

Investigating the Effect of Coated Lipid Nano Particles of Spironolactone with Chitosan on Their Properties

Reza Enayatifard¹,
Jafar Akbari^{2,3},
Majid Saeedi^{2,3},
Katayoun Morteza-Semnani⁴,
Safieh Parvin⁵,
Seyyed Mohammad Hassan Hashemi⁵,
Amirhossein Babaei⁵,
Seyyed Sohrab Rostamkalaei⁶

¹ Associate Professor, Department of Pharmaceutics, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Professor, Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ Pharmaceutical Sciences Research Center, Haemoglobinopathy Institute, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Professor, Department of Medicinal Chemistry, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁵ Pharmacy Student, Student Research Committee, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁶ PhD Student in Pharmaceutics, Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received August 16, 2017 ; Accepted May 29, 2018)

Abstract

Background and purpose: Solid lipid nanoparticles are in the colloid carriers. The benefits of these drug carriers are the controlled release of the drug and the protection of the drug being loaded. Spironolactone is an aldosterone antagonist and androgen receptor. Its oral bioavailability is low due to the low solubility of this drug and its slow release. Reducing particle size by increasing the level of the drug leads to increased release, higher oral bioavailability, higher particle size in contact with the dissolution medium, and increasing the dissolvability of the drug saturation.

Materials and methods: Solvent emulsification/evaporation was used to prepare spironolactone nanoparticles. For this purpose, the lipid and drug were dissolved in an appropriate organic solvent and added to the aqueous phase containing surfactant during mixing by homogenizer. After coated with chitosan, the chitosan was dissolved in dilute acid and was added to the suspension on the stirrer drop by drop.

Results: By maintaining the amount of lipid in the formulation and increasing the amount of surfactant, the particle size decreased significantly. In general, the coating of spironolactone nanoparticles with chitosan increased the particle size and their dispersion, and the zeta potential changed from a negative value to a positive value.

Conclusion: Spironolactone coated with chitosan was found to have a slower release than solid lipid nanoparticles and nanosuspension.

Keywords: solid lipid nanoparticles, spironolactone, Tween 20, Span 80

J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 28 (162): 25-36 (Persian).

* **Corresponding Author:** Seyyed Sohrab Rostamkalaei - Pharmaceutical Sciences Research Center, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (Email: Sohrab.rostamkalaei@gmail.com)

بررسی تاثیر روکش دادن نانو ذرات لیپیدی جامد اسپیرونولاکتون با کیتوسان بر خصوصیات آن ها

رضا عنایتی فرد^۱
جعفر اکبری^{۳و۲}
مجید سعیدی^{۳و۲}
کتایون مرتضی سمنانی^۴
صفیه پروین^۵
سید محمد حسن هاشمی^۵
امیر حسین بابایی^۵
سید سهراب رستمکلائی^۶

چکیده

سابقه و هدف: نانوذرات لیپیدی جامد در دسته حامل های کلوئیدی قرار دارند. از مزایای این حامل های دارویی، امکان رهش کنترل شده دارو و محافظت از داروی بارگذاری شده می باشد. اسپیرونولاکتون آنتاگونیست، آلدوسترون و رسپتور های آندروژنی است و به علت حلالیت در آب کم و آزاد سازی آهسته آن، فراهمی زیستی خوراکی این دارو پایین است. کاهش اندازه ذره ای با زیاد کردن میزان سطح دارو، باعث افزایش آزاد سازی، فراهمی زیستی خوراکی بالاتر، سطح ذرات بالاتر در تماس با محیط انحلال و افزایش پذیرش اشباع دارو، می شود.

مواد و روش ها: در این مطالعه تجربی، برای تهیه نانوذرات اسپیرونولاکتون از روش Solvent emulsification/evaporation استفاده شد. بدین منظور لیپید و دارو در حلال آلی مناسب حل گردید و به فاز آبی حاوی سورفکتانت در حین همزدن توسط هموژنایزر اضافه شد. پس از آن جهت پوشش با کیتوسان، کیتوسان در اسید رقیق حل شد و قطره قطره به سوسپانسیون بر روی استیرر اضافه گردید.

یافته ها: نتایج نشان می دهد که با ثابت ماندن مقدار لیپید در فرمولاسیون و افزایش مقدار سورفکتانت اندازه ی ذرات کاهش معنی داری داشته است. به طور کلی روکش دادن نانوذرات اسپیرونولاکتون با کیتوسان موجب افزایش در اندازه ی ذرات و پراکندگی آن ها گردید و مقدار پتانسیل زتا از عددی با علامت منفی به عددی دیگر با علامت مثبت تغییر پیدا کرد. **استنتاج:** اسپیرونولاکتون روکش شده با کیتوسان، رهش آهسته تری نسبت به نانوذرات لیپیدی جامد و نانسوسپانسیون دارد.

واژه های کلیدی: نانوذرات لیپیدی جامد، اسپیرونولاکتون، توپین ۲۰، اسپان ۸۰

مقدمه

در سال ۱۹۹۰ پژوهش هایی توسط Muller و همکاران (۱) در زمینه قابلیت های نانوذرات لیپیدی جامد در دارو رسانی انجام گرفت. این حامل های دارویی به عنوان جایگزینی برای سیستم های حامل

Email: Sohrab.rostamkalaei@gmail.com

مؤلف مسئول: سید سهراب رستمکلائی - ساری: کیلومتر ۱۷ جاده فرح آباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم

۱. دانشیار، گروه فارماسیوتیکس، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. استاد، گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. مرکز تحقیقات علوم دارویی، پژوهشکده هموگلوبینوپاتی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۴. استاد، گروه شیمی دارویی، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۵. دانشجوی داروسازی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۶. دانشجو PHD فارماسیوتیکس، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۵/۲۵ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۶/۶/۷ تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۳/۸

در شرایط اسیدی باعث تجمع بزرگ در محیط معده می‌شود که باعث محدودیت دارو رسانی خوراکی می‌گردد. برای افزایش سرعت جذب و بهبود رهش نانوذرات، تغییرات سطحی و روکش دادن آن‌ها توسط پلیمرهای طبیعی مانند کیتوسان و آلژینات انجام می‌شود که موجب بهبود ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی ذرات مخصوصا سایز، پتانسیل زتا و پایداری در محیط معده می‌گردد. کیتوسان به عنوان پلی ساکارید طبیعی، با داشتن ویژگی‌هایی مانند غیر سمی بودن انتخاب بهتری برای روکش دادن نانوذرات می‌باشد. SLN های روکش داده شده با کیتوسان بهترین پایداری را در شرایط اسیدی نشان می‌دهند به طوری که یک لایه ضخیم اطراف هسته لیپیدی تشکیل داده که مانع آگریگیشن ذرات می‌گردد (۵).

اسپیرونولاکتون دارای ساختار استروئیدی و آنتاگونیست اختصاصی رسپتورهای آلدوسترون می‌باشد و در اتصال به رسپتور با آلدوسترون رقابت می‌کند. در بخش دیستال توبول کلیه، با بلاک کردن این رسپتور کانال سدیم-پتاسیم و تبادل آن را مهار کرده، سبب حفظ پتاسیم در بدن می‌شود و هم چنین اثر دیورتیکی خود را ایجاد می‌کند. در افزایش سطح هورمون‌های مینرالوکورتیکوئیدی، آلدوسترون سبب هیپرآلدسترونمی می‌گردد که می‌تواند علتش نارسایی احتقانی قلبی، سیروز کبدی و سندرم نفروتیک باشد. اسپرونولاکتون از طریق رقابت با آلدوسترون برای اتصال به رسپتور از ایجاد آسیت و ادم جلوگیری می‌کند. اسپرونولاکتون در پایین آوردن فشار خون سیستولیک و دیاستولیک در بیماران با هیپرآلدسترونمی موثر است. اسپرونولاکتون هم چنین با مهار تبادل سدیم-پتاسیم سبب حفظ پتاسیم در بدن می‌شود. از نظر فارماکو کینتیکی اسپرونولاکتون و متابولیت‌هایش بیش از ۹۰ درصد با پروتئین‌های پلاسما متصل می‌گردند.

متابولیسم و دفع اسپرونولاکتون به سرعت تحت متابولیسم گسترده قرار گرفته و اکثر متابولیت‌هایش نیز

کلوئیدی قدیمی تر مانند امولسیون‌ها و لیپوزوم‌ها معرفی شدند. در ساختار SLN، ماتریکس لیپیدی زیست سازگار و زیست تخریب پذیر وجود دارد. ذرات لیپیدی تولید شده در دمای محیط و بدن جامد، اندازه‌ی آن‌ها در محدوده ۵۰ تا ۱۰۰۰ نانومتر می‌باشد. از جمله اکسیپان‌های به کار رفته در ساخت SLN، لیپیدهای جامد و امولسیفایر برای پایدار کردن بین سطح آب و لیپید است. از لیپیدهای پر کاربرد می‌توان به تری گلیسیریدها، استروئیدها، اسیدهای چرب و موم‌ها و از امولسیفایرهای رایج می‌توان به فسفولیپیدها، پلی سوربات‌ها، استرهای سوریتان، پلیمرهایی نظیر پولوکسامر اشاره کرد. SLN برای دارو رسانی پوستی، خوراکی، تزریقی، گوشه، چشمی، ریوی و مقعدی به کار می‌رود. طبق یک مدل کلی، ساختار نانوذرات لیپیدی جامد متشکل از یک هسته لیپیدی جامد است که با پوششی از امولسیفایر احاطه شده و این پوشش باعث پایداری نانوذرات در حامل می‌گردد (۲). SLN ها به راحتی برای تهیه داروهای لیپوفیل به کار می‌روند، چرا که داروهای لیپوفیل به راحتی با چربی‌های موجود در SLN بر همکنش دارند، در حالی که داروهای هیدروفیل به سختی داخل ماتریکس هیدروفوب SLN قرار می‌گیرند. موارد محدودی از داروهای هیدروفیلی که در SLN انکپسوله شده‌اند وجود دارد (۳). SLN ها مشکلات ناپایداری و زیست تخریب ناپذیری سایر حامل‌های کلوئیدی را ندارند و از آن‌ها برای افزایش فراهمی زیستی و تولید فرم‌های پیوسته رهش داروها استفاده می‌شود (۱). کیتوسان یک بیو پلیمر کاتیونی می‌باشد که در صنعت فارماسیوتیکس و آرایش بهداشتی استفاده می‌شود. این پلیمر از طریق واکنش‌های الکتروستاتیکی با دیگر اجزای موجود در ترکیب، برای ساخت کمپلکس‌های محلول و غیر محلول کاربرد دارد. علاوه بر این با جذب داخل قطره‌های روغنی سطحی با تشکیل یک لایه‌ی جامد موجب پایداری فرآورده می‌گردد (۴). به طور کلی پایداری پایین نانوذرات SLN

فعال بوده و مدت اثرش حدود ۱۶ ساعت می‌باشد (۶). برای افزایش اثر کاهش عوارض و افزایش فراهمی زیستی اسپیرونولاکتون، آن را به صورت لیپوزوم نانو کپسول و sIn فرموله نمودند (۷-۹). در این مطالعه به بررسی تاثیر روکش دادن نانو ذرات لیپیدی جامد اسپیرونولاکتون با کیتوسان بر خصوصیات و رهش آن‌ها پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

در این مطالعه تجربی، پودر اسپیرونولاکتون، با SAMCHUN PURE (Tween 20, Korea)، (CHEMICAL CO., LTD DAEJUNG) Span80، (CHEMICALS & METALS CO., LTD, Korea)، گلیسرین مونو استئارات (Sigma, Germany)، کیتوسان Fluka، کلروفرم، استیک اسید گلاسیال، فیلتر ۰/۲۲ نانومتر (Millipore filters, Germany)، آب UP توسط دستگاه، الکل ۹۶ درصد (غدیر)، آب مقطر تازه تولید گردید.

ساخت پلیمر کیتوسان

۱۰۰ میلی گرم از کیتوسان را به همراه ۲۰۰۰ میلی گرم از توپین ۲۰ در یک بشر ریخته و یک سی سی استیک اسید گلاسیال به آن اضافه گردید و روی استیرر با دور ۴۰۰ با حرارت مناسب قرار داده شد. سپس همزمان ۹۹ سی سی آب به طور آهسته به آن اضافه گردید و مجموعه تا شفاف شدن کامل پلیمر روی استیرر قرار داده و صاف گردید.

ساخت نانوذرات لیپیدی جامد

برای تهیه نانوذرات اسپیرونولاکتون از روش Solvent emulsification/evaporation استفاده گردید که نیاز به دو فاز آبی و آلی می‌باشد. برای تهیه فاز آلی ۲۰۰ میلی گرم از پودر اسپیرونولاکتون، ۲۰۰۰ میلی گرم از لیپید گلیسرین مونو استئارات و ۲۰۰۰ میلی گرم از

اسپان ۸۰ در یک بشر ریخته شد و در ۲۰ میلی لیتر حلال کلروفرم حل گردید. برای تهیه فاز آبی، در بشری جداگانه ۱۵۰۰ میلی گرم از توپین ۲۰ به همراه ۲۰۰۰ میلی گرم اسپان ۸۰ و ۸۰ گرم آب دیونیزه ریخته شد و مخلوط حاصل توسط اولترا هموژنایزر با دور ۷۰۰۰ در دقیقه یکنواخت گردید. روی استیرر فاز آلی قطره قطره به فاز آبی اضافه گردید و امولسیون حاصل به مدت ۱۰ دقیقه بدون حضور دما توسط سونیکاتور پروب دار سونیکه و به مدت ۲۴ ساعت روی استیرر قرار داده شد تا حلال آلی از محیط خارج و نانوسوسپانسیون از ذرات دارو بدست آید. بعد از این مدت با دستگاه زتا سایزر، اندازه ذره‌ای، پتانسیل زتا و شاخص پراکندگی (PDI) خوانده شد و به ۴۰ گرم از فرمولاسیون روی همزن، کیتوسان قطره قطره اضافه گردید و به مدت ۲ ساعت روی استیرر گذاشته شد. بعد از این زمان دوباره اندازه، پتانسیل زتا و شاخص پراکندگی (PDI) نمونه با دستگاه زتا سایزر قرائت گردید.

اندازه گیری پتانسیل زتا، اندازه و شاخص پراکندگی

اندازه، شاخص پراکندگی و پتانسیل زتای نانوذرات لیپیدی جامد اسپیرونولاکتون توسط Dynamic Light Scattering (DLS) با استفاده از دستگاه Zetasizer Nano ZS در دمای ۲۵ درجه و زاویه ۹۰ درجه اندازه گرفته شد.

بررسی رهش دارو

برای بررسی آزاد سازی دارو از روش کیسه دیالیز استفاده شد. ۲۴ ساعت قبل از انجام تست کیسه دیالیز در آب مقطر غوطه ور شد تا انعطاف پذیری مناسبی پیدا کند. مقداری از فرآورده های حاوی نانوذرات لیپیدی جامد، نانوذرات با روکش کیتوسان high و نمونه های دارو بدون لیپید به عنوان شاهد در کیسه دیالیز قرار داده، و دو طرف آن به طور کامل بسته شد. کیسه دیالیز در ظرف حاوی ۲۰۰ میلی لیتر بافر فسفات با PH=۷/۴

نمونه‌ها با سرعت ۱۰ درجه سانتی‌گراد در دقیقه و در محدوده دمایی ۳۰-۳۰۰ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفتند.

فریز درایر کردن

در حوزه داروسازی جهت تبدیل محلول‌ها و سوسپانسیون‌ها به فرم جامد با پایداری قابل قبول جهت توزیع و نگهداری، فریز درایر کردن مورد استفاده قرار می‌گیرد. آب منجمد از طریق تصعید خارج می‌شود. برای تمامی ماتریکس‌های لیپیدی مورد مطالعه، فریز درایر کردن در نتیجه پیوستن نانوذرات، منجر به تشکیل نانوذرات لیپیدی جامد بزرگتر با توزیع اندازه ذره ای گسترده‌تر می‌شود. مقدار مناسبی از cryoprecipitant ها می‌تواند از به هم پیوستن نانوذرات لیپیدی جامد در حین فریز درایر کردن جلوگیری کند. پس از تهیه امولسیون نانو ذرات لیپیدی آن را در ۱۲ اپندورف ریخته و به مدت نیم ساعت با دور ۲۵۰۰ rpm و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد سانتریفیوژ گردید. بخش رویی دور ریخته شد و بخش رسوب با آب دیونیزه شسته و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب حاصل مجدداً با آب دیونیزه شسته شد. اپندورف‌ها در دستگاه فریز درایر قرار داده شدند. در این مطالعه نتایج به‌دست آمده با استفاده از آنالیز واریانس (ANOVA) یک طرفه و متعاقب آن جهت بررسی آزمون صفر در مورد مقایسه میانگین داده‌های موجود در هر بخش از آزمون آماری توکی استفاده گردید. تفاوت با $p < 0/05$ در هر نقطه از نظر آماری معنی‌دار در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

نتایج به‌دست آمده نشان می‌دهد که با ثابت ماندن مقدار دارو و لیپید در فرمولاسیون و افزایش مقدار توین ۲۰ و اسپان ۸۰ به عنوان سورفاکتانت اندازه‌ی ذرات کاهش پیدا کرده و ارتباط معناداری بین تغییرات مقدار سورفاکتانت با شاخص پراکندگی نانو ذرات و

غوطه‌ور گردید. آزاد سازی به کمک دستگاه انحلال شماره دو فارماکوپه آمریکایی طی زمان ۲۴ ساعت و با دور ۶۰ rpm و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌گیری در زمان‌های ۱، ۲، ۴، ۶، ۸، ۲۴ ساعت بعد از قرار دادن غشای دیالیز در محیط انحلال انجام گرفت. برای نمونه‌گیری، هر بار ۵ سی‌سی از محلول موجود در محیط انحلال برداشته، با فیلتر ۰/۲۲ میکرون صاف و جذب آن با دستگاه HPLC در طول موج ۲۳۸ نانومتر قرائت شد. اعداد حاصل از جذب در معادله جذب- غلظت اسپروئولاکتون قرار داده شد و غلظت آزاد دارو محاسبه گردید. جهت ثابت ماندن محیط انحلال، بعد هر بار نمونه‌گیری و برداشتن ۵ سی‌سی از محیط، ۵ سی‌سی بافر به محیط اضافه شد.

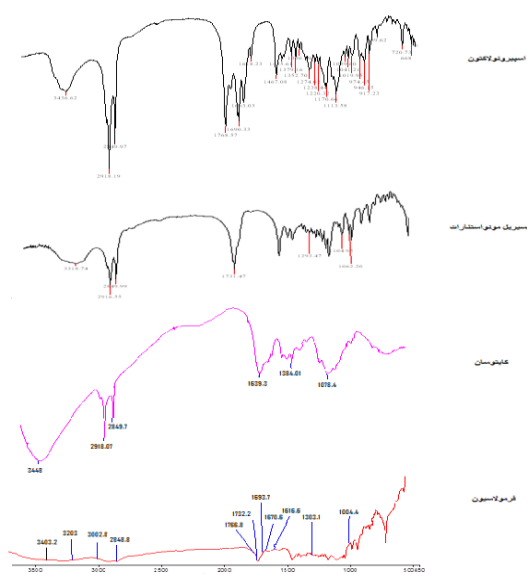
اسپکتروسکوپی FTIR

جهت دستیابی به طیف FTIR از دستگاه جهت دستیابی به طیف FTIR از دستگاه PerkinElmer Spectrum استفاده شد. برای آماده‌سازی نمونه قطره کوچکی از فرآورده‌های حاوی نانوذرات لیپیدی جامد با مقداری پتاسیم بروماید مخلوط شد تا ظاهری خشک پیدا کند و کاملاً همگن شود (پتاسیم بروماید جاذب رطوبت است). مخلوط به‌دست آمده بر روی دیسکی از جنس فولاد ضد زنگ منتقل شد و دیسک دیگری بر روی آن قرار گرفت. با اعمال فشار توسط جک هیدرولیک مخلوط مذکور بین دو دیسک فولادی پرس شد. بر اثر اعمال پرس، یک دیسک شفاف، نازک و یکنواخت از مخلوط KBr و نمونه ایجاد شد که برای بررسی طیف فرسرخ به دستگاه اسپکتروسکوپی FTIR منتقل گردید. دقت اسکن $1/5 \text{ cm}^{-1}$ و محدوده اسکن $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ بوده است.

آنالیز حرارتی DSC

برای دستیابی به ترموگرام نمونه‌های مورد آزمایش از روش آنالیز حرارتی DSC استفاده شد. برای انجام این تست ۵ میلی‌گرم از هر نمونه برداشته و در داخل‌های پن‌های آلومینیومی دستگاه قرار داده شد.

کربونیل لاکتونی و باند دو گانه مشاهده نشد و در نتیجه تداخل شیمیایی موثری را بین دارو و حامل نشان نداد. در طیف FT-IR مربوط به مخلوط فیزیکی که شامل توین ۲۰، اسپان ۸۰، اسپیرونولاکتون و گلیسرین مونو استئارات و کیتوسان بود، تغییری در عدد طول موج های گروه های شاخص ترکیبات به کار رفته دیده نشد، در نتیجه می توان گفت بر هم کنش شیمیایی بین دارو و سایر اجزا در مخلوط فیزیکی وجود ندارد. در بررسی طیف FT-IR مربوط به پودر کیتوسان پیک های شاخص، شامل $3400-3200 \text{ cm}^{-1}$ (کششی O-H، N-H)، 2918 cm^{-1} (کششی C-H نامتقارن)، 2849 cm^{-1} (کششی متقارن، C-H)، $1718-1700 \text{ cm}^{-1}$ (کششی C=O) بوده است. عدم جابه جایی پیک های گروه های شاخص در FTIR حاکی از عدم برهمکنش شیمیایی بین دارو و اجزای فرمولاسیون در فرآورده می باشد.



نمودار شماره ۱: طیف FT-IR

مطالعات Differential Scanning Calorimetry

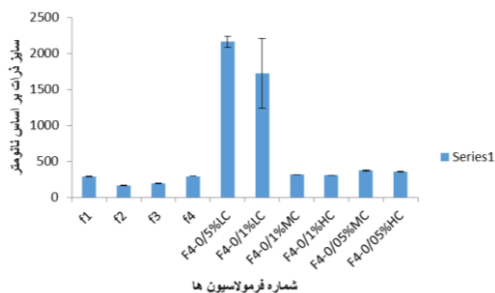
جهت بررسی تداخل و بارگیری مناسب ترموگرام DSC پودر اسپیرونولاکتون، گلیسرین مونو استئارات، کیتوسان و نانوذرات لیپیدی جامد مورد بررسی قرار گرفت (نمودار شماره ۲). ترموگرام DSC اسپیرونولاکتون

پتانسیل زتا وجود دارد. به طور کلی روکش دادن نانوذرات اسپیرونولاکتون با کیتوسان موجب افزایش در اندازه ی ذرات و شاخص پراکندگی آن ها می شود و مقدار پتانسیل زتا از عددی با علامت منفی به عددی دیگر با علامت مثبت تغییر پیدا می کند. نانوذرات اسپیرونولاکتون روکش شده با کیتوسان نسبت به نانوذرات لیپیدی جامد و نانوسپانسیون، رهش آهسته ای دارند. روکش نانو ذرات با کیتوسان یک لایه ضخیمی را اطراف هسته لیپیدی تشکیل می دهد که منجر به آزاد سازی آهسته دارو می شود که می توان گفت روکش دادن نانوذرات با پلیمر کیتوسان موجب کنترل در سرعت آزاد سازی دارو می گردد.

مطالعات Fourier-Transform IR

طیف های FT-IR برای شناسایی تداخلات و پیوندهای احتمالی بین حامل و دارو استفاده می گردد. طیف های FT-IR به دست آمده از نانوذرات لیپیدی جامد اسپیرونولاکتون با طیف اسپیرونولاکتون خالص، گلیسرین مونو استئارات خالص و کیتوسان جهت بررسی تداخلات مورد مقایسه قرار گرفتند (نمودار شماره ۱) که در بررسی طیف FT-IR مربوط به پودر اسپیرونولاکتون خالص پیک ها، 2951 cm^{-1} (CH کششی)، 1768 cm^{-1} (C=O لاکتون کششی)، 1691 cm^{-1} (C=O گروه تیو استیل کششی)، 1617 cm^{-1} (C=C حلقه ی C6 کششی)، 1617 cm^{-1} (کششی) بوده است. در بررسی طیف FT-IR مربوط به پودر گلیسرین مونو استئارات خالص پیک ها، $3400-3200 \text{ cm}^{-1}$ (OH کششی)، $3000-2850 \text{ cm}^{-1}$ (CH کششی)، 1731 cm^{-1} (C=O کششی)، 1300 cm^{-1} (C-O کششی) بود. در بررسی طیف FT-IR نانوذرات لیپیدی جامد اسپیرونولاکتون، پیک های مربوط به گروه های عاملی اسپیرونولاکتون مشاهده شدند و تغییری در عدد موج پیک های گروه شاخص اسپیرونولاکتون مانند گروه های کربونیل تیو استیل و

توین ۲۰ تهیه گردید که نتایج به‌ست آمده از بررسی این فرمولاسیون‌ها در جدول شماره ۱ و نمودار شماره ۳ بیان شده است. با افزایش مقدار امولسیفایر اسپان ۸۰ از ۱/۳۲ گرم به ۳/۳۳ گرم، اندازه نانوذرات به‌طور موثری از $293/56 \pm 4/25$ در فرمولاسیون شماره ۱ به $194/13 \pm 1/3$ در فرمولاسیون شماره ۳ کاهش یافت ($p < 0/05$). مطالعات انجام گرفته توسط سایر محققان تایید کننده این نتایج می‌باشد.



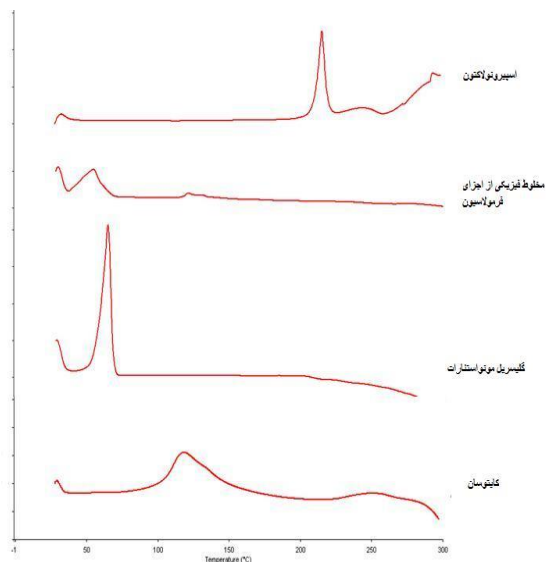
نمودار شماره ۳: میانگین اندازه ی نانوذرات لیپیدی جامد و نانوذرات روکش شده با کیتوسان در فرمولاسیون های ۱-۴

کلیدری و همکاران در مطالعه ای که بر روی نانوذرات لیپیدی جامد حامل اسپیرونولاکتون انجام دادند با به کار گیری سه امولسیفایر Span 60، Span 80، Tween 80 و تغییر در میزان آن‌ها در فرمولاسیون‌های متعدد، نشان دادند که با افزایش مقدار امولسیفایر در فرمولاسیون‌ها اندازه ی ذرات کوچک می‌شود (۶).

تاثیر مقدار امولسیفایر بر پراکندگی اندازه ذره ای

با توجه به جدول شماره ۱ و نمودار شماره ۳، نتایج بررسی‌های آماری نشان می‌دهند در ۳ فرمولاسیون F3، F1، F2 که مقدار امولسیفایر متغییر است ارتباط معنی داری بین تغییر در مقدار امولسیفایر و پراکندگی اندازه ذره‌ای وجود دارد به طوری که با افزایش مقدار امولسیفایر شاخص پراکندگی اندازه ذره‌ای از $0/009 \pm$ به $0/665 \pm$ در فرمولاسیون شماره ۱ به $0/243 \pm 0/005$ در فرمولاسیون شماره ۳ کاهش پیدا می‌کند ($p < 0/05$). در مطالعه‌ای که توسط Muller-Goyman و همکاران

خالص پیک گرم‌گیر تیزی در حدود ۲۱۲ درجه سانتی‌گراد نشان می‌دهد که مربوط به نقطه ذوب کریستال دارو است. وجود این پیک نوک تیز در ترموگرام نشانگر این است که اسپیرونولاکتون در پودر دارویی خود در حالت کریستال می‌باشد. همچنین در دمای بالاتر از ۲۶۰ درجه سانتی‌گراد، دارو شروع به تخریب می‌کند. هم‌چنین ترموگرام DSC گلیسرین منو استئارات پیکی در محدوده ۶۷/۲۶۴ - ۵۶/۵۰۴ درجه سانتی‌گراد را که مربوط به نقطه ذوب است نشان می‌دهد. بررسی ترموگرام کیتوسان یک پیک پهن در محدوده ۱۰۰ درجه را نشان می‌دهد که احتمالاً ناشی از دست دادن آب می‌باشد و در دمای بالای ۲۵۰ درجه این ماده تخریب می‌شود. بررسی نانوذرات روکش شده با کیتوسان تنها اندوترم مربوط به ذوب GMS را نشان می‌دهد که این امر به معنای روکش شدن ذرات دارو توسط چربی مربوطه می‌باشد.



نمودار شماره ۲: ترموگرام DSC

بحث

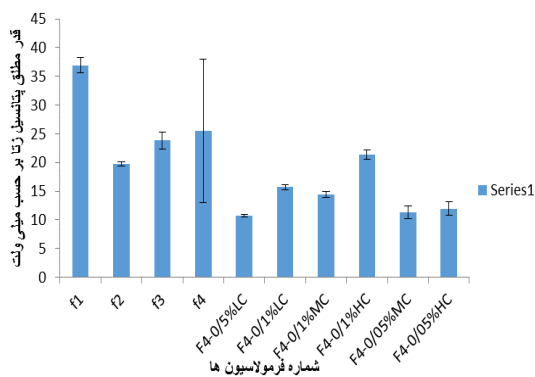
تاثیر مقدار امولسیفایر بر اندازه ذره ای نانوذرات لیپیدی جامد سه فرمولاسیون (F1، F2، F3) با مقدار ثابت از لیپید و دارو و مقدار متغییر از امولسیفایرهای اسپان ۸۰ و

جدول شماره ۱: ترکیبات تشکیل دهنده فرمولاسیون ها و میانگین اندازه ی ذرات، پتانسیل زتا، PDI و داروی بارگیری شده، HC: High Chitosan،

Chitosan n=3، LC: Low، MC: Middle Chitosan

F	Spiro g	GMS g	Span g	Tween ۲۰ g	Water Up ml	کیتوسان			میانگین اندازه ی ذرات nm	میانگین پتانسیل زتا mV	میانگین PDI ذرات	میانگین درصد داروی بارگیری شده
						Low	middle	high				
F1	۰/۱	۱	۱/۳۲	۱	۸۰	-	-	-	۲۹۳/۵۶±۴/۲۵	۲۹۳/۵۶±۴/۲۵	۰/۶۵۶±۰/۰۹	۸/۸۴±۱/۸۸
F2	۰/۱	۱	۳/۳۳	۲/۵	۸۰	-	-	-	۱۶۷/۳±۲/۵۴	۱۶۷/۳±۲/۵۴	۰/۲۲۱±۰/۰۰۶	۵/۸۵±۱/۰۵
F3	۰/۱	۱	۲	۱/۵	۸۰	-	-	-	۱۹۴/۳±۱/۳	۱۹۴/۳±۱/۳	۰/۲۴۴±۰/۰۰۵	۵/۲۲±۰/۸۷
F4	۰/۲	۲	۴	۱/۵	۸۰	-	-	-	۲۹۴/۶±۰/۸۸۴	۲۹۴/۶±۰/۸۸۴	۰/۲۵۵±۰/۰۰۲	۸۸/۳۶±۲/۲۵
F4-0/5%LC	۰/۱	۱	۲	۰/۷۵	۸۰	۰/۵ درصد	-	-	۲۱۶/۰۶۶±۱/۰۹	۲۱۶/۰۶۶±۱/۰۹	۰/۸۷±۰/۰۲۸	۲۵/۰۰۳±۲/۷۵
۰/۱	۰/۱	۱	۲	۰/۷۵	۸۰	۰/۱ درصد	-	-	۱۷۳۳/۵±۴۸۱/۶۸	۱۷۳۳/۵±۴۸۱/۶۸	۰/۶۳۹±۰/۰۱۴	۲۲/۰۸±۲/۸۸
4-0/1%MC	۰/۱	۱	۲	۰/۷۵	۸۰	-	۰/۱	-	۳۱۶/۳۳±۰/۸۹۶	۳۱۶/۳۳±۰/۸۹۶	۰/۴۳۳±۰/۰۱	۸۵/۸۶±۰/۰۲۵
F4-0/1%HC	۰/۱	۱	۲	۰/۷۵	۸۰	-	-	۰/۱ درصد	۳۰۶/۸±۰/۲۱۱	۳۰۶/۸±۰/۲۱۱	۰/۳۵۰±۰/۰۵۳	۸۷/۸۵±۱/۹۳
F4-0/05%MC	۰/۱	۱	۲	۰/۷۵	۸۰	-	-	-	۳۷۵/۳±۹/۰۳	۳۷۵/۳±۹/۰۳	۰/۹۲۱±۰/۰۳۳	۲۴/۰۴±۵/۶۵
F4-0/05%HC	۰/۱	۱	۲	۰/۷۵	۸۰	-	-	-	۳۵۶/۶±۷/۴۳	۳۵۶/۶±۷/۴۳	۰/۸۴۶±۰/۰۳۳	۲۲/۰۶±۶/۶۵

Chitosan - MC: Middle Chitosan- LC: Low Chitosan n=3



نمودار شماره ۴: میانگین قدر مطلق پتانسیل زتای نانوذرات لیپیدی جامد و نانوذرات روکش شده با کیتوسان در فرمولاسیون های ۱۶-۱

در زمینه نانوذرات لیپیدی جامد حامل آلبومین سرم گامی صورت گرفت، نشان داده شد که با افزایش مقدار امولسیفایر در فرمولاسیون پراکنندگی اندازه ذره ای کاهش می یابد (۱۰). هم چنین طبق نتایج به دست آمده در مطالعه Rohan Shah و همکاران در زمینه تاثیر نوع ماتریکس لیپیدی و اکسپان های انتخاب شده بر ویژگی های نانوذرات لیپیدی جامد، با افزایش میزان امولسیفایر در فرمولاسیون پراکنندگی اندازه ذره ای کاهش یافت (۱۱).

تاثیر مقدار امولسیفایر بر پتانسیل زتا

به طور کلی امولسیفایرها بر اساس شارژ الکتریکی سطحی و اعمال دافعه الکتریکی بین ذرات با بار الکتریکی همسان یا دافعه فضایی موجب پایداری یا پراکنندگی های سوسپانسیونی می گردند. امولسیفایر های غیر یونی در بار الکتریکی سطح ذرات تغییر موثری ایجاد نمی کنند بلکه با ایجاد دافعه فضایی موجب پایداری ذرات پراکنده می گردند (۱۲). نتایج مربوط به پتانسیل زتا در جدول شماره ۱ و نمودار شماره ۴ نشان داده شده است. در ۳ فرمولاسیون F1، F2، F3 با ثابت ماندن مقدار دارو و لیپید و افزایش میزان امولسیفایر پتانسیل زتا از ۱/۳۵ ± ۳۶/۹۲ در فرمولاسیون شماره ۱ به ۱/۵ ± ۲۳/۸ در فرمولاسیون ۳، به صورت معناداری کاهش می یابد (p < ۰/۰۵).

در مطالعه ای، Rohan Shah و همکاران تاثیر نوع ماتریکس لیپیدی و اکسپان های انتخاب شده بر ویژگی های نانوذرات لیپیدی جامد را مورد بررسی قرار دادند. در این مطالعه ارتباط خطی بین غلظت امولسیفایر Tween 20 و زتا پتانسیل یافت نشد. در میان نانوذرات لیپیدی تولید شده ذراتی که با Tween 20 پوشیده شده بودند با وجود کمتر بودن قدر مطلق زتا پتانسیل شان پایدار ماند که به علت ایجاد پایداری فضایی توسط امولسیفایر بوده است (۱۱). در مطالعه Carne Dal Pizzol و همکاران در زمینه تاثیر نوع سورفکتانت و لیپید به کار رفته در فرمولاسیون نانوذرات لیپیدی جامد در ویژگی های فیزیکی و شیمیایی آن ها، تاثیر تغییر در غلظت سورفکتانت ها (polysorbate 80 lecithin S75) بر پتانسیل زتا مورد ارزیابی قرار گرفت که طبق نتایج به دست

آمده، افزایش غلظت سورفاکتانت تاثیر معنی داری بر پتانسیل زتا نداشته است و اما با افزایش غلظت سورفاکتانت قدر مطلق پتانسیل زتا ۱۵ به ۱۰ کاهش یافت (۱۴،۱۳).

بررسی تاثیرات کیتوسان با ویسکوزیته‌های مختلف low-middle-high بر اندازه ی ذرات

با ساخت فرمولاسیون‌های مختلف و روکش دادن آن‌ها با پلیمر کیتوسان با ویسکوزیته‌های مختلف، روکش نانوذرات با کیتوسان موجب افزایش اندازه‌ی ذرات می‌شود که به دلیل جذب کیتوسان روی قطره‌های روغنی و تشکیل یک لایه ضخیم دور ذرات می‌باشد. باتوجه به جدول شماره ۱ با کاهش درصد کیتوسان low از ۰/۵ به ۰/۱ اندازه‌ی نانوذرات از $81/00 \pm 2160/66$ در فرمولاسیون F4-0/5%LC به $481/3 \pm 1723/5$ در فرمولاسیون F4-0/1%LC کاهش پیدا می‌کند ولی در مورد middle با کاهش غلظت از ۰/۱ به ۰/۰۵، اندازه‌ی ذرات از $316/3 \pm 0/896$ در فرمولاسیون شماره F4-0/1%MC به $375/33 \pm 9/03$ در فرمولاسیون شماره F4-0/05%MC اندکی افزایش پیدا می‌کند و در مورد high با کاهش غلظت از ۰/۱ به ۰/۰۵ اندازه‌ی ذرات از $306/8 \pm 0/721$ در فرمولاسیون شماره F4-0/1%HC به $356/6 \pm 7/43$ در فرمولاسیون شماره F4-0/05%HC اندکی افزایش پیدا می‌کند. بین کیتوسان با ویسکوزیته‌های مختلف کم‌ترین سایز مشاهده شده مربوط به نوع high می‌باشد. در مطالعه‌ای که توسط Sarmiento و همکاران روی نانو ذرات انسولین روکش شده با کیتوسان انجام شد نشان داد که روکش با کیتوسان موجب افزایش سایز ذرات می‌شود (۱۳).

بررسی تاثیرات کیتوسان با ویسکوزیته‌های مختلف low-middle-high بر پتانسیل زتا

با توجه به جدول شماره ۱ و نمودار شماره ی ۴، روکش دادن نانوذرات لیپیدی جامد اسپیرونولاکتون با پلیمر کیتوسان موجب تغییر در علامت عددی زتا

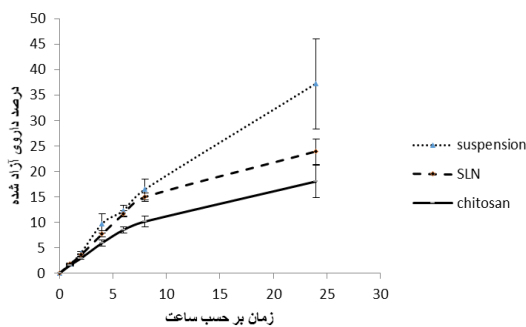
می‌شود به طوری که پتانسیل زتا در نانوذرات لیپیدی جامد در فرمول $(12/56 \pm 25/5)$ F4 که به ترتیب با کیتوسان‌های low، middle، high روکش داده شده اند به $(21/3 \pm 0/81)$ F4-0/1%HC، $(14/46 \pm 0/51)$ F4-0/1%MC، $(15/7 \pm 0/45)$ تغییر یافت. در مطالعه‌ای که توسط یانگ و همکاران برای بهبود پایداری، رهش، ویژگی‌های زیست چسبی و جذب سلولی نانوذرات انجام شد، مشاهده گردید که روکش نانوذرات با کیتوسان موجب تغییر در علامت و مقدار عددی پتانسیل زتا می‌شود (۵).

بررسی تاثیرات کیتوسان با ویسکوزیته‌های مختلف low-middle-high بر شاخص پراکندگی نانوذرات

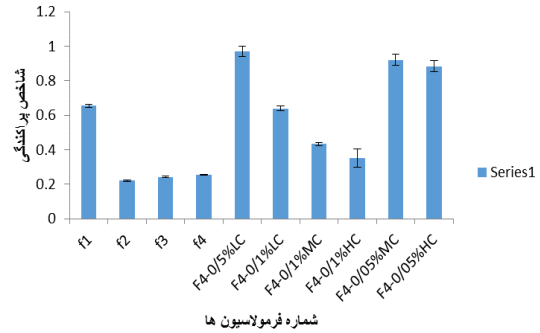
شاخص پراکندگی اندازه ذره‌ای نانوذرات لیپیدی جامد (PDI) در محدوده ۰-۰/۵ به معنای یکنواخت بودن پراکندگی اندازه ذره‌ای می‌باشد. روکش نانوذرات اسپیرونولاکتون با کیتوسان موجب افزایش پراکندگی ذره‌ای می‌شود. نتایج مربوط به PDI در جدول شماره‌ی ۱ و نمودار شماره‌ی ۵ نشان داده شده است. بهترین شاخص پراکندگی مربوط به فرمولاسیون $(0/350 \pm 0/053)$ F4-0/1%HC که با غلظت ۰/۱ درصد کیتوسان می‌باشد و با تغییر غلظت کیتوسان شاخص پراکندگی به طور موثری افزایش می‌یابد ($p < 0/05$) به طوری که مشاهده می‌شود با تغییر غلظت از ۰/۵ درصد به ۰/۰۵ درصد میزان شاخص پراکندگی $0/97 \pm 0/028$ و $0/33 \pm 0/884$ تغییر یافت. هم‌چنین در مورد تاثیر نوع کیتوسان مشاهده شد که بهترین شاخص پراکندگی مربوط به کیتوسان high می‌باشد $(0/350 \pm 0/053)$. با تغییر نوع کیتوسان به low و middle شاخص پراکندگی به ترتیب $0/14 \pm 0/639$ و $0/1 \pm 0/433$ تغییر یافت. در مطالعه‌ای که توسط Sarmiento و همکاران روی نانوذرات انسولین روکش شده با کیتوسان انجام شد، نشان داد که روکش با کیتوسان موجب افزایش در پراکندگی ذرات می‌شود (۱۳).

بررسی میزان داروی آزاد شده در محیط انحلال

با توجه به بررسی‌های انجام گرفته SLN های روکش شده با کیتوسان نسبت به خود نانوذرات لیپیدی جامد و نانوسپانسیون، سرعت آزاد سازی کم‌تری دارند. طبق نمودار شماره ۷ آزاد سازی اسپیرونولاکتون با روکش کیتوسان high از غشای دیالیز از همان ساعت‌های اول به کندی انجام شد و به‌طور معنی‌داری در ساعت ۲ از ۲۳۱±۰/۹۲ درصد تا ساعت ۲۴ به ۱۸/۰۰۱±۳/۱۴۶ درصد، داروی کم‌تری را نسبت به نانوسپانسیون اسپیرونولاکتون در ساعت ۲ از ۲۹۱±۰/۲۹۱ درصد تا ساعت ۲۴ به ۸/۹۱۸±۳۷/۱۶ آزاد نمود (جدول شماره ۲) ($p < 0/05$). با توجه به نمودار شماره ۷ آزاد سازی اسپیرونولاکتون با روکش کیتوسان high از غشای دیالیز به‌طور موثری از نانوذرات لیپیدی جامد در طی ۲۴ ساعت کم‌تر بوده است ($p < 0/05$). نانو ذرات روکش شده با کیتوسان از ساعت اول تا ۲۴ ساعت بعد رهشی آهسته دارند. روکش نانو ذرات با کیتوسان یک لایه ضخیمی را اطراف هسته لیپیدی تشکیل می‌دهد که منجر به آزادسازی آهسته دارو می‌شود پس می‌توان گفت روکش دادن نانوذرات با پلیمر کیتوسان موجب کنترل در سرعت آزاد سازی دارو می‌شود. وانگ و همکاران در مطالعه‌ای برای افزایش کارایی نانوذرات لیپیدی سیس پلاتین در درمان سرطان وابسته به گردن نشان دادند که نانوذرات روکش شده با کیتوسان نسبت به نانو ذرات لیپیدی سرعت آزادسازی کم‌تری دارند(۱۵).



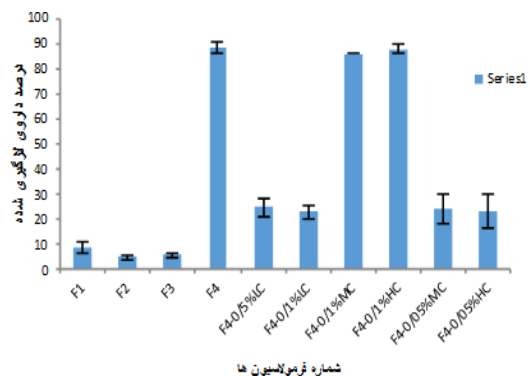
نمودار شماره ۷: مقایسه آزاد سازی داروی اسپیرونولاکتون از سه فرم نانوسپانسیون، نانوذرات لیپیدی جامد و نانوذرات روکش شده با کیتوسان در محیط انحلال در زمان‌های مختلف



نمودار شماره ۵: میانگین PDI نانوذرات لیپیدی جامد و نانوذرات روکش شده با کیتوسان در فرمولاسیون‌های ۱-۱۶

بررسی میزان بارگیری دارو

نتایج مربوط به بارگیری دارو در نانوذرات لیپیدی و فرمولاسیون‌های روکش شده با کیتوسان در جدول شماره ۱ و نمودار شماره ۶ نشان داده شده است. میزان بارگیری دارو با افزایش میزان اسپان ۸۰ از ۱/۳۲ گرم به ۴ گرم از ۸/۸۴±۱/۸۸ در فرمولاسیون F1 به ۸۸/۳۶±۲/۲۵ در فرمولاسیون F4 بصورت موثری افزایش یافت ($p < 0/05$). روکش کردن فرمولاسیون F4 با کیتوسان (F4-0/1%MC و F4-0/1%HC) تغییر معناداری در میزان بارگیری دارو نداشته است. Danila و Ridolfi و همکارانش روی نانوذرات لیپیدی جامد و نانوذرات لیپیدی جامد روکش شده با کیتوسان دارو ترتیبی مطالعه انجام دادند و رابطه معناداری بین بارگیری نانوذرات لیپیدی جامد و نانوذرات لیپیدی جامد روکش شده با کیتوسان نیافتند(۱۵).



تصویر شماره ۶: میانگین درصد داروی بارگیری شده نانوذرات روکش شده با کیتوسان در فرمولاسیون‌های ۷ و ۸

جدول شماره ۲: مقایسه آزاد سازی داروی اسپیرونولاکتون از سه فرم نانوسوسپانسیون، نانو ذرات لیپیدی جامد و نانو ذرات روکش شده با کیتوسان high در محیط انحلال در زمان های مختلف

زمان بر حسب ساعت	درصد داروی آزاد شده به صورت تجمعی بر حسب میلی گرم	F4	F4-0/1%HC	نانوسوسپانسیون
۱	۱/۵۶±۰/۱۶۶	۱/۷۷±۰/۲۱۷	۱/۷۸±۰/۱۲۲	۱/۷۸±۰/۱۲۲
۲	۲/۹۲±۰/۲۳۱	۳/۵۹±۰/۲۳۱	۳/۹۴±۰/۲۹۱	۳/۹۴±۰/۲۹۱
۴	۵/۹۵±۰/۶۰۹	۷/۷۱±۰/۶۱۳	۹/۷۶±۱/۸۶۲	۹/۷۶±۱/۸۶۲
۶	۸/۵۰±۰/۵۹۵	۱۱/۶۳±۰/۵۸۲	۱۲/۲۸±۱/۰۵۶	۱۲/۲۸±۱/۰۵۶
۸	۱۰/۱۳±۱/۰۵۱	۱۴/۹۴±۰/۸۴۵	۱۶/۴۵±۱/۹۹	۱۶/۴۵±۱/۹۹
۲۴	۱۸/۰۰۱±۲/۱۴۶	۲۳/۸۹±۲/۴۶۹	۳۷/۱۶±۸/۹۱۸	۳۷/۱۶±۸/۹۱۸

در مطالعه‌ای که توسط یانگ لی و همکاران برای بهبود رهش نانوذرات لیپیدی و کنترل آزادسازی آن انجام گرفت، نشان داده شد که نانوذرات روکش شده با کیتوسان نسبت به نانو ذرات روکش داده شده با پولوکسامر ۱۸۸، و نانو ذرات روکش شده با پولوکسامر ۱۸۸ و پلی اتیلن گلیکول سرعت آزادسازی کمتری دارند (۱۵).

References

- Mueller RH, Mäder K, Gohla S. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery - a review of the state of the art. *Eur J Pharm Biopharm* 2000; 50(1): 161-177.
- Bhushan B. *Encyclopedia of nanotechnology*. Netherlands; Springer 2012.
- Rohit B, Pal KI. A method to prepare solid lipid nanoparticles with improved entrapment efficiency of hydrophilic drugs. *Curr Nanosci* 2013; 9(2): 211-220.
- Dammak I, Bittante AMQB, Lourenço RV, do Amaral Sobral PJ. Properties of gelatin-based films incorporated with chitosan-coated microparticles charged with rutin. *Int J Biol Macromol* 2017; 101: 643-652
- Y Luo Y, Teng Z, Li Y, Wang Q. Solid lipid nanoparticles for oral drug delivery: chitosan coating improves stability, controlled delivery, mucoadhesion and cellular uptake. *Carbohydr Polym* 2015; 122: 221-229.
- Schäfer-Korting M, Mehnert W, Korting HC. Lipid nanoparticles for improved topical application of drugs for skin diseases. *Adv Drug Deliv Rev* 2007; 59(6): 427-443.
- Limayem Blouza I, Charcosset C, Sfar S, Fessi H. Preparation and characterization of spironolactone-loaded nanocapsules for paediatric use. *Int J Pharm* 2006; 325(1-2): 124-131.
- Kelidari HR, Saeedi M, Akbari J, MortezaSemnani K, Gill P, Valizadeh H, et al. Formulation optimization and in vitro skin penetration of spironolactone loaded solid lipid nanoparticles. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2015; 128: 473-479.
- Laouini A, Jaafar-Maalej C, Sfar S, Charcosset C, Fessi H. preparation using a hollow fiber membrane contactor--application to spironolactone encapsulation. *Int J Pharm*. 2011; 415(1-2): 53-61.
- Schubert MA, Müller-Goymann CC. Characterisation of surface-modified solid lipid nanoparticles (SLN): influence of lecithin and nonionic emulsifier. *Eur J Pharm Biopharm* 2005; 61(1-2): 77-86.
- Shah R, Eldridge D, Palombo E, Harding I. Optimisation and stability assessment of solid lipid nanoparticles using particle size and zeta potential. *J Phys Sci* 2014; 25(1): 59-75.
- Anarjan N, Tan CP. Effects of selected polysorbate and sucrose ester emulsifiers on the physicochemical properties of astaxanthin

- nanodispersions. *Molecules* 2013; 18(1): 768-777.
13. Fonte P, Andrade F, Araújo F, Andrade C, Neves Jd, Sarmiento B .Chitosan-coated solid lipid nanoparticles for insulin delivery. *Methods Enzym* 2012; 508: 295-314.
14. Pizzol CD, Filippin-Monteiro FB, Restrepo JA, Pittella F, Silva AH, Alves de Souza P, et al. Influence of surfactant and lipid type on the physicochemical properties and biocompatibility of solid lipid nanoparticles. *Int J Environ Res Public Health* 2014; 11(8): 8581-8596.
15. Wang JY, Wang Y, Meng X. Chitosan nanolayered cisplatin-loaded lipid nanoparticles for enhanced anticancer efficacy in cervical cancer. *Nanoscale Res Lett* 2016; 11(1): 524.