

طراحی فرمولاسیون، ساخت و مشخصه یابی حامل دارویی نانوکامپوزیت پلی

ساکاریدی حاوی کارکامین

مهديه چگنی^{۱*}، شبنم جهانی زاده^۲

^۱شیمی آلی، دانشگاه آیت الله بروجردی، بروجرد، ایران

^۲شیمی کاربردی، باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد اراک، ایران

تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۳/۲۱

تاریخ تصحیح: ۹۸/۰۳/۰۹

تاریخ دریافت: ۹۷/۱۲/۰۹

چکیده

در این پژوهش با هدف بهبود بازده بارگذاری و اندازه ذرات، نانوکامپوزیت کیتوزان-مونت موریلونیت (CS-MMT)، به وسیله روش ژل سازی یونی جهت کنترل رهایش کارکامین تهیه گردید. فرمول بندی های مختلف و متغیرهای متفاوت فرایند (غلظت پلی ساکارید، درصد مونت موریلونیت، غلظت سورفکتانت، مقدار دارو و مدت زمان اولتراسونیک) جهت تعیین فرمولاسیون بهینه بررسی شد. غلظت پلی ساکارید، غلظت سورفکتانت و زمان اولتراسونیک بیشترین تاثیر را بر اندازه ذرات داشت. افزودن مونت موریلونیت به طور قابل ملاحظه ای باعث افزایش بازده بارگذاری کارکامین شد. درصد مطلوب برای مونت-موریلونیت ۳٪ بود. همچنین، افزایش مقدار کارکامین تا مقدار بهینه (میلی گرم/ میلی لیتر) منجر به افزایش بازده بارگذاری شد. شاخصه های فیزیکوشیمیایی فرمولاسیون بهینه نانوسامانه از منظر بازده درون گیری، پروفایل رهایش دارو، اندازه، پتانسیل زتا، مورفولوژی سطح و طیف FTIR تعیین گردید. فرمولاسیون A_۲ با اندازه ذرات ۸۶-۲۳/۳۱ nm، بازده بارگذاری ۹۳/۷۱٪ و پتانسیل زتا ۰/۱۸ mV ± ۳۸/۷۳- به عنوان فرمول بهینه انتخاب شد. بررسی های SEM و FTIR نشان از مورفولوژی کروی و عدم وجود برهمکنش شیمیایی میان نانوسامانه و دارو بوده است. نتایج نشان داد سرعت رهایش کارکامین از نانوکامپوزیت در pH=۷/۴ آهسته و پایدار بوده و به میزان قابل توجهی در pH اسیدی ۴/۵ افزایش می یابد. حداکثر رهایش دارو از نانوکامپوزیت در شرایط ۳۷ °C، pH=۴/۵، بعد از گذشت ۲۴ ساعت، ۸۰٪ بوده است.

کلمات کلیدی: کیتوزان، کارکامین، ژلسازی یونی، مونت موریلونیت.

۱- مقدمه

سیستم های تحویل دارو را می توان به عنوان ابزاری قدرتمند برای درمان موثر بیماری ها تعریف کرد که قادر به انتقال عوامل درمانی به صورت انتخابی به سایت هدف می باشند، از جمله مزایای این سیستم ها: کاهش عوارض جانبی نامطلوب در بافت های طبیعی، برای محافظت از ترکیبات در برابر تخریب آنزیمی و به حداکثر رساندن اثربخشی داروهای درمانی می باشد [۱]. در طول چند سال گذشته، فناوری نانو به یکی از مهمترین موارد تبدیل شده است و رشته های هیجان انگیز سیستم های نانویی متعددی برای غلبه بر محدودیت های مرتبط با روش های فعلی درمان ارائه شده است. نانو فناوری با توجه به ویژگی های فیزیکی و شیمیایی منحصر به فرد مانند ظرفیت بالا برای بارگیری دارو، ثبات بالا و توانایی در به دام اندازی داروهای هیدروفوب و هیدروفیل، توجه زیادی را به خود جلب کرده است [۲]. نانوذرات کامپوزیتی ذرات نانومقیاس جامد هستند که از حداقل دو

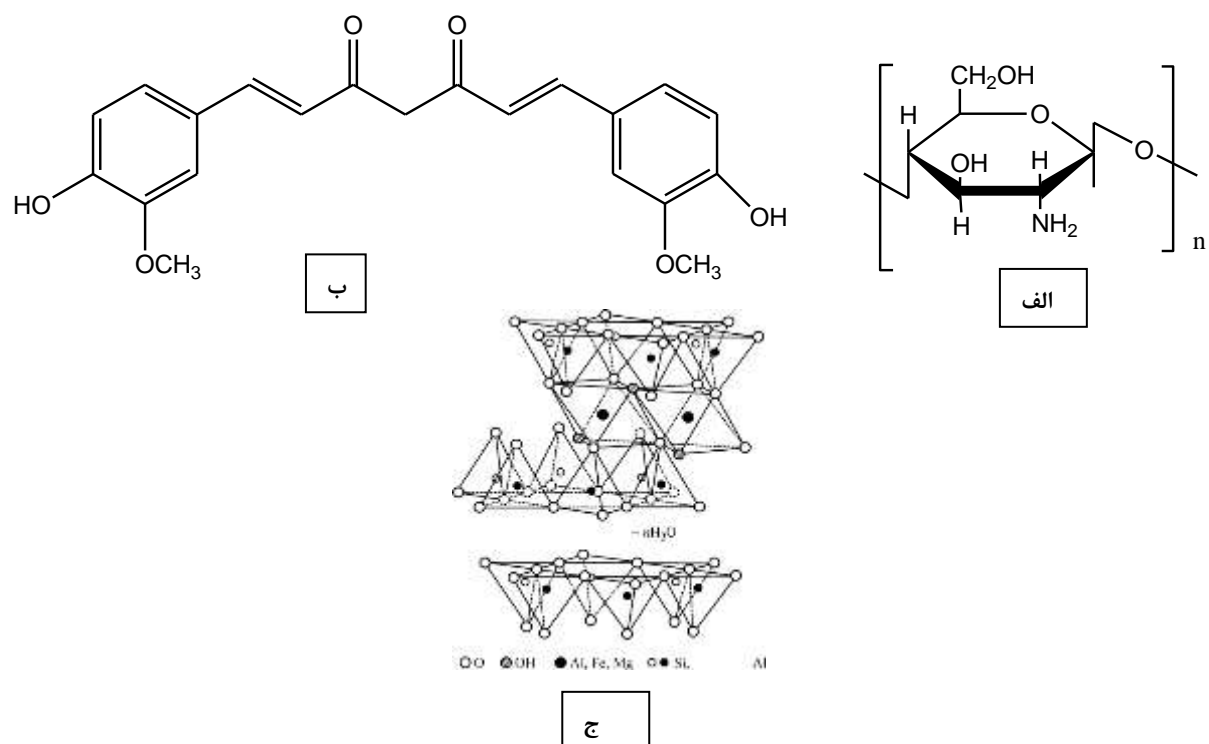
ماده متفاوت تشکیل شده‌اند که می‌توانند از طریق روش‌های مکانیکی یا شیمیایی تولید شوند [۳]. سیستم‌های تحویل دارو از پلیمرهای طبیعی به دلیل سازگاری زیستی و غیرسمی بودن آنها اهمیت می‌یابد [۵ و ۴]. در سالهای اخیر، محققان به بررسی و مطالعه علمی فاکتورهای مختلفی همچون مورفولوژی نانوذرات پلیمری، اندازه ذرات، انتخاب نوع ماده و تکنیکهای سنتز و بهینه‌سازی نانومواد جهت ارائه نانوسیستم ایده‌آل برای دارورسانی هدفمند و موثرتر، پرداخته‌اند [۶]. نانوسامانه‌های رهاکننده دارو ابزارهای قدرتمند درمانی می‌باشند.

کارکامین یک ترکیب کریستالی زرد نارنجی و ماده فعال ادویه زردچوبه است و به‌عنوان ماده‌ی ضد التهاب، ضد میکروبی، ضد سرطان و آنتی‌اکسیدان استفاده می‌شود. با این حال، کاربرد بالینی کارکامین به دلیل نقاط ضعف عمده‌ی آن از قبیل بی‌ثباتی، حلالیت کم، زیست دسترس‌پذیری ضعیف و متابولیسم سریع به شدت محدود شده است [۷ و ۸]. کپسوله شدن کارکامین در نانوذرات یک روش مناسب و مفید برای غلبه بر محدودیت‌های آن است [۹]. برای دارورسانی نانوذرات و نانوکامپوزیت‌های پلیمری پیشنهاد می‌شوند، زیرا بهترین نتیجه و کمترین سمیت را در انکپسولاسیون داروها از خود نشان داده‌اند. نانوذرات پلیمری با اتصالات عرضی و هسته‌ی آبگریز و پوسته‌ی آب دوست برای کپسوله کردن کارکامین استفاده می‌شوند که به‌طور پایدار باعث تولید نانوذرات بارگذاری شده با دارو، با اندازه کمتر از ۱۰۰ nm می‌شوند. از طرفی در ارتباط با ترکیبات یا داروهای کم محلول در آب نظیر کارکامین اثبات شده که سامانه‌های رسانش دارو بر پایه نانوفناوری ابزارهای نویدبخشی جهت افزایش زیست دسترس‌پذیری و هدف قرار دادن بافت هدف هستند [۱۰]. نانوسامانه‌های حمل کننده دارو دارای قابلیت‌های مفیدی می‌باشند که پیش از تبدیل به شکل نانو-دارو آن ویژگی را نداشته‌اند [۱۱]. هنگامی که این سامانه‌ها با اشکال دارویی رایج مقایسه شدند، فواید متمایزی نشان دادند، از جمله: زمان اقامت طولانی دارو در محل مورد استفاده، تماس نزدیک فرمولاسیون با سطح زیستی و موضعی کردن در مکانی خاص که می‌تواند جذب داروها را افزایش دهد، همچنین این سامانه‌ها کاهش اثر جانبی دارو و توانایی تحویل چندین دارو به یک مکان هدف را از خود نشان می‌دهند (شکل ۱) [۱۲].

کیتوزان یک ماده طبیعی است که به دلیل زیست تخریب‌پذیری، زیست‌سازگاری، ثبات بهتر، سمیت کم، روش‌های آماده‌سازی ساده و ملایم و قابلیت ساختاری مناسب برای اصلاح مکانیکی و شیمیایی در ایجاد خواص و عملکرد نوین، ابزار ارزشمندی برای سامانه‌های رسانش دارو است [۱۳]. پلیمرهای زیست تخریب‌پذیر چند سالی است که مورد نظر پژوهشگران قرار گرفته است. از جمله می‌توان به سنتز نانوکامپوزیت‌هایی شامل اجزای زیست تخریب پذیر مانند نانورس و کیتوزان اشاره کرد که در ساخت نانوکامپوزیت‌ها مورد توجه زیادی قرار گرفته است (شکل ۱) [۱۴ و ۱۵].

استفاده از نانورس‌ها به‌عنوان رهاکننده‌های دارویی مورد توجه قرار گرفته است. نانوکامپوزیت‌های خاکرس-پلیمر در فرمولاسیون نانوکامپوزیت جهت تحویل دارو نقش مهمی ایفا می‌کنند، زیرا اثر قویتری در کنترل رهایش دارو در مقایسه با

خاک رس به تنهایی یا پلیمر به تنهایی دارند [۱۶]. خاک رس مونت موریلونیت خواص جذب خوب به دلیل سطح خشن و متخلخل فراهم می‌کند [۱۷]. این نانورس قیمت پایین داشته و آبدوست است، مونت موریلونیت پرکننده نانویی دوست‌دار طبیعت و محیط زیست می‌باشد [۱۸]. استفاده از نانورس می‌تواند حمل دارو را برای کامپوزیت بهتر کند (شکل ۱) [۱۹]. پژوهش حاضر با هدف سنتز فرمولاسیون‌های متفاوت از نانوذرات زیستی همراه با نانورس مونت موریلونیت حاوی کارکامین برای دستیابی به فرمولاسیونی نهایی انجام گرفته است، که طی آن، فرمولاسیون‌های اولیه از نقطه نظر راندمان انکپسولاسیون و الگوی رهایش دارو مورد بررسی قرار گرفته‌اند و بعد از انتخاب فرمول نهایی، این فرمولاسیون از جهت کارایی درون‌گیری دارو، اندازه ذرات، رهایش ۷۲ ساعته و برهمکنش میان دارو و نانو سامانه مورد بررسی قرار می‌گیرد.



شکل ۱- ساختار الف) کیتوزان ب) کارکامین ج) مونت موریلونیت

۲- بخش تجربی

۲-۱- مواد

کیتوزان (low MW)، کارکامین، مونت موریلونیت، تویین ۲۰، استیک اسید، اتانول ۹۶ درصد و مطلق، کلریدریک اسید، سدیم هیدروکسید و استیک اسید، کیتوزان و مونت موریلونیت به صورت خالص از شرکت سیگما آلدریج تهیه شده و سایر مواد مصرفی در این تحقیق از شرکت مرک آلمان تهیه شده است.

۲-۲- دستگاه‌ها

دستگاه طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز (FT-IR) مدل ۱۰-۰۳-۰۶، ساخت شرکت PerkinElmer Spectrum، میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل KYKY_EM3200 برای بررسی مورفولوژی نانوکامپوزیت، اسپکتروفوتومتر مدل PG Instrument، دستگاه تفرق نور دینامیک و زتاپتانسیل مدل Nano zeta sizer ساخت شرکت Malvern Instrument برای اندازه‌گیری متوسط اندازه ذرات نانوکامپوزیت و اندازه بار ذرات و دستگاه گریز از مرکز مدل سیگما برای سانتریفیوژ کردن ذرات نانوکامپوزیت استفاده شد.

۲-۳- روش های آزمایشگاهی

۲-۳-۱- تهیه نانوذرات کیتوزان

محلول نانوذرات کیتوزان با روش ترسیب و ژله‌ای شدن ساخته شد. ابتدا غلظت‌های مختلف کیتوزان محلول در آب دیونیزه (۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵، ۱ درصد وزنی) و همچنین غلظت‌های مختلف کارکامین (۴-۴/۴ mg/ml) و حجم‌هایی از توئین (۵-۱/۳) به‌عنوان متغیر در نظر گرفته شد و با انجام آزمایش‌های متعددی هر کدام بهینه گردید. در حالت بهینه از بین غلظت‌های یادشده، غلظت ۰/۵٪ کیتوزان به منظور سنتز انتخاب گردید. محلول بهینه کیتوزان با حل ۵۰ mg پودر کیتوزان در ۱۰ ml محلول اسید استیک ۰/۵ درصد حجمی/حجمی تهیه شد، محلول یک ساعت به‌منظور حل شدن کامل کیتوزان روی همزن مغناطیسی با ۷۰۰ rpm همزده شد. محلول کیتوزان توسط محلول NaOH ۱ مولار تا pH ۵ تنظیم شد. جهت پراکندگی یکنواخت محلول، ۱۰ μl توئین ۲۰ اضافه شد. مونت‌موریلونیت با غلظت‌های (۰/۲۵-۰/۰۵-۰/۱-۰/۳-۰/۵ درصد وزنی/حجمی) در ۱۰ ml آب مدت ۱۲ ساعت متورم شد. سپس این سوسپانسیون توسط همزن مکانیکی مدت ۳۰ ساعت به شدت همزده و مدت ۳۰ دقیقه تحت التراسونیک قرار گرفت [۲۰].

۲-۳-۲- سنتز نانوکامپوزیت کیتوزان- مونت‌موریلونیت بارگذاری شده با کارکامین

فرمول‌بندی‌های مختلف و متغیرهای متفاوت (غلظت پلی‌ساکارید، غلظت سورفکتانت، درصد مونت‌موریلونیت، مقدار دارو و مدت زمان اولتراسونیک) جهت سنتز بهینه نانوکامپوزیت کیتوزان-مونت‌موریلونیت بارگذاری شده با کارکامین در جدول ۱ نشان داده شده است. ابتدا محلول بهینه کارکامین در اتانول مطلق (غلظت ۲ mg/ml) (نسبت‌های پلیمر/کارکامین (۱/۵، ۱/۱۰، ۱/۵۰، ۱/۱۰۰)) قطره قطره به سوسپانسیون مونت‌موریلونیت اضافه شد و ۱۵ دقیقه همزده شد. سپس محلول نانوذرات کیتوزان به‌آرامی تحت اولتراسونیک به مدت ۵۰ دقیقه اضافه شد تا واکنش بین کیتوزان و کارکامین به‌منظور بارگذاری دارو در نانوکامپوزیت در حین سنتز صورت گیرد. پس از گذشت این زمان، سوسپانسیون نانوذرات به‌منظور ترسیب ذرات درشت‌تر و حذف آن‌ها در فالكون‌های ۱۵ ml ریخته و در ۱۰۰۰ rpm به مدت ۲ دقیقه سانتریفیوژ شد، سپس رسوب دور ریخته شد و

محلول روی آن جدا شد. محلول حاصل در میکروتیوب‌های ۲ml ریخته شد و در ۱۵۰۰۰ rpm مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. این بار محلول دور ریخته شد و رسوب ایجاد شده با ۱ ml اتانول مطلق به منظور حذف کارکامین آزاد شستشو داده شد و اتانول سریعاً از آن خارج گردید و رسوب باقیمانده که حاوی نانوکامپوزیت بارگذاری شده است به منظور اندازه‌گیری میزان بارگذاری نانوذرات به روش انجمادی خشک گردید.

۳-۳-۲- تعیین مقدار دارو در نانوکامپوزیت و تعیین ظرفیت بارگذاری

جهت تعیین مقدار داروی بارگذاری شده در نانوکامپوزیت بهینه شده، بعد از خشک کردن انجمادی، مقدار ۱۰mg از نانوکامپوزیت حاوی کارکامین در یک میکروتیوب ۲ml ریخته شد، سپس ۱/۵ml اتانول مطلق به آن افزوده شد و ۱۵ دقیقه در حمام اولتراسونیک قرار داده شد. میکروتیوب در ۱۴۰۰۰rpm مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید. محلول روئی از میکروتیوب به حجم نهایی ۲ml رسید و میزان غلظت کارکامین با استفاده از روش طیف‌سنجی نوری در طول موج ۴۱۹ nm با استفاده از معادله رگرسیونی به دست آمده از منحنی کالیبراسیون کارکامین در محلول اتانول محاسبه شد. برای تعیین مقدار دارو و تعیین ظرفیت بارگذاری، از روابط زیر استفاده شد [۲۱].

$$\text{کارکامین آزاد} - \text{وزن کل کارکامین} = (\%) \text{ داروی به دام افتاده} \times 100 = \frac{\text{وزن کل کارکامین}}{\text{وزن کل کارکامین}}$$

$$\text{کارکامین آزاد} - \text{وزن کل کارکامین} = (\%) \text{ ظرفیت بارگذاری} \times 100 = \frac{\text{وزن کل کارکامین}}{\text{وزن نانو سامانه}}$$

جدول ۱- فرمولاسیون‌های مختلف کارکامین بارگذاری شده در نانوکامپوزیت کیتوزان-مونت موریلونیت

مدت زمان التراسونیک (min)	غلظت کارکامین (mg/ml)	غلظت تویین-۲۰ (μl/ml)	MMT (W/V) %w.r.t polymer	غلظت کیتوزان (mg/ml)	کد فرمولاسیون
۳۰	۲	۱/۵	۵	۲/۵	اثر غلظت کیتوزان (% w/v)
					A ₁
۳۰	۲	۱/۵	۵	۵	A ₂
۳۰	۲	۱/۵	۵	۷/۵	A ₃
۳۰	۲	۱/۵	۵	۱۰	A ₄
					اثر غلظت سورفکتانت (μl/ml)
۳۰	۲	۰	۵	۵	A ₅
۳۰	۲	۱/۵	۵	۵	A ₆
۳۰	۲	۳	۵	۵	A ₇
					اثر غلظت مونت-موریلونیت (W/V%)
۳۰	۲	۱/۵	۰	۵	A ₈
۳۰	۲	۱/۵	۳	۵	A ₉

۳۰	۲	۱/۵	۵	۵	A ₁₀ اثر مقدار دارو (mg/ml)
۳۰	۰/۲	۱/۵	۵	۵	A ₁₁
۳۰	۲	۱/۵	۵	۵	A ₁₂
۳۰	۴	۱/۵	۵	۵	A ₁₃ اثر زمان اولتراسونیک (min)
۱۵	۲	۱/۵	۵	۵	A ₁₄
۳۰	۲	۱/۵	۵	۵	A ₁₅
۶۰	۲	۱/۵	۵	۵	A ₁₆

۴-۳-۲- خصوصیات نانوکامپوزیت

تعامل بالقوه بین ترکیبات در سیستم نانوکامپوزیتی توسط طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز در دمای اتاق انجام گرفت. طیف FTIR از کیتوزان، مونت موریلونیت، کارکامین و نانوکامپوزیت کیتوزان-مونت موریلونیت بر روی نمونه‌های لیوفیلیزه با استفاده از دستگاه طیف سنج ثبت شد. یک میلی‌گرم از هر نمونه در یک هاون همراه با KBr پودر شد و با ضخامت ۰/۱ Cm روی صفحه قرار گرفت. طیف در محدوده $400-4500 \text{ cm}^{-1}$ مشاهده شد. ویژگی‌های مورفولوژی سطح نانوکامپوزیت فریزدرای شده با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی تعیین شد. توزیع اندازه و پتانسیل زتا ذرات نانوکامپوزیت توسط زتا سایزر تعیین شد. اندازه‌گیری DLS در یک زاویه پراکندگی 90° بعد از التراسونیک محلول انجام شد.

۵-۳-۲- اندازه‌گیری میزان رهایش دارو

اندازه‌گیری رهایش کارکامین از نانوکامپوزیت پلی‌ساکاریدی در دو بافر فسفات با دو pH مختلف (pH های ۷/۴ و ۴/۵) به روش کیسه دیالیز در حمام آب 37°C انجام شد [۲۲]. ابتدا کیسه دیالیزها فرآوری شدند. به ۱ mg پودر نانوکامپوزیت بارگذاری شده با کارکامین که به صورت لیوفیلیزه تهیه شده بود، ۵ ml بافر فسفات اضافه شد، سپس این محلول به یک کیسه دیالیز (۱۲KDa) منتقل شد و در ۵۰ ml از بافر فسفات (pH های ۷/۴ و ۴/۵) حاوی اتانول (۲۰V/V٪) به صورت معلق قرار گرفت. بررسی رهایش دارو در ۱۰ دوره با فواصل زمانی ۰، ۲، ۴، ۶، ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸، ۶۰ و ۷۲ ساعت صورت گرفت. در این فواصل زمانی ۱/۵ ml از نمونه‌ها نمونه‌برداری شده و با حجم معادل از محیط بافر PBS تازه جایگزین شد. مقدار کارکامین آزاد در بافر توسط طیف‌سنجی نوری در طول موج ۴۱۹ nm تعیین گردید. مقدار رهایش کارکامین از رابطه زیر به دست می‌آید:

$$\% \text{ رهایش کارکامین} = \frac{[\text{Curcumin}]_{\text{rel}}}{[\text{Curcumb}]_{\text{load}}} \times 100$$

۳- نتایج و بحث

۳-۱- مشخصه یابی نانوکامپوزیت پلی ساکاریدی حاوی کارکامین

جهت بهبود بازده بارگذاری و اندازه ذرات نانوکامپوزیت CS-MMT حاوی کارکامین، تاثیر متغیرهای مختلف بررسی شده است. اندازه ذرات و بازده بارگذاری نانوکامپوزیت با استفاده از متغیرهای مختلف و فرمول بندی، در جدول ۲ خلاصه شده است.

۳-۱-۱- اثر غلظت پلی ساکارید

غلظت پلی ساکارید تاثیر زیادی بر اندازه ذرات نانوکامپوزیت داشت. از این رو، محلول های مختلف کیتوزان (۰/۲۵، ۰/۵، ۰/۷۵ و ۱ w/v٪) تهیه شد. میانگین اندازه ذرات در فرمولاسیون های ساخته شده از پلی ساکارید (فرمولاسیون های A_۱-A_۴) به ترتیب ۱۵۸، ۹۷، ۲۱۵ و ۳۰۸ نانومتر بود (جدول ۳). همچنین با افزایش غلظت پلیمر در سیستم امولسیون (از ۰/۲۵ تا ۰/۵ و ۱٪ w/v) بازده بارگذاری ۰/۸۶، ۰/۹۳، ۰/۸۲ و ۰/۸۸ بود (با افزایش غلظت تا مقدار بهینه، سایز ذرات کاهش و بازده بارگذاری افزایش می یابد، پس از آن بازده کاهش و اندازه ذرات افزایش می یابد). افزایش مقدار پلیمر با وجود ثابت نگه داشتن حجم اجزای دیگر باعث افزایش ویسکوزیته و افزایش نیروهای چسبندگی قطرات و تشکیل قطرات بزرگتر می شود، همین موضوع منجر به افزایش اندازه ذرات می گردد [۲۳]. همچنین افزایش اندازه ذرات مانع رهایش مولکولهای دارویی از نانوذرات می شود و مقدار رهایش دارو را کاهش می دهد [۲۴].

۳-۱-۲- اثر غلظت سورفکتانت

حضور سورفکتانت اثر مستقیم بر تشکیل کیتوزان پایدار در طی روند سنتز دارد. بر اساس تحقیقات اولیه، توئین ۲۰ انتخاب و به عنوان سورفکتانت استفاده شد. از آنجایی که غلظت سورفکتانت ممکن است براندازه ذرات و جذب دارو تاثیر گذارد، سه غلظت مختلف از توئین ۲۰ (غلظت های ۳ و ۱/۵ و ۰ μl/ml) مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان داد که غلظت سورفکتانت اثر قوی بر اندازه ذرات نانوکامپوزیت دارد. افزایش غلظت توئین ۲۰ از ۰ تا ۱/۵ (فرمولاسیون های A_۵ و A_۶) به ترتیب ذرات اندازه ۴۲۲ nm و ۹۷ nm بود. در غلظت ۱/۵ (μl/ml) توئین ۲۰ (فرمولاسیون A_۶)، محلول پایدار تشکیل شد و پس از چند ساعت، جداسازی صورت نگرفت. با افزایش غلظت سورفکتانت از ۱/۵ (μl/ml) تا ۳ (μl/ml) (فرمولاسیون A_۷)، اندازه ذرات از ۹۷ nm تا ۲۴۰ nm افزایش یافت. سورفکتانت می تواند از به هم پیوستن ذرات کروی در محلول نانوذره جلوگیری کند. جذب مولکول های سورفکتانت روی سطح قطرات، باعث کاهش انرژی آزاد در حفاصل بین مولکول ها شده و در برابر انعقاد و تجمع ذرات نانوکامپوزیت مقاومت می کند [۲۵ و ۲۶]. محلول نانوذره ناپایدار ممکن است به دلیل مقدار کمتر سورفکتانت تشکیل شود، و غلظت ۰ (μl/ml) توئین ۲۰ ممکن است برای تثبیت نانوکامپوزیت کافی نباشد.

افزایش غلظت توئین ۲۰ از $(\mu\text{l/ml})$ ۰ تا ۱/۵ موجب افزایش بازده بارگذاری از ۷۷٪ تا ۹۳٪ شده و با افزایش غلظت سورفکتانت از $(\mu\text{l/ml})$ ۱/۵ (فرمول A₆) تا $(\mu\text{l/ml})$ ۳ (فرمول A₇) بازده بارگذاری تا ۸۲٪ کاهش یافت. نتایج نشان داد بازده بارگذاری با افزایش غلظت سورفکتانت، تا حد معینی کاهش می یابد. با افزایش غلظت سورفکتانت، کارکامین ممکن است از نانوکامپوزیت به محلول آبی نفوذ کند و تجزیه شود. همانطور که مولکول های بیشتر دارو در محلول آبی تجزیه می شوند، مقدار سورفکتانت موجود کاهش یافته، در نتیجه ممکن است تجمع نانوکامپوزیت رخ دهد. تفاوت در اندازه ذرات در غلظت های مختلف می تواند دلیل این پدیده باشد [۲۷].

۳-۱-۳ اثر غلظت مونت موریلونیت (w/v%)

غلظت مونت موریلونیت تأثیر زیادی بر بازده بارگذاری نانوکامپوزیت داشت. افزودن مونت موریلونیت به ترکیب تأثیر معنی داری در اندازه ذرات نانوکامپوزیت نداشت. سه غلظت مختلف مونت موریلونیت به عنوان جاذب در غلظت های (w/v) ۰٪، ۳ و ۵ مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بازده بارگذاری نشان داد که افزایش مونت موریلونیت موجب افزایش کارایی ضریب نفوذ می شود. با افزایش غلظت مونت موریلونیت از w/v ۰٪ تا w/v ۳٪ (فرمول های A₈ و A₉) بازده بارگذاری از ۵۱٪ به ۹۳٪ افزایش می یابد، این نتیجه می تواند به دلیل ساختار فیزیکی خاص مونت موریلونیت باشد. مونت موریلونیت دارای ساختار سیلیکات لایه ای است؛ که آن را به صورت یک سطح بزرگ در ماتریکس پلیمر ارائه می دهد و منجر به بارگذاری بالاتری از مولکول های دارویی می شود [۱۳]. در حالیکه افزایش بیشتر مونت موریلونیت ((w/v) ۵٪ باعث کاهش بازده بارگذاری کارکامین به ۸۴٪ (فرمول A₁₀) شد. اندازه ذرات نانوکامپوزیت فرمولاسیون های A₈، A₉ و A₁₀ به ترتیب ۴۴۴nm، ۲۳۸ و ۱۷۹ به دست آمد.

۳-۱-۴ تأثیر مقدار دارو

برای رسیدن به حداکثر جذب دارو، مقادیر متفاوت دارو، از ۰/۲ mg/ml تا ۴، به سیستم اضافه شد. اندازه ذرات متوسط فرمولاسیون های A₁₁ و A₁₂ با استفاده از ۰/۲ mg/ml و ۲ mg/ml کارکامین به ترتیب ۸۴nm و ۹۷nm بود (جدول ۴). اما با افزایش مقدار دارو به ۴mg/ml (فرمولاسیون A₁₃)، اندازه ذرات به ۱۱۲nm افزایش یافت. افزایش اندازه ذرات می تواند به مقدار بیشتر مواد موجود در نانوکامپوزیت مربوط شود [۲۴]. بازده بارگذاری ابتدا افزایش (از ۹٪ تا ۹۳٪) و سپس کاهش (۷۱٪) را با افزایش مقدار دارو در فرمولاسیون از ۰/۲ تا ۲ و سپس ۴ mg/ml، نشان داد. هنگامی که مقدار دارو در سیستم افزایش می یابد، مولکول های دارویی بیشتر در ترکیب زنجیره های پلیمری قرار می گیرند، بنابراین، بازده بارگذاری افزایش می یابد، اما چون فقط یک مقدار ثابت از دارو می تواند در مقدار مشخصی از پلیمر گنجانیده شود، با افزایش بیشتر مقدار دارو در یک حد

معینی، محتوای پلیمری قادر به جذب بیش از حد دارو نخواهد بود، لذا بازده بارگذاری کاهش می‌یابد. همچنین افزایش بیشتر مقدار دارو ممکن است به ایجاد فاز ویسکوز و چسبنده منجر شود که نتیجه آن تشکیل ذرات بزرگتر خواهد بود [۲۸].

۵-۱-۳- تأثیر زمان اولتراسونیک

مدت زمان اولتراسونیک بیشترین اثر را بر اندازه ذرات داشت، اما تاثیر معنی داری در بازده بارگذاری نانوکامپوزیت نداشت. سه مدت زمان ۱۵ دقیقه و ۳۰ دقیقه و ۶۰ دقیقه مورد بررسی قرار گرفت. با افزایش زمان اولتراسونیک (فرمولاسیون‌های A₁₄، A₁₅ و A₁₆) به ترتیب اندازه ذرات ۱۱۹ nm، ۹۷ nm و ۹۷ nm بود. زمان ۳۰ دقیقه زمان بهینه فرمولاسیون بود و با افزایش زمان به ۶۰ دقیقه سایز ذرات نانوکامپوزیت تغییری نداشت. بازده بارگذاری فرمولاسیون A₁₄ برابر ۷۹٪، A₁₅ برابر ۸۰٪ و A₁₆ برابر ۸۰٪ حاصل شد.

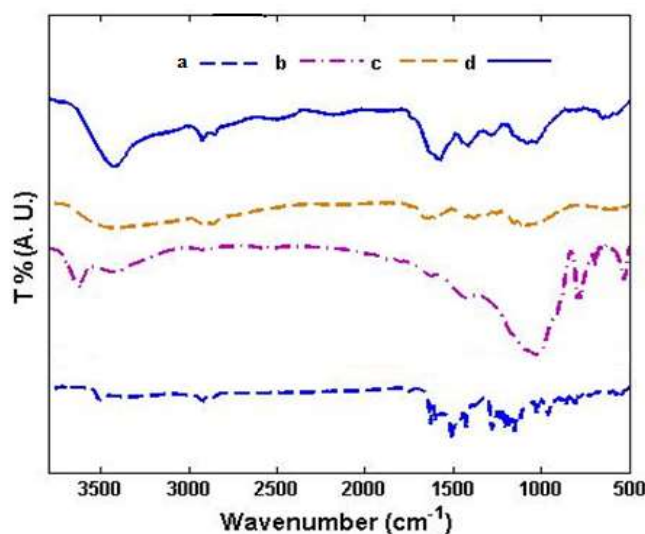
جدول ۲- فرمولاسیون‌های مختلف جهت بهینه‌سازی کارکامین بارگذاری شده در نانوکامپوزیت کیتوزان-مونت موریلونیت

کد فرمولاسیون	بازده بارگذاری (%)	اندازه ذرات (nm)	زتا پتانسیل (mV)
اثر غلظت کیتوزان (%w/v)			
A ₁	۸۶	۱۵۸	۱۷
A ₂	۹۳	۹۷	۳۷/۲
A ₃	۸۲	۲۱۵	۳۰
A ₄	۸۸	۳۰۸	۳۲
اثر غلظت سورفکتانت (μl/ml)			
A ₅	۷۷	۴۴۲	۳۳
A ₆	۹۳	۹۷	۳۷/۲
A ₇	۸۲	۲۴۰	۳۰
اثر غلظت مونت‌موریلونیت (%)			
A ₈	۵۱	۴۴۴	۳۲/۳
A ₉	۹۳	۲۳۸	۲۹/۸
A ₁₀	۸۴	۱۷۹	۳۱/۱۱
اثر مقدار دارو (mg/ml)			
A ₁₁	۹	۸۴	۲۲/۴
A ₁₂	۹۳	۹۷	۳۷/۲
A ₁₃	۷۱	۱۱۲	۳۹
اثر زمان اولتراسونیک (min)			
A ₁₄	۷۹	۱۱۹	۳۳
A ₁₅	۸۰	۹۷	۳۴/۲
A ₁₆	۸۰	۹۷	۳۰

۲-۳- طیف سنجی مادون قرمز (FTIR)

از طیف سنجی مادون قرمز برای بررسی برهمکنش بین مونت‌موریلونیت، کارکامین و پلی‌ساکارید (شکل ۲) استفاده شد. طیف FT-IR کارکامین (منحنی a) دارای پیکهای شاخص زیادی از جمله باند جذبی در 3510 cm^{-1} که به ارتعاش کشش گروه-O

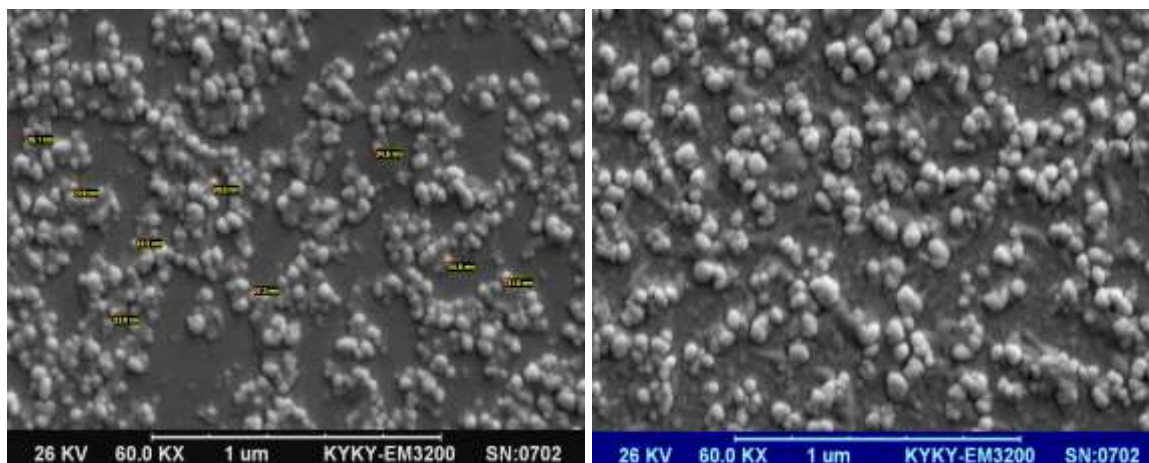
H فنلی نسبت داده شده است. نوارهای جذب تیز در 1599cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی حلقه بنزن، 1503cm^{-1} ارتعاشات C-C و C-O، 1435cm^{-1} ارتعاش خمشی C-H الفین، 1278cm^{-1} مربوط به ارتعاش کششی C-O آروماتیک و 813cm^{-1} نمایانگر گروه شیمیایی C-H می باشد [29]. در طیف FTIR مونت موریلونیت (منحنی b)، پیک جذبی 3630cm^{-1} مربوط به ارتعاشات کششی OH^- و پیک گسترده در محدوده $1120-580\text{cm}^{-1}$ به ارتعاشات کششی Si-O نسبت داده شده است [29 و 30]. طیف FTIR کیتوزان، پیک جذبی گسترده در محدوده $3500-3200\text{cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاش کششی نامتقارن NH_2 ، و پیک 2950cm^{-1} با ارتعاش کششی OH^- مطابقت دارد [31]. آمید ۱ و آمید ۲ در 1640cm^{-1} و 1560cm^{-1} ظاهر شدند، که به ارتعاش کششی گروه کربوکسیل (آمید ۱) و ارتعاش خمشی NH (آمید ۲) نسبت داده شده است [32]. همانطور که در شکل ۱ مشخص است، شدت پیک کششی O-H در نانوکامپوزیت حاوی کارکامین کاهش یافته و به عدد موجی پایین تر نسبت به کارکامین، کیتوزان و مونت موریلونیت انتقال یافته، که تعامل بین کیتوزان، مونت موریلونیت و کارکامین را به خوبی نشان می دهد. پیک های OH و NH_2 شدت کمتری نسبت به حالت های اولیه در کارکامین و کیتوزان دارند. باتوجه به اینکه پیک های طیف کارکامین درون طیف نانوسامانه ی حامل دارو دیده می شود، میتوان استناد کرد که دارو (کارکامین) با نانوسامانه ی پلی ساکارییدی واکنشی داده است و دارو بصورت مناسب درون سامانه بارگیری شده است.



شکل ۲- طیف تبدیل فوریه مادون قرمز (a): کارکامین، (b): مونت موریلونیت، (c): کیتوزان و (d): نانوکامپوزیت

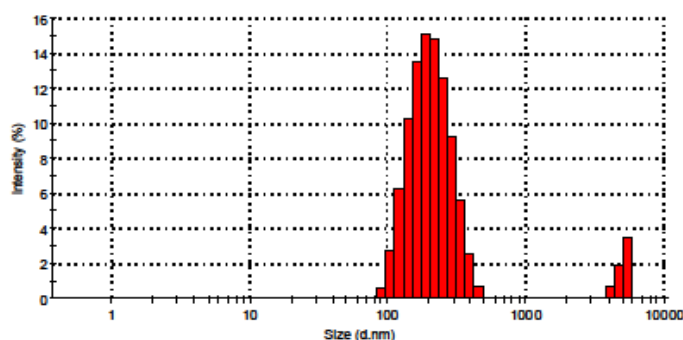
۳-۳- مورفولوژی نانوکامپوزیت

شکل ۳ تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نانوکامپوزیت کیتوزان-مونت موریلونیت بارگذاری شده با کارکامین را نشان می دهد. با توجه به تصاویر SEM، نانوکامپوزیت حاوی کارکامین، کروی شکل بوده و دارای ساختار متراکم جامد است. سطح نانوکامپوزیت همگن به نظر می رسد، که نشان دهنده سازگاری خوب بین کیتوزان، مونت موریلونیت و کارکامین است [33].



شکل ۳- تصاویر SEM نانوکامپوزیت کیتوزان-مونت موریلونیت بارگذاری شده با کارکامین

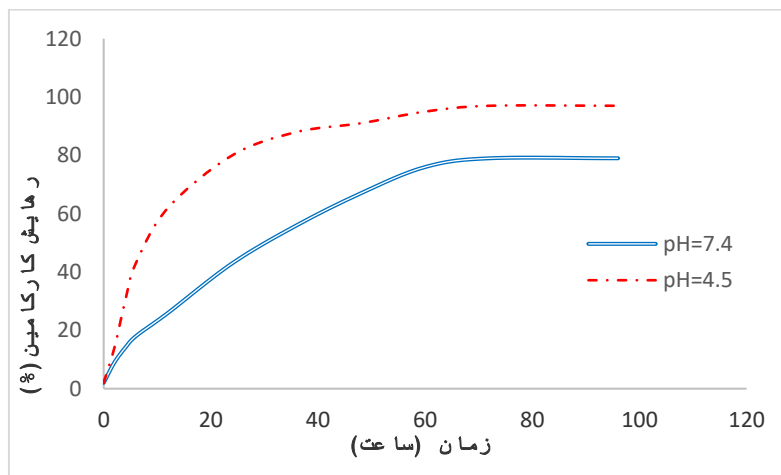
طبق تصاویر SEM قطر متوسط نانوکامپوزیت در محدوده $۸/۶-۲۳/۳۱$ nm بود. اندازه ذرات نانوکامپوزیت با استفاده از DLS تعیین شد. مطابق شکل ۴، توزیع اندازه ذرات از ۹۷ nm تا ۲۴۰ nm به دست آمد. ثبات ذرات نانوکامپوزیت را می توان با مقادیر پتانسیل زتا آنها تایید کرد. پتانسیل زتا نانوذرات بین $۲۶/۲-۳۹$ mV نشان داده شد، که پایداری خوب نانوکامپوزیت را تایید می کند. پتانسیل زتا شاخصی از پایداری محلول های نانوذره می باشد. بار الکتریکی بیشتر بر روی سطح نانوذرات به دلیل نیروهای دافعه قوی بین ذرات از تجمع آنها ممانعت می کند. به عنوان یک قاعده کلی مقادیر پتانسیل زتا بالاتر از ۳۰ mV پایداری خوبی را فراهم می کند و مقادیر بالاتر از ۶۰ mV پایداری بسیار خوبی را سبب می شوند. مقادیر حدود ۲۰ mV و کمتر، پایداری لازم را فراهم می کنند، ولی مقادیری که در محدوده ۵ mV تا ۵ mV قرار می گیرند، باعث تجمع سریع نانوذرات می شوند [۳۴]. در تحقیق حاضر، نانوکامپوزیت، شامل کیتوزان با پتانسیل زتا برابر $+۲۱$ و کارکامین با پتانسیل زتا برابر $+۱۲/۳$ می باشد (اجزاء نانوکامپوزیت دارای بار مثبت هستند). نانوکامپوزیت بارگذاری شده با کارکامین به دلیل پایداری لازم دارای پتانسیل زتا مثبت است. همچنین به دلیل استفاده از توپین ۲۰ در فرایند سنتز، پایداری فضایی آن به میزان بیشتری حفظ می گردد.



شکل ۴- توزیع اندازه ذرات نانوکامپوزیت کیتوزان-مونت موریلونیت بارگذاری شده با کارکامین

۴-۳- رهایش کارکامین

سرعت رهایش کارکامین از نانوکامپوزیت به روش دیالیز در دو بافر مختلف (pH=۴/۵ و ۷/۴) در ۳۷°C طی یک دوره ۹۶ ساعت مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۵). داده‌های حاصل از بررسی الگوی رهایش نشان می‌دهد بعد از ۲۴ ساعت و در pH=۷/۴، ۴۳٪ از کارکامین از نانوکامپوزیت رها شد. نتایج نشان داد سرعت رهایش کارکامین از نانوکامپوزیت در pH=۷/۴ آهسته و پایدار بوده و به میزان قابل توجهی در pH اسیدی ۴/۵ افزایش می‌یابد، بنابراین سامانه در pH=۷/۴ پایداری بیشتری نسبت به محیط بافری با pH=۴/۵ را دارد. بعد از ۲۴ ساعت و در pH=۴/۵، ۸۰٪ از کارکامین از نانوکامپوزیت رها شد. این نتیجه حساسیت رفتار نانوکامپوزیت نسبت به pH را نشان می‌دهد.



شکل ۵- نمودار رهایش کارکامین از نانوکامپوزیت در دو بافر مختلف (pH=۴/۵ و ۷/۴)

۴- نتیجه گیری

در تحقیق حاضر، نانوکامپوزیت کیتوزان-مونت موریلونیت بارگذاری شده با کارکامین با میانگین اندازه ذرات ۲۳/۳۱-۸/۶ nm و مورفولوژی کروی توسط روش ژل سازی یونی به صورت بهینه تهیه شد. طبق نتایج بدست آمده، درطیف مادون قرمز پیک جذبی مشخصه کیتوزان، مونت موریلونیت و کارکامین در نانوکامپوزیت مشاهده شد که نشان‌دهنده مخلوط شدن مونت موریلونیت و کارکامین در نانوسامانه می‌باشد. شدت پیک کششی O-H در نانوکامپوزیت حاوی کارکامین کاهش یافته و به عدد موجی پایین‌تر نسبت به کارکامین، کیتوزان و مونت موریلونیت انتقال یافته، که تعامل بین کیتوزان، مونت موریلونیت و کارکامین را به خوبی نشان می‌دهد. در بررسی مورفولوژی نانوکامپوزیت تفاوت بین اندازه ذرات به دست آمده از طریق DLS و SEM ممکن است به این دلیل باشد که DLS شعاع هیدرودینامیکی در محلول سوسپانسیون را اندازه می‌گیرد که در حالت تعلیقی ذرات به هم متصل شده‌اند و سایز بزرگتر است، اما SEM اندازه قطر ذرات در حالت خشک را نشان می‌دهد که سایز

نانوذرات کمتر است. درصد رهایش دارو در pH ۴/۵ بعد از ۲۴ ساعت حدود ۸۰٪ رسید که نشان دهنده کنترل رهایش دارو در حضور مونت موریلونیت در مقایسه با نانوکامپوزیت فاقد مونت موریلونیت می باشد.

۵- تقدیر و تشکر

بدینوسیله نویسندگان این مقاله از حمایت‌های دانشگاه آیت الله العظمی بروجردی تشکر و قدردانی می نمایند. لازم به ذکر است این مقاله حاصل طرح پژوهشی با کد ۱۶۰۴۱۷-۱۵۶۶۴ دانشگاه آیت الله بروجردی (ره) است.

۶- مراجع

- [1] A.C. Anselmo, and S. Mitragotri, *J Control Release*, **190** (2014) 15.
- [2] E. K. Lim, et al, *Pharmaceutic*, **5** (2013) 294.
- [3] E. Pinonn-Segundo N. Mendoza-Muñoz and D. Quintanar-Guerrero, Nanoparticles as Dental Drug-Delivery Systems, *Nano biomaterials in Clinical Dentistry*, **475** (2013).
- [4] N. Sanko, H. Marianne, R. Morten and S. Gro, *European J. Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, **77** (2011) 75.
- [5] V. Pencheva, E. Margaritova, M. Borinarova, M. Slavkova, D. Momekova, P. D. Petrov, *Carbohydrate Poly*, **183** (2018) 165.
- [6] A.E. Krausz, B.L. Adler, V. Cabral, M. Navati, J. Doerner and R. Charafeddine, *J. Nanomedicine*, **11** (2015) 195.
- [7] G. Devanand Venkatasubbu, T. Anusuya, *Int. J. Biolog. Macromole*, **98** (2017) 366.
- [8] G. Flora, D. Gupta and A. Tiwari, *J. Critic. Rev*, **30** (2013) 331.
- [9] L. Banik, P. Fattahi and J. L. Brown, *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, **8** (2016) 271.
- [10] D.E. Said, L.M. Elsamad and Y.M. Gohar. *Parasitol Res.*, **111** (2012) 545.
- [11] K. Nagpal, S.K Singh and D.N. Mishra, *Chemical & pharm bull*, **58** (2010) 1423.
- [12] L. Mazzarino, Ch. Travelet, S. Ortega-Murillo, I. Otsuka and I. J. Pignot-Paintrand, *Coll. Interf. Sci*, **370** (2012) 58.
- [13] T.M.P. Le, V.P. Pham, T.M.L. Dang, T.H. La, T.H. Le, Q.H. Le, *Adv. Nat. Sci: Nano sci. Nano techno*, **4** (2013) 1.
- [14] W.u. Tzong-Ming and Wu. Cheng-Yang, *Polymer Degradation and Stability*, **91** (2006) 2198.
- [15] H. Ferfera-Harrar, D. Berdous, T. Benhalima, *Poly. Bulletin*, **75** (2018) 2819.
- [16] J.M. Hutchinson, S. Montserrat, F. Roma, P. Corte, L. Campos Departament de Maquines i Motors Termics, ETSEIAT, Universitat Politècnica de Catalunya, 08222 Terrassa, Spain, (2006).
- [17] M. Fathy and A. Ahmed, Use of alginate/montmorillonite nanocomposites as a drug delivery system for curcumin, Thesis, (2015).

- [18] Dos. Santosa, B.R. B. Bacalhaub, F. Santos Pereira, T.d. Fonseca. C. Souza and R. Faez, *Carbohydrat. Poly*, **127** (2015) 340.
- [19] C.M.O. Müller, J.B. Laurindo and F. Yamashita, *Carbohydrat. Poly*, **89** (2012) 504.
- [20] C.h. Saikia, A. Hussain, A. Ramteke, H.K. Sharma and T.K. Maji, *J. Microencapsul*, **32** (2015) 29.
- [21] A. Anitha, S. Maya, N. Deepa, K.P. Chennazhi, S.V. Nair, H. Tamura and R. Jayakumar, *Carbohydrat. Poly*, **83** (2011) 452.
- [22] B.R Shah, Y. Li. W. Jin, Y. An, L. He, Zh .Li, W. Xu and B. Li. *Food Hydrocol*; **52** (2016) 369.
- [23] M.L. Zweers, D.W. Grijpma and G.H. Engbers, *J. Biomed. Mater. Res. B*, **66** (2003) 559.
- [24] Y. Krishnamachari, P. Madan and S. Lin, *Int. J. Pharm.*, **338** (2007) 238.
- [25] D. Quintanar-Guerrero, H. Fessi and E. All mann, et al., *Int. J. Pharm.*, **143** (1996) 133.
- [26] L.S. Wan and P.F. Lee, *J. Pharm. Sci.*, **63** (1974) 136.
- [27] Y.Y. Yang and T.S. Chung, *Biomaterials*, **22** (2001) 231.
- [28] S. Mao, Y. Shi and L. Li, *Eur. J. Pharm. Biopharm*, **68** (2008) 214.
- [29] X. Su, G. Zang, K. Xu, J.Wang, C. Song and P. Wang, *Poly Bull*; **60** (2008) 69.
- [30] J. Zheng, J. Shan, Z. Fan and K. Yao, *Technol-Mater Sci*, **26** (2011) 628.
- [31] A. Anitha, S. Maya, N. Deepa, K.P. Chennazhi, S.V. Nair and H. Tamura. *Carbohydrat. Poly*, **83** (2011) 452.
- [32] K. Wilpiszewska, A.K. Antosik and T. Szychaj, *Carbohydrat Poly*, **128** (2015) 82.
- [33] S.h. Jahanizadeh, F. Yazdian, A. Marjani, M. Omid, H. Rashedi, *Int. J. Biolog. Macromol*, **105** (2017) 757.
- [34] B.R. Shah, Y. Li, W. Jin, Y. An, L. He, Zh. Li and W. Xu, *Food Hydrocol* **52** (2016) 369.