

حامل‌های لیپیدی نانوساختار (NLC) حاوی اسید لینولئیک مزدوج: بهینه‌سازی اندازه ذرات بر اساس روش سطح پاسخ

سودابه فرید آقایی^۱، بابک قنبرزاده*^۲ و حامد همیشه کار^۳

تاریخ دریافت: ۹۴/۳/۴

تاریخ پذیرش: ۹۴/۷/۱۳

^۱ دانش آموخته کارشناسی ارشد، مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد تبریز

^۲ استاد گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی دانشگاه تبریز

^۳ دانشیار مرکز تحقیقات دارویی دانشگاه علوم پزشکی تبریز

*مسئول مکاتبه: Email: babakg1359@yahoo.com

چکیده

یکی از انواع مواد غذا-دارو (نوتریسیستیکال) قابل استفاده برای توسعه غذاهای فراسودمند اسید لینولئیک مزدوج (CLA) است که نسبت به اکسیداسیون حساس می‌باشد. حامل‌های لیپیدی نانوساختار (NLC) با روش هموژنیزاسیون گرم، برای درون پوشانی CLA استفاده گردید. از میان چهار لیپید جامد مختلف (پرسیرول ATO-5، کامپریترول ATO-888، کره کائو و اسید لوریک) استفاده شده در تولید این سیستم‌ها، تنها پرسیرول ATO-5 اندازه ذره‌ای و ساختار مقبولی ایجاد کرد. در مرحله بعد بر اساس روش سطح پاسخ و طرح مرکب مرکزی از غلظت‌های مختلف پرسیرول و سورفاکتانت فاز آبی (پلوکسامر ۴۰۷) و نسبت‌های مختلف لیپید مایع به جامد (اسید لینولئیک مزدوج به پرسیرول) برای تولید نمونه بهینه NLC حاوی CLA استفاده شد. اندازه ذره‌ای و توزیع اندازه ذرات (اسپن) به ترتیب در محدوده ۲۰۴۰-۷۵ نانومتر و ۰/۴۴-۵/۱۶ بودند و مشاهده گردید که با افزایش غلظت لیپید جامد و سورفاکتانت فاز آبی اندازه ذرات به طور چشم گیری افزایش یافت. همچنین افزایش نسبت لیپید مایع به جامد موجب افزایش پایداری اندازه ذرات گردید. فرمولاسیون NLC حاوی ۲٪ (وزنی/حجمی) سورفاکتانت، ۲٪ (وزنی/حجمی) لیپید جامد پرسیرول و نسبت ۵۰٪ اسید لینولئیک مزدوج به لیپید جامد با اندازه ذره‌ای ۹۳ نانومتر به عنوان نمونه بهینه انتخاب شد و این نمونه از نظر اندازه ذرات طی ۴۵ روز نگهداری در دمای ۴ °C پایدار بود.

واژگان کلیدی: اندازه ذرات، اسید لینولئیک مزدوج، حامل‌های لیپیدی نانوساختار

مقدمه

۲۰۰۳، جیمنز و همکاران ۲۰۰۸ و بومن و لاک (۲۰۰۶). تحقیقات انجام شده نشان داده است که اسید لینولئیک مزدوج می‌تواند به عنوان مانعی برای مواد سرطان‌زا-تومورزا در حیوانات و همچنین عامل کاهش دهنده

اسید لینولئیک مزدوج، ایزومر مکانی و هندسی اسید لینولئیک با سیستم پیوند دوگانه مزدوج است که از جمله ترکیبات غذا-دارو می‌باشد (گنادیگ و همکاران

شفافیت می‌گردد. حامل‌های لیپیدی نانوساختار، سیستم‌های تحویلی بر پایه لیپید از جدیدترین سیستم‌ها در بین انواع نانوحامل‌ها می‌باشند (کوشن و همکاران ۲۰۱۲). این ساختارها متشکل از فاز لیپیدی جامد، فاز لیپیدی مایع، عامل فعال سطحی (امولسیفایر) و آب می‌باشند که در آن پوشش لیپیدی جامد، لیپید مایع را در بر می‌گیرد. حامل‌های لیپیدی نانوساختار دارای مزایای متعددی نسبت به سایر حامل‌های لیپیدی هستند که مهمترین آنها عبارتند از: پایداری کلونیدی بالاتر (تفکیک گرانشی کمتر) نسبت به امولسیون‌ها و لیپوزوم‌ها به علت چگالی بالای لیپید (ناشی از جامد بودن بخشی از لیپید)، راندمان انکپسولاسیون بالاتر و نشست کمتر نسبت به نانوذرات لیپیدی (SLN) به علت وجود فاز مایع (آمورف) و در نتیجه کاهش پلی‌مورفیسم و عدم تشکیل ساختار کریستالی کامل، عدم استفاده از حلال‌های آلی برخلاف لیپوزوم‌ها، سرعت رهایش کمتر نسبت به لیپوزوم‌ها و امولسیون‌ها (فنگ و همکاران ۲۰۱۳ و تمجیدی و همکاران ۲۰۱۳). در چند سال اخیر کارهای معدودی بر روی استفاده از NLC برای درون پوشانی مواد غذا-دارو و کاربرد آن در مواد غذایی صورت گرفته است که مهمترین آنها عبارتند از: لوتئین (لیو و همکاران ۲۰۱۰، لاکاتوسو و همکاران ۲۰۱۳)، هسپرتین (فتحی و همکاران ۲۰۱۳)، β -کاروتن (هجری و همکاران ۲۰۱۳، کیان و همکاران ۲۰۱۳)، کوئرسیتین (چن-یو و همکاران ۲۰۱۲، سان و همکاران ۲۰۱۴)، آدیتیا و همکاران (۲۰۱۴)، فنیل اتیل رزورسینول (فان و همکاران ۲۰۱۴) و فرولیک اسید (کاربن و همکاران ۲۰۱۴).

مطابق مطالعات صورت گرفته تا زمان این پژوهش، تاکنون از سیستم NLC برای درون پوشانی CLA به عنوان ماده فعال بدون حضور لیپید مایع حامل استفاده نگردیده است. بنابراین هدف از این پژوهش تولید بهینه نانوحامل‌های لیپیدی حاوی اسید لینولئیک مزدوج با حداقل اندازه ذرات بوده است.

تصلب شرابین، کاهش دهنده تحریک سیستم ایمنی و چربی بدن و نیز بهبود دهنده رشد در موش‌های جوان و افزایش دهنده وزن بدون چربی بدن در حیوانات عمل کند. این اسید چرب می‌تواند سرطان‌های ایجاد شده از طریق مواد شیمیایی در پستان، معده، کولون و پوست را مهار کرده و از رشد و تکثیر گروهی از سلول‌های توموری (سرطان سینه، سرطان کولورکتال، سرطان پروستات، غده بدخیم شش، ملانومالی بدخیم و غده گلیوم^۱) تا ۵۰-۴۰٪ جلوگیری کند (کیرچوسکی ۲۰۰۴).

با این وجود، اسید لینولئیک مزدوج به دلیل دارا بودن پیوندهای دوگانه در ساختار مولکولی خود، پایداری اکسیداتیو پایینی نسبت به اسید لینولئیک، اسید لینولئیک و اسید آراشیدونیک داشته و در مقابل اکسیداسیون حساس می‌باشد (سارلا ۲۰۰۷، لی و همکاران ۲۰۰۹). پایداری اکسیداتیو پایین این ماده می‌تواند موجب افت کیفیت تغذیه‌ای و بد طعمی هنگام استفاده از آن به عنوان افزودنی غذایی باشد. درون پوشانی^۲ (انکپسولاسیون) اسیدهای چرب حساس می‌تواند روش موثر برای رفع این مشکل باشد. درون پوشانی فرایندی است که طی آن، مواد زیست فعال مانند اسید لینولئیک مزدوج درون سیستم دیواره‌ای به دام افتاده و پوشش داده میشوند و در نتیجه ماده هسته‌ای در مقابل شرایط نامساعد محیطی مانند نور و اکسیژن محافظت شده و پایداری اکسیداتیو و ماندگاری آن افزایش می‌یابد (جیمنز و همکاران ۲۰۰۸ و لی و همکاران ۲۰۰۹). نوعی از انکپسولاسیون، نانوانکپسولاسیون^۳ می‌باشد که در آن ذرات در اندازه نانومتری^۴ (کوچکتر از ۱۰۰ نانومتر) تولید می‌شوند. کاهش اندازه ذرات به زیر مقیاس نانومتری، موجب افزایش نسبت سطح به حجم و در نتیجه افزایش دسترسی زیستی، پایداری فیزیکی و

1 - Melanoma

2 - Gliom

3 - Encapsulation

4 - Nanoencapsulation

5 - Nanometer

مواد و روش‌ها

مواد

اسید لینولئیک مزدوج با خلوص نزدیک ۸۰٪ (مخلوطی از ایزومرهای ۹-سیس ۱۱-ترانس و ۱۰-ترانس ۱۲-سیس) (شرکت داروسازی Nutricentury کانادا)، پرسیرول ATO-5 (با ترکیب گلیسرول دی استئارات، تری پالمیتین، تری استئارین)، کامپریتول ATO-888 (با ترکیب گلیسرول دی بهینات، تری بهنن و گلیسرول بهنات) (Gattefosse فرانسه)، اسید لوریک (Merk آلمان)، کره کاکائو (درجه تجاری تهیه شده از شرکت شیرین عسل) و سورفاکتانت غیریونی پلوکسامر ۴۰۷ (با ترکیب پلی اتیلن اکسید و پلی پروپیلن اکسید) (Sigma-Aldrich آلمان) تهیه شدند.

روش تولید و آماده‌سازی

تهیه NLC‌های حاوی اسید لینولئیک مزدوج به روش هموژنیزاسیون گرم انجام شد (ویس و همکاران ۲۰۰۸، منا و همکاران ۲۰۱۳). ابتدا فاز روغنی (شامل لیپید جامد و اسید لینولئیک مزدوج) در مقادیر وزنی مشخص شده در حمام آبی تا ۵ درجه بالاتر از نقطه ذوب چربی (دمای ۸۰°C) حرارت داده شدند. سپس محلول سورفاکتانت فاز آبی (پلوکسامر ۴۰۷) با دمای ۸۰°C، قطره قطره به داخل فاز روغنی حاوی اسید لینولئیک مزدوج با دمای ۸۰°C و تحت هموژنایزر با دور ۲۰۰۰ rpm (Hiedolph ساخت آلمان) افزوده شد. پس از اضافه کردن تمام فاز آبی به فاز لیپیدی دور هموژنایزر به ۲۳۰۰ rpm افزایش یافته و به مدت ۱۵ دقیقه هموژن گردید. به دلیل استفاده از دمای بالا در تهیه فرمولاسیون، لیپید جامد و مایع به صورت قطرات لیپیدی احاطه شده با لایه سورفاکتانت در محیط آبی تولید شده و سپس با خنک شدن سیستم در دمای اتاق و محیط آب و یخ ذرات حاوی لیپید جامد و روغن مایع به شکل کریستال‌های نامنظم لیپیدی تشکیل شد.

در این تحقیق به منظور یافتن فرمولاسیونی مناسب با اندازه ذرات نانومتری، از انواع فاز لیپیدی مختلف با

نسبت‌های متفاوت، نسبت‌های مختلف لیپید مایع به لیپید جامد و غلظت‌های مختلف سورفاکتانت فاز آبی برای ساخت حامل‌های لیپیدی نانو ساختار حاوی اسید لینولئیک مزدوج استفاده شد.

تعیین اندازه و میانگین اندازه ذرات

توزیع اندازه ذرات و قطر متوسط آن‌ها در دستگاه آنالیز اندازه ذرات (با محدوده اندازه ذرات ۵۰ نانومتر تا ۵۰ میکرومتر) (SHIMADZO مدل SALD 2101 ساخت ژاپن) بر اساس روش پراش استاتیک پرتو لیزر (روش SLS) اندازه‌گیری شدند. متوسط اندازه ذرات از طریق فرمول میانگین قطر حجمی و توزیع اندازه ذرات با محاسبه شاخص پراکنش ذرات (span) تعیین شد.

فرمول [۱]:

$$\bar{D}_{[x,y]} = \frac{\sum n_i d_i^x}{\sum n_i d_i^y}$$

$\bar{D}_{[x,y]}$: میانگین قطر حجمی، n_i : تعداد ذرات، d_i : متوسط

قطر ذرات

فرمول [۲]:

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

D (90%): قطری که حجم ذرات کوچکتر از آن، ۹۰٪

حجم کل ذرات سیستم را تشکیل می‌دهد.

D (50%): قطری که حجم ذرات کوچکتر از آن، ۵۰٪

حجم کل ذرات را تشکیل می‌دهد (قطر میانه).

D (10%): قطری که حجم ذرات کوچکتر از آن، ۱۰٪

حجم کل ذرات سیستم را تشکیل می‌دهد (همیشه کار و همکاران ۲۰۰۹).

تعیین لیپید جامد مناسب

در ابتدا برای تعیین لیپید جامد مناسب از چهار لیپید

جامد مختلف پرسیرول ATO 5 (گلیسرول دی

استئارات، تری پالمیتین، تری استئارین)، کامپریتول

پلوکسامر (۲٪ و ۶٪ وزنی/حجمی) و طرح کاملاً تصادفی استفاده شد که در جدول ۱ فرمولاسیون‌های مختلف نشان داده شده است.

ATO 888 (گلیسرین دی بهینات، تری بهین و گلیسرین بهنات)، اسید لوریک و کره کاکائو و غلظت ثابتی (۲٪ وزنی/حجمی) از هر کدام، دو نسبت لیپید مایع (CLA) به جامد (۱۰٪ و ۲۰٪) و دو سطح غلظت از سورفاکتانت

جدول ۱- فرمولاسیون‌های مختلف حامل‌های لیپیدی نانوساختار جهت تعیین لیپید جامد مناسب

شماره فرمولاسیون	فرمولاسیون‌های مختلف حامل‌های لیپیدی نانوساختار
۱	۲٪ پرسیرول + ۲٪ پلوکسامر + ۱۰٪ CLA / لیپید جامد
۲	۲٪ کامپریترویل + ۲٪ پلوکسامر + ۱۰٪ CLA / لیپید جامد
۳	۲٪ کره کاکائو + ۲٪ پلوکسامر + ۱۰٪ CLA / لیپید جامد
۴	۲٪ اسید لوریک + ۲٪ پلوکسامر + ۱۰٪ CLA / لیپید جامد
۵	۲٪ پرسیرول + ۶٪ پلوکسامر + ۱۰٪ CLA / لیپید جامد
۶	۲٪ کامپریترویل + ۶٪ پلوکسامر + ۱۰٪ CLA / لیپید جامد
۷	۲٪ کره کاکائو + ۶٪ پلوکسامر + ۱۰٪ CLA / لیپید جامد
۸	۲٪ اسید لوریک + ۶٪ پلوکسامر + ۱۰٪ CLA / لیپید جامد
۹	۲٪ پرسیرول + ۲٪ پلوکسامر + ۲۰٪ CLA / لیپید جامد
۱۰	۲٪ کامپریترویل + ۲٪ پلوکسامر + ۲۰٪ CLA / لیپید جامد
۱۱	۲٪ کره کاکائو + ۲٪ پلوکسامر + ۲۰٪ CLA / لیپید جامد
۱۲	۲٪ اسید لوریک + ۲٪ پلوکسامر + ۲۰٪ CLA / لیپید جامد
۱۳	۲٪ پرسیرول + ۶٪ پلوکسامر + ۲۰٪ CLA / لیپید جامد
۱۴	۲٪ کامپریترویل + ۶٪ پلوکسامر + ۲۰٪ CLA / لیپید جامد
۱۵	۲٪ کره کاکائو + ۶٪ پلوکسامر + ۲۰٪ CLA / لیپید جامد
۱۶	۲٪ اسید لوریک + ۶٪ پلوکسامر + ۲۰٪ CLA / لیپید جامد

(مقادیر درصدی بر حسب وزنی/حجمی می‌باشد).

پایداری بلند مدت NLC بهینه تولید شده با اندازه‌گیری تغییرات در اندازه ذرات در طی نگهداری در دمای آزمایشگاه (تقریباً ۲۵ ° C) و دمای یخچالی (۴ ° C) به مدت ۴۵ روز بررسی شد (یانگ و همکاران ۲۰۱۲).

آنالیزهای آماری

در این تحقیق از آنالیز آماری طرح مرکب مرکزی و نرم افزار Design Expert (7.1.5) برای آنالیز اندازه ذرات استفاده شد (جدول ۲). پس از انتخاب نمونه‌های بهینه از نظر اندازه سایر آزمون‌ها با سه تکرار بر روی آن‌ها انجام پذیرفت. برای تحلیل داده‌ها از نرم افزار آماری SAS(9.2) و از آنالیز واریانس یک طرفه و آزمون مقایسه میانگین‌های دانکن در سطح ۵٪ استفاده شد.

تعیین فرمولاسیون بهینه بر اساس حداقل اندازه ذرات

پس از تعیین لیپید جامد مناسب، فاز دوم آزمایشها برای رسیدن به نمونه‌هایی با حداقل اندازه و توزیع اندازه ذرات با استفاده از روش سطح پاسخ و طرح آزمایش مرکب مرکزی با سه متغیر و شش بار تکرار نقطه مرکزی صورت گرفت. سطوح مختلف سه متغیر مستقل شامل غلظت امولسیفایر (پلوکسامر)، غلظت لیپید جامد (پرسیرول) و نسبت لیپید مایع به جامد بر متغیر وابسته شامل اندازه و توزیع اندازه ذرات مورد بررسی قرار گرفت.

تعیین پایداری حامل‌های لیپیدی نانوساختار

جدول ۲- متغیرهای مستقل در ۵ سطح برای بهینه‌سازی اندازه ذرات

نوع متغیر	واحد	نماد ریاضی متغیر	سطوح کد بندی شده متغیر				
			-۱/۶۸۲	-۱	۰	+۱	+۱/۶۸۲
غلظت پلوکسامر	(وزنی/حجمی) %	A	۰/۶۴	۲	۴	۶	۷/۳۶
غلظت پرسیرول	(وزنی/حجمی) %	B	۰/۶۴	۲	۴	۶	۷/۳۶
نسبت لیپید مایع/لیپید جامد	%	C	۳/۰۷	۱۵	۳۲/۵	۵۰	۶۱/۹۳

نتایج و بحث

تعیین میانگین اندازه ذرات

تعیین لیپید جامد مناسب بر اساس حداقل اندازه ذرات

برای تعیین لیپید جامد مناسب از چهار لیپید جامد مختلف پرسیرول ATO 5، کامپریترول ATO 888، اسید لوریک و کره کاکائو با غلظت ثابتی (۲٪ وزنی/حجمی) از هر کدام، دو نسبت لیپید مایع (CLA) به جامد (۱۰٪ و ۲۰٪) و دو سطح غلظت از سورفاکتانت پلوکسامر (۲٪ و ۶٪ وزنی/حجمی) استفاده شد (جدول ۳). پرسیرول و کامپریترول بر اساس مطالعات انجام شده پیشین لیپیدهای مناسبی در تولید سیستم‌های نانوحامل لیپیدی با مواد هسته‌ای متفاوت بودند (لیو و وو ۲۰۱۰، فتحی و ورشوساز ۲۰۱۲). هدف از انتخاب اسید لوریک بررسی اثر استفاده از لیپید جامد هموزن (دارای یک نوع اسید چرب) بر روی ساختار و اندازه ذره‌ای این سیستم و همچنین امکان تولید حامل‌های لیپیدی نانو ساختار با استفاده از این لیپید جامد در حضور لیپید مایع و سورفاکتانت مشخص بود. همچنین کره کاکائو به عنوان لیپید جامد هتروژن و تجاری مورد مصرف در صنعت مورد بررسی قرار گرفت تا امکان برقراری پیوند مناسب با لیپید مایع و سورفاکتانت و توانایی ایجاد یک سیستم پایدار بررسی گردد. کره کاکائو در تمام فرمولاسیون‌ها به دلیل عدم ایجاد پیوند مناسب با سورفاکتانت آبی مورد استفاده و رها شدن CLA از سیستم پس از ۲۴ ساعت از زمان تولید، لیپید مناسبی برای تولید NLC حاوی CLA با سورفاکتانت پلوکسامر ۴۰۷ نبود. از سوی دیگر استفاده از اسید لوریک به

عنوان لیپید جامد بلافاصله پس از خنک شدن و کریستالیزاسیون، موجب به هم پیوستن ذرات بلوری و ژله‌ای شدن در فرمولاسیون و ایجاد بافتی ویسکوز و سفت در تمام سیستم شد و در کمتر از یک روز کل فرمولاسیون سفت و یکپارچه شد که نشانگر تجمع ذرات و تشکیل ژل بود که به تشکیل کریستال‌های منظم و فشرده بتا نسبت داده شد. لیپیدهای هموزن (مانند اسیدهای چرب میریستیک، استئاریک، پالمیتیک و لوریک) یا تری‌گلسیریدهای حاوی اسیدهای چرب یکسان معمولاً مستعد تشکیل کریستال‌های کامل به فرم β و صفحه‌ای شکل هستند و لیپیدهای جامد با تنوع اسیدچرب و تری‌گلسیرید بیشتر، به علت تولید بیشتر کریستال‌های α و β نسبت به کریستال‌های β اندازه کوچکتری دارند (زنگ و همکاران ۲۰۱۱). تشکیل کریستال‌های کامل تر و بزرگتر اولاً می‌تواند منجر به ایجاد اندازه بزرگتر ذرات و تجمع کریستال‌ها و ناپایدار شدن سیستم گردد و ثانیاً موجب رانش ماده فعال از ساختار حامل حین فرایند سرمایش شود. بنابراین ترکیب لیپید مورد استفاده، نوع کریستال ایجاد شده را تعیین می‌کند و در نتیجه می‌تواند بر پایداری نانوحامل تولیدی و همچنین رهایش ماده فعال به دام افتاده در ساختار آن موثر باشد. همچنین کامپریترول به دلیل ایجاد ذرات درشت‌تر در مقایسه با پرسیرول و پایداری کمتر اندازه ذرات نسبت به فرمولاسیون‌های تهیه شده با پرسیرول مناسب تشخیص داده نشد. در نتیجه از میان لیپیدهای مورد استفاده، پرسیرول ATO5 به عنوان لیپید مناسب شناخته شد که به صورت مخلوطی از تری استئارین و تری پالمیتین است. کوچکترین

اندازه‌های ذره‌ای به ترتیب در فرمولاسیون‌های شماره ۱ و ۹ به دست آمد که به ترتیب ۷۵ و ۹۸ نانومتر بود.

جدول ۳- فرمولاسیون‌های مختلف حامل‌های لیپیدی نانوساختار جهت تعیین لیپید جامد مناسب با استفاده از طرح کاملاً تصادفی

شماره فرمولاسیون	فرمولاسیون‌های مختلف حامل‌های لیپیدی نانوساختار	میانگین قطر حجمی (نانومتر)	توضیحات
۱	۲٪ پرسیرول + ۲٪ پلوکسامر + ۱۰٪ CLA/لیپید جامد	۷۵	
۲	۲٪ کامپریترول + ۲٪ پلوکسامر + ۱۰٪ CLA/لیپید جامد	۱۲۴	
۳	۲٪ کره کاکائو + ۲٪ پلوکسامر + ۱۰٪ CLA/لیپید جامد	۸۲	پس از ۲۴ ساعت از زمان تولید CLA از سیستم جدا شده و در سطح قرار گرفته بود.
۴	۲٪ اسید لوریک + ۲٪ پلوکسامر + ۱۰٪ CLA/لیپید جامد	-	نمونه در کمتر از ۲۴ ساعت جامد گردید
۵	۲٪ پرسیرول + ۶٪ پلوکسامر + ۱۰٪ CLA/لیپید جامد	۴۳۹	
۶	۲٪ کامپریترول + ۶٪ پلوکسامر + ۱۰٪ CLA/لیپید جامد	۴۵۳	
۷	۲٪ کره کاکائو + ۶٪ پلوکسامر + ۱۰٪ CLA/لیپید جامد	۵۵۲	پس از ۲۴ ساعت از زمان تولید CLA از سیستم جدا شده و در سطح قرار گرفته بود.
۸	۲٪ اسید لوریک + ۶٪ پلوکسامر + ۱۰٪ CLA/لیپید جامد	-	نمونه در کمتر از ۲۴ ساعت جامد گردید
۹	۲٪ پرسیرول + ۲٪ پلوکسامر + ۲۰٪ CLA/لیپید جامد	۹۸	
۱۰	۲٪ کامپریترول + ۲٪ پلوکسامر + ۲۰٪ CLA/لیپید جامد	۶۸۸	
۱۱	۲٪ کره کاکائو + ۲٪ پلوکسامر + ۲۰٪ CLA/لیپید جامد	۹۵	پس از ۲۴ ساعت از زمان تولید CLA از سیستم جدا شده و در سطح قرار گرفته بود.
۱۲	۲٪ اسید لوریک + ۲٪ پلوکسامر + ۲۰٪ CLA/لیپید جامد	-	نمونه در کمتر از ۲۴ ساعت جامد گردید
۱۳	۲٪ پرسیرول + ۶٪ پلوکسامر + ۲۰٪ CLA/لیپید جامد	۵۵۸	
۱۴	۲٪ کامپریترول + ۶٪ پلوکسامر + ۲۰٪ CLA/لیپید جامد	۶۹۵	
۱۵	۲٪ کره کاکائو + ۶٪ پلوکسامر + ۲۰٪ CLA/لیپید جامد	۸۷۰	پس از ۲۴ ساعت از زمان تولید CLA از سیستم جدا شده و در سطح قرار گرفته بود.
۱۶	۲٪ اسید لوریک + ۶٪ پلوکسامر + ۲۰٪ CLA/لیپید جامد	-	نمونه در کمتر از ۲۴ ساعت جامد گردید

آفتابگردان اشباع شده، روغن شلغم روغنی کاملاً هیدروژنه یا روغن شلغم روغنی اشباع شده و مخلوطی

زنگ و همکاران (۲۰۱۱) در تولید NLC حاوی CLA از روغن آفتابگردان کاملاً هیدروژنه شده و یا روغن

دارای کوچکترین اندازه ذرات (۳۱ نانومتر) با توزیع یکنواخت ($PDI = 0.2$) و پایداری فیزیکی بالا بود. لیو و وو (۲۰۱۰) در پژوهش خود بر روی بهینه‌سازی فرمولاسیون NLC حاوی لوتئین با مصرف استاسان به عنوان لیپید مایع و توئین ۸۰ به عنوان سورفاکتانت گزارش نمودند که از میان لیپیدهای جامد مورد استفاده (اسید استئاریک، اسید میریستیک، پالمیتیک و پیرسرول ATO5) تنها پیرسرول قادر به تولید نانو ذرات لیپیدی پایدار گردید. استفاده از سایر لیپیدها، منجر به تولید سیستم دو فازه پس از ۲۴ ساعت نگهداری گردید. سان و همکاران (۲۰۱۴) در تولید حامل‌های لیپیدی نانو ساختار حاوی کوئرستین با استفاده از لیپیدهای گلسیریل تری‌دکونوات، گلسیریل تری پالمیتات، ویتامین E استات و لستین سویا، اندازه ذرات ۳۲ نانومتر با پایداری شیمیایی و فیزیکی مطلوب و رهایش کنترل شده از کوئرستین در طول مدت زمان به دست آوردند. استفاده از ویتامین E استات به جای بخشی از ساختار تری‌گلسیریدی، علاوه بر دارا بودن خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی، موجب بهبود ساختار NLC شد.

تعیین فرمولاسیون بهینه بر اساس حداقل اندازه ذرات

طرح آزمایشی مرکب مرکزی با غلظت‌های مختلف پرسیرول (۲-۶٪ وزنی/حجمی)، پلوکسامر (۲-۶٪ وزنی/حجمی) و نسبت‌های متفاوتی از لیپید مایع (CLA) به لیپید جامد (۱۵-۵۰٪) طراحی گردید. میانگین قطر حجمی و معیار توزیع اندازه ذرات (اسپن) به ترتیب در محدوده ۲۰۴۰-۷۵ نانومتر و ۰/۱۶-۰/۴۴ قرار داشتند (جدول ۴). در جدول ۵ تجزیه واریانس اثر متغیرهای مستقل بر روی اندازه ذرات آورده شده است.

از روغن پالم و پالم استارین به عنوان لیپید جامد و روغن سویا و تری‌گلسیریدهای زنجیر متوسط (۶۰٪ کاپریلیک و کاپریک اسید ۴۰٪) به عنوان لیپید مایع به این نتیجه رسیدند که پالم و تری‌گلسیریدهای زنجیر متوسط کوچکترین سوسپانسیون‌های NLC را ایجاد می‌کنند (با اندازه حدود ۱۵۸ نانومتر). درحالی که فرمولاسیون‌های مشتق شده از روغن سویا و روغن شلغم روغنی هیدروژنه (HRO) بزرگترین اندازه ذرات را داشتند (۲۸۳ نانومتر). برای توضیح این پدیده ترکیب اسیدهای چرب تمامی لیپیدها با کروماتوگرافی گازی تعیین گردید. HRO حاوی ۱/۴۰٪ اسید استئاریک، ۷/۳۷٪ اسید بهینیک، روغن آفتابگردان هیدروژنه (HSF) به طور عمده شامل اسید استاریک و روغن پالم حاوی ۳/۴۵٪ اسید پالمیتیک و ۹/۳۷٪ اسید اولئیک بود. در فرمولاسیون بر پایه HRO به دلیل مقدار زیاد اسید بهینیک ذرات درشت‌تر تولید شد. از سوی دیگر NLC تشکیل شده از پالم به دلیل دارا بودن اسید پالمیتیک و اولئیک در ساختار خود کوچکترین اندازه ذرات را داشت. ارتباط اندازه با این سه چربی جامد به شکل: $NLC > HSF > palm > HRO$ بود. اندازه ذره‌ای کمتر در NLC تهیه شده از پالم، به دلیل تنوع، طول زنجیر کوتاه‌تر و یا عدم اشباعیت اسیدهای چرب موجود در پالم بود. همچنین فتحی و همکاران (۲۰۱۳) در تولید NLC حاوی هسپرتین نشان دادند که از میان سه لیپید جامد استفاده شده گلیسرول مونو استئارات (GMS)، اسید استئاریک و گلیسرول بهنات (کامپریتول ۸۸۸)، نمونه‌های حاوی GMS اندازه ذرات کوچکتر و توزیع اندازه ذره‌ای باریکتری داشتند.

در تحقیقی دیگر لیو و همکاران (۲۰۰۷) استفاده از انواع لیپیدهای جامد شامل کامپریتول، پیرسرول و گلسرین مونواستئارات را جهت تهیه نانوحامل‌های لیپیدی جامد (SLN) حاوی ایزوتریتونوئین بررسی کردند. SLN-های تولید شده با پیرسرول، در مقایسه با سایر لیپیدها

جدول ۴- طرح آزمایش مرکب مرکزی برای بررسی اثر متغیرهای آزمایشی بر اندازه و توزیع اندازه ذرات
(A): غلظت پلوکسامر (% وزنی/حجمی) (B): غلظت پرسیرول (% وزنی/حجمی) (C): نسبت CLA به پرسیرول (%)

span	متغیرهای بدون کد				متغیرهای کد دار		
	میانگین قطر حجمی (نانومتر)	نسبت CLA/لیپید جامد	غلظت پرسیرول	غلظت پلوکسامر	C	B	A
۰/۴۸	۸۰۹	۳۲/۵	۴	۴	۰	۰	۰
۱/۰۲	۱۵۳	۳۲/۵	۴	۰/۶۴	۰	۰	-۱/۶۸
۰/۴۷	۷۹۸	۳۲/۵	۴	۴	۰	۰	۰
۰/۹۴	۳۳۴	۳۲/۵	۰/۶۴	۴	۰	-۱/۶۸	۰
۰/۸۶	۱۲۶۳	۶۱/۹۳	۴	۴	۱/۶۸	۰	۰
۱/۷۸	۷۸۴	۵۰	۶	۲	۱	۱	-۱
۰/۴۴	۷۶۸	۳۲/۵	۴	۴	۰	۰	۰
۱/۲۹	۵۵۴	۱۵	۶	۴	-۱	۱	۰
۰/۴۹	۸۱۵	۳۲/۵	۴	۴	۰	۰	۰
۳/۲۵	۱۸۷	۳/۰۷	۴	۴	-۱/۶۸	۰	۰
۲/۹۲	۵۴۱	۱۵	۲	۶	-۱	-۱	۱
۰/۴۵	۷۲۲	۳۲/۵	۴	۴	۰	۰	۰
۰/۶۷	۹۳	۵۰	۲	۲	۱	-۱	-۱
۵/۱۶	۲۰۴۰	۶۱/۹۳	۶	۶	۱/۶۸	۱	۱
۱/۴۳	۴۵۳	۱۵	۶	۲	-۱	۱	-۱
۱/۵	۱۱۰۰	۵۰	۲	۶	۱	-۱	۱
۰/۴۵	۷۲۸	۳۲/۵	۴	۴	۰	۰	۰
۰/۷۲	۷۵	۱۵	۲	۲	-۱	-۱	-۱
۱/۶۷	۹۲۳	۳۲/۵	۷/۳۶	۴	۰	۱/۶۸	۰
۱/۱۷	۱۳۰۹	۳۲/۵	۴	۷/۳۶	۰	۰	۱/۶۸

(میانگین قطر حجمی ذرات) را نشان داده و پیش بینی کند.

با توجه به مقادیر P و F اثرات خطی غلظت پلوکسامر، غلظت پرسیرول و نسبت CLA به پرسیرول ($P < 0/001$) و اثر درجه دوم غلظت پرسیرول ($P < 0/01$) - معنی- دار می‌باشد. همچنین اثرات متقابل غلظت پلوکسامر در برابر نسبت CLA به پرسیرول و غلظت پرسیرول در برابر نسبت CLA به پرسیرول ($P < 0/001$) معنی دار هستند.

با توجه به جدول ۵ مقادیر معنی‌دار P برای مدل ($P < 0/001$) و مقادیر غیر معنی‌دار برای فقدان برازش ($0/0802$) تأییدی بر تطبیق خوب مدل با داده‌های آزمایشی می‌باشد. همچنین مقدار عددی ضریب تبیین (R^2) برابر $0/99$ و ضریب تبیین تنظیم شده (R^2_{adj}) برای مدل رگرسیونی به دست آمده $0/9719$ بود. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که مدل رگرسیونی توانسته رابطه بین متغیرهای مستقل (غلظت پلوکسامر، غلظت پرسیرول و نسبت CLA به پرسیرول) و متغیر وابسته

جدول ۵- نتایج تجزیه واریانس (ANOVA) بررسی تاثیر متغیرهای مستقل بر اندازه ذرات

ارزش P	ارزش F	میانگین مربعات	درجه آزادی	مجموع مربعات	ضریب رگرسیونی	
***< ./.0001	۱۱۵/۳۰	۴/۷۲۵E+۰۰۵	۹	۴/۲۵۳E+۰۰۶	-۳۸۴/۰۰۴۶۹	مدل
***< ./.0001	۲۹۳/۶۷	۱/۲۰۴E+۰۰۶	۱	۱/۲۰۴E+۰۰۶	۲۰۲/۳۰۹۱۳	A
***< ./.0001	۱۲۶/۱۶	۵/۱۷۰E+۰۰۵	۱	۵/۱۷۰E+۰۰۵	۳۲۵/۷۸۸۴۵	B
***< ./.0001	۲۶۱/۱۶	۱/۰۷۰E+۰۰۶	۱	۱/۰۷۰E+۰۰۶	-۹/۹۰۰۵۵	C
۰/۱۲۰۲	۲/۸۹	۱۱۸۳۰/۶۲	۱	۱۱۸۳۰/۶۲	-۴۵/۷۹۱۳۸	AB
***< ./.0001	۴۴/۵۳	۱/۸۲۵E+۰۰۵	۱	۱/۸۲۵E+۰۰۵	۹/۱۹۱۹۷	AC
***./۰۰۱۰	۲۰/۷۹	۸۵۱۸۴/۸۵	۱	۸۵۱۸۴/۸۵	۵/۷۵۳۰۳	BC
۰/۲۸۲۱	۱/۲۹	۵۲۹۷/۶۱	۱	۵۲۹۷/۶۱	-۱۹/۵۱۸۹۱	A ²
***./۰۰۹۶	۱۰/۱۹	۴۱۷۴۳/۵۹	۱	۴۱۷۴۳/۵۹	-۵۴/۲۳۷۹۲	B ²
۰/۲۴۲۴	۱/۵۴	۶۳۲۷/۱۰	۱	۶۳۲۷/۱۰	-۰/۰۶۴۹۰۵	C ²
۰/۰۸۰۲	۳/۹۲	۶۵۲۹/۵۲	۵	۳۲۶۴۷/۶۲		فقدان برآزش

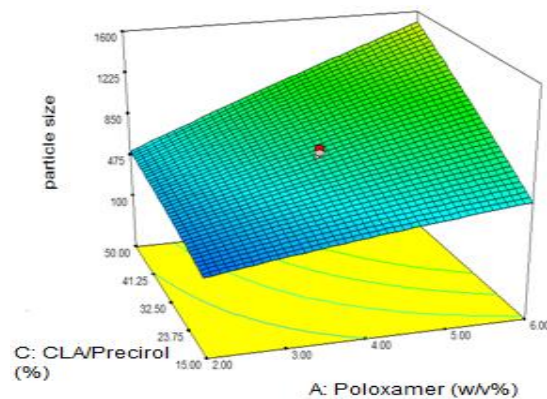
*** نشان دهنده معنی‌داری در سطح احتمال ۰/۰۰۱ است.

بعد از حذف عوامل غیر معنی دار، معادله رگرسیون زیر برای اثر متغیرهای مستقل بر اندازه ذرات به دست آمد.

$$Y = -384 + 202/30 \times A + 325/78 \times B - 9/90 \times C + 9/19 \times AC + 5/75 \times BC - 54/23 \times B^2. \quad \text{فرمول [۳]}$$

گرفتن نسبت لیپید مایع/ لیپید جامد در کمترین مقدار (۱۵٪) با افزایش مقدار سورفاکتانت اندازه ذرات با شیبی بسیار آرام افزایش می‌یابد ولی در بالاترین نسبت لیپید مایع/ لیپید جامد (۵۰٪) با افزایش مقدار سورفاکتانت اندازه ذره‌ای با شیب تندتری افزایش می‌یابد که بیانگر اثر متقابل بین نسبت لیپید مایع/لیپید جامد و غلظت سورفاکتانت است (شکل ۱).

اثر متقابل غلظت سورفاکتانت- نسبت لیپید مایع/لیپید جامد: در شکل ۱ اندازه ذرات به عنوان تابعی از غلظت سورفاکتانت- نسبت لیپید مایع/ لیپید جامد نشان داده شده است. با توجه به شکل مشاهده می‌شود که با کاهش غلظت‌های سورفاکتانت (از ۶٪ به ۲٪ وزنی/حجمی) در هر نسبتی از لیپید مایع / لیپید جامد (در مقادیر مرکزی لیپید جامد یعنی پرسیرول ۴٪) اندازه ذرات بصورت خطی کاهش می‌یابد و این تغییرات در نسبت‌های بالایی از لیپید مایع/لیپید جامد بیشتر به چشم می‌خورد. حداقل اندازه ذرات در حداقل مقدار سورفاکتانت و نسبت لیپید مایع/ لیپید جامد مشاهده می‌گردد. این احتمال وجود دارد که با افزایش غلظت سورفاکتانت، به دلیل پوشش اضافی ذرات کریستالیزه شده با سورفاکتانت افزایش اندازه ذرات و تمایل به آگلومریزاسیون اتفاق بیافتد. در صورت ثابت در نظر



شکل ۱- نمودار سطح پاسخ اثر متقابل غلظت سورفاکتانت پلوکسامر- نسبت لیپید مایع (CLA)/لیپید جامد بر اندازه ذرات در مقدار ثابت پرسیرول (۴٪ وزنی/حجمی)

ذرات موجب تنظیم کریستالیزاسیون شده و از تبدیل بلورهای ریز α و β' به بلورهای درشت بتا (بلورینگی مجدد) طی سرمایش و نگهداری جلوگیری می‌کند. تبدیل شکل کم پایدار α -کریستال به شکل پایدارتر β -کریستال موجب افزایش مساحت سطح نانوذرات می‌گردد که تمایل بیشتری به تجمع دارند. همچنین، پوشاندن سطح ذرات با سورفاکتانت از تجمع ذرات و درشت تر شدن آنها جلوگیری می‌کند که یونی بودن و داشتن ممانعت فضایی بالا در سورفاکتانت، به علت افزایش پتانسیل این اثر را تشدید می‌کند. پلوکسامر ۴۰۷ (سورفاکتانت پلیمری غیریونی هیدروفیل) یک پایدارکننده فضایی (استریک) است که می‌تواند دافعه فضایی مناسب را میان نانوذرات ایجاد کند. در ساختار پلوکسامر، کوپلیمرهای پلی اتیلن اکساید (PEO) و پروپیلن اکساید (PPO) بلوکه شده‌اند. زنجیره‌های هیدروفوبیک PPO در سطح ذره جذب شده و زنجیره هیدروفیل PEO از سطح ذره لیپیدی به سمت محیط آبی کشیده می‌شود و یک لایه پایدارکننده بوجود می‌آورد (گوش و همکاران ۲۰۱۱).

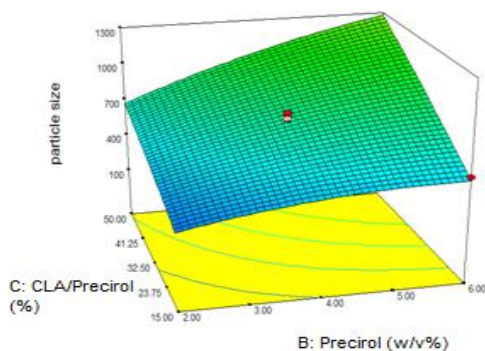
بلوگویی و همکاران (۲۰۱۳) در تحقیقی بر روی فاکتورهای موثر در تولید NLC با استفاده از روش هوموژناسیون داغ، از غلظت (w/v) ۱۰٪ پرسیرول ATO5 و ۱٪ میگیلول ۸۱۲ به عنوان فاز لیپیدی و

نوع و میزان سورفاکتانت تأثیر قابل توجهی در پایداری فیزیکی نانوحامل تولید شده دارد. سورفاکتانت‌ها دو نقش اساسی مجزا را در پایداری NLC بازی میکنند: ۱) تشکیل و پایداری امولسیون اولیه بطوریکه حضور سورفاکتانت مناسب موجب کاهش کشش بین سطحی میان لیپید و آب می‌شود و این امر منجر به افزایش مساحت سطح قطرات لیپید-حلال شده و شکل گیری قطرات کوچکتر می‌گردد. در امولسیون اولیه، سورفاکتانت‌ها بایستی سریعاً قطرات لیپیدی ایجاد شده را پس از خروج از هموژنایزر پایدار کنند تا از هم آمیختگی آن‌ها ممانعت به عمل آید. در سیستم‌های امولسیونی، نوع و غلظت سورفاکتانت مصرفی بر اندازه نهایی قطرات و پایداری دیسپرسیون (با ایجاد نیروهای دافعه کافی که مانع از تجمع و درهم آمیختگی ذرات می‌شود)، موثر است (تروتا و همکاران ۲۰۰۳). قطرات کوچکتر طی سرمایش، تمایل به تشکیل بلورهای ریز α و β' را دارند. با افزایش غلظت سورفاکتانت اندازه ذرات به دلیل کاهش کشش سطحی کاهش می‌یابد تا به پایین ترین حد خود برسد و غلظت‌های سورفاکتانت بیشتر از این حد اندازه ذرات بزرگتری را ایجاد می‌کند (هجری و همکاران ۲۰۱۳) که در این تحقیق به نظر می‌رسد غلظت بهینه سورفاکتانت ۲٪ می‌باشد. ۲) پایداری سنتیکی ذرات NLC: حضور سورفاکتانت مناسب در سطح

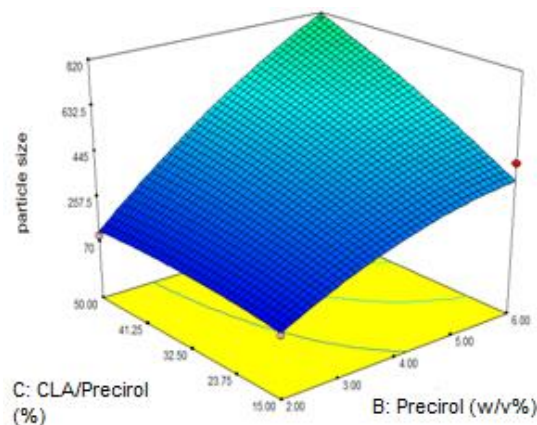
می‌شود. در نتیجه افزایش در اندازه مشاهده شد. اندازه ذره ارزیابی شده با روش DLS با مقادیر بدست آمده از آنالیزهای میکروسکوپی پیوستگی مناسبی نشان داد. **اثر متقابل غلظت پرسیرول - نسبت لیپید مایع (CLA)/لیپید جامد بر اندازه ذرات**

در شکل ۲ اندازه ذرات به عنوان تابعی از غلظت پرسیرول - نسبت لیپید مایع (CLA)/لیپید جامد نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود در غلظت ثابت سورفاکتانت (۴٪ وزنی/حجمی) با کاهش غلظت-های پرسیرول (از ۶٪ به ۲٪ وزنی/حجمی) در هر نسبتی از لیپید مایع (CLA)/لیپید جامد، اندازه ذره‌ای کاهش می‌یابد همچنین با کاهش نسبت لیپید مایع (CLA)/لیپید جامد از ۵۰٪ به ۱۵٪ نیز اندازه ذرات کاهش می‌یابد و این تغییرات در مقادیر بالای پرسیرول و نسبت‌های بالایی از لیپید مایع (CLA)/لیپید جامد بیشتر دیده می‌شود. حداکثر اندازه ذرات در حداکثر مقدار لیپید جامد و نسبت لیپید مایع / لیپید جامد و حداقل اندازه در حداقل مقدار این پارامترها مشاهده می‌شود. از طرفی با کاهش غلظت سورفاکتانت به کمترین مقدار (۲٪ وزنی/حجمی) اندازه ذرات کوچک بوده و تحت تاثیر نسبت لیپید مایع (CLA)/لیپید جامد در مقادیر پایین تا متوسط پرسیرول قرار نمی‌گیرد (شکل ۳).

غلظت (w/v) ۲٪ توپین ۸۰ و ۱٪ پلوکسامر ۱۸۸ به عنوان سورفاکتانت فاز آبی استفاده کردند و اندازه ذرات ۱۵۰ نانومتر با توزیع اندازه ۰/۲ و پتانسیل زتا ۲۰- میلی‌ولت تولید کردند. با جایگزینی ستیل تری متیل آمونیوم بروماید (CTAB) با پلوکسامر ۱۸۸، اندازه ذرات به ۱۸۰ نانومتر افزایش یافت. برخلاف نتایج این تحقیق، لاکاتوسو و همکاران (۲۰۱۲) در تهیه NLC حاوی لوتئین از روغن ماهی به عنوان لیپید مایع استفاده کردند. کاهش در اندازه متوسط NLCها با افزایش محتوای روغن ماهی وجود داشت. (برای مثال از ۳۷۵/۸ نانومتر برای محتوای ۱۰٪ روغن ماهی به ۲۰۶/۶ نانومتر برای ۳۰٪ روغن ماهی و مقدار اولیه بارگذاری لوتئین ۰/۱۲٪). دلیل این افت در اندازه با افزایش روغن ماهی ممکن است مربوط به تفاوت‌ها در ویسکوزیته فاز دیسپرس شده و حلالیت بهتر لوتئین لیپوفیل به درون شبکه لیپیدی باشد. با توجه به اثر غلظت اولیه لوتئین بر روی اندازه ذرات لیپیدی، افزایش در غلظت لوتئین از ۰/۰۴٪ به ۰/۰۸٪ منجر به کاهش در ارزش متوسط Z برای تمام NLCها شد. همچنین مقدار اولیه ۰/۱۲٪ از لوتئین در اندازه متوسط ذرات افزایشی از ۱۶۷ نانومتر به ۲۰۶ نانومتر را نشان داد که می‌تواند مرتبط با کاهش مرحله حلالیت لوتئین باشد. این به این معنی است که هسته لیپیدی نمی‌تواند مقادیر زیادی از لوتئین را در خود جای دهد و در نتیجه منجر به جذب سطحی لوتئین به سطح پوشیده شده با سورفاکتانت



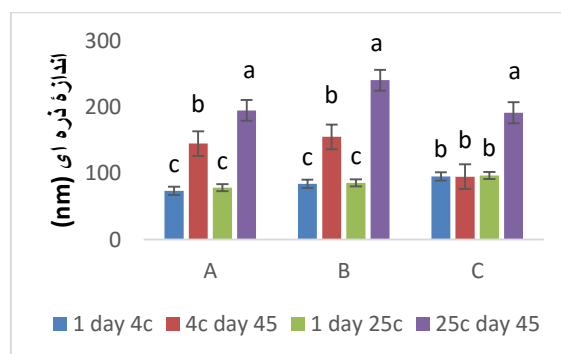
شکل ۲- نمودار سطح پاسخ اثر متقابل غلظت پرسیرول - نسبت لیپید مایع (CLA)/لیپید جامد بر اندازه ذرات در مقدار ثابت پلوکسامر (۴٪ وزنی/حجمی)



شکل ۳- نمودار سطح پاسخ اثر متقابل غلظت پرسیرول - نسبت CLA/لیپید جامد بر اندازه ذرات در مقدار ثابت پلوکسامر ۲٪ وزنی/حجمی

پایداری اندازه ذرات نانوحامل لیپیدی در شکل ۴ پایداری اندازه ذرات NLC بهینه در نسبت-های مختلف لیپید مایع / لیپید جامد شامل ۱۷/۵٪ (A)، ۳۲/۵٪ (B) و ۵۰٪ (C) و در مقادیر ثابت ۲٪ سورفاکتانت و ۲٪ لیپید جامد طی مدت ۴۵ روز در دو دمای محیط (۲۵ °C) و یخچالی (۴ °C) ارائه شده است.

احتمالاً افزایش غلظت لیپید به دلیل بیشتر شدن برهم-کنش بین ذرات، موجب افزایش ویسکوزیته و جامد شدن سیستم و در نتیجه افزایش اندازه ذره‌ای به دلیل برهم کنش‌های بین مولکولی و تجمع ذرات لیپید به دلیل هیدروفوب بودن آن‌ها می‌شود. با توجه به نتایج، فرمولاسیون بهینه به دست آمده از طرح مرکب مرکزی شامل ۲٪ لیپید جامد، ۲٪ پلوکسامر و نسبت لیپید مایع (CLA) به لیپید جامد ۱۷/۵٪ بود.



شکل ۴- پایداری اندازه ذرات NLC سه نمونه بهینه NLC با نسبت‌های ۱۷/۵٪ (A)، ۳۲/۵٪ (B) و ۵۰٪ (C) از لیپید مایع به لیپید جامد در مقادیر ثابت ۲٪ وزنی/حجمی سورفاکتانت و ۲٪ وزنی/حجمی لیپید جامد در دو دمای محیط (۲۵ °C) و یخچالی (۴ °C) و در طی مدت نگهداری ۴۵ روزه (حروف متفاوت نشان دهنده تفاوت معنی داری در سطح ۵٪ آزمون دانکن می باشد) ($P < 0.05$).

در دمای ۲۵ °C و در مدت زمان نگهداری در هر سه نمونه افزایش اندازه نسبت به روز اول معنی‌دار است. همچنین در هر سه نمونه، افزایش اندازه ذرات پس از ۴۵ روز

در دمای ۴ °C در نمونه‌های A و B اختلاف معنی‌داری بین روز اول و روز ۴۵ مشاهده می‌شود ولی در نمونه C تغییر اندازه معنی‌دار نیست. در صورتی که در دمای

متوسط و توزیع اندازه ذره‌ای تغییر چندانی نکرد که نشانگر پایداری فیزیکی خوب ذرات با هر دو سورفاکتانت بود. در تحقیقی که رینگانایات و اکونوگی (۲۰۱۲) بر روی NLC حاوی لیکوپین انجام دادند مشخص شد که اندازه و توزیع اندازه ذره‌ای با سورفاکتانت پلانتوکر ۱۲۰۰ طی ۳۰ روز نگهداری تغییر معنی‌داری نداشت. دلیل این پایداری NLC‌های حاوی پلانتوکر ۱۲۰۰ می‌تواند مربوط به توانایی این سورفاکتانت در ایجاد پتانسیل زتای بالا در سطح ذره باشد که ممکن است حاصل از یون‌های هیدروکسیلی باشد که توسط پلانتوکر ۱۲۰۰ سطح ذرات را پوشانده است.

نتیجه‌گیری

در این تحقیق، حامل‌های لیپیدی نانوساختار (NLC) حاوی اسید لینولئیک مزدوج تولید شد و با استفاده از تغییر سه پارامتر نوع و غلظت لیپید جامد، غلظت امولسیفایر و نسبت لیپید مایع/ جامد ذرت با حداقل اندازه تولید شد. از میان چهار لیپید جامد مورد آزمون، پرسیرول 5 ATO، کامپریترول 888 ATO، اسید لوریک و کره‌کاکائو مصرفی در تهیه NLC تنها پرسیرول 5 ATO از لحاظ اندازه ذرات و پایداری مناسب بود. فرمولاسیون NLC تولید شده به روش هوموژنیزاسیون گرم حاوی ۲٪ (وزنی/حجمی) سورفاکتانت پلوکسامر ۴۰۷، ۲٪ (وزنی/حجمی) لیپید جامد پرسیرول و نسبت ۵۰٪ اسید لینولئیک مزدوج به لیپید جامد پرسیرول به عنوان فرمولاسیون بهینه با اندازه ذره‌ای ۹۳ نانومتر و ضریب پراکنش ۰/۶۷ و پایدار از نظر اندازه ذرات طی ۴۵ روز نگهداری در دمای ۴ °C بود. غلظت لیپید جامد و سورفاکتانت نقش مهمی در اندازه ذرات داشت. به طوری که از نتایج حاصل از طرح مرکب مرکزی مشاهده گردید که با افزایش میزان لیپید جامد و سورفاکتانت افزایش قابل

در دمای ۴ °C کمتر از افزایش آن در دمای ۲۵ °C است. این امر به خصوص در نمونه C بسیار واضح می‌باشد. دمای بالاتر موجب افزایش سرعت و تعداد برخوردها و در نتیجه انبوهش بیشتر ذرات می‌شود. همچنین، دمای بالا ممکن است پیوندهای هیدروژنی سورفاکتانت را شکسته و موجب کاهش پایداری ساختارهای NLC با ناتوانی در ایجاد ممانعت فضایی بین ذرات، تجمع و به هم آمیختگی ذرات و نهایتاً افزایش اندازه ذره‌ای گردد (لیو و همکاران ۲۰۰۷).

همانگونه که مشاهده می‌شود در نمونه C که حاوی ۵۰٪ لیپید مایع (CLA) // لیپید جامد می‌باشد هیچ تغییر معنی‌داری در دمای ۴ °C طی مدت نگهداری وجود ندارد. این امر می‌تواند مربوط به محتوای لیپید مایع بالای این نمونه باشد که منجر به ایجاد بخش آمورفی بیشتر و در نتیجه کریستالیزاسیون مجدد کمتر می‌شود. میزان پایداری اندازه ذرات می‌تواند مربوط به میزان ممانعت فضایی سورفاکتانت (برای سورفاکتانت‌های غیر یونی همانند پلوکسامر ۴۰۷)، میزان دافعه الکترواستاتیک سورفاکتانت (درسورفاکتانت‌های یونی) و میزان پلی مورفیسم در لیپید جامد باشد. از فواید پایداری از طریق ممانعت فضایی (پایداری استریک) می‌توان به عدم حساسیت نسبی به حضور الکترولیت‌ها، کارایی یکسان در محیط آبی و غیر آبی، کارایی یکسان در محتوای مواد جامد بالا و پایین و قابلیت بازگشت انبوهش (فلوکولاسیون) اشاره کرد (مارندوزو و همکاران ۲۰۰۶).

کوواسویک و همکاران (۲۰۱۱) بیان نمودند منو و دی-گلسیریدها و همچنین مخلوطی از آنها، امولسیفیکاسیون را تسهیل کرده و فیلم‌های محکمی از سورفاکتانت در اطراف نانوذرات لیپیدی تشکیل می‌دهند و باعث بهبود و افزایش پایداری فیزیکی نانوحامل کلونیدی می‌گردد. آن‌ها نشان دادند که در نمونه‌های بهینه NLC تولید شده با دو نوع سورفاکتانت پلانتوکر ۸۱۰ و پلی گلسیرول-۶-دی استئارات در طی ۹۰ روز اندازه

توجهی در اندازه ذرات و ضریب پراکنش آن‌ها ایجاد

قدردانی

می‌شود.

بدین وسیله از مرکز تحقیقات کاربردی دارویی و دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی تبریز به دلیل حمایت‌های علمی و فنی در انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌شود.

منابع مورد استفاده

- Aditya NP, Macedo A, Doktorovova S, Souto E, Kim S, Chang, P and Ko, S, 2014. Development and evaluation of lipid nanocarriers for quercetin delivery: a comparative study of solid lipid nanoparticles (SLN), nanostructured lipid carriers (NLC), and lipid nanoemulsions (LNE). *Food Science and Technology*, in Press.
- Beloqui A, Solinís M.A, Delgado A, Évora C, Pozo-Rodríguez AD and Gascón A.R, 2013. Biodistribution of nanostructured lipid carriers (NLCs) after intravenous administration to rats: Influence of technological factors. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 84(2): 309-14.
- Carbone C, Campisi A, Musumeci T, Raciti G, Bonfanti R and Puglisi G, 2014. FA-loaded lipid drug delivery systems: Preparation, characterization and biological studies. *European Journal of Pharmaceutical Sciences* 52: 12–20.
- Chen-yu G, Chun-fen Y, Qi-lu L, Qi T, Yan-wei X, Wei-na L and Guang-xi Z, 2012. Development of a Quercetin-loaded nanostructured lipid carrier formulation for topical delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 430: 292-298.
- Cushen M, Kerry J, Morris M, Cruz-Romero M and Cummins E, 2012. Nanotechnologies in the Food Industry – Recent Developments, Risks and Regulation. *Trends in Food Science & Technology* 24:30-46.
- Ghosh I, Bose S, Vippagunta R and Harmon F, 2011. Nanosuspension for improving the bioavailability of a poorly soluble drug and screening of stabilizing agents to inhibit crystal growth. *International Journal of Pharmaceutics* 409: 260-268.
- Gnädig S, Xue Y, Berdeaux O, Chardigny J.M and Sebedio J-L, 2003. *Functional dairy products*, Woodhead publishing limited, Cambridge England, 263-298.
- Fan H, Liu G, Huang Y, Li Y and Xia Q, 2014. Development of a nanostructured lipid carrier formulation for increasing photo-stability and water solubility of Phenylethyl Resorcinol. *Applied surface science* 288: 193–200.
- Fang C.L, Al-Suwayeh S and Fang J.Y, 2013. Nanostructured lipid carriers (NLCs) for drug delivery and targeting. *Journal of Recent Patents on Nanotechnology* 7(1): 41-55.
- Fathi M and Varshosaz J, 2013. Novel hesperetin loaded nanocarriers for food fortification: production and characterization. *Journal of Functional Foods* 5: 1382-1391.
- Hamishehkar H, Emami J, Rouholamini Najafabadi A, Gilani K, Minaiyan M, Mahdavi H and Nokhodchi A, 2009. The effect of formulation variables on the characteristics of insulin-loaded poly (lactic-co-glycolic acid) microspheres prepared by a single phase oil in oil solvent evaporation method. *Colloids and Surface. B* 74: 340–349.
- Hejri A, Khosravi A, Gharanjig K and Hejazi M, 2013. Optimisation of the Formulation of β -Carotene Loaded Nanostructured Lipid Carriers Prepared by Solvent Diffusion Method. *Food Chemistry* 141: 117-123.
- Jimenez M, Garcia H.S and Beristain C, 2008. Sensory evaluation of dairy products supplemented with microencapsulated conjugated linoleic acid. *Journal of Food Science and Thechnology* 41: 1047–1052.
- Kritchevsky D, 2004. Conjugated linoleic acid. pp: 326-340, Shortt C and O’Brein J (eds), In: *handbook of functional dairy products*, CRC Press, New York.
- Kovacevic A.B, Savica S, Vuletaa G, Müllerb R.H and Keck C.M, 2011. Polyhydroxy surfactants for the formulation of lipid nanoparticles (SLN and NLC): Effects on size, physical stability and particle matrix structure. *International Journal of Pharmaceutics* 406: 163–172.

- Lacatusu I, Badea N, Ovidiu O, Bojin D and Meghea A, 2012. Highly antioxidant carotene-lipid nanocarriers: synthesis and antibacterial activity. *Journal of nanoparticle research* 14: 902-918.
- Lee J.S, Song Y.B, Lee J.Y, Kim M.K, Jun S.J and Lee H.G, 2009. Optimization and oxidative stability of the microencapsulated conjugated linoleic acid. *International Journal of Biological Macromolecules* 45: 348-351.
- Liu C and Wu C, 2010. Optimization of nanostructured lipid carries for lutein delivery. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* 353: 149-156.
- Liu J, Hu W, Chen H, Ni Q, Ni H and Yang H, 2007. Isotretinoin-loaded solid lipid nanoparticles with skin targeting for topical delivery. *International Journal of Pharmaceutics* 328: 191-195.
- Bauman D.E and Lock A.L, 2006. Conjugated linoleic acid: Biosynthesis and nutritional significance, Pp: 93-125, Fox P.F and McSweeney P.L.H (eds), In: *Advanced dairy chemistry*, Springer Science Business Media, New York.
- Marenduzzo D, Finan K and Cook P.R, 2006. The depletion attraction: an underappreciated force driving cellular organization. *Journal of Cell Biology* 175: 681-686.
- Menea A, Vasile B and Meghea A, 2013. Antioxidant and antimicrobial activities of green tea extract loaded into nanostructured lipid carries. *Comptes Rendus Chimie*, In Press.
- Qian CH, Decker E.A, Xiao H and McClements D.J, 2013. Impact of lipid nanoparticle physical state on particle aggregation and β -carotene degradation: Potential limitations of solid lipid nanoparticles. *Food Research International* 52: 342-349.
- Riangjanapatee P and Okonogi S, 2012. Effect of surfactant on lycopene-loaded nanostructured lipid carriers. *Drug discoveries & therapeutics* 6(3): 163-168.
- Saarela, M. (2007). *Functional dairy products (Vol. 2)*. Cambridge, England: CRC Press.
- Sun M, Nie S, Pan X, Zhang R, Fan Z and Wang S, 2014. Quercetin-nanostructured lipid carries: characteristics and anti-breast cancer activities in vitro. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 113: 15-24.
- Tamjidi F, shahedi M, Varshosaz J and Nasirpour A, 2013. Nanostructured lipid carries (NLC): a potential delivery system for bioactive food molecules. *Journal of Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10: 1016-1068.
- Trotta M, Debernardi F and Caputo O, 2003. Preparation of solid lipid nanoparticles by a solvent emulsification-diffusion technique. *International Journal of Pharmaceutics* 257: 153-160.
- Weiss J, Decker E.A, McClements D.J, Kristbergsson K, Helgason T and Awad T, 2008. Solid lipid nanoparticles as delivery systems for bioactive food components. *Food Biophysics* 3: 146-154.
- Yang Y, Marshall-Breton CH, Leser M.E, Sher A.A and McClements D.J, 2012. Fabrication of ultrafine edible emulsions: Comparison of high-energy and low-energy homogenization methods. *Food Hydrocolloid* 29: 398-406.
- Zheng M, Falkeborg M, Zheng Y, Yang T and Xu X, 2011. Formulation and characterization of nanostructured lipid carriers containing a mixed lipids core. *Colloids and Surfaces A: Physicochemistry Engineering Aspects* 430: 76-84.

Conjugated linoleic acid loaded nanostructured lipid carriers (NLC): optimization of particle size by response surface methodology

S Farid Aghae¹, B Ghanbarzadeh ^{2*}and H Hamishekar³

Received: May 25, 2015

Accepted: October 05, 2015

¹MSc, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Azad University of Tabriz, Tabriz, Iran

²Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

³Associate Professor, Pharmaceutics, Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

*Corresponding author: Email: babakg1359@yahoo.com

Abstract

Conjugated linoleic acid (CLA) is a type of nutraceuticals which can be used in functional food development however, it is sensitive to oxidation. Nanostructured lipid carriers (NLC) were used for the encapsulation of conjugated linoleic acid by hot homogenization method. Among four different solid lipids used in the production of this system (precirol ATO-5, Compritol ATO-888, Cacao butter and lauric acid) only precirol was able to produce acceptable particle size and structure. On the next step, on the basis of response surface method and central composite design, various concentrations of precirol and aqueous phase surfactant (poloxamer) and different ratios of liquid to solid lipid (conjugated linoleic acid to precirol) were used to find the optimum sample of CLA bearing NLC. The particle size and particle size distribution (Span) were in the range of 75-2040 nanometer and 0.44-5.16, respectively and it was observed that by increasing the concentrations of solid lipid and aqueous phase surfactant, the particle size increased considerably. Also, increment in liquid to solid lipid ratio enhanced particle size stability. The NLC formulation containing 2% (w/v) surfactant, 2% (w/v) precirol solid lipid and 50% of CLA to solid lipid ratio was chosen as optimum sample by 93 nm particle size and was stable at 4°C during 45 days of preservation.

Keywords: Particle size, Conjugated linoleic acid, Nanostructured lipid carriers