دانشکده کشاورزی

گروه علوم و صنایع غذایی

پایان نامه برای دریافت درجه کارشناسی ارشد در رشته علوم و صنایع غذایی گرایش تکنولوژی مواد غذایی

عنوان

بررسی خواص کلوئیدی و آنتی اکسیدانی نانولیپوزوم های حاوی عصاره گزنه

استاد راهنما:

دکتر یلک قنبرزاده

اساتید مشاور:

دکتر حامد همیشه کار - دکتر جلال دهقان نیا

پژوهشگر:

سارا حق جو

تابستان ۹۳

خدایا...[1]

به من زیستنی عطا کن که در لحظه مرگ، بر بی ثمری لحظه ای که گذشته است، حسرت نخورم و مردنی عطا کن که بر بیهودگیش، سوگوار نباشم. بگذار تا آن را، خود انتخاب کنم، اما آنچنان که تو دوست می داری.

تو می دانی و همه می دانند که شکنجه دیدن بخاطر تو، زندانی کشیدن بخاطر تو و رنج بردن به پای تو تنها لذت بزرگ زندگی من است، از شادی توست که من در دل می خندم، از امید رهایی توست که برق امید در چشمان خسته ام می درخشد و از خوشبختی توست که هوای پاک سعادت را در ریه هایم احساس می کنم. نمی توانم خوب حرف بزنم. نیروی شگفتی را که زیر کلمات ساده و جمله های ضعیف و افتاده، پنهان کرده ام دریاب، دریاب.

تو می دانی و همه می دانند که زندگی از تحمیل لبخندی بر لبان من، از آوردن برق امیدی در نگاه من، از برانگیختن موج شعفی در دل من، عاجز است.

تو چگونه زیستن را به من بیاموز، چگونه مردن را خود خواهم آموخت.

به من توفیق تلاش در شکست، صبر در نومیدی، رفتن بی همراه، جهاد بی سلاح، کار بی پاداش، فداکاری در سکوت، دین بی دنیا، مذهب بی عوام، خدمت بی نان، ایمان بی ریا، خوبی بی نمود، گستاخی بی خامی، قناعت بی غرور، عشق بی هوس، تنهایی در انبوه جمعیت، و دوست داشتن بی آنکه دوست بداند روزی کن.

اگر تنهاترین شوم، باز خدا هست

او جانشین همه نداشتن ها ست...

---

[1]-مناجاتی از دکتر علی شریعتی

فهرست

فصل اول: کلیات

۱-۱- کلیات ۳

۱-۱-۱- نانوتکنولوژی و کاربرد آن در صنایع غذایی ۳

۱-۱-۲- انکپسولاسیون ۵

۱-۱-۲-۱- تعریف و مزایای آن ۵

۱-۱-۳- لیپوزوم‌ها ۶

۱-۱-۳-۱- ساختار شیمیایی لیپوزوم‌ها ۶

۱-۱-۳-۲- نحوه تولید لیپوزوم‌ها ۷

۱-۱-۳-۳- انواع لیپوزوم ۱۰

۱-۱-۳-۳- ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی لیپوزوم‌ها ۱۰

۱-۱-۳-۵- روش‌های تهیه لیپوزوم‌ها ۱۵

۱-۱-۴- گزنه ۱۷

۱-۱-۴-۱- خاصیت آنتی‌اکسیدانی ۱۸

۱-۱-۵- ترکیبات فنولیک ۱۸

۱-۱-۵-۱- مشکلات استفاده از ترکیبات فنولیک در مواد غذایی ۲۳

فصل دوم: مروری بر منابع

۲-۱- مروری بر پژوهش‌های اخیر ۲۴

فصل سوم: مواد و روش‌ها

۳-۱- مواد ۲۸

۳-۲- تجهیزات و لوازم آزمایشگاهی ۲۸

۳-۳- محل انجام پروژه ۲۹

۳-۴- روش‌ها ۲۹

۳-۴-۱-روش استخراج عصاره ۲۹

۳-۴-۲-تولید نانولیپوزوم‌ها ۳۰

۳-۴-۳- آزمون‌ها ۳۱

فهرست

۳-۵- آنالیزهای آماری..... ۳۵

فصل چهارم: نتایج و بحث

۴-۱- اندازه و توزیع اندازه ذرات..... ۳۶

۴-۲- تعیین کارآیی کپسولاسیون..... ۳۹

۴-۳- تعیین خاصیت آنتی‌اکسیدانی..... ۴۱

۴-۴- پتانسیل زتا و تحرک الکتروفورتیک..... ۴۲

۴-۵-اندازه‌گیری کدورت..... ۴۴

۴-۶-بررسی پایداری..... ۴۶

۴-۶-۱- اندازه‌گیری کارآیی کپسولاسیون طی بیست روز نگهداری در یخچال..... ۴۶

۴-۶-۲- بررسی پایداری اندازه ذرات پس از یک ماه نگهداری در یخچال..... ۴۷

فصل پنجم: نتیجه‌گیری و پیشنهادها

۵-۱- نتیجه‌گیری..... ۵۰

۵-۲- پیشنهادها..... ۵۱

فصل ششم: منابع

مراجع..... ۵۲

فهرست

فهرست شکل‌ها

عنوان صفحه

فصل اول

شکل ۱-۱: نمایی شماتیک از ساختار فسفولیپید..... ۷

شکل ۱-۲: نمای شماتیک لیپوزوم..... ۸

شکل ۱-۳: نمایی از انکپسولاسیون ترکیبات آبدوست و چربی‌دوست..... ۹

شکل ۱-۴: مشتقات هیدروکسی بنزوئیک..... ۱۹

شکل ۱-۵: مشتقات هیدروکسی سینامیک..... ۱۹

شکل ۱-۶: ساختار پایه اسکلت فلاوونوئیدی..... ۲۰

شکل ۱-۷: فلاوان-۳-ال..... ۲۱

شکل ۱-۸: فلاوونول..... ۲۱

شکل ۱-۹: فلاوانون..... ۲۱

شکل ۱-۱۰: فلاوون‌ها..... ۲۲

شکل ۱-۱۱: آنتوسیانین..... ۲۲

شکل ۱-۱۲: آنتوسیانیدین..... ۲۳

فصل سوم

شکل ۳-۱: دستگاه سوکسله برای استخراج..... ۳۰

شکل ۳-۲: شمای تولید لیپوزوم به روش هیدراسیون لایه نازک..... ۳۱

شکل ۳-۳: دستگاه اسپکتروفتومتر نور مرئی مدل Ultra spec2000ساخت انگلیس..... ۳۴

شکل ۳-۴: دستگاه زتاسایزر مدل Nano-zsبرای اندازه‌گیری میزان بار سطحی ذرات..... ۳۴

فصل چهارم

شکل ۴-۱: تأثیر غلظت لستین-کلسترول بر اندازه ذرات نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره گزنه..... ۳۶

شکل ۴-۲: تأثیر غلظت لستین-کلسترول بر توزیع اندازه ذرات نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره گزنه..... ۳۹

شکل ۴-۳: منحنی استاندارد جهت تعیین غلظت میزان فنول کل بر حسب میلی‌گرم اسیدگالیک..... ۳۹

شکل ۴-۴: تأثیر غلظت لستین-کلسترول بر کارآیی درون‌پوشانی نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره گزنه..... ۴۰

فهرست

شکل ۴-۵: مقایسه خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آزاد و کپسوله در غلظت‌های مختلف..... ۴۲
شکل ۴-۶: مقادیر کدورت اندازه‌گیری شده برای غلظت‌های مختلف لسیتن-کلسترول..... ۴۵
شکل ۴-۷: پایدار کپسولاسیون نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره گزنه طی بیست روز نگهداری..... ۴۶
شکل ۴-۸: تأثیر زمان نگهداری (۱،۱۵، ۳۰ روز) بر اندازه ذرات در غلظت‌های مختلف لستین به کلسترول ۶۰:۰ (A)، ۵۰:۱۰ (B)، ۴۰:۲۰ (C)، ۳۰:۳۰..... ۴۹

فهرست جداول

عنوان صفحه

فصل چهارم

جدول ۴-۱: تأثیر غلظت لستین-کلسترول بر توزیع اندازه ذرات نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره گزنه..... ۴۳

مقدمه

آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی استخراج‌شده از گیاهان دارویی، جزء مهم‌ترین ترکیبات زیست‌فعال هستند که می‌توانند در تولید مواد غذایی و نوشیدنی‌ها مورد استفاده قرار بگیرند. این ترکیبات بخش مهمی از رژیم غذایی انسانها را تشکیل داده و باعث کاهش خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی عروقی، دیابت، پوکی استخوان و سرطان می‌شوند. امروزه به دلیل عوارض آنتی‌اکسیدان‌های شیمیایی از جمله احتمال سرطان‌زایی و ایجاد آسیب‌های کبدی، تمایل به سمت مصرف آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی افزایش یافته است. ترکیبات پلی‌فنولیک از متابولیت‌های ثانویه گیاهان بوده و یکی از مهم‌ترین ترکیبات آنتی‌اکسیدانی هستند که می‌توانند در تولید مواد غذایی فراسودمند و یا جلوگیری از اکسیداسیون و افزایش ماندگاری مواد غذایی حساس به اکسیژن مورد استفاده قرار بگیرند. این ترکیبات در گیاهان از L-فنیل آلانین مشتق شده و شامل انواع غیرمحلول نظیر تانن‌ها، لیگنین، هیدروسینامیک اسید متصل به دیواره سلولی و یا ترکیبات محلول شامل فنولیک اسید، فنیل پروپانوئید، فلاوونوئید و کینون می-باشند.

گزنه یکی از گیاهان دارویی بومی ایران است که در نواحی آذربایجان‌غربی به وفور یافت می‌شود. گیاهی چندساله با نام علمی *Urtica dioica L.* و از تیره *Urticaceae* بوده، که با کرک‌های گزنده روی ساقه و برگ مشخص می‌گردد. این گیاه دارای خواص درمانی گسترده‌ای از جمله خلط‌آور، مسهل، ادرارآور، بندآورنده‌ی خونریزی و ضدکرم می‌باشد. بعلاوه در درمان بیماری‌هایی نظیر اگزما، رماتیسم، بواسیر، پرکاری تیروئید، آماس نایژه، دیابت و سرطان مؤثر است. درون‌پوشانی، تکنولوژی به دام انداختن مواد جامد، مایع یا گازی در کپسول-هایی که محتویات خود را در سرعت‌های کنترل شده و تحت شرایط ویژه آزاد می‌کنند، می‌باشد که شامل مراحل تشکیل دیواره اطراف ترکیب زیست فعال، اطمینان از عدم نشت این ترکیبات به بیرون و عدم پوشش ترکیبات نامطلوب در کپسول می‌باشد. یکی از انواع حاملهای لیپیدی که برای درون‌پوشانی مواد زیست فعال و غذا–دارو استفاده می شود، لیپوزوم‌ها می‌باشد. لیپوزوم‌ها وزیکول‌های کلوئیدی متشکل از لیپیدهای قطبی به ویژه فسفولیپیدها بوده که در حضور مولکول‌های آب ساختارهای کروی دولایه‌ای را ایجاد می‌کنند. این ترکیبات به دلیل خاصیت آمفی فیلیک توانایی کپسوله کردن طیف وسیعی از ترکیبات آبدوست، چربی‌دوست و آمفی‌فیل را دارند. لیپوزوم‌ها و نانولیپوزوم‌ها اگرچه خصوصیات ساختاری، شیمیایی و ترمودینامیک یکسان دارند اما نانولیپوزوم‌ها در مقایسه با لیپوزوم‌ها، به علت اندازه ذرات کوچکتر، ناحیه سطحی بیشتری را فراهم

می‌کنند و باعث افزایش حلالیت، بهبود قابلیت دسترسی زیستی و رهایش کنترل شده و تحویل دقیق‌تر مواد انکپسوله شده به نواحی هدف می‌شوند همچنین دارای پایداری کلوئیدی بالاتر بوده و کدورت کمتری ایجاد می کنند.

کارآیی ترکیبات فنولیک به فعالیت، پایداری و دسترسی زیستی آن‌ها بستگی دارد. جذب کم ترکیبات فنولیک در روده، ناپایداری طی فرآیند و نگهداری مواد غذایی در برابر عوامل محیطی از قبیل اکسیژن، حرارت، عوامل شیمیایی و بیولوژیک، حلالیت کم در آب و طعم تلخ، کاربرد این ترکیبات را در مواد غذایی محدود کرده است که این مشکلات بطور بالقوه می تواند با درون پوشانی توسط لیپوزوم ها بهبود یابد.

با توجه به اهمیت عصاره های گیاهان دارویی در تولید مواد غذایی فرا سودمند و گسترش محصولات مفید جدید در صنایع غذایی و ضمن اینکه بر اسا کار کتابخانه ای ما، تاکنون پژوهشی در زمینهٔ تولید نانولیپوزوم حاوی عصاره گزنه در ایران صورت نگرفته است، هدف از این پژوهش، تولید نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره گزنه به روش هیدراسیون لایه نازک–سونیکاسیون و بررسی ویژگی‌های کلوئیدی و آنتی‌اکسیدانی آن‌ها می‌باشد.

فصل اول:کلیات

۳-۱-کلیات

۱-۱-۱- نانوتکنولوژی و کاربرد آن در صنایع غذایی

«نانو» معادل کلمه یونانی "dwarf" به معنای کوتوله می‌باشد و اصولاً به اجسامی با اندازه $۱۰^{-۹}$ متر گفته شده و نانوفناوری، به کاربرد و استفاده از این مواد و ذرات (با ابعاد کمتر از ۱۰۰۰ نانومتر) اطلاق می‌شود. اولین جرقه فناوری نانو در سال ۱۹۵۹ توسط ریچارد فاینمن زده شد. وی طی یک سخنرانی، ایده فناوری نانو را مطرح ساخت. واژه فناوری نانو، توسط نوریوتاینگوچی در سال ۱۹۷۴، برای اولین بار بر زبان‌ها جاری شد و در سال ۱۹۸۶، توسط کی‌اریک‌درکسلر در کتابی تحت عنوان «موتور آفرینش: آغاز دوران فناوری نانو» بازآفرینی و تعریف مجدد شد (ژوزف و همکاران، ۲۰۰۶). نانوتکنولوژی[1] جزء فناوری‌هایی است که تحول عظیمی را در صنعت غذا و کشاورزی ایجاد کرده است. نانوفناوری در مهندسی سیستم‌ها و ساختارهای بسیار کوچک تعریف شده و در زمینه‌های مختلف اعم از صنعت غذا کاربرد دارد. کنترل اندازه ذرات در مقیاس نانو ممکن است باعث ایجاد تغییراتی در ویژگی‌های ماکروسکوپی مواد نظیر بافت، طعم، خواص حسی[2]، قابلیت فرآیند و پایداری مواد غذایی شود. یکی از کاربردهای مهم نانوتکنولوژی در صنعت غذا، طراحی و پیشرفت غذاهای عملگرا[3] با حلالیت بالا در آب، پایداری حرارتی، دسترسی زیستی[4]، خواص حسی، قابلیت فرآیند و عملکرد فیزیولوژیک مناسب است. طبق تعریف سازمان بین‌المللی اطلاعات مواد غذایی (IFIC)[5]، غذاهای عملگرا، غذاهایی هستند که دارای فواید سلامت‌بخش می‌باشند. با افزایش نیاز مصرف‌کنندگان به محصولات غذایی جدید و غنی‌سازی با غذاهای عملگرا، میزان فروش این نوع مواد غذایی از سال‌های ۲۰۰۷ تا ۲۰۱۲ با نرخ سالانه، ۵/۷٪ رو به افزایش بوده است. به عنوان مثال، ترکیبات فیتوشیمیایی به عنوان مکمل‌های سلامتی‌بخش، در رژیم غذایی روزانه مورد استفاده هستند، اما بدلیل حلالیت کم آن‌ها، میزان جذب آن‌ها در بدن پایین می-باشد. بنابراین یکی از ضرورت‌های انکپسولاسیون ترکیبات فیتوشیمیایی، افزایش دسترسی زیستی آن‌هاست (هوآنگ و همکاران، ۲۰۱۰).

[1]-Nanotechnology
[2]-Sensory attributes
[3]-Functional food
[4]-Bioavailability
[5]-International food information commission

به طور کلی کاربردهای اصلی نانوتکنولوژی در صنایع غذایی عبارتنداز:

- توسعه مواد با عملکردهای جدید مثل نانوپارتیکل‌ها[۶]، نانوامولسیون‌ها[۷]، نانوکامپوزیت‌ها[۸]، نانولیپوزوم‌ها[۹] و مواد با ساختار نانو؛
- توسعه فرآیندهای در مقیاس نانو و میکرو؛
- توسعه محصولات با هدف تحویل، فرمولاسیون و بسته‌بندی؛
- طراحی روش‌ها و ابزارها برای امنیت مواد غذایی مثل نانوسنسورها (بلاسکو و همکاران، ۲۰۱۱).
- از سه مسیر می‌توان به ذرات در مقیاس نانو دسترسی پیدا کرد:

۱. روش بالا به پایین (تاپ داون)

۲. روش پایین به بالا (باتم آپ)

۳. روش ترکیبی

در نوع اول، ساختارهای نانو از طریق روش‌های مکانیکی و با شکستن توده مواد، تشکیل شده و در نوع دوم که عموماً آن را فناوری مولکولی نیز می‌نامند؛ ساختارها با توجه به توانایی مولکول‌ها در ایجاد پیوند بین یکدیگر ساخته می‌شوند؛ یعنی اتم به اتم و یا مولکول به مولکول تولید می‌گردند. در روش ترکیبی نیز، نانوذرات از ترکیب دو روش فوق تشکیل می‌شوند. مانند شکستن قطرات روغن با روش‌های مکانیکی و سپس پوشاندن آن‌ها با بیوپلیمرها (ران و همکاران، ۲۰۱۰).

[6]-Nanoparticles
[7]-Nanoemulsion
[8]-Nanocamposite
[9]-Nanoliposome

۱-۱-۲-انکپسولاسیون

۱-۱-۲-۱-تعریف و مزایای آن

انکپسولاسیون، تکنولوژی است که از حدود ۶۰ سال پیش توسعه یافته و به عنوان فناوری به دام انداختن مواد جامد، مایع یا گازی در کپسول‌هایی که محتویات خود را در سرعت‌های کنترل شده و تحت شرایط ویژه آزاد می‌کنند، تعریف می‌گردد. ترکیب تحت پوشش یک جزء خالص یا مخلوطی از ترکیبات بوده که به آن هسته[۱۰] می‌گویند. بعلاوه ترکیبات مورد استفاده به عنوان پوشش، دیواره نامیده شده که می‌توانند از جنس قند، صمغ، پروتئین، پلی‌ساکاریدهای طبیعی یا تغییریافته، لیپیدها و پلی‌مرهای سنتتیک باشد. میکروکپسول‌ها، وزیکول‌ها یا ذرات کوچکی در حد میکرون تا چند میلی‌متر هستند. مرفولوژی‌های زیادی در کپسولاسیون مورد استفاده هستند، اما همواره دو مرفولوژی موجود است:

- کپسول‌های تک‌هسته‌ای، که دارای یک هسته و دیواره می‌باشند.
- حالت تجمع یافته، که دارای تعداد زیادی هسته جای گرفته درون یک ماتریکس شبکه‌ای است.

بطور کلی در انکپسولاسیون ترکیبات فعال، سه مرحله وجود دارد: تشکیل دیواره اطراف ترکیب فعال، اطمینان از عدم نشت ترکیبات فعال به بیرون و بألاخره، اطمینان از عدم پوشش ترکیبات نامطلوب در کپسول. روش‌های انکپسولاسیون شامل خشک کردن پاششی، سرد کردن پاششی، اکستروژن[۱۱]، استفاده از بستر سیال، کوآسرواسیون[۱۲]، استفاده از لیپوزوم، تصعید انجمادی[۱۳] و امولسیونه کردن می‌باشند. بطور کلی هدف اصلی انکپسولاسیون، حفظ ترکیبات هسته از شرایط نامناسب محیطی نظیر نور، رطوبت، اکسیژن و در نتیجه افزایش ماندگاری محصول و کنترل آزادسازی ترکیبات انکپسوله می‌باشد (فانگ و هانداری، ۲۰۱۰).

[10]-Core
[11]-Extrusion
[12]-Coacervation
[13]-Lyophilization

اهداف استفاده از کپسولاسیون در صنایع غذایی عبارتنداز:

- حفظ ترکیبات هسته در برابر شرایط نامطلوب محیطی
- کاهش سرعت تبخیر یا انتقال مواد هسته به بیرون
- آزادسازی کنترل شده مواد طی زمان یا در زمان مشخص
- پوشاندن طعم نامطلوب مواد هسته‌ای
- کمک به جداسازی ترکیبات مخلوط که ممکن است با مواد دیگر واکنش دهد.

امروزه ترکیبات مختلف نظیر اسید، ترکیبات طعم‌دهنده، شیرین کننده‌ها، رنگ‌ها، لیپیدها، ویتامین‌ها، آنزیم‌ها و سایر مواد با استفاده از تکنولوژی‌های کپسوله می‌شوند (فانگ و هانداری، ۲۰۱۰).

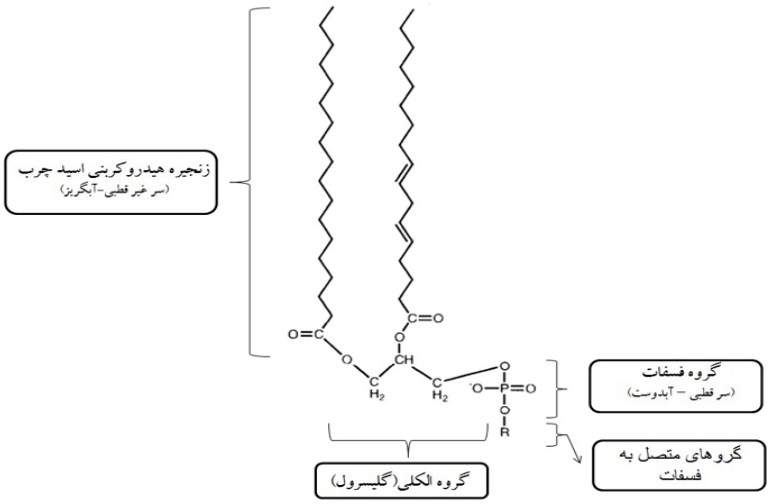
۱-۱-۳-لیپوزوم‌ها

۱-۱-۳-۱-ساختار شیمیایی لیپوزوم‌ها

منظور از لیپوزوم[۱۴]، وزیکول[۱۵]های میکروسکوپی شامل دو لایه فسفولیپیدی است که آب را داخل ساختار خود به دام می‌اندازد. ضخامت این لیپید دولایه بطور معمول بین ۶-۳ میلی‌متر می‌باشد و لیپوزوم‌های تشکیل شده از آن‌ها ممکن است قطری بین ۱۰۰-۱ نانومتر داشته باشند (زاسادزینسکی و همکاران، ۲۰۱۱). لیپوزوم‌ها به علت ساختار آمفی‌پاتیک خود می‌توانند در کپسولاسیون ترکیبات هیدروفیل[۱۶]، هیدروفوب[۱۷] و آمفی‌فیل[۱۸] مورد استفاده قرار بگیرند. ویژگی‌هایی نظیر سمیت پایین و زیست‌تخریب پذیری باعث شده لیپوزوم‌ها به عنوان حامل‌های مناسب در سیستم‌های غذایی مورد استفاده باشند. لیپوزوم‌ها از مولکول‌های آمفی‌پاتیک تشکیل شده که دارای یک سر آبدوست و یک سر آبگریز می‌باشند. ساختار فسفولیپیدها متشکل از یک گروه الکلی (گلیسرول یا اسفنگوزین)، دو مولکول اسید چرب، گروه فسفات و گروه‌های متصل به آن می‌باشد.وزیکول‌های

[14]-liposome
[15]-vesicle
[16]-hydrophyle
[17]-hydrophobe
[18]-amphipatic

فسفولیپیدی یا لیپوزوم‌ها از اجتماع فسفولیپیدها در محیط آبی به وجود می‌آیند. البته در اکثر موارد، کلسترول[19] نیز جهت حفظ سیالیت غشا مورد استفاده قرار می‌گیرد (کربی و همکاران، ۱۹۸۰).



شکل۱-۱: نمایی شماتیک از ساختار فسفولیپیدها

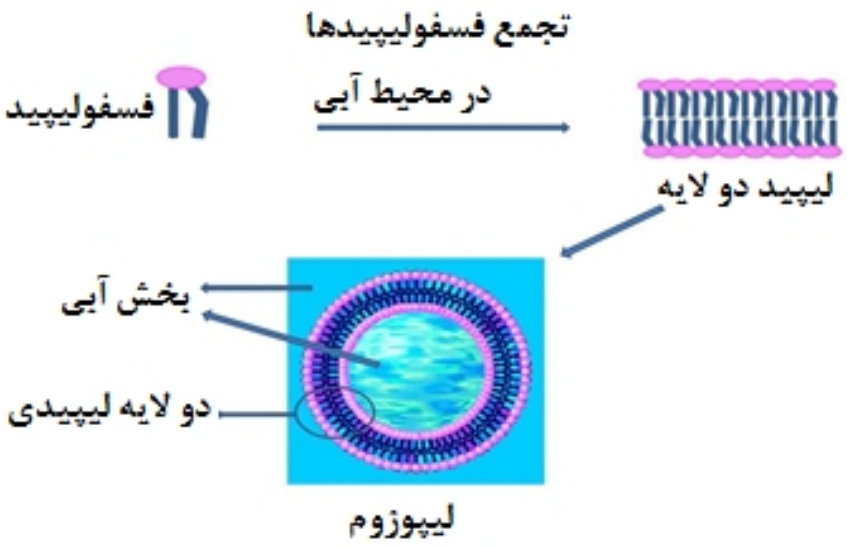
۱-۱-۳-۲- تولید لیپوزوم

زمانی که مولکول‌های آمفی‌پاتیک نظیر فسفولیپیدها در یک محیط آبی قرار می‌گیرند، ساختارهای دو لایه‌ای را ایجاد می‌کنند که در آن، قسمت‌های غیرقطبی دور از دسترس آب بوده ولی قسمت‌های قطبی در تماس با مولکول‌های آب هستند. طی این فرآیند، لیپوزوم‌ها می‌توانند ترکیبات آبدوست موجود در محیط آبی را به دام بیندازند. مولکول‌های لیپوفیل نظیر ویتامین‌ها، ترکیبات مغذی و داروها را می‌توان از طریق حل کردن آن‌ها با لیپیدها در ساختار لیپوزوم کپسوله کرد. راه دیگر این است که ابتدا این ترکیبات را با سیکلودکسترین‌ها[20] کمپلکس کرده و سپس در محیط آبی لیپوزوم، انکپسوله نمود. هم اکنون امکان مهندسی طیف گسترده‌ای ازاندازه،ترکیب فسفولیپیدی و ویژگیهای سطحی لیپوزوم‌ها وجوددارد. سطح لیپوزوم‌ها را میتوان با انتخاب لیپیدهای دولایه وهمچنین با تلفیق و پیوند کووالانسی با پروتئینها (همچون آنتی‌بادی و پروتئینهای متصل به قندها مانند لکتین) وگلیکوپروتئینها و پروتئینهای سنتزی اصلاح نمود (جونز، ۱۹۹۵). بطور کلی در سیستم‌های انتقال لیپوزومی، دو هدف مهم مورد توجه است. یکی سنتز لیپوزوم‌های مورد نظر و دیگری بارگیری مناسب و

[19]-cholesterol
[20]-cyclodextrins

بالای ترکیب فعال در ساختار لیپوزوم‌ها. روش‌های بسیار متنوعی در تولید لیپوزوم‌ها ابداع شده، اما تعدادی معدودی از آن‌ها قادر به دام انداختن مقادیر زیاد ترکیبات آبدوست هستند. بهترین روش تولید لیپوزوم، روشی است که از یک طرف، ذراتی با اندازه مد نظر تولید کند و از طرف دیگر، راندمان بارگیری مناسبی داشته باشد. انتخاب صحیح روش تولید لیپوزوم به پارامترهای زیر وابسته است:

- ویژگی‌های شیمیایی ترکیبات کپسوله و اجزای مورد استفاده در تهیه لیپوزوم؛
- ماهیت محیطی که وزیکول‌های لیپیدی در آن پراکنده شده‌اند؛
- غلظت مؤثر مواد به دام افتاده و سمیت بالقوه آن‌ها؛
- اندازه ذرات و پراکندگی آن‌ها و مدت ماندگاری بهینه وزیکول‌ها.



شکل۱-۲: نمای شماتیک لیپوزوم

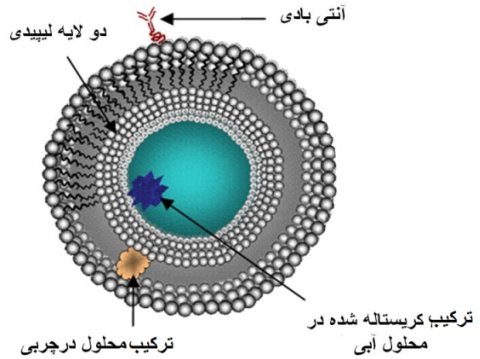
دو روش کلی در تهیه لیپوزوم‌ها بر پایه بارگیری وجود دارد:

۱. تکنیک‌های بارگیری غیر فعال:

در این شیوه، به دام انداختن ترکیب فعال قبل از تولید و یا حین تولید لیپوزوم‌ها انجام می‌گیرد. در این تکنیک، ترکیبات آبدوست در محیط آبی درون لیپوزوم انکپسوله شده، در حالی که ترکیبات آبگریز بین دو لایه فسفولیپیدی محصور می‌شوند. هنگامی که ترکیبات آبدوست در لیپوزوم محصور شوند، تغییری در خصوصیات فیزیکی لیپوزوم ایجاد نمی‌کنند و تأثیر متقابلی بین ترکیب فعال و لیپوزوم وجود ندارد. ولی هنگامی که ترکیبات چربی‌دوست در غشای لیپوزوم قرار می‌گیرند، تغییرات قابل ملاحظه‌ای در خواص فیزیکی وزیکول‌ها، نظیر دمای تغییر فاز (T_c)[۲۱] ایجاد می‌شود.

۲. تکنیک‌های بارگیری فعال:

این تکنیک به نوع خاصی از ترکیبات با گروه‌های یونیزه شونده و یا ترکیبات آمفی‌پاتیک مربوط است که پس از تشکیل لیپوزوم، می‌توانند به داخل ساختار آن نفوذ کنند. باید توجه داشت که در تکنیک بارگیری غیرفعال، ترکیبات فعال، قبل یا حین تشکیل لیپوزوم‌ها درون آن‌ها به دام می‌افتند و پس از تشکیل، قابلیت نفوذ به ساختار لیپوزومی را ندارند. بنابراین تکنیک‌های بارگیری فعال، منحصر به ترکیبات خاصی هستند (ماهرانی و همکاران، ۲۰۱۱).



شکل۱-۳: نمایی از انکپسولاسیون ترکیبات آبدوست و چربی‌دوست

[21]-phase transition temperature

۱-۱-۳-۳- انواع لیپوزوم‌ها

طبقه‌بندی لیپوزوم‌ها بر اساس تک‌لایه یا چندلایه بودن و اندازه ذرات صورت می‌گیرد که شامل موارد زیر می-باشند:

- وزیکول‌های یونی لاملار[۲۲] که دارای پوسته غشایی دولایه‌ای بوده و به انواع بزرگ و کوچک تقسیم می-شوند؛
- وزیکول‌های مولتی لاملار[۲۳] دارای غشاهای چندلایه‌ای متعدد در یک ساختار هم‌مرکز می‌باشند؛
- وزیکول‌های مولتی وزیکولار[۲۴] در قسمت داخلی خود دارای وزیکول‌های دیگری هم هستند (کلر و همکاران، ۲۰۰۱).

نانولیپوزوم‌ها از انواع لیپوزوم‌ها در مقیاس نانو و یکی از سیستم‌های انکپسولاسیون و رهایش کنترل شده مواد هستند. لیپوزوم‌ها و نانولیپوزوم‌ها خصوصیات ساختاری، شیمیایی و ترمودینامیک یکسان دارند. در مقایسه با لیپوزوم‌ها، نانولیپوزوم‌ها ناحیه سطحی بیشتری را فراهم می‌کنند و باعث افزایش حلالیت، تقویت قابلیت دسترسی زیستی، بهبود رهایش کنترل شده و تحویل دقیق‌تر مواد انکپسوله شده به نواحی هدف می‌شوند (مظفری و همکاران، ۲۰۰۵).

۱-۱-۳-۴- ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی لیپوزوم‌ها

- **درجه حرارت انتقال فاز (T_c)**: تشکیل لیپوزوم‌ها به فاکتورهای داخلی و خارجی متعددی وابسته است که شامل طول زنجیر اجزای فسفولیپیدی، pH و دمای انتقال فاز می‌باشد. یکی از ویژگی‌های مهم مولکول‌های آمفی‌پاتیک نظیر فسفولیپیدها این است که در دماهای کمتر از نقطه ذوب، وارد تغییر فاز ترموتروپیک[۲۵] می-شوند. این دما که دمای انتقال از حالت ژلی به کریستال مایع نیز گفته می‌شود، دمایی است که در آن، نظم

[22]-Unilamellar
[23]-Multilamellar
[24]-Multivesicular
[25]-thermotropic

لایه‌های لیپیدی کاهش یافته، در حالی که سیالیت آن‌ها افزایش می‌یابد. دمای انتقال فاز فسفولیپیدها به عوامل زیر وابسته است:

- سر قطبی مولکول
- طول زنجیره آسیل
- درجه اشباع زنجیره‌های هیدروکربنی
- ماهیت و قدرت یونی محیط سوسپانسیون

بطور کلی T_c، با کاهش طول زنجیر و افزایش درجه غیر اشباعیت و حضور شاخه‌های جانبی، کاهش می‌یابد. درک انتقال فاز و سیالیت غشاهای فسفولیپیدی جهت تولید و بهره‌برداری از لیپوزوم‌ها ضروری است. دلیل این امر این است که رفتار فازی لیپوزوم‌ها و نانولیپوزوم‌ها، ویژگی‌های مهمی نظیر قابلیت نفوذ، تجمع و تغییر شکل آن‌ها را تعیین می‌کند که تمامی این فاکتورها می‌توانند پایداری وزیکول‌های لیپیدی و رفتار آن‌ها را در سیستم-های بیولوژیک تحت تأثیر قرار دهند. لیپوزوم‌های تشکیل یافته از فسفولیپیدهای خالص در زیر دمای انتقال فاز فسفولیپید تشکیل نمی‌شوند. این مسئله با افزودن کلسترول تا حدودی کاهش یافته اما بطور کلی حذف نمی-شود (مظفری و همکاران، ۲۰۰۸).

- **بار سطحی:** بار سطحی لیپوزوم‌ها می‌تواند متفاوت باشد. بطوری که ممکن است لیپوزوم‌ها خنثی (فسفاتیدیل کولین، فسفاتیدیل اتانول آمین)، دارای بار منفی (فسفولیپیدهای اسیدی مثل فسفاتیدیل سرین، فسفاتیدیل گلیسرول، فسفاتیدیک اسید یا دی استیل فسفات) یا مثبت (لیپیدهایی نظیر دی اولئیل تری متیل آمونیوم پروپان یا استئاریل آمین) باشند. بار لیپوزوم‌ها یک ویژگی مهم است که پایداری و کارایی انکپسولاسیون آن‌ها را تعیین می‌کند. جذب الکترواستاتیک بین ترکیبات فعال و لیپوزوم‌ها راهکاری جهت افزایش کارایی انکپسولاسیون است (ماهرانی و همکاران، ۲۰۱۱).

- **پتانسیل زتا**[۲۶]: پتانسیل زتا تابعی از بار سطحی وزیکول‌های لیپیدی، لایه‌های جذب شده سطحی، ماهیت و ساختار محیطی است که لیپوزوم‌ها در آن پراکنده شده‌اند. پتانسیل زتا بطور مستقیم قابل اندازه‌گیری نبوده اما از طریق مدل‌های تئوریکی و تحرک الکتروفورتیک[۲۷] قابل تعیین است. هر چه پتانسیل زتا بیشتر باشد، سوسپانسیون لیپوزومی پایدارتر خواهد بود. زیرا وزیکول‌های باردار همدیگر را دفع کرده و بر تمایل طبیعی ذرات نسبت کلوخه شدن غالب می‌شوند. بعلاوه بار سطحی لیپوزوم‌ها می‌تواند زمان سیرکولاسیون آن‌ها را در خون تحت تأثیر قرار دهد. مقادیر پتانسیل زتا تحت تأثیر ساختار لیپیدی لیپوزوم‌ها می‌باشد (مظفری و همکاران، ۲۰۰۸).
- **سیالیت**[۲۸]: سیالیت لایه‌های لیپوزومی ناشی از تحرک و نظم زنجیره‌های آلکیل فسفولیپیدها در آن است. حضور کلسترول در ساختار غشا، بر هم کنش‌های وان دروالسی بین زنجیره‌های اسیدچرب را تضعیف کرده و بنابراین از کریستالیزاسیون لیپوزوم جلوگیری می‌کند. محققین نشان دادند که بکارگیری برخی از لیپیدهای سیال در لایه‌های لیپوزوم می‌تواند از طریق کاهش دمای انتقال فاز و افزایش سیالیت، در عملکرد حامل دخالت داشته باشد. آزاد شدن ترکیب کپسوله به تعداد لایه‌ها، قابلیت نفوذ و سیالیت لیپوزوم‌ها بستگی دارد (محمد و همکاران، ۲۰۰۴).
- **تعیین لاملاریته**[۲۹]: یکی از مهم‌ترین ویژگی‌های وزیکول‌های لیپیدی، تعیین لاملاریته و سایز آن‌هاست. منظور از لاملاریته، تعداد لایه‌های لیپیدی اطراف فضای آبی داخل وزیکول‌هاست. مشاهده میکروسکوپی مستقیم، اطلاعاتی در مورد سایز، هموژن بودن نمونه و تعداد لایه‌های آن بدست می‌دهد (ماهرانی و همکاران، ۲۰۱۱).
- **کارآیی یا راندمان کپسولاسیون**[۳۰]: ترکیبات زیست فعال بسته به ویژگی‌های خاص خود نظیر حلالیت و قطبیت به صورت‌های مختلف می‌توانند با لیپوزوم‌ها بر هم‌کنش دهند. بطوری که ممکن است در فاز آبی یا لیپیدی کپسوله شده و یا جذب قسمت سطحی لیپوزوم گردند. دانستن ویژگی‌های لیپوزوم جهت بهبود فرمولاسیون با کارایی کپسولاسیون مناسب، ضروری است. ساختار لیپوزوم و روش تهیه آن کارآیی

[26]-Zeta potential
[27]-Electrophoretic mobility
[28]-Fluidity
[29]-Lamellarity
[30]-Encapsulation efficiency

انکپسولاسیون را تحت تأثیر قرار می‌دهد. افزودن کلسترول بطور معنی‌داری این کارآیی را تغییر می‌دهد. کارایی انکپسولاسیون لیپوزوم‌ها به سفتی غشای لایه‌ای آن وابسته است. لاریدی و همکاران طی تحقیقات خود بدین نتیجه رسیدند که این پارامتر با افزایش سفتی لیپوزوم‌ها افزایش و با افزودن ترکیبات روان‌کننده نظیر کلسترول، کاهش می‌یابد. در اکثر روش‌های آزمایشگاهی جهت تعیین کارآیی انکپسولاسیون نیاز است قبل از تعیین مواد کپسوله به روش آنالیز، ترکیبات فعال آزاد از انواع کپسوله جدا شوند که این کار توسط روش‌هایی نظیر کروماتوگرافی ستونی[۳۱]، کروماتوگرافی غربال مولکولی[۳۲] و اولتراسانتریفوژ[۳۳] صورت می-گیرد (ویس و همکاران، ۲۰۰۹).

- **پایداری لیپوزوم‌ها**[۳۴]: پایداری لیپوزوم‌ها یکی از مهم‌ترین فاکتورها در کاربرد لیپوزوم بوده و به فاکتورهایی نظیر اندازه و پایداری شیمیایی بستگی دارد. پایداری لیپوزوم‌ها شامل پایداری فیزیکی، شیمیایی، کلوئیدی و بیولوژیک می‌باشد. پایداری فیزیکی به خمش طبیعی مخلوط لیپیدها و سفتی لایه‌های لیپیدی وابسته است. غشاهای سفت‌تر (نقطه ذوب بالاتر) با خمش‌های نزدیک به حالت طبیعی، در برابر شرایط نامطلوب مثل افزایش دما، برش، ویبراسیون[۳۵] و چرخه‌های انجاد–ذوب پایدارتر هستند. پایداری شیمیایی نیز اشاره به توانایی لیپوزوم‌ها جهت حفظ کارایی انکپسولاسیون طی تغییرات در شیمی محلول نظیر تغییر در pH، ساختار الکترولیت، عوامل اکسیدکننده و حضور ترکیبات فعال سطحی (سورفاکتانت، کلسترول و نمک‌های صفراوی) دارد. منظور از پایداری کلوئیدی، ثابت ماندن سایز تحت شرایط مختلف نگهداری است. تجزیه شیمیایی، پایداری فیزیکی و بیوشیمیایی لیپوزوم‌ها را کاهش می‌دهد. کاهش پایداری فیزیکی بعلت کلوخه-ای شدن[۳۶] یا نشت ترکیب از ساختار لیپوزوم، باعث کاهش کاربرد لیپوزوم شده است. واکنش‌های شیمیایی اصلی شامل هیدرولیز باندهای آسیل‌استر و آسیب اکسیداتیو زنجیره‌های آسیل غیراشباع، کلسترول و گروه-های آمین اولیه می‌باشد. در مورد پایداری فیزیکی، مهم‌ترین پارامترها در کنترل کیفیت و ویژگی‌های

[31]-Column chromatography
[32]-Size exclusion
[33]-Ultracentrifugation
[34]-Liposome stability
[35]-Vibration
[36]-Aggregation