



Semnan University

Applied Chemistry Today

Journal homepage: <https://chemistry.semnan.ac.ir/>

ISSN: 2981-2437



Research Article

Synthesis and Characterization of Gemcitabine-Loaded Magnetic Solid Lipid Nanoparticles: Response Optimization and Modeling via Definitive Screening Designs

Aniseh Motamedifar^a, Hossein Ghafouri^{b,*}, Nina Alizadeh^a

^aDepartment of Chemistry, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran

^bDepartment of Biology, Faculty of Science, University of Guilan, Rasht, Iran

PAPER INFO

Article history:

Received: 03/Dec/2023

Revised: 15/Jan/2024

Accepted: 28/Jan/2024

Keywords:

Gemcitabine, Solid lipid nanoparticles, Cancer, Magnetic nanoparticles, Definitive screening designs

ABSTRACT

Gemcitabine hydrochloride (Gem HCl) is an effective anticancer agent used to treat a wide variety of solid tumors, however, Gem's rapid metabolism and systemic instability (short half-life) limit its clinical effectiveness. This study aims to prepare Gemcitabine-loaded magnetic solid lipid nanoparticles (Gem-MSLNs) for improved therapeutic effectiveness and minimize undesirable side effects. Gem-MSLNs were prepared by emulsification and solvent evaporation process. A definitive screening design was employed to optimize the formulation for Gem-MSLNs. Drug entrapment efficiency, zeta potential, and particle size of Gem-MSLNs were investigated as responses. The optimized Gem-MSLNs were characterized and evaluated. The optimal formulation for Gem-MSLNs had an entrapment efficiency of $21.10 \pm 2.12\%$, particle diameter around 96.50 ± 4.36 nm with a narrow size distribution, and a zeta potential of $+72.1 \pm 0.3$ mV. These results indicate good colloidal stability of the Gem-MSLNs in an aqueous environment, which avoids aggregation during the experiments. Therefore, Gem-MSLNs are a promising multifunctional nanocarrier that can be used for future therapeutic applications.

DOI: <https://doi.org/10.22075/chem.2024.32534.2230>

© 2024 Semnan University.

This is an open access article under the CC-BY-SA 4.0 license. (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>)

*.Corresponding author: Assistant Professor of of Biology. E-mail address: hosein.ghafouri@gmail.com

How to cite this article: Motamedifar, A., Ghafouri, H., & Alizadeh, N. (2024). Synthesis and Characterization of Gemcitabine-Loaded Magnetic Solid Lipid Nanoparticles: Response Optimization and Modeling via Definitive Screening Designs. *Applied Chemistry Today*, 19(71), 303-330. (in Persian)

سنتز و مشخصه‌یابی نانوذرات لیپیدی جامد مغناطیسی بارگذاری شده با جمسیتابین:

بهینه‌سازی پاسخ و مدل‌سازی با طراحی غربالگری قطعی

انیسه معتمدی فر^۱، حسین غفوری^{۲*}، نینا علیزاده^۱

^۱گروه شیمی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

^۲گروه زیست‌شناسی، دانشکده علوم پایه، دانشگاه گیلان، رشت، ایران

اطلاعات مقاله	چکیده
دریافت مقاله: ۱۴۰۲/۰۹/۱۲	جمسیتابین هیدروکلرید (Gem HCl) یک عامل ضد سرطان موثر است که برای درمان طیف گسترده‌ای از توده‌های جامد استفاده می‌شود، با این حال متابولیسم سریع و ناپایداری سیستمیک جمسیتابین (نیمه عمر کوتاه) اثربخشی بالینی آن را محدود می‌کند. هدف این مطالعه تهیه نانوذرات لیپیدی جامد مغناطیسی بارگذاری شده با جمسیتابین (Gem-MSLNs) برای بهبود اثربخشی درمانی و حداقل رساندن اثرات جانبی نامطلوب است. Gem-MSLNs به روش امولسیون‌سازی و تبخیر حلال تهیه شده‌اند. یک طراحی غربالگری قطعی برای بهینه‌سازی فرمولاسیون Gem-MSLNs استفاده شده است. بازه به دام افتادن دارو، پتانسیل زتا و اندازه ذرات Gem-MSLNs به عنوان پاسخ مورد بررسی قرار گرفت. Gem-MSLNs بهینه شده مشخصه‌یابی و ارزیابی شدند. فرمولاسیون بهینه Gem-MSLNs بازه دارویی به دام افتاده $21/10 \pm 2/12\%$ ، قطر ذرات حدود $4/36 \pm 96/50$ nm با توزیع سایز باریک و پتانسیل زتا $0/3 \pm 72/1$ mV دارند. این نتایج پایداری کلوتیدی خوب Gem-MSLNs را در محیط آبی نشان می‌دهد که در طی آزمایش‌ها از تجمع جلوگیری می‌کند. بنابراین Gem-MSLNs یک نانو‌حامل چندمنظوره امیدوارکننده هستند که می‌توانند برای کاربردهای درمانی آینده مورد استفاده قرار گیرند.
بازنگری مقاله: ۱۴۰۲/۱۰/۲۵	
پذیرش مقاله: ۱۴۰۲/۱۱/۰۸	
کلمات کلیدی:	
جمسیتابین، نانوذرات لیپیدی جامد، سرطان، نانوذرات مغناطیسی، طراحی غربالگری قطعی.	

DOI: <https://doi.org/10.22075/chem.2024.32534.2230>

This is an open access article under the CC-BY-SA 4.0 license. (<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>)

۱- مقدمه

دارو جمسیتابین با نام شیمیایی ۲، ۲' دی فلوئورو ۲-دئوکسی سیتیدین^۱ یا ۱- (۲-اکسو-۴-آمینو-۱، ۲-دی هیدروپیریمیدین-۱-یل)-۲-دئوکسی-۲،۲-دیفلوئورریبوس هیدروکلرید^۲ نامیده می‌شود [۱]، جمسیتابین یک داروی شیمی درمانی ضد سرطان و جزء دسته‌بندی ضد متابولیت می‌باشد. این دارو اولین بار در سال ۱۹۹۶ توسط سازمان غذا و دارو ایالات متحده (FDA) مورد تایید قرار گرفت [۲]. جمسیتابین به صورت جداگانه یا در ترکیب با مولکول‌های ضد سرطان دیگر در درمان انواع مختلف تومورهای بدخیم از جمله سرطان‌های روده بزرگ، لوزالمعده، ریه، سر و گردن، تخمدان، مثانه، سینه، تیروئید و مغز استخوان مورد استفاده قرار می‌گیرد [۳ و ۴]. پارامترهای فارماکوکینتیک^۳ نامطلوب جمسیتابین به عنوان

^a 2', 2'-difluoro-2'-deoxycytidine

^b 1-(2-oxo-4-amino-1,2-dihydropyrimidin-1-yl)-2-deoxy-2,2-difluororibose hydrochloride

^c Pharmacokinetics

محدودیتی برای کاربردهای دارویی آن عمل می‌کند. سه مشکل اساسی در دارورسانی جمسیتابین وجود دارد که می‌توان به این موارد اشاره کرد: (۱) نیمه عمر کوتاه در پلاسما خون و متابولیسم سریع، (۲) سمیت غیر اختصاصی (۳) افزایش مقاومت دارویی و نفوذپذیری کم [۵].

نانوذرات لیپیدی جامد^d (SLNs) حامل^e‌های کلونیدی کروی شکل با سطح صاف و سایز زیرمیکرون هستند که از مواد زیست سازگار و زیست تخریب^f پذیر ساخته می‌شوند [۶-۸]. SLNs یک کاندید مناسب برای تحویل داروهای ضد سرطان آب‌گریز و آب دوست هستند. SLNs به دلیل اندازه نانو (۷۰۰-۱۰۰۰ nm) توانایی انتشار از رگ‌های خونی و تجمع در داخل تومور را دارند [۹]. معایبی که اغلب در داروهای ضد سرطان وجود دارد همانند اثر سمیت بر بافت سالم، پایداری ضعیف، افزایش مقاومت دارویی می‌تواند به وسیله سیستم دارورسانی SLNs رفع شوند و علاوه بر این سبب تنظیم سنتیک رهش، افزایش زمان گردش در خون و به طور کلی افزایش اثربخشی درمانی داروهای ضد سرطان می‌شوند [۱۰-۱۲].

در سال‌های اخیر یک نوع جدید سیستم دارورسانی هدفمند شامل نانوذرات مغناطیسی به دلیل کاربرد موثر در درمان سرطان مورد توجه قرار گرفته است. هدفمندی مغناطیسی دارو به وسیله بارگذاری نانوذرات سوپر پارامغناطیس اکسید آهن (SPIONS) درون نانوذرات لیپیدی جامد یک استراتژی امیدوارکننده برای آزادسازی کنترل شده دارو در محل تومور، کاهش سمیت سیستمیک و کاهش دوز دارو می‌باشد. علاوه بر این با توجه به خواص SPIONS، نانوذرات لیپیدی جامد مغناطیسی می‌توانند در گرما درمانی^g و ردیابی غیرتهاجمی با تصویر برداری رزونانس مغناطیسی (MRI) مورد استفاده قرار گیرند [۱۲-۱۴].

مطالعات زیادی به منظور بهینه‌سازی فرمولاسیون، شرایط فرآیند، تاثیر فاکتورها و برهمکنش‌های آن‌ها بر ویژگی‌های محصول براساس کاربرد روش سطح پاسخ^h (RSM) انجام شده است [۱۵-۲۱]. در سال ۲۰۱۱ یک طراحی غربالگری جدید آزمایش به نام طراحی غربالگری قطعیⁱ (DSD) توسط جونز^h و ناچشیمⁱ معرفی شد که از آن زمان تاکنون در زمینه‌های متنوعی به کار رفته است. مزایای اصلی DSD در مقایسه با طرح‌های غربالگری سنتی این است که می‌توان با تعداد کمی اجرا (آزمایش) اطلاعات مفیدی در مورد فاکتورهای موثر و برهمکنش‌های بین آنها بدست آورد. بیشتر طراحی‌های غربالگری هر فاکتور را تنها به دو سطح محدود می‌کنند در حالی که DSD برای هر فاکتور سه سطح دارد که امکان ارزیابی غیرخطی در رابطه فاکتور-پاسخ فراهم می‌کند. به طور کلی طراحی DSD خواص مطلوب بسیاری دارد که آن را به عنوان گزینه مناسب نسبت به دیگر طراحی‌های غربالگری تبدیل می‌کند [۲۳ و ۲۲].

^d Solid lipid nanoparticles (SLNs)

^e Hyperthermia

^f Response surface methodology (RSM)

^g Definitive Screening Design (DSD)

^h Jones

ⁱ Nachtsheim

در این تحقیق به منظور بهبود اثربخشی دارو ضد سرطان جمسیتابین هیدروکلرید و هدفمندی دارورسانی آن برای اولین بار دارو جمسیتابین هیدروکلرید و نانوذرات سوپر پارامغناطیس درون نانوذرات لیپیدی جامد بارگذاری شده‌اند و یک نانوحامل Gem-MSLNs سنتز شده است. برای دستیابی به فرمولاسیون بهینه Gem-MSLNs و تاثیر فاکتورهای متغییر بر ویژگی‌های نانوحامل از نظر بازده به دام افتادن دارو و پتانسیل زتا و میانگین سایز نانوذرات از یک طراحی غربالگری جدید آزمایش (DSD) با استفاده از نرم افزار Design Expert 12 به کار گرفته شده است. در نهایت Gem-MSLNs با فرمولاسیون بهینه از نظر بازده داروی به دام افتاده و پتانسیل زتا و سایز و آنالیز طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه مورد ارزیابی و تایید قرار گرفتند.

۲- بخش تجربی

۲-۱- مواد شیمیایی

مواد شیمیایی مورد استفاده در این مطالعه عبارتند از: جمسیتابین هیدروکلرید (Gem HCl) با خلوص ۹۹/۶٪ از شرکت شیلپا مدیکر لیمیتد^۱، گلیسرول مونواستراتات (GMS) از شرکت آلفا، لیسیتین سویا (PC) از شرکت سروا، توئین ۸۰ (TW80)، فریک کلرید ۶ آبه (FeCl₃.6H₂O)، فروس سولفات ۷ آبه (FeSO₄.7H₂O)، اکتادسیل آمین (ODA)، هگزا دسیل تری متیل آمونیوم برماید (CTAB) از شرکت مرک و آلفا-توکوفرول (α-Tp) با خلوص ۹۶٪> از شرکت سیگما آلدریچ خریداری شدند. همچنین کلروفرم (۹۹٪) از شرکت مرک، اتانول (۹۶٪) و آمونیاک (۲۵٪) از شرکت دکتر مجللی خریداری شدند.

۲-۲- دستگاه‌ها

پتانسیل زتا با استفاده از دستگاه ZETA-check مدل microtrac و سایز و توزیع سایز نانوذرات لیپیدی جامد به وسیله دستگاه پراکندگی دینامیکی نور (DLS) مدل Micro Trac-Nano Flex اندازه گیری شد. طیف سنج فرابنفش-مرئی (UV-Vis) مدل Biochrom WPA Biowave II برای اندازه‌گیری جذب محلول‌ها و ثبت طیف‌های جذبی و دستگاه طیف سنج مادون قرمز تبدیل فوریه (FT-IR) مدل JASCO 4700 مجهز به ATR جهت بررسی ساختار و شناسایی گروه‌های عاملی ترکیبات مورد استفاده قرار گرفت. سانتریفیوژ یخچال دار شرکت ارمن طب ایرانیان، دستگاه التراسونیک پروب دار Misonix Sonicator 3000 مدل S-3000-010، آون آزمایشگاهی ساخت شرکت شیماز، هات پلیت و همزن آلفا مدل HS-860 در فرآیند سنتز نانوذرات استفاده شده است. فریزر با دمای بسیار پایین مدل Eppendorf Newburn-u410 و دستگاه خشک کن انجمادی مدل CHRIST Alpha 1-2 LDplus جهت خشک کردن نانوذرات لیپیدی جامد مورد استفاده قرار گرفت.

^۱ Shilpa medicare limited

۲-۳- روش‌های سنتز

۲-۳-۱- سنتز نانوذرات سوپرپارامغناطیسی اکسید آهن (Fe_3O_4)

برای تهیه نانوذرات مغناطیسی Fe_3O_4 از نمک‌های آهن (II) و آهن (III) با نسبت مولی ۱:۲ به روش هم رسوبی استفاده شد. ابتدا ۳۲۴۴ میلی گرم نمک فریک کلرید ۶ آبه و ۱۶۸۸ میلی گرم نمک فروس سولفات ۷ آبه هر کدام جداگانه در ۲۰ میلی لیتر آب دوبار تقطیر حل گردید. نمک‌های آهن در یک ظرف مخلوط شدند و به منظور حذف اکسیژن محلول در آب تحت گاز بی اثر نیتروژن اکسیژن زدایی شد. این محتویات در محدوده دمای $85^{\circ}C - 80^{\circ}C$ به وسیله همزن مغناطیسی همزده شد و سپس قطره قطره محلول آمونیاک به مدت ۴۰ دقیقه به ظرف واکنش اضافه گردید. در این شرایط رسوب نانوذرات مغناطیسی سیاه رنگ تشکیل شد. سپس هم‌زدن مخلوط واکنش به مدت ۳۰ دقیقه برای پایان واکنش ادامه یافت. بعد از سرد شدن و ته نشینی رسوب نانوذرات به وسیله میدان مغناطیسی خارجی جداسازی شد. رسوب بدست آمده چندین بار با آب مقطر شست‌وشو داده تا به pH حدود ۷ برسد. در نهایت رسوب سه مرتبه با اتانول شست‌وشو داده شد و به وسیله آون در دمای $50^{\circ}C$ خشک گردید [۲۴ و ۲۵].

۲-۳-۲- نانوذرات لیپیدی جامد (SLNs) و نانوذرات لیپیدی جامد مغناطیسی بارگذاری شده با جمسیتابین هیدروکلرید (Gem-MSLNs)

نانوذرات لیپیدی جامد مغناطیسی بارگذاری شده با جمسیتابین هیدروکلرید (Gem-MSLNs) با استفاده از روش امولسیون‌سازی و تبخیر حلال تهیه شد. برای بدست آمدن فاز چربی در حلال آلی، گلیسرول مونواسترات (۵۰-۱۰۰ mg)، اکتادسیل آمین (۵۰-۱۰۰ mg)، (۳۰-۵۰ mg) لیسیتین سویا/آلفا-توکوفرول (۱:۱) و هگزا دسیل تری متیل آمونیوم برماید (۷۰-۲۰ mg) و در ۵ میلی لیتر کلروفرم حل شد. سپس نانوذرات Fe_3O_4 (Fe_3O_4 : کل لیپید، ۱:۱۳) پراکنده شده در ۲/۵ میلی لیتر کلروفرم به فاز آلی اضافه می‌شود. فاز آبی حاوی (۱/۵-۱/۳) توئین ۸۰ و (۱۰-۲۰ mg) جمسیتابین هیدروکلرید در ۱۵ میلی لیتر آب دوبار تقطیر تهیه شد. فاز چربی قطره قطره با هم‌زدن آهسته به فاز آبی اضافه شد. سپس محتویات ظرف واکنش ۱۵ دقیقه تحت امواج فراصوت (پروپ التراسونیک) قرار گرفت. برای حذف کلروفرم باقی مانده نانوامولسیون‌های بدست آمده ۲/۵ ساعت به وسیله هم‌زن مغناطیسی هم‌زده شد. سپس به منظور جمع‌آوری SLNs، سوسپانسیون بدست آمده تحت سانتریفیوژ در دمای $4^{\circ}C$ با سرعت ۱۰۰۰۰ دور بر دقیقه به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت [۲۶-۲۸ و ۱۴].

SLNs مطابق روش تهیه Gem-MSLNs سنتز شد، با این تفاوت که فاز آلی آن فاقد Fe_3O_4 و فاز آبی بدون دارو تهیه شده است.

۴-۲- طراحی آزمایش

طراحی آزمایش به منظور بهینه سازی فرمولاسیون نانوذرات لیپیدی جامد مغناطیسی و بررسی تاثیر متغیرهای موثر و تعامل احتمالی آنها بر ویژگی های نانوذرات با هدف سنتز نانوذرات با عملکرد مورد نظر صورت گرفت. تاثیر شش فاکتور متغیر در سه سطح و به روش سطح پاسخ با طراحی غربالگری قطعی به وسیله نرم افزار Design-Expert 12 مورد مطالعه قرار گرفت. برای طراحی آزمایش متغیرهای موثر بر نانوذرات لیپیدی جامد مغناطیسی بارگذاری شده با دارو جمسیتابین هیدروکلرید شامل مقدار لیپیدهای گلیسرول مونواستئارات (GMS)، اکتادسیل آمین (ODA)، هگزا دسیل تری متیل آمونیوم برماید (CTAB) و مقادیر سورفاکتانت های توئین ۸۰ (TW80)، لیسیتین سوفا (PC) و همچنین دارو جمسیتابین هیدروکلرید (Gem HCl) می باشند که فاکتورهای متغیر مستقل نامیده می شوند و در ادامه به اختصار فاکتورهای متغیر ذکر می شوند. همچنین فاکتورهای متغیر وابسته نظیر سایز نانوذرات، پتانسیل زتا و بازده داروی به دام افتاده^۱ به عنوان پاسخ در نظر گرفته شدند. آزمایش های اولیه برای تعیین مقادیر مناسب سطوح پایین و بالا فاکتورهای متغیر و مقادیر فاکتورهای ثابت انجام شد. همچنین مقدار نانوذرات Fe_3O_4 افزوده شده به سامانه برای بارگذاری در نانوذرات لیپیدی نسبت به کل مقدار لیپید با نسبت وزنی ثابت ۱۳:۱ و نسبت وزنی ۱:۱ برای لیسیتین سوفا و آلفا-توکوفرول منظور گردید. فاکتورهای متغیر در نظر گرفته شده در طراحی آزمایش و سطوح آنها در جدول ۱ ذکر شده است.

جدول ۱. فاکتورهای متغیر در نظر گرفته شده در طراحی آزمایش و سطوح آنها

Factor	Name	Units	Type	Low	High
A	GMS	mg	Numeric	50	100
B	ODA	mg	Numeric	50	100
C	PC	mg	Numeric	35	50
D	CTAB	mg	Numeric	20	70
E	TW80	g/mL (%)	Numeric	1.5	3
F	Gem HCl	mg	Numeric	10	20

۴-۵- مشخصه یابی نانوذرات

۴-۵-۱- سایز و پتانسیل زتا نانوذرات

سایز و پتانسیل زتا نانوذرات لیپیدی جامد پراکنده شده در آب دوبار تقطیر در دمای اتاق به ترتیب با استفاده از دستگاه پراکندگی دینامیکی نور (DLS) و دستگاه پتانسیل زتا اندازه گیری شد.

۴-۵-۲- طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوری

طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوری بازتاب کلی تضعیف شده (ATR-FTIR) به منظور شناسایی گروه های عاملی و

^k Entrapment efficiency

همچنین برهمکنش بین Fe_3O_4 و ماتریکس لیپیدی و به عنوان تکنیک تکمیلی برای تایید حضور Fe_3O_4 درون نانوذرات لیپیدی جامد مورد استفاده قرار گرفت. طیف‌ها در محدوده $4000-475\text{ cm}^{-1}$ با قدرت تفکیک 2 cm^{-1} ثبت شدند.

۲-۵-۳- تعیین بازده داروی به دام افتاده (%EE)

مقدار دارو به دام افتاده در نانوذرات از طریق تعیین غلظت دارو آزاد در مایع شناور بر روی رسوب نانوذرات، بعد از مراحل سانتریفیوژ و رقیق سازی با استفاده از طیف سنج فرابنفش-مرئی در 269 nm تعیین شد. بازده دارو به دام افتاده با استفاده از فرمول (۱) محاسبه شده است [۲۹]:

$$\%EE = \frac{W_t - W_f}{W_t} \times 100 \quad (1)$$

که W_t مقدار کل دارو و W_f مقدار داروی آزاد می‌باشد.

۳-۳- بحث و نتیجه گیری

۳-۱- طراحی آزمایش: تجزیه و تحلیل نتایج

هدف از طراحی آزمایش دستیابی به فرمولاسیون بهینه نانوذرات از لحاظ سایز و پتانسیل زتا و مقادیر بازده داروی به دام افتاده می‌باشد. به طور کلی در این طراحی آزمایش به ازای ۶ فاکتور متغییر، ۱۳ اجرا که ترتیب تصادفی شده آزمایش هاست طراحی و انجام شده است. طراحی آزمایش DSD با مقادیر فاکتورهای متغییر و پاسخ‌های بدست آمده از آن‌ها در جدول ۲ گزارش شده است.

جدول ۲. طراحی آزمایش DSD با مقادیر فاکتورهای متغییر و میانگین پاسخ‌های بدست آمده

Run	Factor 1 A: GMS (mg)	Factor 2 B: ODA (mg)	Factor 3 C: PC (mg)	Factor 4 D: CTAB (mg)	Factor 5 E: TW 80 (%)	Factor 6 F: Gem HCl (mg)	Response 1 Entrapment efficiency (%)	Response 2 Zeta potential (mV)	Response 3 Mean size (nm)
1	100	50	42.5	20	3	20	7.59	99.4	72.70
2	50	100	42.5	70	1.5	10	17.7	129.9	101.03
3	50	50	35	70	2.25	20	11.73	91.7	85.00
4	75	50	35	20	1.5	10	16.12	82.8	91.00
5	100	75	35	70	3	10	16.52	77.1	124.55
6	50	50	50	45	3	10	16.12	94.4	107.12
7	50	100	35	20	3	15	11.22	111.6	101.20
8	100	100	50	20	2.25	10	21.64	70.9	96.63
9	100	50	50	70	1.5	15	14.11	84.9	82.57
10	50	75	50	20	1.5	20	17.05	61.1	86.77
11	75	100	50	70	3	20	11.92	78.5	114.50
12	100	100	35	45	1.5	20	19.22	92.4	101.60
13	75	75	42.5	45	2.25	15	13.59	90.5	103.00

مطالعه پاسخ سطح با طراحی غربالگری قطعی با استفاده از داده‌های تجربی بدست آمده برای هر پاسخ با نرم افزار Design-Expert 12 انجام شد. برای تجزیه و تحلیل داده‌ها از شاخص p-value و مدل‌های پیش بینی برای پاسخ‌ها با استفاده از روش برازش دو مرحله‌ای یا مدل سازی گام به گام ساخته شدند.

۳-۱-۱- اثر فاکتورهای مورد بررسی بر بازده داروی به دام افتاده (%EE)

به منظور ایجاد یک مدل ریاضی مناسب برای پاسخ بازده داروی به دام افتاده، داده‌های تجربی با یک معادله چند جمله‌ای درجه دوم کاهش یافته (معادله ۲) برازش شده‌اند. با توجه به جدول آنالیز واریانس (جدول ۳) مدل انتخابی با مقدار $20/09 = F\text{-value}$ مدلی معنادار است و تنها $0/1\%$ احتمال دارد که یک مقدار F-value به این بزرگی به دلیل نویز رخ دهد و مقدار p-value مدل $0/001$ بدست آمده که در سطح اطمینان 95% ، مقادیر p-value کمتر از $0/05$ نشان دهنده معنادار بودن مدل انتخابی می‌باشد.

همانطور که در جدول ۴ برازش آماری مدل انتخابی قابل مشاهده است، ضریب همبستگی (R^2) و ضریب همبستگی تعدیل شده (R^2_{Adj}) و ضریب همبستگی پیش‌بینی شده (R^2_{Pred}) به ترتیب $0/953$ ، $0/905$ ، $0/790$ می‌باشد. مقادیر بالا هر سه ضریب همبستگی نشان می‌دهد که معادله چند جمله‌ای بسیار مناسب با داده‌های تجربی برازش شده است یا به عبارت دیگر مطابقت بالای نتایج حاصل از مدل با نتایج آزمایشگاهی را نشان می‌دهد. تفاوت R^2_{Pred} با R^2_{Adj} کمتر از $0/2$ است و مطابقت منطقی در مورد قابلیت پیش بینی مدل وجود دارد. کفایت دقت^۱ نسبت سیگنال به نویز را اندازه گیری می‌کند که بزرگتر از ۴ است و نشان دهنده سیگنال کافی و کفایت مدل می‌باشد.

جدول ۳. آنالیز واریانس (ANOVA) ارائه شده توسط نرم افزار Design-Expert برای پاسخ بازده داروی به دام افتاده

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value
Model	162.27	6	27.05	20.09	0.0010 significant
A- GMS	2.77	1	2.77	2.05	0.2017
B- ODA	25.70	1	25.70	19.08	0.0047
E- TW 80	43.39	1	43.39	32.23	0.0013
F- Gem HCl	42.39	1	42.39	31.49	0.0014
AB	17.68	1	17.68	13.13	0.0110
EF	7.12	1	7.12	5.29	0.0612
Residual	8.08	6	1.35		
Cor Total	170.35	12			

^۱ Correlation coefficient

^m Adjusted R-Square

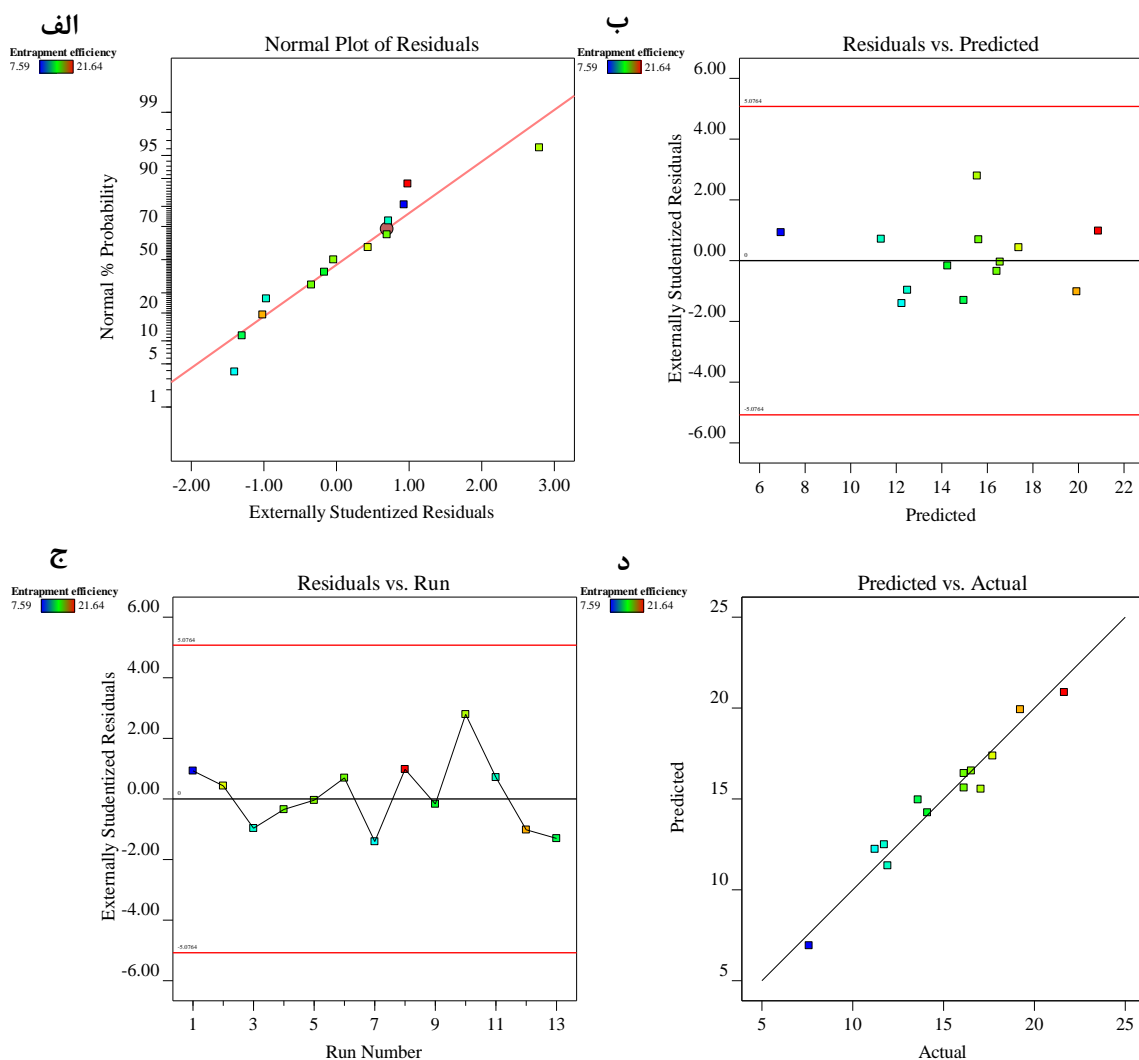
ⁿ Predicted R-Square

^o Adequate precision

جدول ۴. برازش آماری مدل برای پاسخ بازده داروی به دام افتاده

Std. Dev.	1.16	R ²	0.9526
Mean	14.96	Adjusted R ²	0.9052
C.V. %	7.75	Predicted R ²	0.7895
		Adeq Precision	16.3595

ابزار تشخیصی گرافیکی برای تجزیه و تحلیل کفایت مدل همچون نمودار توزیع نرمال باقی مانده، نمودار باقی مانده برحسب مقادیر پیش‌بینی شده، نمودار باقی مانده برحسب اجرا و همچنین نمودار مقادیر پیش‌بینی شده برحسب مقادیر واقعی در شکل ۱ مورد بررسی قرار گرفتند. نمودار توزیع نرمال باقی مانده (شکل ۱. الف) نشان می‌دهد که باقی مانده‌ها در نزدیکی خط برازش شده نرم افزار قرار دارند و توزیع باقی مانده‌ها نرمال می‌باشد و همبستگی بین فاکتورهای متغیر در نظر گرفته شده و پاسخ موردنظر و همچنین مناسب بودن مدل را نشان می‌دهد. در نمودار باقی مانده برحسب مقادیر پیش‌بینی شده (شکل ۱. ب)، باقی مانده‌ها توزیع پراکنده در اطراف صفر دارند و از الگو خاصی پیروی نمی‌کنند و فرض میانگین صفر باقی مانده و ثابت بودن واریانس برقرار می‌باشد. نمودار باقی مانده برحسب اجرا (شکل ۱. ج)، استقلال باقی مانده‌ها از زمان و ترتیب اجرا را بررسی می‌کند که در اینجا نقاط باقی مانده‌ها بر حسب شماره اجرا از الگو خاصی پیروی نمی‌کند که نشان دهنده استقلال باقی مانده‌ها از زمان و ترتیب انجام اجراست. در نمودار (شکل ۱. د) مقادیر پیش‌بینی شده برحسب مقادیر واقعی مقایسه شده است که ضریب همبستگی بالایی بین نتایج تجربی بدست آمده و مقادیر پیش‌بینی شده را نشان می‌دهد.



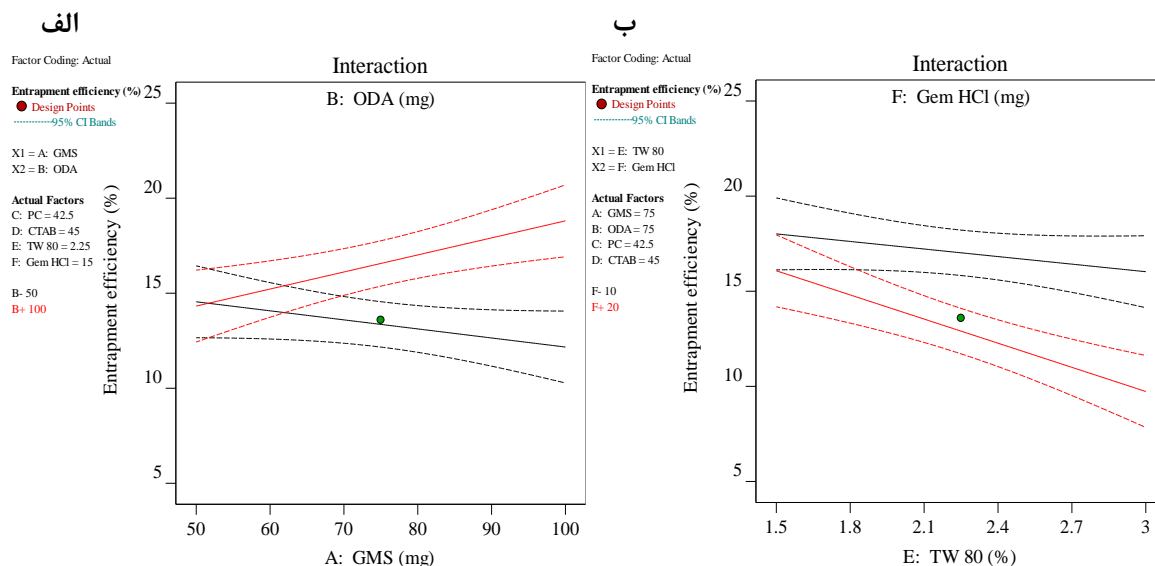
شکل ۱. نمودارهای تشخیصی گرافیکی برای کفایت مدل برای پاسخ بازده داروی به دام افتاده: نمودار توزیع نرمال باقی مانده (الف)، نمودار باقی مانده برحسب مقادیر پیش‌بینی شده (ب)، نمودار باقی مانده برحسب اجرا (ج) و نمودار مقادیر پیش‌بینی شده برحسب مقادیر واقعی (د)

معادله چند جمله‌ای زیر که برحسب ترم‌های کدگذاری شده از داده‌های طراحی آزمایش بدست آمده، ارتباط بین فاکتورهای متغیر بر بازده داروی به دام افتاده را نشان می‌دهد.

$$\text{Entrapment efficiency} = +14.96 + 0.5260A + 1.60B - 2.08E - 2.06F + 1.72AB - 1.09 EF \quad (2)$$

مقادیر AB، EF به ترتیب برهمکنش گلیسرول مونواستراتات و اکتادسیل آمین و برهمکنش توئین ۸۰ و دارو جمسیتابین هیدروکلرید می‌باشد. مقادیر ODA، TW80، Gem HCl و برهمکنش دوتایی GMS و ODA با توجه به جدول آنالیز واریانس ۳ فاکتورهای معنادار ($p\text{-value} < 0.05$) و موثر بر بازده داروی به دام افتاده می‌باشند. در این معادله برهمکنش TW80 و Gem HCl با مقدار $p\text{-value} = 0.06$ با تاثیر ناچیز و فاکتور GMS علیرغم عدم معناداری به دلیل برهمکنش دوتایی GMS و ODA و همچنین اثراتی که بر تنظیم فاکتور دیگر دارند در معادله گنجانده شده و یک فرم چند جمله‌ای سلسله مراتبی

مناسب را ایجاد می‌کند. در بررسی تاثیر فاکتورهای معنا دار بر پاسخ، فاکتورهای GMS و ODA و همچنین TW80 و Gem HCl درگیر برهمکنش هستند بنابراین باید نمودارهای مربوط به برهمکنش‌ها را بررسی کرد. برهمکنش GMS و ODA دارای ضریب $+1/72$ است و تاثیر مثبت بر بازده داروی به دام افتاده دارد که با توجه به نمودار برهمکنش GMS و ODA (شکل ۲. الف) اگر مقدار لیپیدهای GMS و ODA هر دو در بالاترین سطح باشد بیشترین %EE بدست می‌آید. در واقع مقادیر ماتریکس لیپیدی بالاتر به دلیل ایجاد فضای بیشتر برای آمیختن با دارو، سبب افزایش %EE می‌شوند [۳۰]. همچنین برهمکنش TW80 و Gem HCl اثر منفی بر پاسخ داشته است و نمودار برهمکنش TW80 و Gem HCl (شکل ۲. ب) نشان می‌دهد که در پایین ترین سطح TW80، اثر مقدار دارو کمتر معنادار است و به نظر می‌رسد که در پایین ترین سطح دارو با افزایش مقدار TW80 تفاوت معنا داری بر بازده داروی به دام افتاده نداشته و مقدار TW80 و Gem HCl در پایین ترین سطح خود بیشترین مقدار %EE مشاهده می‌شود.



شکل ۲. نمودارهای برهمکنش: اثر برهمکنش GMS و ODA (الف) و اثر برهمکنش TW80 و Gem HCl (ب) بر پاسخ بازده داروی به دام افتاده

۳-۱-۲- اثر فاکتورهای مورد بررسی بر پتانسیل زتا

پاسخ پتانسیل زتا بدست آمده از اجراهای طراحی آزمایش به وسیله نرم افزار مورد بررسی قرار گرفت و یک مدل درجه دوم کاهش یافته با داده‌های تجربی برازش شده است. همانطور که در جدول آنالیز واریانس ارائه شده برای پتانسیل زتا قابل مشاهده است (جدول ۵)، مدل انتخابی با مقدار $p\text{-value} = 0/0007$ و مقدار $F\text{-value} = 172/62$ مدلی معنادار است و تنها $0/07\%$ احتمال دارد که یک مقدار $F\text{-value}$ به این بزرگی به دلیل نویز باشد. برازش آماری مدل انتخابی (جدول ۶) ضریب همبستگی (R^2) و ضریب همبستگی تعدیل شده (R^2_{Adj}) و ضریب همبستگی پیش‌بینی شده (R^2_{Pred}) به ترتیب $0/998$ ، $0/992$ ، $0/942$

را نشان می‌دهد. مقادیر بالای ضرایب همبستگی و مطابقت مناسب R^2_{Pred} با R^2_{Adj} (اختلاف کمتر از ۰/۲) و همچنین مقدار کفایت دقت ۵۱/۰۹۷ نشان‌دهنده سیگنال کافی است و مدل انتخابی برای برازش داده‌های تجربی بسیار مناسب می‌باشد.

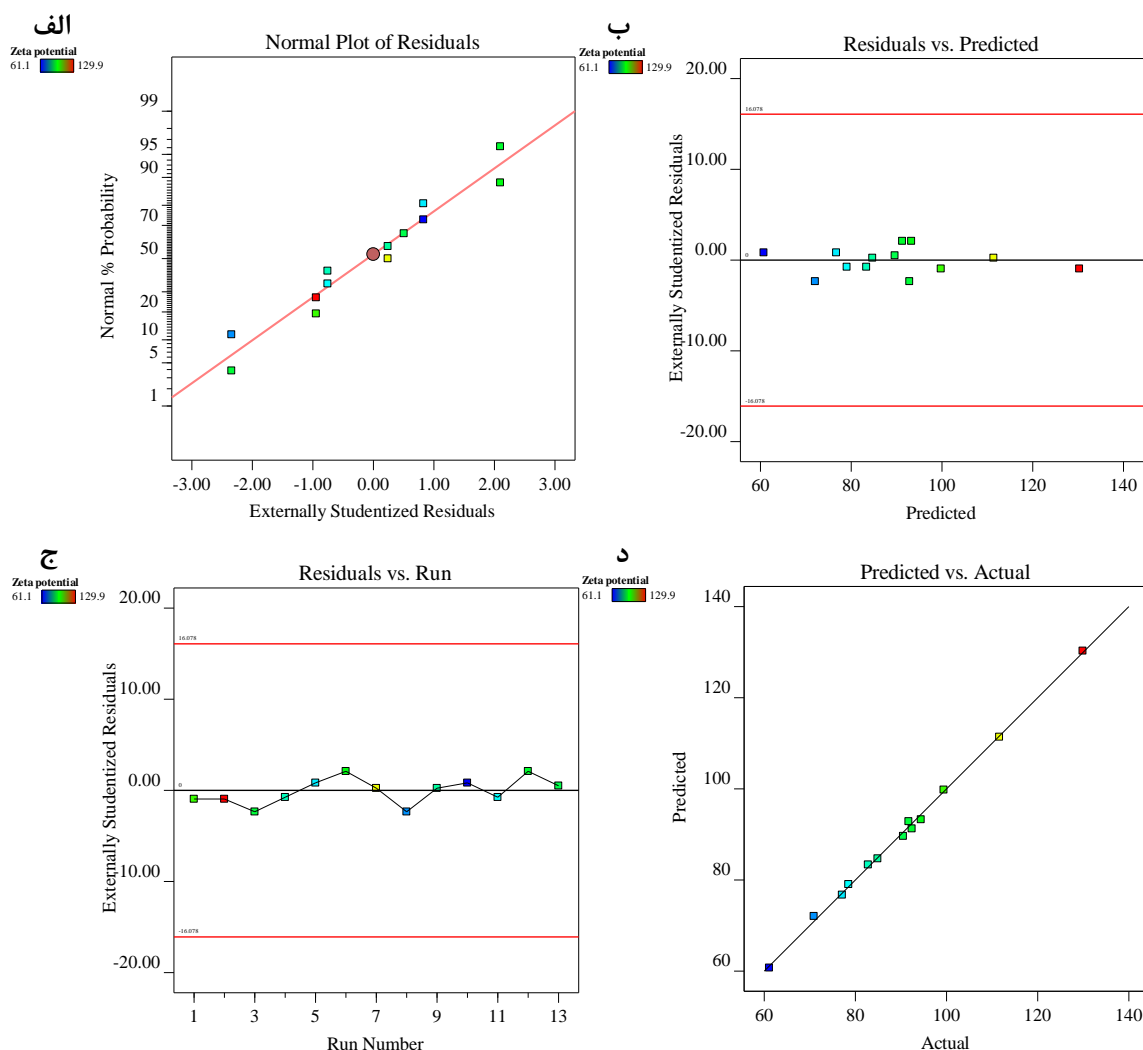
جدول ۵. آنالیز واریانس (ANOVA) ارائه شده توسط نرم افزار Design-Expert برای پاسخ پتانسیل زتا

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value
Model	3742.72	9	415.86	172.62	0.0007 significant
A- GMS	409.60	1	409.60	170.02	0.0010
B- ODA	90.60	1	90.60	37.61	0.0087
C- PC	432.96	1	432.96	179.72	0.0009
D- CTAB	131.77	1	131.77	54.70	0.0051
E- TW 80	9.80	1	9.80	4.07	0.1371
F- Gem HCl	102.40	1	102.40	42.51	0.0073
BD	301.92	1	301.92	125.33	0.0015
CE	41.16	1	41.16	17.09	0.0257
DE	2440.63	1	2440.63	1013.08	< 0.0001
Residual	7.23	3	2.41		
Cor Total	3749.95	12			

جدول ۶. برازش آماری مدل برای پاسخ پتانسیل زتا

Std. Dev.	1.55	R^2	0.9981
Mean	89.63	Adjusted R^2	0.9923
C.V. %	1.73	Predicted R^2	0.9424
		Adeq Precision	51.0971

نمودار توزیع نرمال باقی مانده (شکل ۳. الف)، نمودار باقی مانده برحسب مقادیر پیش‌بینی شده (شکل ۳. ب)، نمودار باقی مانده برحسب اجرا (شکل ۳. ج) و نیز نمودار مقادیر پیش‌بینی شده برحسب مقادیر واقعی (شکل ۳. د) به منظور کفایت مدل انتخابی بررسی شدند و مناسب بودن مدل انتخابی را نشان می‌دهند.



شکل ۳. نمودارهای تشخیصی گرافیکی برای کفایت مدل برای پاسخ پتانسیل زتا: نمودار توزیع نرمال باقی مانده (الف)، نمودار باقی مانده برحسب مقادیر پیش بینی شده (ب)، نمودار باقی مانده برحسب اجرا (ج) و نمودار مقادیر پیش بینی شده برحسب مقادیر واقعی (د)

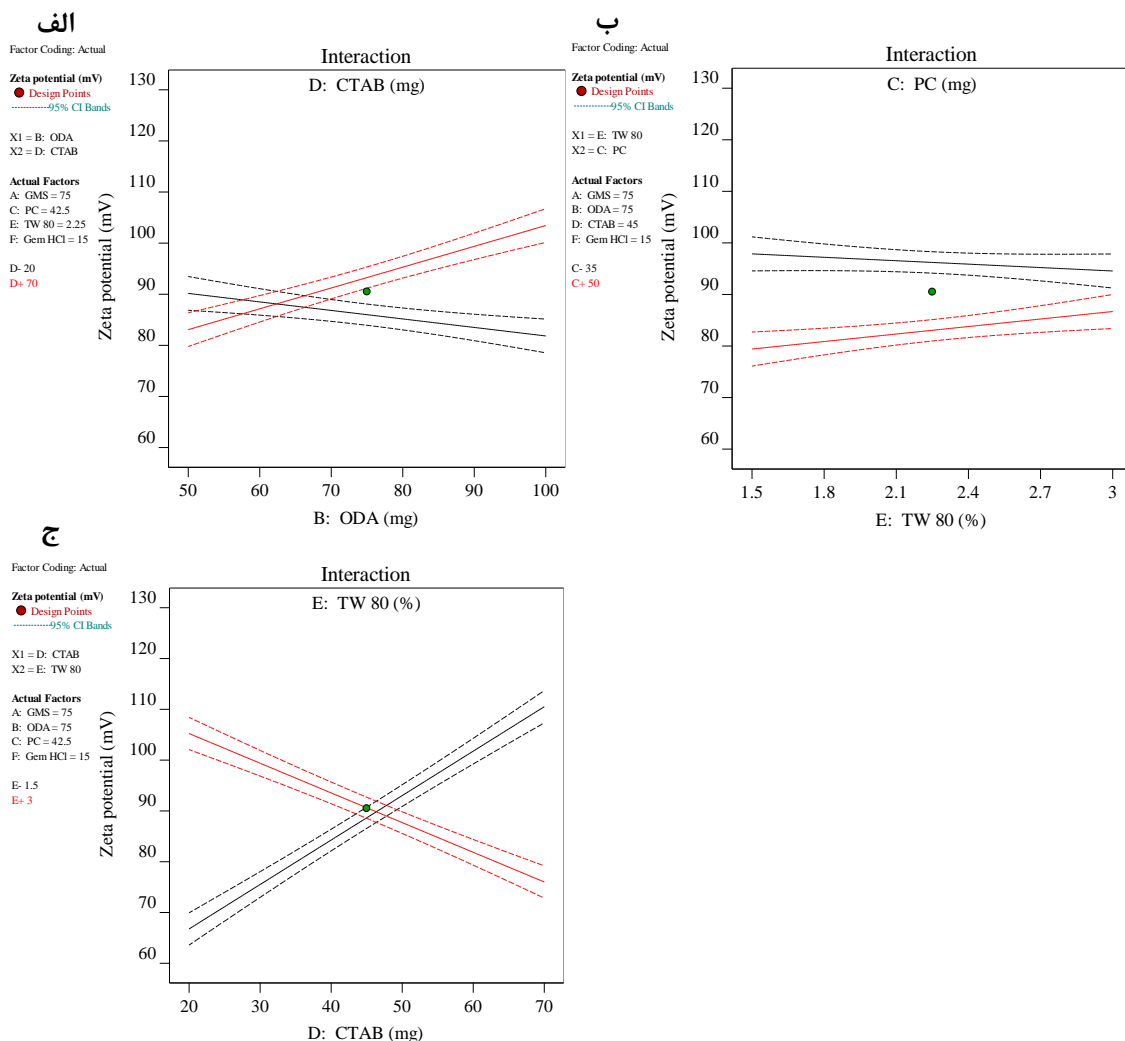
معادله درجه دوم کاهش یافته زیر تاثیر فاکتورهای متغییر بر پاسخ پتانسیل زتا را نشان می دهد.

$$\text{Zeta potential} = +89.63 - 6.40A + 3.01B - 6.58C + 3.63D + 0.99E - 3.20F + 7.17BD + 2.65CE - 18.24DE \quad (3)$$

مقادیر DE, CE, BD به ترتیب برهمکنش ODA و CTAB، برهمکنش PC و TW80، برهمکنش CTAB و TW80 و TW80 می باشد. با توجه به جدول آنالیز واریانس (جدول ۵)، فاکتور E معنادار نیست ($p\text{-value} > 0.1$) اما به علت معنادار بودن برهمکنش TW80 و PC و برهمکنش TW80 و CTAB در معادله گنجانده شده و یک مدل سلسله مراتبی را تشکیل می دهد. با توجه به معادله ۳ و جدول ۶ و نمودارهای برهمکنش فاکتورها (شکل ۴) می توان نتیجه گرفت که افزایش مقدار GMS سبب کاهش پتانسیل زتا (کم مثبت تر شدن) نانوذرات می شود. همانطور که در شکل ۴ الف قابل مشاهده می باشد، در مقادیر بالا ODA و CTAB بیشترین مقدار پتانسیل زتا بدست می آید و نتایج بدست آمده با توجه به اینکه ODA دارای گروه های

عاملی آمینی و CTAB یک لیپید کاتیونی می باشد، قابل انتظار است [۳۱ و ۳۲]. طبق شکل ۴. ب پتانسیل زتا از برهمکنش بین PC و TW80 متاثر می شود و در پایین ترین سطح PC بیشترین مقادیر پتانسیل زتا بدست می آید که با افزایش درصد TW80 تفاوت معناداری در مقادیر پتانسیل زتا ایجاد نمی کند و در بالاترین سطح PC پتانسیل زتا کمترین مقدار را دارا است، به طور کلی وقتی مقادیر سورفاکتانت (PC و سورفاکتانت غیر یونی TW80) زیاد می شود، جذب مولکول های سورفاکتانت بر سطح نانوذرات سبب کاهش مقادیر پتانسیل زتا اندازه گیری شده می شود، به عبارت دیگر هنگامی که مولکول های سورفاکتانت بر سطح نانوذرات لیپیدی جامد جذب می شوند به جای دافعه الکترواستاتیک یک پایداری (ممانعت) فضایی ایجاد کرده و صفحه لغزشی[□] (جایی که پتانسیل زتا اندازه گیری می شود) را از سطح ذرات دور می کند و سبب کاهش مقدار پتانسیل زتا می شود [۳۳ و ۳۰-۳۱]. برهمکنش CTAB و TW80 (شکل ۴. ج) با داشتن بیشترین ضریب در معادله کد گذاری شده و کمترین مقدار p-value و بیشترین مقدار F-value، نسبت به بقیه فاکتورها و برهمکنش ها بیشترین تاثیر را بر پتانسیل زتا دارد. CTAB و TW80 در سطح پایین و بالا با هم تفاوت معنادار و اثرات متقابل دارند و همانطور که از شکل مشخص است، قرار گرفتن TW80 در پایین ترین سطح و با افزایش مقدار CTAB پتانسیل زتا افزایش می یابد [۳۲ و ۳۱]. در حضور مازاد TW80 به علت جذب سطحی روی سطح نانوذرات و اشباع شدگی سطح با TW80 سبب کاهش پتانسیل زتا می شود [۳۰].

[□] Slipping plane



شکل ۴. نمودارهای برهمکنش: اثر برهمکنش ODA و CTAB (الف) و اثر برهمکنش PC و TW80 (ب) اثر برهمکنش TW80 و CTAB (ج) بر پاسخ پتانسیل زتا

۳-۱-۳- اثر فاکتورهای مورد بررسی بر سایز ذرات

مطالعه پاسخ سطح داده‌های تجربی پاسخ سایز ذرات به منظور تعیین بهترین مدل صورت گرفت. آنالیز واریانس مدل (جدول ۷) نشان می‌دهد که مدل انتخابی با مقدار $p\text{-value} = 0/0006$ و $F\text{-value} = 34/10$ مدل معناداری است و یک مقدار $F\text{-value}$ به این بزرگی تنها ۰/۰۶٪ احتمال دارد که به سبب نویز بدست آمده باشد. برازش آماری مدل در جدول ۸ قابل مشاهده است و ضریب همبستگی (R^2) و ضریب همبستگی تعدیل شده (R^2_{Adj}) و ضریب همبستگی پیش‌بینی شده (R^2_{Pred}) به ترتیب ۰/۹۸۰، ۰/۹۵۱، ۰/۹۲۱ بدست آمده است. ضرایب همبستگی مقادیر بالایی دارند و تفاوت R^2_{Pred} با R^2_{Adj} کمتر از ۰/۲ است و توافق منطقی در مورد قابلیت پیش‌بینی مدل وجود دارد و همچنین مقدار کفایت دقت بیشتر از ۴ (سیگنال کافی) می‌باشد و در مجموع نشان دهنده برازش بسیار مناسب داده‌های تجربی با مدل انتخابی می‌باشد.

جدول ۷. آنالیز واریانس (ANOVA) ارائه شده توسط نرم افزار Design-Expert برای پاسخ سایز ذرات

Source	Sum of Squares	df	Mean Square	F-value	p-value
Model	2290.80	7	327.26	34.10	0.0006 significant
B- ODA	586.30	1	586.30	61.09	0.0005
C- PC	24.84	1	24.84	2.59	0.1686
D- CTAB	352.24	1	352.24	36.70	0.0018
E- TW 80	326.04	1	326.04	33.97	0.0021
F- Gem HCl	357.13	1	357.13	37.21	0.0017
BC	204.40	1	204.40	21.30	0.0058
DE	640.67	1	640.67	66.75	0.0004
Residual	47.99	5	9.60		
Cor Total	2338.79	12			

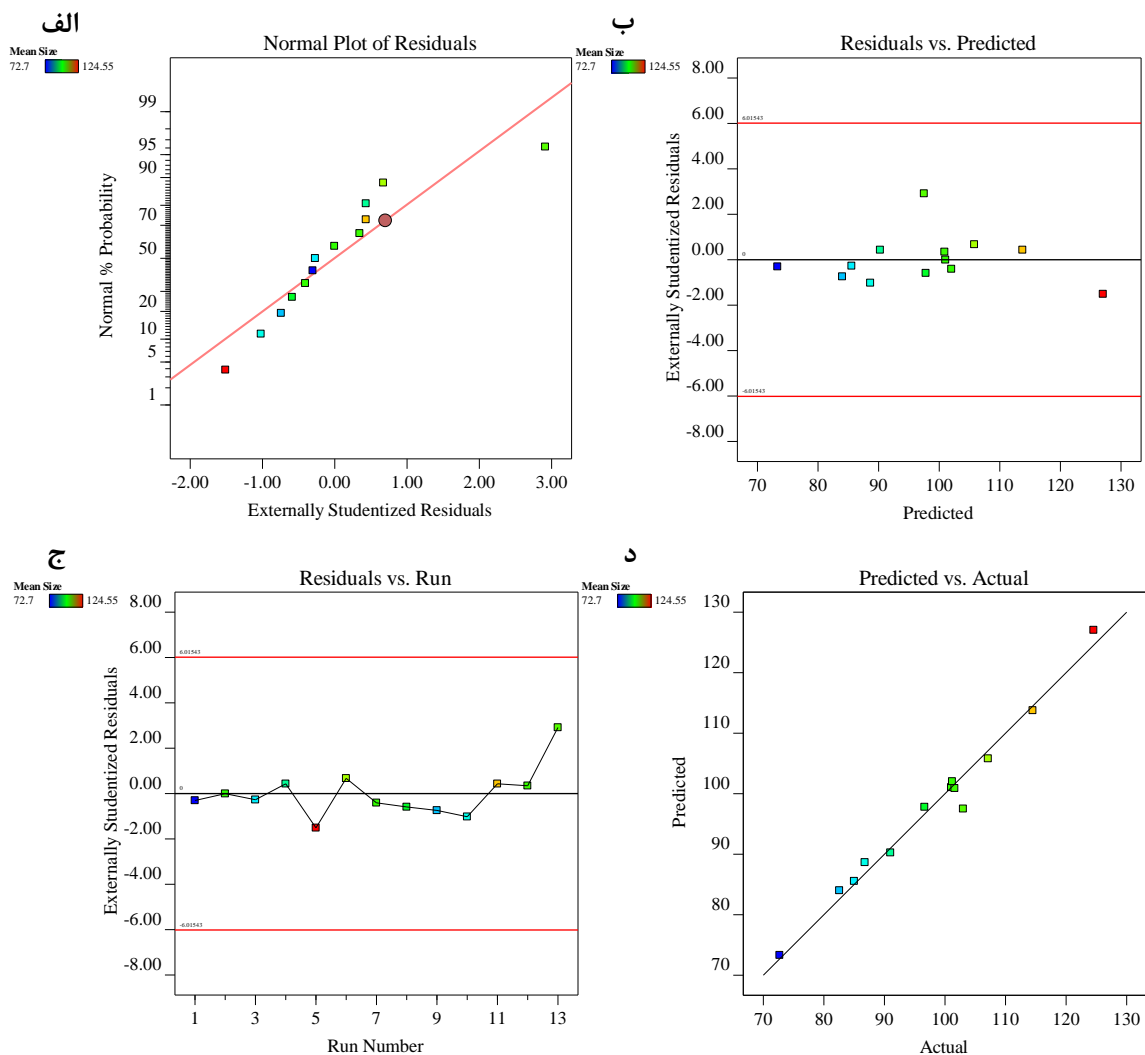
جدول ۸. برازش آماری مدل برای پاسخ سایز ذرات

Std. Dev.	3.10	R ²	0.9795
Mean	97.51	Adjusted R ²	0.9508
C.V. %	3.18	Predicted R ²	0.9213
		Adeq Precision	22.1050

کفایت مدل انتخابی با بررسی نمودار توزیع نرمال باقی مانده (شکل ۵. الف)، نمودار باقی مانده برحسب مقادیر پیش‌بینی شده

(شکل ۵. ب)، نمودار باقی مانده برحسب اجرا (شکل ۵. ج) و نیز نمودار مقادیر پیش‌بینی شده برحسب مقادیر واقعی (شکل ۵.

د) مورد تایید قرار گرفت.



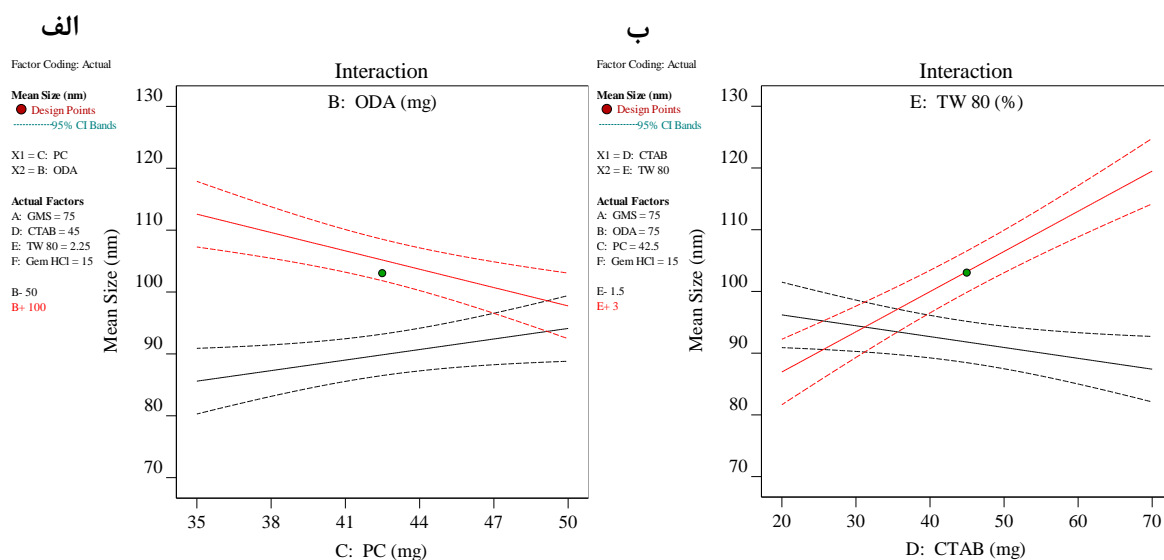
شکل ۵. نمودارهای تشخیصی گرافیکی برای کفایت مدل برای پاسخ سایز ذرات: نمودار توزیع نرمال باقی مانده (الف)، نمودار باقی مانده برحسب مقادیر پیش‌بینی شده (ب)، نمودار باقی مانده برحسب اجرا (ج) و نمودار مقادیر پیش‌بینی شده برحسب مقادیر واقعی (د)

معادله ۴ تاثیر فاکتورهای متغیر را بر پاسخ سایز ذرات نشان می‌دهد.

$$\text{Mean Size} = +97.51 + 7.66B - 1.58C + 5.94D + 5.71E - 5.98F - 5.84BC + 10.33DE \quad (4)$$

مقادیر BC, DE به ترتیب برهمکنش ODA و PC و برهمکنش CTAB و TW80 می‌باشد. فاکتور PC به تنهایی معنادار نبوده ولی به علت برهمکنش معنادار با ODA در معادله گنجانده شده است. با ملاحظه به معادله ۴ و جدول آنالیز واریانس مدل (جدول ۷) و نمودارهای برهمکنش فاکتورها (شکل ۶)، تاثیر برهمکنش‌ها بر سایز ذرات مورد بررسی قرار گرفت. همانطور که در شکل ۶ الف قابل مشاهده است هنگامی که ODA (لیپید) در بالاترین سطح و PC (سورفاکتانت) در پایین ترین سطح خود قرار دارد سایز ذرات در بالاترین حد قرار دارد و وقتی که ODA در بالاترین سطح باشد با افزایش PC سایز ذرات کاهش می‌یابد. در پایین ترین سطح ODA با افزایش PC سایز کم می‌آید، با توجه به مطالعات گذشته این تاثیرات را اینگونه می‌توان توضیح داد که افزایش مقدار لیپید سبب افزایش قطر ذرات می‌شود [۳۳-۳۴ و ۳۰] و PC به تشکیل یک

پهنه مرزی بزرگ روغن/آب کمک می‌کند که یک ناحیه بین سطحی اضافی فراهم می‌کند و در نتیجه منجر به ذرات کوچکتر می‌شود. با این حال هنگامی که شعاع انحنای به یک مقدار بحرانی برسد، به نظر نمی‌رسد که PC از نظر انرژی به کاهش بیشتر اندازه کمک کند و در غلظت‌های بیشتر PC و افزایش تحرک آن، بهم آمیختگی و تجمع رخ می‌دهد که سبب افزایش سایز ذرات می‌شود [۳۴ و ۳۰]. نمودار شکل ۶ نشان می‌دهد که بیشترین سایز ذرات هنگامی بدست می‌آید که مقدار TW80 و CTAB در بالاترین سطح خود قرار دارند و در مقدار پایین‌ترین سطح TW80 (۱/۵٪) با افزایش CTAB کاهش می‌یابد. که با توجه به اینکه CTAB یک لیپید کاتیونی است با افزایش پتانسیل زتا سبب ایجاد دافعه الکترواستاتیک و کاهش سایز ذرات می‌شود [۳۳] و همچنین افزایش TW80 به عنوان سورفاکتانت تا یک غلظت بهینه‌ای سایز ذرات را کاهش می‌دهد و سورفاکتانت مازاد سبب ویسکوزیته بالا و تاثیر بر امولسیون سازی در طی تهیه SLNs می‌شود که در نهایت منجر به تولید ذرات با سایزهای غیر یکنواخت می‌شود [۳۳-۳۴ و ۳۰].



شکل ۶. نمودارهای برهمکنش: اثر برهمکنش PC و ODA (الف) و اثر برهمکنش CTAB و TW80 (ب) بر پاسخ سایز ذرات

۳-۱-۴- بهینه‌سازی و اعتبارسنجی مدل

در این تحقیق مناسب بودن مدل‌های انتخابی برای پاسخ‌ها به وسیله آنالیز واریانس و برازش آماری مدل و بررسی نمودارهای تشخیصی گرافیکی مختلف مورد تایید قرار گرفت و به منظور بهینه سازی فرمولاسیون Gem-MSLNs محدوده مقادیر فاکتورهای متغییر و مقادیر پاسخ‌های هدف مطابق جدول ۹ تنظیم شده است. مقادیر پتانسیل زتا موردنظر به منظور پایداری کلئوئیدی نانوذرات انتخاب شده است، به طور کلی مقادیر بالا پتانسیل زتا به دلیل دافعه الکترواستاتیک سبب پایداری پراکندگی کلئوئیدی نانوذرات می‌شود و پتانسیل زتا بزرگتر از ± 60 mV برای پایداری فیزیکی عالی و ± 40 تا ± 60 mV برای پایداری فیزیکی خوب مورد نیاز است [۳۵-۳۸]. از آنجایی که به طور گستره اثبات شده است که نانوذرات برای کاربردهای داخل وریدی

باید اندازه‌هایی در محدوده ۱۰۰ تا ۳۰۰ nm داشته باشند [۳۹] و همچنین به دلیل گستره نانوسایز نانوذرات لیپیدی جامد سلول‌های سیستم رتیکولواندوتلیال قادر به جذب آن‌ها نیستند، بنابراین آن‌ها را قادر می‌سازد که تا از فیلتراسیون طحال و کبد عبور کند و در نتیجه می‌توانند نیمه عمر بیشتری در جریان خون داشته باشند [۳۵]. با توجه به این نکات میانگین سایز Gem-MSLNs به گونه‌ای طراحی شد که سایز نهایی نانوذرات سنتزی مناسب سیستم‌های دارورسانی باشد. بهینه‌سازی فاکتورهای متغییر با استفاده از تابع مطلوبیت به وسیله نرم افزار برای دستیابی به پاسخ‌های هدف مورد نظر بررسی شد. در نهایت مقادیر گلیسرول مونواستئارات ۹۹/۶۴ میلی گرم، اکتادسیل آمین ۹۹/۴۴ میلی گرم، هگزا دسیل تری متیل آمونیوم برماید ۲۴/۸۴ میلی گرم، ۲/۰۰ درصد توئین ۸۰، لیسیتین سویا ۴۹/۷۷ میلی گرم و جمسیتابین هیدروکلرید ۱۰/۰۱ میلی گرم به عنوان فرمولاسیون بهینه انتخاب شد. نمودارهای سطح پاسخ سه بعدی فرمولاسیون بهینه و اثر فاکتورهای متغییر بر پاسخ‌ها در شکل ۷ قابل مشاهده است.

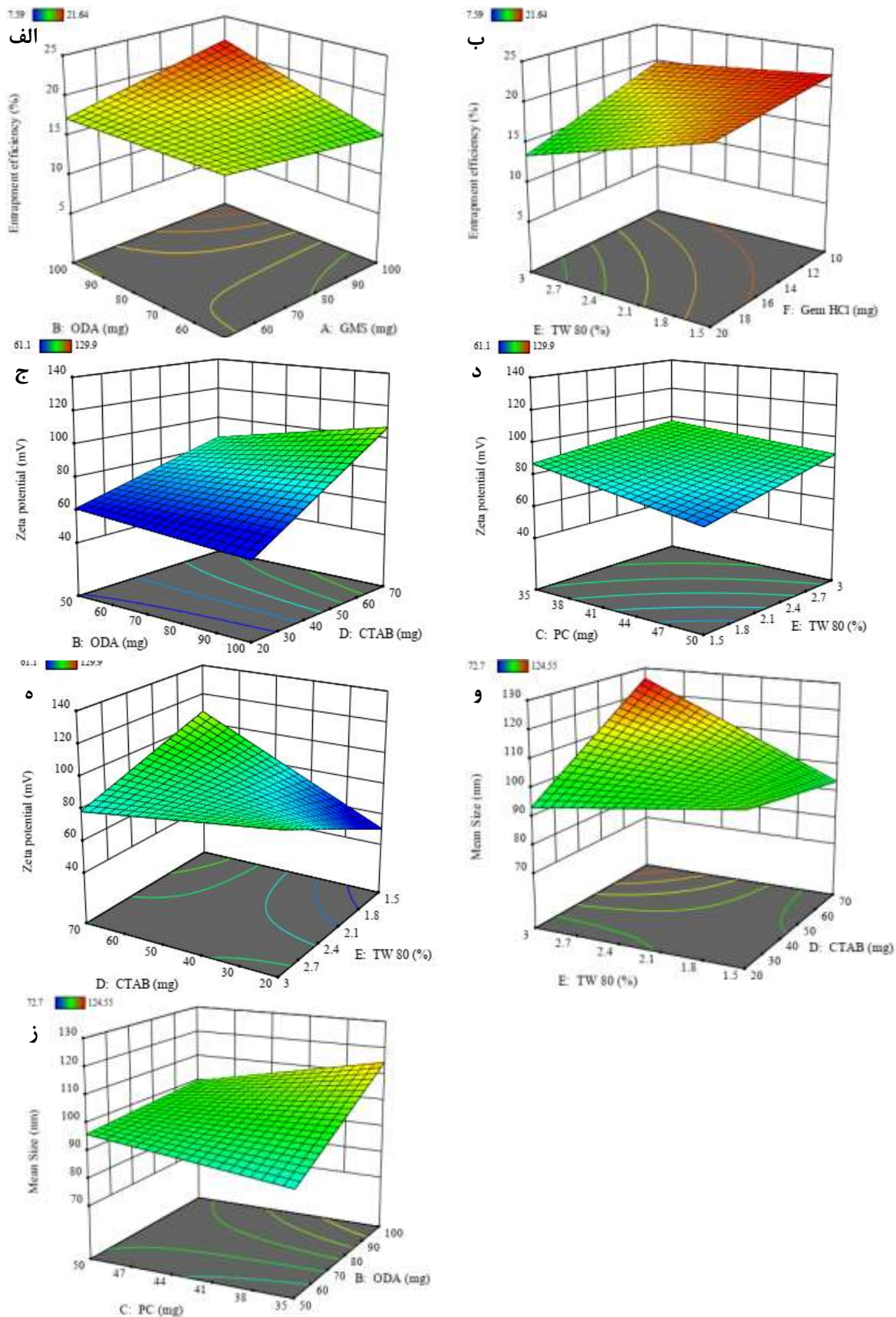
نانوذرات طبق مقادیر فرمولاسیون بهینه برای اعتبار سنجی مدل و تایید تکرار پذیری سه بار سنتز شدند. نتایج آزمایشگاهی بدست آمده در محدوده پیش بینی شده بوده است که مناسب بودن مدل توسعه یافته و تکرار پذیری مشخصات نانوذرات را نشان می‌دهد (جدول ۱۰).

جدول ۹. بهینه‌سازی فرمولاسیون توسط نرم افزار Design-Expert

Criteria	Limits		Goal	Importance
	Lower	Upper		
A: GMS (mg)	50	100	In range	+++
B: ODA (mg)	50	100	In range	+++
C: PC (mg)	35	50	In range	+++
D: CTAB (mg)	20	70	In range	+++
E: TW80 (%)	1.5	3	In range	+++
F: Gem HCl (mg)	10	20	In range	+++
Entrapment efficiency (%)	7.59	21.64	Maximize	+++
Zeta potential (mV)	61.1	129.9	Target = +70	+++
Mean size (nm)	72.7	124.55	Target = 100	+++

جدول ۱۰. مقادیر پاسخ‌های تخمین زده شده و مشاهده شده نانوذرات سنتز شده

پاسخ‌ها	مقادیر تخمین زده شده	مقادیر مشاهده شده
(%) بازده داروی به دام افتاده	۲۱/۶۴ ± ۱/۱۶	۲۱/۱۰ ± ۲/۱۲
(mV) پتانسیل زتا	۷۰/۰ ± ۱/۶	۷۲/۱ ± ۰/۳
(nm) میانگین سایز	۱۰۰/۰۰ ± ۳/۱۰	۹۶/۵۰ ± ۴/۳۶

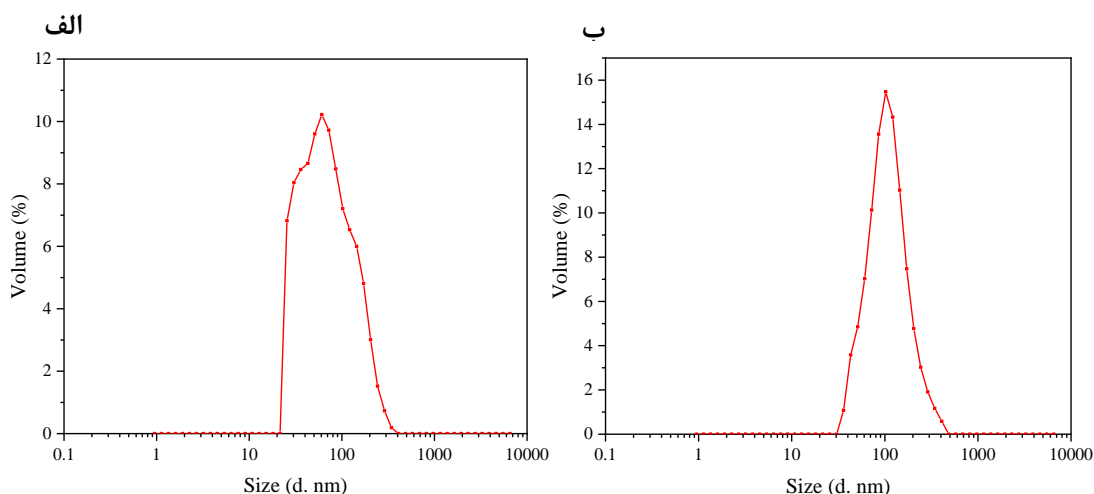


شکل ۷. نمودارهای سطح پاسخ سه بعدی فرمولاسیون بهینه نشان دهنده: اثر فاکتورهای متغییر بر بازده داروی به دام افتاده (الف و ب)، اثر فاکتورهای متغییر بر پتانسیل زتا (ج، د، ه)، اثر فاکتورهای متغییر بر سایز ذرات (و، ز)

۳-۲- مشخصه‌یابی نانوذرات

۳-۲-۱- سایز و پتانسیل زتا نانوذرات

میانگین قطر هیدرودینامیکی SLNs، Gem-MSLNs به ترتیب 54.7 ± 6.1 nm، 96.5 ± 4.3 nm بدست آمد و وقتی Fe_3O_4 درون SLNs بارگذاری می‌شود، یک افزایش سایز معنادار مشاهده می‌شود. همچنین در هر دو آن‌ها یک توزیع سایز باریک و رضایت بخش مشاهده می‌شود که مناسب برای سیستم‌های دارورسانی می‌باشند (شکل ۸). اندازه گیری پتانسیل زتا می‌تواند اطلاعاتی درباره پایداری کلئیدی ذرات و همچنین دوام پراکندگی کلئیدی آن‌ها را فراهم کند. پتانسیل زتا SLNs، Gem-MSLNs، به ترتیب 0.5 ± 0.67 mV، 0.3 ± 0.72 mV می‌باشد. مقادیر بالا پتانسیل زتا می‌تواند پایداری پراکندگی کلئیدی را به وسیله دافعه الکترواستاتیک فراهم کند و بنابراین از تجمع آن‌ها جلوگیری می‌کند.



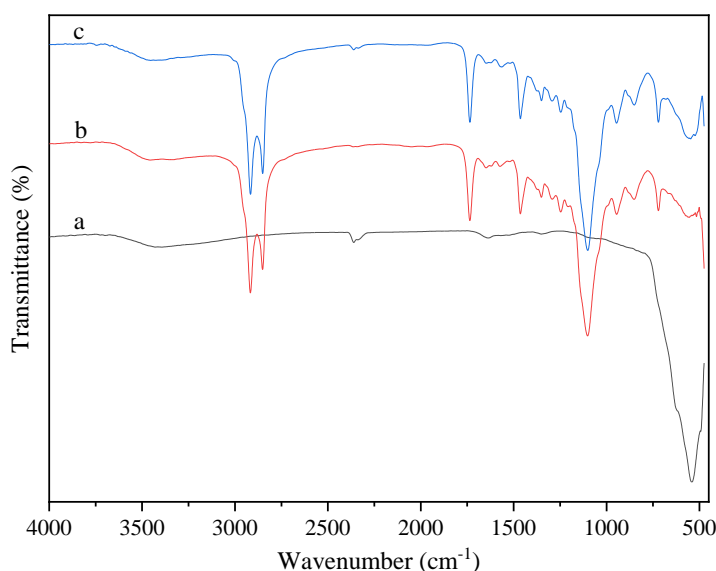
شکل ۸. توزیع سایز نانوذرات، (الف) SLNs، (ب) Gem-MSLNs

۳-۲-۲- طیف سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه

طیف FTIR، Fe_3O_4 ، (a)، SLNs، (b)، Gem-MSLNs (c) در شکل ۹ قابل مشاهده است. در منحنی (a) قله جذب در cm^{-1} 3430 مربوط به ارتعاش کششی پیوند O-H می‌باشد که به دلیل باقی مانده آب جذب شده در سطح نانوذرات Fe_3O_4 است و همچنین نوار جذبی قوی در گستره $700-475$ cm^{-1} در مرکز 541 cm^{-1} به ارتعاش پیوند Fe-O نسبت داده می‌شود. در منحنی متناظر با SLNs (b) قله‌های مشخصه ماتریکس لیپیدی همچون قله پهن گسترده بین $3650-3100$ cm^{-1} به ارتعاش کششی O-H گلیسرول مونواسترات، ارتعاش کششی N-H اکتا دسیل آمین و دیگر ترکیبات، نوارهای جذب 2917 و cm^{-1} 2852 به ترتیب مربوط به ارتعاش کششی C-H نامتقارن و متقارن زنجیر آلیفاتیک ترکیبات، 1736 cm^{-1} ارتعاش کششی C=O، جذب خمشی N-H در حدود 1573 cm^{-1} ، نوارهای مربوط به ارتعاش خمشی C-H در 1464 cm^{-1} (خمشی CH_2)، حدود 1351 cm^{-1} (خمشی CH_3)، 1247 cm^{-1} و 721 cm^{-1} و جذب در محدوده $1200-960$ cm^{-1} مربوط به ارتعاش کششی

C-N, C-O [۴۰-۴۳] و همپوشانی زیاد با ارتعاش کششی PO_2^- , P-O-C (ترکیب لیسیستین سوپا) قابل مشاهده است و یک جذب ضعیف در 555 cm^{-1} به ارتعاش خمشی P-O نسبت داده می‌شود [۴۵ و ۴۴]. به طور کلی نوارهای جذبی و الگو طیف FTIR متناظر با Gem-MSLNs و SLNs به دلیل استفاده از لیپیدها و سورفاکتانت‌های مشابه تقریباً شبیه به هم هستند، که در طیف Gem-MSLNs علاوه بر قله‌های مشخصه ماتریکس لیپیدی نوار جذب مربوط به پیوندهای Fe-O در گستره $475-700 \text{ cm}^{-1}$ در مرکز 548 cm^{-1} مشاهده می‌شود. نوار Fe-O در طیف Gem-MSLNs نسبت به طیف Fe_3O_4 خالص به صورت قله تضعیف شده قابل مشاهده است که نشان دهنده کپسوله شدن Fe_3O_4 درون نانوذرات لیپیدی جامد می‌باشد.

شکل ۹. طیف ATR-FTIR، نانوذرات (a) Fe_3O_4 ، (b) SLNs، (c) Gem-MSLNs را نشان می‌دهد و نوار جذب مربوط به Fe-O (cm^{-1})



(۴۷۵-۷۰۰) در طیف Fe_3O_4 و طیف نانوذرات لیپیدی جامد مغناطیسی قابل مشاهده است.

۳-۲-۳- تعیین بازده دارو به دام افتاده (%EE)

بازده دارو به دام افتاده در ۱۳ فرمولاسیون طراحی شده Gem-MSLNs در گستره ۷/۵۹ تا ۲۱/۶۴٪ اندازه‌گیری شد. فرمولاسیون بهینه پیشنهادی نرم افزار با هدف ماکزیم بازده دارو به دام افتاده سنتز شد و مقدار بازده $21/10 \pm 2/12$ بدست آمد.

۴- مقایسه نتایج تحقیق با تحقیقات گذشته

در این بخش به طور خلاصه در جدول ۱۱ یک مقایسه کلی بین تحقیقاتی که تاکنون در زمینه نانوذرات لیپیدی جامد بارگذاری شده با داروی جمسیتابین هیدروکلرید انجام شده و این تحقیق مشاهده می‌شود. نانوذرات لیپیدی جامد مغناطیسی پیشنهادی ما در مقایسه با روش‌هایی که قبلاً گزارش شده، ویژگی‌های رضایت بخشی از نظر سایز و بازده به دام افتادن از خود نشان می‌دهد.

جدول ۱۱. مقایسه ویژگی‌های نانوذرات لیپیدی جامد مختلف بارگذاری شده با جمسیتابین هیدروکلرید

نانوذرات لیپیدی جامد	روش تهیه	عوامل هدفمندی	میانگین سایز (nm)	بازده به دام افتادن دارو (%)	رفرنس
۱	همگن سازی سرد فشار بالا	-	60.3 ± 19	68.3 ± 4.8	[۹]
۲	امولسیون سازی و تبخیر حلال	مانوز	228.8 ± 5.42	68.95 ± 1.32	[۲۱]
۳	امولسیون چندگانه w/o/w	-	۲۶۳	72.42 ± 1.13	[۲۴]
۴	امولسیون سازی و تبخیر حلال	نانوذرات سوپر پارامغناطیس (Fe_3O_4)	96.50 ± 4.36	21.10 ± 2.12	در این تحقیق

۵- نتیجه‌گیری

در این تحقیق برای اولین بار یک فرمولاسیون نانوذرات لیپیدی جامد بارگذاری شده با نانوذرات سوپر پارامغناطیس اکسید آهن و دارو جمسیتابین هیدروکلرید با موفقیت ساخته شده است. ویژگی‌های نانوذرات لیپیدی جامد مغناطیسی از جمله قطر میانگین، پتانسیل زتا، بازده داروی به دام افتاده تعیین شدند و همچنین سازگاری خوب بین لیپیدها و نانوذرات مغناطیسی و کپسوله شدن آن‌ها درون ماتریکس لیپیدی نانوذرات به وسیله FT-IR نشان داده شده است. در این تحقیق یک روش طراحی آزمایش جدید به نام طراحی غربالگری قطعی با کمترین تعداد اجرا در طراحی آزمایش به منظور بهینه سازی فرمولاسیون و بررسی تاثیر فاکتورهای متغیر موثر بر تهیه نانوذرات لیپیدی جامد مغناطیسی مورد استفاده قرار گرفت. بارگذاری دارو جمسیتابین درون نانوذرات جامد لیپیدی سبب انتقال حفاظت شده آن‌ها و اجتناب از دوزهای مکرر، کاهش عوارض جانبی نامطلوب و آزادسازی پیوسته دارو و افزایش اثر بخشی درمانی آن می‌شود و همچنین به واسطه بارگذاری موفقیت آمیز نانوذرات سوپر پارامغناطیس درون نانوذرات لیپیدی جامد می‌تواند برای استفاده به عنوان سیستم‌های دارورسانی هدفمند برای شیمی درمانی و همچنین فعالیت گرما درمانی در توده تومور و MRI مورد مطالعه قرار گیرند. بنابراین Gem-MSLNs می‌تواند گزینه مناسبی برای کاربردهای درمانی سرطان باشد.

۶- تقدیر و تشکر

از معاونت پژوهشی دانشگاه گیلان در حمایت از این پروژه کمال تشکر و قدردانی را داریم.

۷- فهرست منابع و مآخذ

- [1] Birhanu, G., Javar, H. A., Seyedjafari, E., & Zandi-Karimi, A. (2017). Nanotechnology for delivery of gemcitabine to treat pancreatic cancer. *Biomedicine & pharmacotherapy*, 88, 635-643.
- [2] Mader, M. Mary, H., James R., (2006), Antimetabolites, *Comprehensive Medicinal Chemistry II*, 7, 55-79.
- [3] Martín-Banderas, L., Sáez-Fernández, E., Holgado, M. Á., Durán-Lobato, M. M., Prados, J. C., Melguizo, C., & Arias, J. L. (2013). Biocompatible gemcitabine-based nanomedicine engineered by Flow Focusing® for efficient antitumor activity. *International journal of pharmaceutics*, 443(1-2), 103-109.
- [4] Celia, C., Cosco, D., Paolino, D., & Fresta, M. (2011). Gemcitabine-loaded innovative nanocarriers vs GEMZAR: biodistribution, pharmacokinetic features and in vivo antitumor activity. *Expert Opinion on Drug Delivery*, 8(12), 1609-1629.
- [5] Paroha, S., Verma, J., Dubey, R. D., Dewangan, R. P., Molugulu, N., Bapat, R. A., Sahoo, P.K. & Kesharwani, P. (2021). Recent advances and prospects in gemcitabine drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*, 592, 120043.
- [6] Manjunath, K., Reddy, J. S., & Venkateswarlu, V. (2005). Solid lipid nanoparticles as drug delivery systems. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 27(2), 127-144.
- [7] Tapeinos, C., Battaglini, M., & Ciofani, G. (2017). Advances in the design of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers for targeting brain diseases. *Journal of Controlled Release*, 264, 306-332.
- [8] Tekade, R. K., Maheshwari, R., Tekade, M., & Chougule, M. B. (2017). Solid lipid nanoparticles for targeting and delivery of drugs and genes. In *Nanotechnology-based approaches for targeting and delivery of drugs and genes* (pp. 256-286). Academic Press.
- [9] Affram, K. O., Smith, T., Ofori, E., Krishnan, S., Underwood, P., Trevino, J. G., & Agyare, E. (2020). Cytotoxic effects of gemcitabine-loaded solid lipid nanoparticles in pancreatic cancer cells. *Journal of drug delivery science and technology*, 55, 101374.
- [10] Emami, A., Ghafouri, H., & Sariri, R. (2023). Polyphyllin D-loaded solid lipid nanoparticles for breast cancer: Synthesis, characterization, in vitro, and in vivo studies. *International Journal of Pharmaceutics*, 639, 122976.
- [11] Tran, T. H., Choi, J. Y., Ramasamy, T., Truong, D. H., Nguyen, C. N., Choi, H. G., Yong, C.S., Kim, J. O. (2014). Hyaluronic acid-coated solid lipid nanoparticles for targeted delivery of vorinostat to CD44 overexpressing cancer cells. *Carbohydrate polymers*, 114, 407-415.
- [12] Zhao, S., Zhang, Y., Han, Y., Wang, J., & Yang, J. (2015). Preparation and characterization of cisplatin magnetic solid lipid nanoparticles (MSLNs): Effects of loading procedures of Fe₃O₄ nanoparticles. *Pharmaceutical research*, 32, 482-491.

- [13] Oliveira, R. R., Carrião, M. S., Pacheco, M. T., Branquinho, L. C., de Souza, A. L. R., Bakuzis, A. F., & Lima, E. M. (2018). Triggered release of paclitaxel from magnetic solid lipid nanoparticles by magnetic hyperthermia. *Materials Science and Engineering: C*, 92, 547-553.
- [14] Grillone, A., Riva, E.R., Mondini, A., Forte, C., Calucci, L., Innocenti, C., de Julian Fernandez, C., Cappello, V., Gemmi, M., Moscato, S., & Ronca, F. (2015). Active targeting of sorafenib: preparation, characterization, and in vitro testing of drug-loaded magnetic solid lipid nanoparticles. *Advanced healthcare materials*, 4(11), 1681-1690.
- [15] Haghighi Asl, A., Ahmadpour, A., & Fallah, N. (2017). Synthesis of Nano N-TiO₂ for modeling of petrochemical industries spent caustic wastewater photocatalytic treatment in visible light using DOE method, *Applied Chemistry*, 12(42), 253-286. (in persian)
- [16] Nabizadeh Chianeh, F., Mohammadi, B., & Asghari, A. (2017). Application of response surface methodology for optimizing removal of malachite green (MG) from aqueous solutions by natural zeolite. *Applied Chemistry*, 12(42), 209-222. (in persian)
- [17] Dehghani Mobarake, M., Habibi, M., Faghihi Zarandi, A. (2019). New membrane based on Pd-SiO₂ catalyst on PSS/NaX for hydrogen separation: Design and optimization. *Applied Chemistry Today*, 15(56), 131-148. (in persian)
- [18] Lotfi, Z., Zavvar Mousavi, H., Sajjadi, S. M. (2020). Selective ultrasound enhanced removal of anionic dyes from binary mixture using multivariate calibration and central composite design modeling by positively charged hyper branched ammonium functionalized magnetic graphene oxide. *Applied Chemistry Today*, 14(53), 67-78. (in persian)
- [19] Jannatdost, E., Tavakoli, A., Emamalisabzi, R., Kheiri, F. (2019). Synthesis of nanosized alumina templates with desired pores using Central Composite Design. *Applied Chemistry Today*, 15(55), 81-94. (in persian)
- [20] Kazemi, H., Rajabi, M., Fahimirad, B., (2020). Application of response surface methodology for the photo degradation of dye using ZnO nanorods loaded on the activated carbon. *Applied Chemistry Today*, 14(53), 21-30. (in persian)
- [21] Fekri, M. H., Saki, F., Razavi Mehr, M., Soleymani, S. (2024). Preparation of SBA-16 Silicate Nanoabsorbent by Green Method From Reed Plant Stem, Using it to Remove Phenolphthalein Pollutant and Investigating Effective Factors by RSM Method, *Applied Chemistry Today*, 18(68), 271-288. (in persian)
- [22] Romić, M. D., Špoljarić, D., Klarić, M. Š., Cetina-Čižmek, B., Filipović-Grčić, J., & Hafner, A. (2019). Melatonin loaded lipid enriched chitosan microspheres–Hybrid dressing for moderate exuding wounds. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 52, 431-439.
- [23] Jones, B., & Nachtsheim, C. J. (2011). A class of three-level designs for definitive screening in the presence of second-order effects. *Journal of Quality Technology*, 43(1), 1-15.

- [24] Ma, M., Zhang, Y., Yu, W., Shen, H. Y., Zhang, H. Q., & Gu, N. (2003). Preparation and characterization of magnetite nanoparticles coated by amino silane. *Colloids and Surfaces A: physicochemical and engineering aspects*, 212(2-3), 219-226.
- [25] Wang, C., Li, B., Niu, W., Hong, S., Saif, B., Wang, S., Dong, C. & Shuang, S. (2015). β -Cyclodextrin modified graphene oxide-magnetic nanocomposite for targeted delivery and pH-sensitive release of stereoisomeric anti-cancer drugs. *RSC advances*, 5(108), 89299-89308.
- [26] Soni, N., Soni, N., Pandey, H., Maheshwari, R., Kesharwani, P., & Tekade, R. K. (2016). Augmented delivery of gemcitabine in lung cancer cells exploring mannose anchored solid lipid nanoparticles. *Journal of colloid and interface science*, 481, 107-116.
- [27] Venishetty, V. K., Samala, R., Komuravelli, R., Kuncha, M., Sistla, R., & Diwan, P. V. (2013). β -Hydroxybutyric acid grafted solid lipid nanoparticles: A novel strategy to improve drug delivery to brain. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology and Medicine*, 9(3), 388-397.
- [28] Calucci, L., Grillone, A., Redolfi Riva, E., Mattoli, V., Ciofani, G., & Forte, C. (2017). NMR relaxometric properties of SPION-loaded solid lipid nanoparticles. *The Journal of Physical Chemistry C*, 121(1), 823-829.
- [29] Nandini, P. T., Doijad, R. C., Shivakumar, H. N., & Dandagi, P. M. (2015). Formulation and evaluation of gemcitabine-loaded solid lipid nanoparticles. *Drug delivery*, 22(5), 647-651.
- [30] Campos, J., Varas-Godoy, M., & Haidar, Z. S. (2017). Physicochemical characterization of chitosan-hyaluronan-coated solid lipid nanoparticles for the targeted delivery of paclitaxel: a proof-of-concept study in breast cancer cells. *Nanomedicine*, 12(5), 473-490.
- [31] Tran, B. N., Nguyen, H. T., Kim, J. O., Yong, C. S., & Nguyen, C. N. (2017). Combination of a chemopreventive agent and paclitaxel in CD44-targeted hybrid nanoparticles for breast cancer treatment. *Archives of pharmacal research*, 40, 1420-1432.
- [32] Gao, X., Zhang, J., Xu, Q., Huang, Z., Wang, Y., & Shen, Q. (2017). Hyaluronic acid-coated cationic nanostructured lipid carriers for oral vincristine sulfate delivery. *Drug development and industrial pharmacy*, 43(4), 661-667.
- [33] Hassan, H., Bello, R. O., Adam, S. K., Alias, E., Meor Mohd Affandi, M. M. R., Shamsuddin, A. F., & Basir, R. (2020). Acyclovir-loaded solid lipid nanoparticles: Optimization, characterization and evaluation of its pharmacokinetic profile. *Nanomaterials*, 10(9), 1785.
- [34] Trotta, M., Debernardi, F., & Caputo, O. (2003). Preparation of solid lipid nanoparticles by a solvent emulsification-diffusion technique. *International journal of pharmaceutics*, 257(1-2), 153-160.
- [35] Mishra, V., Bansal, K. K., Verma, A., Yadav, N., Thakur, S., Sudhakar, K., & Rosenholm, J. M. (2018). Solid lipid nanoparticles: Emerging colloidal nano drug delivery systems. *Pharmaceutics*, 10(4), 191-212.
- [36] Manjunath, K., Reddy, J. S., & Venkateswarlu, V. (2005). Solid lipid nanoparticles as drug delivery systems. *Methods Find Exp Clin Pharmacol*, 27(2), 127-144.

- [37] Pate, K., & Safier, P. (2022). Chemical metrology methods for CMP quality. In *Advances in chemical mechanical planarization (CMP)* (pp. 355-383). Woodhead Publishing.
- [38] Freitas, C., & Müller, R. H. (1998). Effect of light and temperature on zeta potential and physical stability in solid lipid nanoparticle (SLNTM) dispersions. *International journal of pharmaceutics*, 168(2), 221-229.
- [39] Albuquerque, J., Moura, C. C., Sarmiento, B., & Reis, S. (2015). Solid lipid nanoparticles: a potential multifunctional approach towards rheumatoid arthritis theranostics. *Molecules*, 20(6), 11103-11118.
- [40] Delgado-Rosales, E. E., Quintanar-Guerrero, D., Piñón-Segundo, E., Magaña-Vergara, N. E., Leyva-Gómez, G., Martínez-Martínez, F. J., & Mendoza-Muñoz, N. (2018). Novel drug delivery systems based on the encapsulation of superparamagnetic nanoparticles into lipid nanocomposites. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 46, 259-267.
- [41] Tapeinos, C., Marino, A., Battaglini, M., Migliorin, S., Brescia, R., Scarpellini, A., ... & Ciofani, G. (2019). Stimuli-responsive lipid-based magnetic nanovectors increase apoptosis in glioblastoma cells through synergic intracellular hyperthermia and chemotherapy. *Nanoscale*, 11(1), 72-88.
- [42] Chatterjee, S., Lee, M. W., & Woo, S. H. (2009). Influence of impregnation of chitosan beads with cetyl trimethyl ammonium bromide on their structure and adsorption of congo red from aqueous solutions. *Chemical Engineering Journal*, 155(1-2), 254-259.
- [43] Pavia, D. L., Lampman, G. M., Kriz, G. S., & Vyvyan, J. A. (2014). *Introduction to spectroscopy*. Cengage learning.
- [44] Kuligowski, J., Quintás, G., Esteve-Turrillas, F. A., Garrigues, S., & De la Guardia, M. (2008). On-line gel permeation chromatography–attenuated total reflectance–Fourier transform infrared determination of lecithin and soybean oil in dietary supplements. *Journal of Chromatography A*, 1185(1), 71-77.
- [45] Michał, W., Ewa, D., & Tomasz, C. (2015). Lecithin-based wet chemical precipitation of hydroxyapatite nanoparticles. *Colloid and polymer science*, 293, 1561-1568.

