آماری نشان داد، در نمونه‌های حاوی 150 و 250 mg فسفولیپید، از نظر درصد درون‌پوشانی اختلاف معنی‌داری وجود ندارد ( $P > 0/05$ )؛ ولی بین نمونه‌های حاوی 150، 250، 500 و 1000 mg فسفولیپید، اختلاف معنی‌داری مشاهده شد ( $P < 0/05$ ). با توجه به نتایج، راندمان درون‌پوشانی در نمونه حاوی 1000 mg فسفولیپید، نسبت به سایر نمونه‌ها بیش‌ترین مقدار بود که جهت انجام آزمایشات از این مقدار لیپید استفاده شد.

### 2-3- نتایج تعیین اندازه ذرات و توزیع اندازه ذرات

نتایج مربوط به اندازه‌گیری قطر متوسط ذرات و شاخص اسپن برای فرمولاسیون‌های مختلف در جدول 1 آورده شده است. با توجه به نتایج، متوسط قطر حجمی و توزیع اندازه ذرات به ترتیب در محدوده 76 تا 90 نانومتر و شاخص اسپن بین 0/73 تا 0/9 می‌باشد. نتایج نشان داد که در نمونه‌های



شکل (1) تاثیر مقدار فسفولیپید بر درصد درون‌پوشانی

### 3-4- درصد درون‌پوشانی

مقدار ماده درون‌پوشانی شده در فرمولاسیون‌ها، بر اساس فرمول محاسبه شد و نتایج حاصل از میزان درون‌پوشانی در فرمولاسیون‌های حاوی ناپسین، ناتامایسین و مخلوطی از هر دو به ترتیب 92-85٪، 96-89٪ و 89-85٪ محاسبه گردید. نتایج تحقیقی که توسط ویلکینسون و همکاران انجام شد نشان داد که در سیستم‌های لیپوزومی که از ترکیباتی مانند کلسترول در فرمولاسیون لیپوزومی استفاده شده، به دلیل سخت شدن دیواره لیپوزوم‌ها و در نتیجه کاهش اندازه ذرات آن‌ها نسبت به فسفاتیدیل کولین خالص، راندمان درون‌پوشانی کاهش یافته ولی استفاده از پلی اتیلن گلیکول در ساختار لیپوزوم به دلیل افزایش اندازه ذرات، افزایش چشم‌گیری در راندمان درون‌پوشانی ایجاد کرده که با نتایج این تحقیق مطابقت دارد [19].

### 3-5- نتایج بررسی پایداری نانولیپوزوم‌ها از نظر اندازه در طی زمان

بررسی پایداری لیپوزوم‌ها از نظر اندازه ذرات، طی زمان نگهداری برای فرمولاسیون‌های حاوی پلی اتیلن گلیکول و بدون پلی اتیلن گلیکول به ترتیب در شکل‌های 2 و 3 و نتایج تجزیه و تحلیل آماری برای نمونه‌های مختلف نانولیپوزوم فاقد پلی اتیلن گلیکول در شکل 2 آورده شده است. نتایج نشان می‌دهد، طی 70 روز نگهداری، بین نمونه‌های مختلف ناپسین لیپوزومی، ناتامایسین لیپوزومی، مخلوط لیپوزومی و نمونه شاهد اختلاف معنی‌داری وجود ندارد ( $P>0/05$ ). هم‌چنین از نظر مدت زمان نگهداری، نمونه‌های مختلف ناپسین لیپوزومی، ناتامایسین لیپوزومی، مخلوط لیپوزومی و نمونه شاهد بین 0 تا 14 روز نگهداری، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ( $P>0/05$ ), ولی بین نمونه‌های مختلف در زمان‌های 28، 42، 56 و 70 روز اختلاف معنی‌داری وجود داشت ( $P<0/05$ ). در مورد نمونه‌های حاوی پلی اتیلن گلیکول با توجه به شکل 3، نتایج تجزیه و تحلیل آماری نشان داد، طی 70 روز نگهداری، بین نمونه‌های مختلف (ناپسین لیپوزومی، ناتامایسین لیپوزومی، مخلوط لیپوزومی و نمونه شاهد) اختلاف معنی‌داری وجود نداشت ( $P>0/05$ ). هم‌چنین از نظر مدت زمان نگهداری، در نمونه‌های مختلف (ناپسین لیپوزومی، ناتامایسین لیپوزومی،

و این امر موجب کاهش اندازه ذرات می‌شود [15]. در این تحقیق با توجه به ساختار آب‌گریز ناپسین و ناتامایسین اندازه ذرات بایستی کاهش می‌یافت، ولی با قرار گرفتن پلی اتیلن گلیکول در سطح، اندازه ذرات افزایش یافته است.

### 3-3- پتانسیل زتا

با توجه به جدول 2 مقادیر پتانسیل زتا در فرمولاسیون حاوی فسفاتیدیل خالص 29/8- است که با افزودن پلی اتیلن گلیکول، ناپسین و ناتامایسین مقادیر پتانسیل زتا، کاهش یافته است. در تحقیقی که کنورتی و همکاران، انجام دادند به این نتیجه رسیدند که مقدار پلی اتیلن گلیکول استفاده شده و وزن مولکولی آن عامل مهمی در تعیین نیروهای پایدار کننده سیستم می‌باشند. به طوری که هر چه مقدار و وزن مولکولی پلی اتیلن گلیکول بیشتر باشد، دافعه و ممانعت فضایی غالب می‌شود [16]. هم‌چنین با توجه به نتایج این تحقیق، با افزودن ناپسین و ناتامایسین مقادیر پتانسیل زتا منفی نسبت به فرمولاسیون اول یعنی فسفاتیدیل کولین خالص کاهش یافته است. در این خصوص سوبرین-لوپز و همکاران، به این نتیجه رسیدند که ناپسین و ناتامایسین در pH اسیدی دارای بار مثبت می‌باشد. لذا کاهش پتانسیل زتای منفی به دلیل کاهش در بار منفی ذرات است که این امر به دلیل جذب مولکول‌های دارای بار مثبت ناپسین و ناتامایسین، توسط مولکول‌ها با بار منفی موجود در غشا امکان‌پذیر است [17]. افزودن هم‌زمان ناپسین و ناتامایسین، باعث کاهش شدیدتر پتانسیل زتای منفی شده است که به احتمال زیاد، به دلیل اثر هم‌افزایی ناپسین و ناتامایسین بر کاهش بارهای منفی موجود در سطح لیپوزوم‌ها می‌باشد. هم‌چنین در جدول 2 نتایج حاصل از PDI، به‌عنوان معیاری از یکنواختی اندازه ذرات آورده شده است. کلیه فرمولاسیون‌ها دارای مقادیر PDI پایینی هستند. مقادیر پایین PDI ( $PDI<0/35$ ) نشان دهنده هموزن بودن سیستم و مقادیر بالاتر PDI ( $PDI>0/35$ ) نشان دهنده هتروژن بودن سیستم می‌باشد [18]. از این رو می‌توان نتیجه گرفت که سیستم‌های لیپوزومی (فرمولاسیون‌های 1 تا 5) از نظر اندازه ذره‌ای هموزن می‌باشند.

**جدول (1)** نتایج مربوط به اندازه‌گیری اندازه ذرات و شاخص اسپن برای فرمولاسیون‌های مختلف (حروف غیر مشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی‌دار

در سطح 0/05 در آزمون دانکن است)

نمونه	شاخص اسپن	میانگین قطر حجمی (nm) ± انحراف معیار
فسفاتیدل کولین خالص	0/73±0/022 a	76±2/8 a
فسفاتیدل کولین و پلی اتیلن گلیکول	0/78±0/095 a	90±3/3 b
فسفاتیدل کولین و پلی اتیلن گلیکول و نایسین	0/87±0/083 a	86±4 c
فسفاتیدل کولین و پلی اتیلن گلیکول و ناتامایسین	0/86±0/086 a	85±3/8 c
فسفاتیدل کولین و پلی اتیلن گلیکول و مخلوط ناتامایسین و نایسین	0/9±0/051 a	81±2/3 d

**جدول (2)** نتایج مربوط به پتانسیل زتا و PDI برای فرمولاسیون‌های مختلف

نمونه	PDI	پتانسیل زتا
فسفاتیدل کولین خالص	0/227	-29/8
فسفاتیدل کولین و پلی اتیلن گلیکول	0/266	-19/3
فسفاتیدل کولین و پلی اتیلن گلیکول و نایسین	0/253	-14/3
فسفاتیدل کولین و پلی اتیلن گلیکول و ناتامایسین	0/266	-16/1
فسفاتیدل کولین و پلی اتیلن گلیکول و مخلوط ناتامایسین و نایسین	0/253	-12/5

مخلوط لیپوزومی و نمونه شاهد) بین 0، 14، 28 و 42 روز نشده. اندازه نمونه‌ها در طول 42 روز نگهداری کم‌تر از نگهداری، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ( $P>0/05$ ). 400 nm باقی مانده است. از مواردی که موجب افزایش پایداری ولی بین نمونه‌های مختلف در زمان‌های 56 و 70 روز با سایر نمونه‌ها اختلاف معنی‌داری وجود داشت ( $P<0/05$ ). هم‌چنین بین نمونه‌های مختلف نایسین لیپوزومی، ناتامایسین لیپوزومی، مخلوط لیپوزومی و نمونه شاهد که در آن‌ها از پلی اتیلن گلیکول استفاده شده بود، با نمونه‌هایی که در آن‌ها از پلی اتیلن گلیکول استفاده نشده بود، اختلاف معنی‌داری وجود داشت ( $P<0/05$ ). نتایج حاصل از مقایسه فرمولاسیون‌های حاوی پلی اتیلن گلیکول و بدون پلی اتیلن گلیکول با توجه به شکل 4 نشان می‌دهد، به غیر از زمان‌های 0 تا 14 روز در تمامی روزهای نگهداری اختلاف معنی‌داری بین اندازه ذرات وجود دارد ( $P<0/05$ ). با توجه به نتایج به‌دست آمده اندازه ذرات در طی 70 روز نگهداری، به‌خصوص در نمونه‌هایی که در آن‌ها از پلی اتیلن گلیکول استفاده شده، کم‌تر از 400 nm بود، ولی در نمونه‌هایی که در آن‌ها از پلی اتیلن گلیکول استفاده

نشده. اندازه نمونه‌ها در طول 42 روز نگهداری کم‌تر از نگهداری، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد ( $P>0/05$ ). 400 nm باقی مانده است. از مواردی که موجب افزایش پایداری سیستم لیپوزومی می‌شود، می‌توان به موارد زیر اشاره کرد: الف) استفاده از گلیسرول یکی از مواردی است که موجب پایداری سیستم لیپوزومی می‌شود. گلیسرول با خاصیت پخش‌کنندگی، مانع از اتصال و افزایش اندازه ذرات می‌شود [20]. در این تحقیق نیز از مقدار مناسب گلیسرول، 3 v/v% استفاده شده است [6].

ب) میزان پراکندگی اندازه ذرات سیستم لیپوزومی در پایداری سیستم تاثیر دارد. به‌طوری که با افزایش پراکندگی اندازه ذرات، سیستم دچار ناپایداری از نوع رسیدگی اسوالد، انتقال جرم از ذرات کوچک به ذرات بزرگ، می‌شود [21]. با توجه به نتایج به‌دست آمده، همه فرمولاسیون‌ها شاخص اسپن و پراکندگی ذرات باریک‌تر داشتند.

ج) استفاده از روش مظفری جهت تولید نانولیپوزوم‌ها نیز نسبت به سایر روش‌های تولید، نانولیپوزوم‌های پایدارتری در طول

سطح لیپوزوم‌ها جذب و می‌تواند باعث سفتی سطح لیپوزوم‌ها، افزایش پایداری و حفظ ماده درون پوشانی شده برای مدت طولانی در داخل لیپوزوم شود. هم‌چنین پلی اتیلن گلیکول از طریق قسمت آب‌دوست خود به سر آب‌دوست لسیتین متصل شده و زنجیره‌های خود را در محیط اطراف پخش کرده و باعث ایجاد دافعه شده و از اتصال لیپوزوم‌ها جلوگیری می‌کند که این امر موجب افزایش پایداری و ماندگاری طولانی مدت مواد درون پوشانی شده در داخل لیپوزوم‌ها می‌شود. قرارگیری پلی اتیلن گلیکول در قسمت داخلی و خارجی لیپوزوم‌ها نیز باعث منظم شدن چیدمان غشای لیپوزوم شده و از نشت یک باره مواد به بیرون غشا جلوگیری می‌کند [25].

### 3-7- میکروسکوپ الکترونی عبوری، TEM

به منظور بررسی مورفولوژی نانو ذرات و تایید اندازه ذرات، تصویر میکروسکوپ الکترونی از نمونه بهینه، تهیه شد (شکل 6). تصویر وجود وزیکول‌های کروی شکل یونی لاملا<sup>1</sup> با اندازه 180 نانومتر را نشان می‌دهد و نتایج حاصل از اندازه‌گیری ذرات با استفاده از دستگاه سنجش اندازه ذرات را تایید می‌نماید.

### 4- نتیجه گیری

نتایج این پژوهش نشان داد، هر چه غلظت فسفولیپید افزایش یابد، تعداد ذرات و درصد درون پوشانی نیز افزایش می‌یابد و استفاده از لیپید به میزان 1000 mg تاثیر بر افزایش اندازه ذرات ندارد. هم‌چنین با استفاده از روش مظفری و استفاده از پلی اتیلن گلیکول می‌توان نانولیپوزوم‌هایی با اندازه ذرات 100 nm با راندمان درون پوشانی و پایداری فیزیکی بالا تولید کرد.

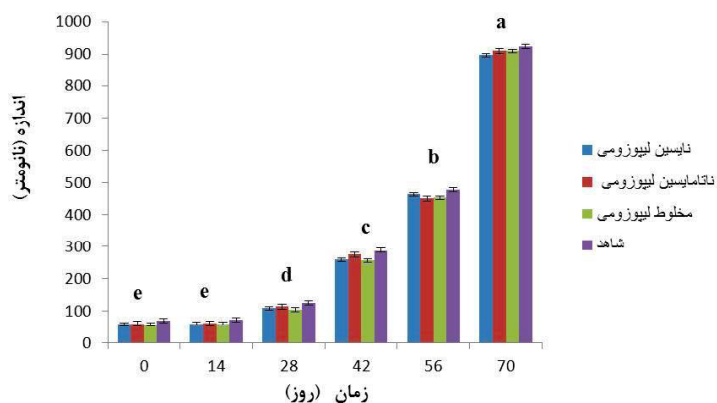
زمان تولید می‌کند. نتایج به دست آمده از پایداری لیپوزوم‌ها با نتایج به دست آمده از تحقیقات راستی و همکاران، مطابقت داشت. در این تحقیق نانولیپوزوم‌های حاوی امگا سه، به دو روش هیدراسیون لایه نازک و مظفری تولید شدند. نتایج نشان داد که پایداری و میزان درون پوشانی ذرات در روش مظفری بیش‌تر از روش هیدراسیون لایه نازک بوده است [22].

### 3-6- بررسی میزان رهایش نانولیپوزوم‌ها طی زمان

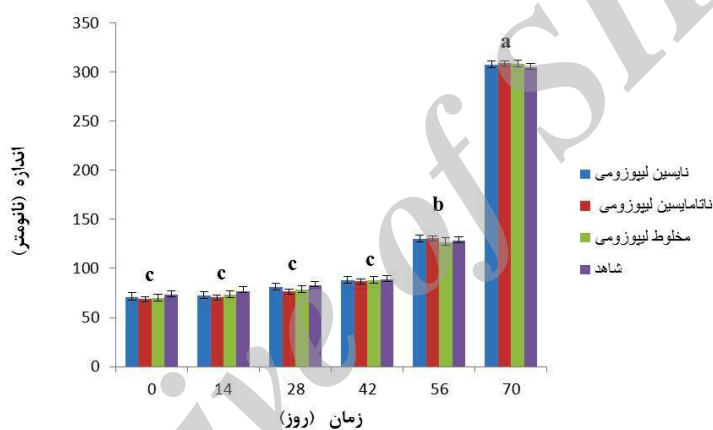
یکی از ویژگی‌های منحصر به فرد لیپوزوم‌ها توانایی در آزادسازی و رهایش کنترل شده مواد در طول زمان می‌باشد که باعث افزایش کارایی ماده درون پوشانی شده می‌شود [23]. درصد درون پوشانی فرمولاسیون‌های مختلف طی زمان در شکل 5 آورده شده است. نتایج حاصل از تجزیه و تحلیل آماری نشان می‌دهد، بین فرمولاسیون‌های مختلف نایسین لیپوزومی، ناتامایسین لیپوزومی و مخلوط لیپوزومی اختلاف معنی‌داری وجود ندارد ( $P > 0/05$ ). هم‌چنین نمونه‌ها در زمان‌های 0 تا 7 روز نگره‌داری، اختلاف معنی‌داری با هم نداشتند ( $P > 0/05$ )، ولی با گذشت زمان از نظر درصد درون پوشانی، طی 14 تا 35 روز نگره‌داری اختلاف معنی‌داری وجود داشت ( $P < 0/05$ ). همان‌طور که مشاهده می‌شود مواد فعال محصور شده در لیپوزوم‌ها به صورت تدریجی و بسیار آهسته در طول حدود 35 روز آزاد شده و وارد محیط می‌شود که این ویژگی منحصر به فرد لیپوزوم‌ها، خصوصیات و کارایی ماده فعال ضد میکروبی را به شدت افزایش داده و هم‌چنین باعث کاهش مصرف مقدار ماده فعال مورد استفاده می‌شود. عوامل مختلفی بر میزان سرعت رهاسازی و نشت مواد از لیپوزوم‌ها تاثیرگذار است. فرمولاسیون لیپید و ترکیب فعال هسته عامل مهمی در کنترل آزاد سازی و نشت مواد محصور شده در لیپوزوم می‌باشد [24]. نایسین و ناتامایسین به علت ساختار آب‌گریز خود با قرارگیری بین غشاء دو لایه‌ای لیپوزوم‌ها باعث افزایش سفتی لیپوزوم‌ها شده که منجر به پایداری و حفظ ماده فعال در داخل لیپوزوم‌ها می‌شود. پلی اتیلن گلیکول موجود در فرمولاسیون، ساختارهای حلقوی ماندنی را تشکیل داده و در

1. ULVS (Unilamellar Vesicles)

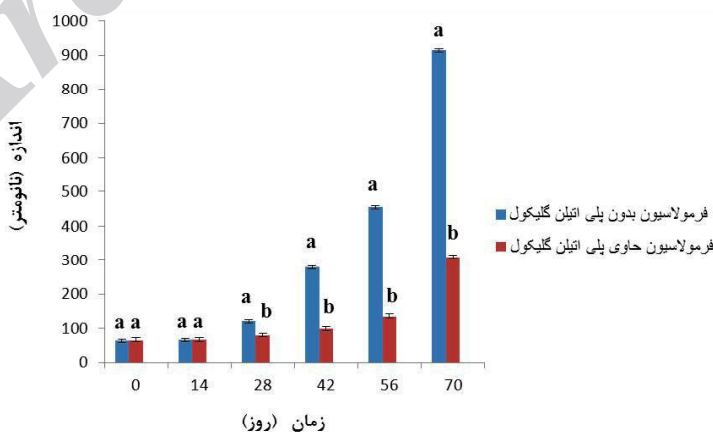




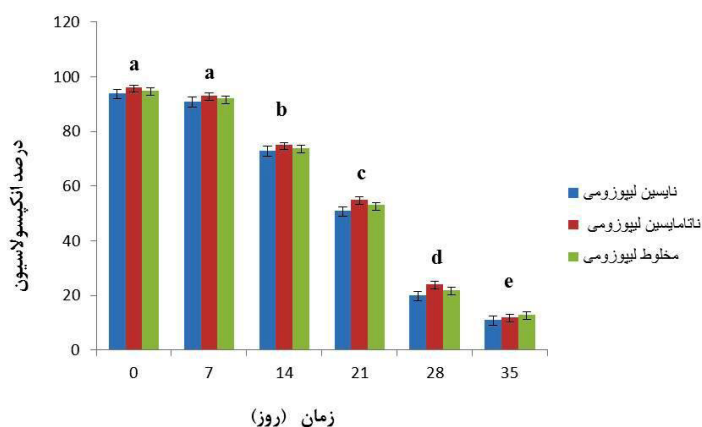
شکل (2) بررسی پایداری نانولیپوزوم‌ها طی زمان نگهداری بدون استفاده از پلی اتیلن گلیکول



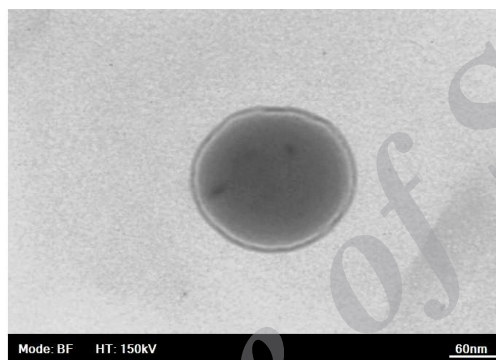
شکل (3) بررسی پایداری نانولیپوزوم‌ها طی زمان نگهداری با استفاده از پلی اتیلن گلیکول



شکل (4) نمودار افزایش اندازه ذرات در طول زمان برای فرمولاسیون‌های حاوی پلی اتیلن گلیکول و بدون پلی اتیلن گلیکول



شکل (5) درصد درون‌پوشانی فرمولاسیون‌های مختلف طی زمان (میزان رهایش)



شکل (6) تصویر میکروسکوپ عبوری نمونه بهینه نانولیپوزوم‌های حاوی نایسین و ناتامایسین تهیه شده به روش مظفری

crobiols in Food. *Food Sci. Technol.*, 145, 273-291.

[5] Phikunthong, K., Varissaporn, M., Warin, C. (2011).

Potential use of niosomes for encapsulation of nisin and EDTA and their antibacterial activity enhancement. *Food Res. Int.*, 44, 605-612.

[6] Mozafari, M., Johnson, C., Demetzos, C. (2008).

Nanoliposomes and their application in food nanotechnology. *Int. J. Liposome. Res.*, 18, 309-327.

[7] Gomez-hens, A., Fernands-Romero, J.M. (2006).

Analytical methods for the control of liposome delivery system. *Trend. Analytical. Chem.*, 25, 167-178.

[8] Rasti, B., Jinap, S., Mozafari, M., Yazid, A.M.

(2012). Comparative study of the oxidative and physical stability of liposomal and nanoliposomal polyun-

## منابع

[1] تیزچنگ، س؛ صوتی خیابانی، م؛ رضایی مکرّم، ر؛

قنبرزاده، ب؛ جوادزاده، ی. (1392) بهینه سازی و بررسی ویژگی‌های فیزیکی لیپوزوم‌های حاوی نایسین. فصلنامه علوم

و فناوری‌های نوین غذایی. سال اول، شماره دوم، ص 59-68.

[2] Chollet, E., Sebti, I., Martial-Gros, A., Degraeve, P.

(2008). Nisin preliminary study as a potential preservative for sliced ripened cheese: NaCl, fat and enzymes influence on nisin concentration and its antimicrobial activity. *Food Cont.*, 19, 982-989.

[3] Jay, J. (1992). Food preservation with chemicals.

*Modern Food Microbiology*, 251-252.

[4] Davidson, P., John, N., Sofos, A.L. (2004). Antimi-

- steric pressure between bilayers containing phospholipids with covalently attached poly (ethylene glycol). *Bioph. J.*, 68, 1921-1936.
- [17] Sobrin-Lopez, A., Matin-belloso, O. (2007). Use of nisin and other bacteriocins for preservation of dairy product. *Agri. Food Chem.*, 53, 8722-8728.
- [18] Colace, J.C., Shi, W., Rao, V.S., Omri, A., Mozafari, M.R., Singh, H. (2007). Microscopical investigations of nisin-loaded nanoliposome prepared by mozafari method and their bacterial targeting. *Micron.*, 38, 841-847.
- [19] Wilkinson, M., Kilcawley, K. (2005). Mechanisms of incorporation and release of enzymes into cheese during ripening. *Int. Dairy. J.*, 15, 817-830.
- [20] خسروی دارانی، ک.؛ مظفری، م.ر. (1390) نانولیپوزوم‌ها، کاربردهای درمانی و صنعتی. انتشارات دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی و درمانی شهید بهشتی.
- [21] Wu, L., Zhang, J., Watanabe, W. (1993). Physical and chemical stability of durg nanoparticle. *Adv. Durg Deliver. Rev.*, 63, 456-469.
- [22] Rasti, B., Jinap, S., Mozafari, M.R., Yazid, A.M. (2012). Comparative study of the oxidative and physical stability of liposome and nanoliposome polyunsaturated fatty acids prepared with conventional and mozafari methods. *Food Chem.*, 34, 2761-2770.
- [23] زایرزاده، ا.؛ مرتضوی، س.ع.؛ جعفری، م.ر.؛ افشارزاد، س.؛ طباطبایی یزدی، ف.؛ نصیری محلاتی، م. (1390) بررسی اثر ضدباکتریایی نایسین به دو فرم آزاد و نانوانکپسوله در لیپوزوم بر ماندگاری و کاهش جمعیت لیستریایی پنیر سفید ایرانی فرآپالایش. نشریه پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران، شماره 3، ص 199-191.
- [24] Brandl, M. (2001). Liposome as durg carriers: A technological approach. *Biotechnology Annual Review*, 7, 59-85.
- [25] Hua, W., Liu, T. (2007). Preparation and properties of highly stable innocuous noisome in span 80/PEG/400/H<sub>2</sub>O system. *Colloid. Surface. A.*, 302, 377-3882.
- saturated fatty acids prepared with conventional and Mozafari method. *Food Chem.*, 135, 2764-2770.
- [9] Mozafari, M., Mortazavi, S. (2005). Liposomes: an overview of manufacturing techniques. *Int. J. Liposome. Res.*, 18, 309-327.
- [10] Marsanasco, M., Márquez, A.L., Wagner, J.R., Alonso, S., Chiaramoni, N.S. (2011). 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.*, 44, 3039-3046.
- [11] Teeranachaideekul, V., Souto, E., Junyaprasert, V., Muller, R. (2007). Cetyl palmitate-base NLC for topical delivery of Coenzym Q10-Development, physico-chemical characterization and in vivo release studies. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 67, 141-148.
- [12] Atouros, D.G., Antimisariar, S.G. (2002). Effect of amphiphilic drugs on the stability and Zeta-potential of their liposome formulation: A study with prednisolone, diazepam, and griseofulvin. *J. Colloid Interface Sci.*, 251, 271-277.
- [13] Watanabe, N., Kamei, S., Ohkubo, A., Yamanaka, M., Ohsawa, S., Makino, S. (1986). Urinary protein as measured with a pyrogallol red-molybdate complex. Manually and in a Hitachi 726 automated analyzer. *Clin. Chem.*, 32, 1551-1554.
- [14] Teixeira, M.L., Silveira, A. (2008). Phospholipid nanovesicles containing a bacteriocin-like substance for control of *Listeria monocytogenes*. *In. Food Sci. Emerging Technol.*, 9, 49-53.
- [15] Mohamed, A.N., Ranjard, L., Catroux, C., Catroux, R., Hartmann, A. (2005). Effect of natamycin on the enumeration, genetic structure and composition of bacterial community isolated from soils and soybean rhizosphere. *J. Micro. Methods.*, 60, 31-40.
- [16] Kenworthy, A.K., Hristova, K., Needham, D., McIntosh, T.J. (1995). Range and magnitude of the