

Investigating the Effect of Mixed Surfactants with Different HLBs on the Properties of Solid Lipid Nanoparticle of Spironolactone

Zhila Imani¹,
Majid Saeedi^{2,3},
Jafar Akbari^{3,2},
Katayon Morteza Semnani⁴,
Zahra Imani⁵

¹ Pharmacology Resident, Faculty of Pharmacy, 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 Pharmaceutical Chemistry, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁵ Assistant Professor, Department of Pediatric Dentistry, Faculty of Dentistry, Birjand University of Medical Sciences, Birjand, Iran

(Received March 12, 2018 ; Accepted May 29, 2018)

Abstract

Background and purpose: This study investigated the effect of different HLBs on these nanoparticles using spironolactone solid lipid nanoparticles.

Materials and methods: The spironolactone loaded SLN was prepared by emulsion/solvent evaporation technique followed by ultrasonication. In this study, Palmitic acid was used as carrier. Different weight ratio of drug, carrier, Span60 and Tween80 were selected. Different formulations were prepared with different HLBs. Nanoparticle properties like particle size, polydispersity index, zeta potential and entrapment efficiency were investigated. Optimum formulation was chosen for evaluation of drug release and other properties of nanoparticles by DSC and FT-IR spectroscopy.

Results: Increasing lipid concentration resulted in consequent increase entrapment efficiency and the size. Also, the F1-F9 formulations showed that Zeta potential was in an acceptable range, and only reduce in HLB in F4 was accompanied with decreasing Zeta potential. Spironolactone was found to have a higher drug release rate in the SLN form. Information from the FT-IR spectroscopy and the DSC thermogram indicated effective entrapment of drug in the carrier.

Conclusion: spironolactone-SLNs provide a controlled and increased drug release rates. Spironolacton-SLN would provide high drug levels at the site of action, therefore, this product could be useful in topical drug delivery.

Keywords: solid lipid nanoparticles, spironolactone, Tween 80, Palmitic acid, Span 60

J Mazandaran Univ Med Sci 2018; 28 (162): 37-46 (Persian).

* **Corresponding Author:** Zhila Imani - Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (Email: vidashafipour@yahoo.com)

بررسی تاثیر مخلوط سورفکتانت با HLB های مختلف، بر ویژگی‌های نانوذرات لیپیدی از داروی اسپرونولاکتون

ژیلا ایمانی^۱
مجید سعیدی^{۳و۲}
جعفر اکبری^{۲و۳}
کتایون مرتضی سمناي^۴
زهرای ایمانی^۵

چکیده

سابقه و هدف: در این پژوهش با ساخت نانوذرات لیپیدی جامد از اسپرونولاکتون، تاثیر HLB های مختلف بر روی ویژگی های این نانوذرات مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها: برای تهیه نانو ذرات لیپیدی اسپرونولاکتون از روش Solvent emulsification/evaporation به همراه ultrasonication استفاده شد. در این پژوهش از پالمیتیک اسید به عنوان حامل استفاده شد. نسبت‌های مختلف وزنی حامل و دارو، هم‌چنین نسبت‌های مختلف اسپان ۸۰ و توین ۶۰ انتخاب گردید. فرمولاسیون‌های مختلف با HLB متفاوت تهیه و ویژگی‌های نانوذرات مانند اندازه ذره‌ای، توزیع اندازه ذرات، پتانسیل زتا و بارگیری دارو مورد بررسی قرار گرفت. در نهایت فرمولاسیون اپتیمم جهت بررسی میزان آزاد سازی دارو و ارزیابی خصوصیات نانوذرات توسط DSC و اسپکتروسکوپی FT-IR انتخاب شد.

یافته‌ها: با افزایش میزان چربی، میزان بارگیری دارو و اندازه‌ی نانو ذرات افزایش می‌یابد. بررسی فرمولاسیون‌های F₁-F₉ نشان می‌دهد که پتانسیل زتا در محدوده قابل قبول قرار دارد و تنها در F₄ کاهش HLB با کاهش پتانسیل زتا همراه است. هم‌چنین اسپرونولاکتون در فرم SLN سرعت آزادسازی بالاتری دارد. اطلاعات به دست آمده از FT-IR و ترموگرام DSC نیز نشان از بارگیری موثر دارو در حامل دارد.

استنتاج: نانو ذرات لیپیدی جامد اسپرونولاکتون باعث رهش کنترل شده و هم‌چنین افزایش میزان رهش دارو می‌شود. با به کارگیری آن در فرآورده‌های موضعی، مقدار داروی بیش‌تری در محل اثر آزاد خواهد شد. بنابراین کاربرد آن در فرآورده‌های موضعی مطلوب خواهد بود.

واژه های کلیدی: نانوذرات لیپیدی جامد، اسپرونولاکتون، توین ۸۰، پالمیتیک اسید، اسپان ۶۰

مقدمه

داروی اسپرونولاکتون (Spironolactone) یک آنتاگونیست آلدوسترون و یک آنتاگونیست رسپتورهای آندروژنی است (۱) که بیش از ۲۰ سال است که به طور موضعی در درمان هیرسوتیسم و آکنه مورد استفاده قرار گرفته می‌گیرد (۲). با وجود اثربخشی این دارو، حلالیت کم آن در آب و آزادسازی آهسته سبب

E-mail: jilaimani@protonmail.com

مؤلف مسئول: ژیلایمانی - ساری: کیلومتر ۱۸ جاده خزرآباد، مجتمع دانشگاهی پیامبر اعظم، دانشکده داروسازی

۱. دانشجوی دکتری حرفه ای داروسازی، دانشکده داروسازی، 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، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۵. استادیار، گروه دندانپزشکی کودکان، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، دانشگاه علوم پزشکی بیرجند، بیرجند، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۱۲/۲۱ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۷/۱/۱۸ تاریخ تصویب: ۱۳۹۷/۳/۸

کاهش فراهمی زیستی خوراکی این دارو شده است. یکی از راه های امیدوار کننده برای مدیریت این دارو استفاده از اشکال دارویی نانو است که می تواند سبب پایداری دارو و اثربخشی آن گردد (۳).

مطالعات نشان می دهد که کاهش اندازه ذرات دارو با زیاد کردن میزان سطح دارو، باعث افزایش آزادسازی دارو می شود. هم چنین با توجه به رابطه Noyes-Whitney سرعت آزادسازی دارو با سطحی از دارو که در تماس با محیط انحلال است، مرتبط می باشد (۴). مطالعات حاکی آن است که قرص های اسپرونولاکتون که ذراتشان $21/2$ میکرون است، نسبت به قرص هایی با اندازه ذره ای $78/8$ میکرون، فراهمی زیستی بسیار بالاتری دارند (۵). با توجه به این موضوع، برای اطمینان خاطر از داشتن فراهمی زیستی بالای خوراکی، ۹۰ درصد ذرات دارو باید کم تر از 10 میکرون باشند (۶). هم چنین روش هایی مثل کمپلکس با سیکلو دکسترین، لیوفیلیزه شدن و پراکندگی جامد، باعث افزایش انحلال پذیری اسپرونولاکتون می شود (۷). در سال های اخیر، رساندن اندازه ذره دارویی در ابعاد تحت میکرون از اهمیت بالایی برخوردار گشته است. از دلایل این امر، فراهمی زیستی خوراکی بالاتر، سطح ذرات بالاتر در تماس با محیط انحلال، افزایش انحلال پذیری اشباع دارو و آزاد سازی دارو می باشد (۷). نانوذرات لیپیدی به دلیل داشتن چربی های فیزیولوژیک و تجزیه پذیر به عنوان سیستم های حامل با تحمل بالا برای مصارف پوستی مطرح می باشد. پتانسیل نانوذرات لیپیدی در هدفمند کردن پوستی، کنترل آزادسازی، عوارض پوستی کم و محافظت از ترکیبات فعال اثبات شده می باشد. نشان داده شده است که اندازه کوچک ذرات در نانوذرات لیپیدی، حضور نانوذرات را در تماس مستقیم با لایه شاخی بهبود و ورود عوامل انکپسوله به داخل سلول را تضمین می کند (۸).

هدف از این بررسی، ساخت نانوذرات لیپیدی جامد Solid Lipid Nanoparticles (SLN) از

اسپرونولاکتون و بررسی تاثیر HLB های مختلف بر روی این نانوذرات می باشد. بدین منظور، ۹ فرمولاسیون مختلف تهیه شده و تاثیر میزان چربی و HLB های مختلف بر روی بارگیری دارو، اندازه ذره ای و شاخص پراکندگی مورد بررسی قرار گرفت. هم چنین در انتها، آزادسازی دارو توسط غشا دیالیز اندازه گیری شد.

مواد و روش ها

مواد مورد استفاده

پالمیتیک اسید و گلیسرین مونو استئارات از شرکت سیگما (Sigma, Germany) خریداری شد. پودر داروی اسپرونولاکتون ساخت شرکت بهداشت کار ایران بود. توئین ۸۰ و اسپان ۶۰ از شرکت کره ای SAMSHUN PURE تهیه شد. هم چنین کلیه حلال ها از نوع آزمایشگاهی با خلوص بالا بودند.

ساخت نانوذرات لیپیدی جامد

برای تهیه نانو ذرات اسپرونولاکتون از روش Solvent emulsification/evaporation استفاده شد. برای این منظور بر اساس مقادیر جدول شماره ۱، پالمیتیک اسید، اسپان ۶۰ و اسپرونولاکتون در دی کلرومتان حل گردید. در مرحله بعد محلول حاصل به فاز آبی حاوی توئین ۸۰ در حین همزدن توسط هورنایزر اضافه شد. به مدت پنج دقیقه مخلوط حاصل توسط اولترا همونایزر با دور ۱۳۰۰۰ در دقیقه هموزن گردید. سوسپانسیون حاصل، ۵ دقیقه در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد با سونیکاتور پروب دار سونیکه و سپس به مدت ۲۴ ساعت، روی استیرر قرار داده شد تا حلال آلی از محیط خارج و نانو سوسپانسیون از ذرات دارو به دست آید (۹).

اندازه گیری پتانسیل زتا، اندازه و شاخص پراکندگی

اندازه ذرات، شاخص پراکندگی و پتانسیل زتای نانو ذرات لیپیدی جامد اسپرونولاکتون توسط

(DSC) Differential Scanning Calorimetry

برای دستیابی به ترموگرام نمونه‌های مورد آزمایش از این روش استفاده شد. برای انجام این تست، ۵ میلی گرم از هر نمونه برداشته و در داخل پن‌های آلومینیومی دستگاه قرار داده شد. نمونه‌ها با سرعت ۱۰ درجه سانتی گراد در دقیقه و در محدوده دمایی ۳۰-۳۰۰ درجه سانتی گراد مورد بررسی قرار گرفتند.

خشک و منجمد کردن

در حوزه داروسازی جهت تبدیل محلول‌ها و سوسپانسیون‌ها به فرم جامد با پایداری قابل قبول جهت توزیع و نگهداری فریز درای کردن مورد استفاده قرار می‌گیرد. آب منجمد از طریق تصعید خارج می‌شود. برای تمامی ماتریکس‌های لیپیدی مورد مطالعه، فریز درای کردن در نتیجه پیوستن نانوذرات، منجر به تشکیل نانو ذرات لیپیدی جامد بزرگ تر با توزیع اندازه ذره‌ای گسترده‌تر می‌شود. مقدار مناسبی از cryoprecipitant ها می‌تواند از به هم پیوستن نانوذرات لیپیدی جامد در حین فریز درای کردن جلوگیری کند (۱۰). پس از تهیه امولسیون نانوذرات لیپیدی فرمولاسیون منتخب (F3)، آن را در ۱۲ اپندورف ریخته و به مدت نیم ساعت با دور ۲۵۰۰ rpm و در دمای ۴ درجه سانتی گراد سانتریفیوژ، بخش رویی را دور ریخته و بخش رسوب را با آب دیونیزه شسته و به مدت ۱۵ دقیقه سانتریفیوژ گردید. رسوب حاصل مجدداً با آب دیونیزه شسته شد. اپندورف‌ها در دستگاه فریز درای قرار داده شدند.

بررسی رهش و آزادسازی دارو

در این مرحله فرمولاسیون منتخب (فرمولاسیون شماره ۳) برای سنجش میزان داروی آزاد شده انتخاب شد و رهش دارو در ۹۰۰ میلی لیتر بافر فسفات (pH= ۶/۶) و با استفاده از غشای دیالیز ۲۷ کیلو دالتون (بیوژن، ایران) مورد بررسی قرار گرفت.

ابتدا غشای دیالیز به مدت ۲۴ ساعت در آب مقطر قرار داده شد. پس از بستن انتهای کیسه‌های دیالیز، ۵

Dynamic Light Scattering (DLS) با استفاده از دستگاه Zetasizer Nano ZS در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد و زاویه ۹۰ درجه اندازه گرفته شد. غلظت نمونه‌ها به گونه‌ای بود که در تمام نمونه‌ها برای اندازه‌گیری پتانسیل زتا به ۴۰۰-۲۰ کیلو شمارش در هر ثانیه دست یافته شد (۹).

اندازه‌گیری میزان داروی بارگیری شده

به این منظور فراورده مایی از نانو ذرات لیپیدی جامد را با دور ۲۵۰۰ rpm به مدت ۳۰ دقیقه، در دمای ۴ درجه سانتی گراد در سه اپندورف ۲ میلی لیتری، سانتریفیوژ گردید. بخش رویی را جداگانه جمع‌آوری و از فیلتر ۰/۲۲ نانومتر عبور داده شد. ۵۰۰ میکرولیتر از بخش رویی جمع‌آوری شده را در بالون ژوژه ۵۰ میلی لیتری ریخته و به حجم ۵۰ میلی لیتر رسانده شد، جذب نمونه رقیق شده در طول موج ۲۳۹/۸ نانومتر قرائت گردید و با قرار دادن عدد جذب در منحنی استاندارد، غلظت بر حسب میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد. عدد به دست آمده در ضریب رقت (۱۰۰) ضرب و با ضرب غلظت واقعی در حجم سوپرناتانت میزان داروی بارگیری نشده محاسبه گردید و با کسر آن از ۱۶۰ (مقدار کل داروی موجود در ۸۰ میلی لیتر فرآورده)، میزان داروی بارگیری شده و درصد آن نیز به دست آمد (۹).

$$\text{Entrapment Efficiency} = \frac{W_{\text{total}} - W_{\text{free}}}{W_{\text{total}}} \times 100\%$$

اسپکتروسکوپی FTIR

از دستگاه Perkin-Elmer spectrum one استفاده شد. جهت تهیه دیسک‌های ۱۰ میلی لیتری مورد نیاز برای انجام آزمایش، هر یک از نمونه‌ها به نسبت ۱:۵ با پتاسیم برماید مخلوط و به مدت ۱۵ ثانیه تحت فشار ۳-۶ تن قرار گرفت. نیروی لازم برای اعمال این فشار توسط جک هیدرولیک بر روی دستگاه پرس تعبیه شده، تامین شد. دقت اسکن 4 cm^{-1} و محدوده اسکن $4000-400\text{ cm}^{-1}$ بوده است.

سی سی دارو داخل آن‌ها ریخته و سر کیسه‌های دیالیز نیز بسته شد. کیسه‌های دیالیز به صورت افقی به بخش پارویی دستگاه تست انحلال متصل و آزادسازی در مدت ۲۴ ساعت با دور ۶۰ rpm و دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت. نمونه‌گیری در ساعات ۰/۵، ۱، ۲، ۴، ۶، ۸، ۲۴ 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 اسپکتروفتومتر UV قرائت شد. اعداد حاصل از جذب در معادله جذب-غلظت اسپرونولاکتون قرار داده و غلظت داروی آزاد شده محاسبه گردید. جهت ثابت ماندن محیط انحلال، بعد از هر بار نمونه‌گیری و برداشتن ۵ سی‌سی از محیط، ۵ سی‌سی بافر به محیط اضافه شد.

بررسی آماری داده‌ها

در این پژوهش نتایج به دست 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 و ارزش $p < 0/05$ مبنای تفاوت معنی‌دار تلقی گردید.

یافته‌ها

برای تهیه نانو ذرات اسپرونولاکتون از روش Solvent emulsification/evaporation استفاده شد. برای این منظور ابتدا ۹ فرمولاسیون مختلف دارو با نسبت‌های وزنی مختلف از حامل و دارو (جدول شماره ۱) انتخاب شد و پس از ساخت آن‌ها، تاثیر میزان چربی و HLB‌های مختلف بر روی بارگیری دارو، اندازه ذره‌ای و شاخص پراکندگی مورد بررسی قرار گرفت.

بازده محبوس‌سازی و بارگذاری دارو

نمودار استاندارد محلول دارو در الکل در طول موج ۲۳۹/۸ رسم شد، فرمول استاندارد به صورت

$abs = 0.0474con + 0.0078$, $r^2 = 0.999$ به دست آمد. میزان بازده محبوس‌سازی و بارگذاری دارو در ۹ فرمولاسیون مختلف ذکر شده مطابق جدول شماره ۱ به دست آمد. نتایج به دست آمده نشان می‌دهد افزایش در میزان چربی باعث افزایش در میزان بارگیری دارو می‌شود. در فرمولاسیون‌های F₁-F₆، میزان چربی ۴ برابر میزان دارو و در فرمولاسیون‌های F₇-F₉، میزان چربی ۲ برابر میزان دارو می‌باشد. میانگین درصد بارگیری دارو در فرمولاسیون F₄ برابر $85/038 \pm 1/78$ و در فرمولاسیون F₇ برابر $71/408 \pm 0/696$ محاسبه شد (جدول شماره ۱). از سوی دیگر نتایج نشان دهنده موثر بودن HLB بر میزان داروی بارگیری شده است. در فرمولاسیون F₄ و F₅ و F₆ با کاهش HLB، میانگین درصد بارگیری دارو در بالاترین میزان قرار گرفت. میانگین درصد بارگیری دارو در فرمولاسیون F₅ برابر $87/09667 \pm 5/899$ ، در فرمولاسیون F₄ برابر $85/038 \pm 1/78$ و در فرمولاسیون F₆ برابر $83/2933 \pm 3/439$ محاسبه شد (جدول شماره ۱).

اندازه متوسط ذرات و توزیع اندازه ذرات

اندازه متوسط نانو ذرات ساخته شده در فرمولاسیون‌های مختلف در جدول شماره ۱ نمایش داده شده است. نتایج نشان می‌دهد که با افزایش میزان لیپید، اندازه نانو ذرات نیز افزایش یافته است. به طوری که در فرمولاسیون F₅، میانگین قطر اندازه ذره‌ای برابر $593/9 \pm 171/5654$ و در فرمولاسیون F₈ برابر $308/8667 \pm 38/4831$ نانو متر می‌باشد.

تاثیر تغییرات HLB بر پتانسیل زتا نانو ذرات لیپیدی جامد

بار سطحی نانو ذرات با اندازه‌گیری پتانسیل زتا تعیین می‌شود که در جدول شماره ۱ ارائه شده است. نتایج به دست آمده از F₁-F₉ نشان می‌دهد که پتانسیل زتا در محدوده قابل قبولی قرار دارد. این نتایج نشان می‌دهد که تنها در F₄، کاهش HLB با کاهش پتانسیل

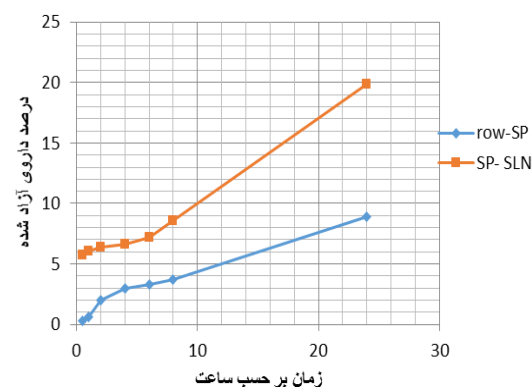
زتا همراه است و در بقیه فرمولاسیون‌ها، کاهش HLB تأثیری بر کاهش پتانسیل زتا نداشته است. هم‌چنین در F7 بر خلاف تصور، با وجود HLB بالا، میزان پتانسیل زتا کمی کاهش یافته است.

شاخص پراکندگی نانوذرات لیپیدی جامد

نتایج نشان می‌دهد که شاخص پراکندگی در محدوده قابل قبولی قرار دارد (جدول شماره ۱) و تغییرات HLB با تغییرات PI همراه نبوده است.

میزان داروی آزاد شده در محیط انحلال

نتایج نشان داد که اسپیرونولاکتون در فرم SLN نسبت به پودر خالص دارو سریع‌تر آزاد می‌گردد (تصویر شماره ۱). پودر اسپیرونولاکتون به فرم کریستال بوده و ساینز ذرات درشت است. در حالی که ذرات اسپیرونولاکتون در فرم SLN، به صورت آمورف بوده و بسیار ریزترند که این امر باعث افزایش سرعت آزادسازی دارو می‌شود.

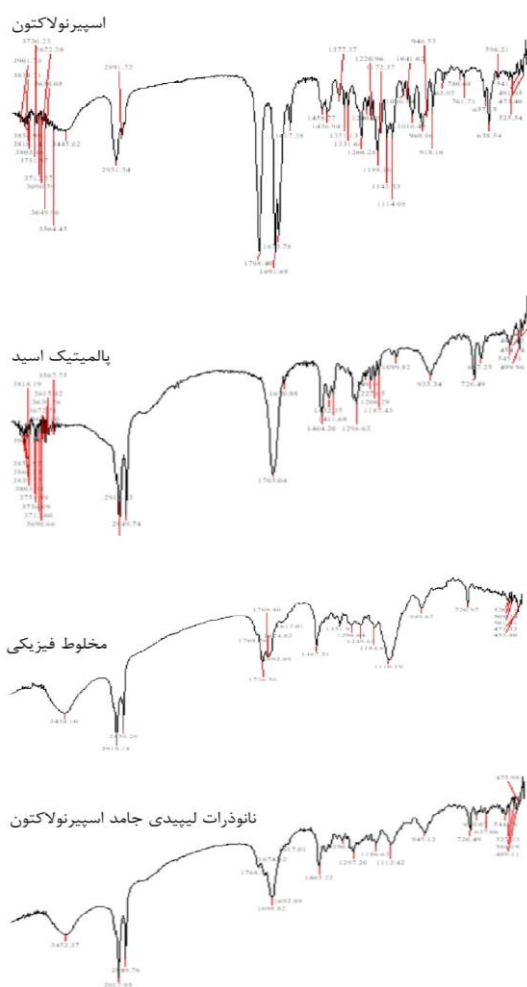


تصویر شماره ۱: درصد داروی آزاد شده از فرمولاسیون F3 در محیط انحلال در مقایسه با پودر اسپیرونولاکتون

مطالعات Fourier-Transform IR

طیف‌های FT-IR برای شناسایی تداخلات و پیوندهای احتمالی بین حامل و دارو استفاده می‌شود. در بررسی طیف FT-IR نانوذرات لیپیدی جامد اسپیرونولاکتون، پیک‌های مربوط به گروه‌های عاملی

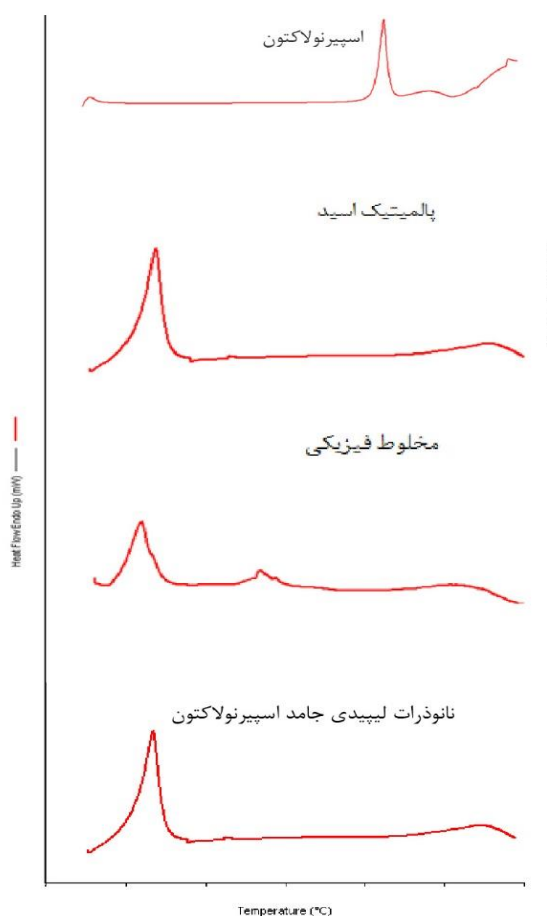
اسپیرونولاکتون مشاهده شدند. تغییری در عدد موج پیک‌های گروه شاخص اسپیرونولاکتون مانند گروه‌های کربونیل تیو استیل و کربونیل لاکتون و باند دوگانه مشاهده نشد، در نتیجه تداخل شیمیایی موثری را بین دارو و حامل نشان داده نشد (تصویر شماره ۲). طیف‌های FT-IR مربوط به مخلوط فیزیکی که شامل توین ۸۰، اسپان ۶۰، اسپیرونولاکتون و پالمیتیک اسید بود، جهت بررسی تداخلات مقایسه شدند. در نتایج به دست آمده، تغییری در عدد طول موج‌های گروه‌های شاخص ترکیبات به کار رفته دیده نشد، در نتیجه می‌توان گفت برهم کنش شیمیایی بین دارو و سایر اجزا در مخلوط فیزیکی وجود ندارد (تصویر شماره ۲).



تصویر شماره ۲: طیف‌های FT-IR اسپیرونولاکتون، پالمیتیک اسید، مخلوط فیزیکی و نانوذرات لیپیدی جامد اسپیرونولاکتون

درصد افزایش می‌یابد، بارگیری دارو به میزان موثری افزایش می‌یابد (۱۱).

نتایج مطالعه ما هم چنین نشان‌دهنده افزایش اندازه نانوذرات با افزایش میزان لیپید است. به طوری که در فرمولاسیون F5، میانگین قطر اندازه ذره ای برابر $171/5654 \pm 593/9$ و در فرمولاسیون F8، $38/48 \pm 308/86$ می باشد.



تصویر شماره ۳: ترموگرام DSC اسپیرونولاکتون، پالمیتیک اسید، مخلوط فیزیکی و نانوذرات لیپیدی جامد اسپیرونولاکتون

مطالعات Differential Scanning Calorimetry

ترموگرام DSC اسپیرونولاکتون خالص پیک گرماگیر تیزی در 212 درجه سانتی گراد نشان داد (تصویر شماره ۳) که وجود این پیک تیز در ترموگرام نشانگر این می باشد که اسپیرونولاکتون در پودر دارویی خود در حالت کریستال می باشد (۱۰). هم چنین ترموگرام DSC پالمیتیک اسید پیکی در محدوده $67/264 - 56/50359$ درجه سانتی گراد را نشان می دهد (تصویر شماره ۳). ترموگرام های DSC نانوذرات لیپیدی جامد فاقد پیک در 212 درجه سانتی گراد می باشند و تنها در $64/58226$ درجه سانتی گراد پیک ناشی از ذوب پالمیتیک اسید را نشان می دهند که نشان از بارگیری موثر دارو توسط حامل می باشد (تصویر شماره ۳). در همه فرمولاسیون ها، مقادیر دارو 160 میلی گرم، آب 80 سی سی و دی کلرومتان 16 سی سی می باشد.

بحث

در این مطالعه برای بررسی تاثیر HLB های مختلف بر نانوذرات لیپیدی جامد حاوی اسپیرونولاکتون، ۹ فرمولاسیون مختلف تهیه شده و تاثیر میزان چربی و HLB های مختلف بر روی بارگیری دارو، اندازه ذره ای و شاخص پراکندگی مورد بررسی قرار گرفت. نتایج به دست آمده نشان دهنده افزایش میزان بارگیری دارو در نانوذرات حاوی چربی بالاتر است. نتایج به دست آمده با نتایج سایر مطالعات انجام گرفته در این خصوص مطابقت دارد. Khalil و همکاران در مطالعه ای که بر روی نانوذرات لیپیدی جامد ملوکسیکام انجام دادند نشان دادند که وقتی غلظت چربی از 5 درصد به $7/5$

جدول شماره ۱: مقدار حامل، سورفکتانت، HLB، اندازه ذره ای، PDI، پتانسیل زتا و درصد بارگیری دارو

فرمولاسیون	پالمیتیک اسید (mg)	تولین ۸۰ (mg)	اسپان ۶۰ (mg)	HLB	اندازه ذره ای	PDI	پتانسیل زتا	درصد بارگیری دارو
F1	۶۴۰	۱۰۷۸/۲	۳۵۲/۸	۱۲/۴۷	۴۳۸/۴۳۳	۰/۵۳	-۱۳/۵۹	۷۸/۱۵۸
F2	۶۴۰	۹۶۰	۴۸۰	۱۱/۵۶	۳۷۰/۹	۰/۵۰۷	-۲۱/۲۳	۸۱/۳۹
F3	۶۴۰	۸۴۰	۶۰۰	۱۰/۷۰	۳۳۵/۱	۰/۵۳۳	-۲۴/۴۳۳	۷۶/۸۹
F4	۶۴۰	۷۲۰	۷۲۰	۹/۸۵	۵۰۸/۸۳۳	۰/۵۵۷	-۱۲/۹۱۶	۵۸/۰۳۸
F5	۶۴۰	۶۱۲	۸۲۸	۹/۰۷۷	۵۹۳/۹	۰/۸۷۶	-۲۳/۴۶۶	۸۷/۰۹۶
F6	۶۴۰	۴۸۰	۹۶۰	۸/۱۳	۳۶۰/۷۳۳	۰/۶۶۷	-۲۲/۵۶۶	۸۳/۲۹۳
F7	۳۲۰	۱۳۲۸/۸	۴۳۱/۲	۱۲/۴۷	۳۵۶/۳۶۶	۰/۹۲	-۱۵/۳۳۳	۷۱/۴۰
F8	۳۲۰	۱۱۷۹/۲	۵۸۰/۸	۱۱/۶۰۱	۳۰۸/۸۶۶	۰/۶۶	-۲۲/۰۳۳	۷۸/۱۳
F9	۳۲۰	۱۰۲۲/۴	۷۳۰/۴	۱۰/۶۹	۳۵۰/۶۶۶	۰/۵۱	-۱۵/۹	۸۱/۲۷

در همین راستا Witorino و همکاران نشان دادند که میانگین اندازه ذره‌ای با غلظت لیپید در فاز آلی در ارتباط است. براین اساس، محتوای لیپیدی بالا باعث افزایش در میزان ویسکوزیته شده و در نتیجه باعث می‌شود نیروی کافی برای خرد کردن ذرات وجود نداشته و در نتیجه اندازه ذره‌ای افزایش یابد (۱۲). هم‌چنین Rawia و همکاران در مطالعه‌ای که بر روی نانوذرات لیپیدی جامد ملوکسیکام انجام دادند، نشان دادند که وقتی غلظت چربی از ۵ درصد به ۷/۵ درصد افزایش می‌یابد، اندازه نانوذرات به‌طور موثر افزایش می‌یابد (۱۲). در بخشی دیگر از این مطالعه، تأثیر تغییرات HLB بر اندازه نانوذرات لیپیدی جامد مورد بررسی قرار گرفت. نتایج نشان داد که با کاهش میزان HLB در فرمولاسیون‌های F2-F5، اندازه نانوذرات افزایش می‌یابد. نتایج به دست آمده با شواهد علمی مبنی بر این که برای ساخت امولسیون روغن در آب HLB های مابین ۱۶-۸ مناسب است مطابقت دارد (۱۳). هم‌چنین افزایش میزان توئین ۸۰ با کاهش کشش بین سطح بین فاز مایه و لیپیدی منجر به تشکیل قطرات با اندازه کوچک‌تر می‌شود که این امر به‌طور موثری پایداری ذرات را با تشکیل یک سد فضایی بر روی سطح نانوذرات و محافظت آن‌ها از کواگوله شدن افزایش می‌دهد. به علاوه این افزایش در اندازه می‌تواند به این دلیل مناسب‌تر بودن سورفکتانت توئین ۸۰ جهت کاهش اندازه نانوذرات با حامل پالمیتیک اسید نسبت به اسپان ۶۰ باشد. به‌طوری‌که با افزایش نسبت توئین به اسپان، اندازه کاهش می‌یابد.

Samein نیز در مطالعه‌ای که بر روی تهیه و ارزیابی نانوذرات لیپیدی جامد نیستاتین با استفاده از گلیسرین مونو استئارات، توئین ۸۰ و اسپان ۶۰ برای دارورسانی موضعی با استفاده از طراحی Behnken Box انجام داد نشان داد که با افزایش غلظت اسپان ۶۰، اندازه نانوذرات کاهش می‌یابد (۱۴). نتایج تأثیر تغییرات HLB بر پتانسیل زتا و شاخص پراکندگی نانوذرات لیپیدی جامد نیز نشان‌دهنده قرار گرفتن پتانسیل زتا و شاخص پراکندگی

در حد قابل قبول است. تنها در F4، کاهش HLB با کاهش پتانسیل زتا همراه بود و در بقیه فرمولاسیون‌ها، کاهش HLB تأثیری بر کاهش پتانسیل زتا نداشت. در F7 نیز بر خلاف تصور، با وجود HLB بالا، میزان پتانسیل زتا کمی کاهش یافته است. نتایج به دست آمده نشان‌دهنده میزان بارگیری بالای دارو در نانوذرات لیپیدی جامد نیز بود. Samein در مطالعه‌ای که بر روی تهیه و ارزیابی نانوذرات لیپیدی جامد نیستاتین با استفاده از گلیسرین مونو استئارات، توئین ۸۰ و اسپان ۶۰ برای دارورسانی موضعی با استفاده از طراحی Box Behnken انجام داد نشان داد که با افزایش غلظت اسپان ۶۰ میزان بارگیری دارو در نانوذرات افزایش می‌یابد (۱۴).

در مطالعه‌ای که کلیدری و همکاران انجام دادند، مشاهده شد که درصد داروی بارگیری شده در فرمولاسیون‌های حاوی اسپان ۶۰، نسبت به فرمولاسیون‌های حاوی اسپان ۸۰، بیش‌ترین درصد داروی بارگیری شده را داشتند. اسپان ۶۰ با داشتن بیش‌ترین دمای فاز انتقال، بیش‌ترین میزان داروی بارگیری شده را داشت (۳). بررسی میزان داروی آزاد شده در محیط انحلال نیز با نتایج جالبی همراه بود. نتایج نشان داد که اسپیرونولاکتون در فرم SLN نسبت به پودر خالص دارو سریع‌تر آزاد می‌گردد. پودر اسپیرونولاکتون به فرم کریستال بوده و سایز ذرات درشت است. در حالی که ذرات اسپیرونولاکتون در فرم SLN، به صورت آمورف بوده و بسیار ریزترند. بنابراین به نظر می‌رسد که این امر باعث افزایش سرعت آزادسازی دارو می‌شود. به علاوه Negi و همکاران نشان دادند که اسپیرونولاکتونی که در نانوذرات لیپیدی بارگیری شده بود، آزادسازی بیش‌تری نسبت به قرص‌های اسپیرونولاکتون موجود در بازار نشان دادند. آن‌ها این امر را مربوط به مساحت سطحی بالای نانوذرات اسپیرونولاکتون دانستند (۱۵).

در مطالعه‌ای دیگر که توسط کلیدری و همکارانش انجام شد، بعد از آزادسازی سریع دارو طی نیم ساعت، اول، طی ۲۴-۱ ساعت، رهش آهسته و کندتری از دارو

مشاهده شد. رهش آهسته اسپرونولاکتون می تواند به دلیل نفوذ آهسته محیط انحلال به داخل هسته نانوذرات، آب گریز بودن هسته لیپیدی و انتشار آهسته اسپرونولاکتون به بیرون هسته باشد (۳). در این مطالعه برای شناسایی تداخلات و پیوندهای احتمالی بین حامل و دارو از طیف های FT-IR استفاده شد که در بررسی طیف های FT-IR نانوذرات لیپیدی جامد اسپرونولاکتون، تغییری در عدد موج پیک های گروه شاخص اسپرونولاکتون مانند گروه های کربونیل تیو استیل و کربونیل لاکتونی و باند دو گانه و هم چنین سورفکتانت ها مشاهده نشد. در نتیجه می توان گفت که برهم کنش شیمیایی بین دارو و حامل وجود ندارد. هم چنین نتایج ترموگرام DSC در

تمام بررسی ها نشان دهنده بارگیری موثر دارو توسط حامل می باشد. به طور کلی نتایج این تحقیق نشان دهنده میزان بارگیری بالای دارو و سرعت آزادسازی بالاتر در فرم SLN اسپرونولاکتون است. با توجه به این که SLN ها دارای چربی های غیر سمی و سازگار با بدن می باشند، استفاده از این نانوذرات سبب افزایش انحلال پذیری اشباع دارو، افزایش فراهمی زیستی خوراکی دارو و آزاد سازی بهتر دارو می گردد. بنابراین برای استفاده در سطح پوست های آسیب دیده و ملتهب مناسب می باشند (۷) و پیشنهاد می شود برای بررسی جذب پوستی فراورده، تست های لازم در این زمینه انجام شود.

References

1. Spritzer PM, Lisboa KO, Mattiello S, Lhullier F. Spironolactone as a single agent for long-term therapy of hirsute patients. Clin Endocrinol(Oxf) 2000; 52(5): 587-594.
2. Afzali BM, Yaghoobi E, Yaghoobi R, Bagherani N, Dabbagh MA. Comparison of the efficacy of 5% topical spironolactone gel and placebo in the treatment of mild and moderate acne vulgaris: a randomized controlled trial. J Dermatolog Treat 2012; 23(1): 21-25.
3. Kelidari HR, Akbari J, Saeedi M. Application and Characterization of Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructured Lipid Carriers as Drug Delivery Systems. J Mazandaran Univ Med Sci 2013; 23(98): 387-403 (Persian).
4. Kesisoglou F, Panmai S, Wu Y. Nanosizing--oral formulation development and biopharmaceutical evaluation. Adv Drug Deliv Revi 2007; 30; 59(7): 631-644.
5. McInnes GT, Asbury MJ, Ramsay LE, Shelton JR, Harrison IR. Effect of micronization on the bioavailability and pharmacologic activity of spironolactone. J Clin Pharmacol 1982; 22(8-9): 410-417.
6. State Pharmacopoeia Commission of the PRC(Editor). Pharmacopoeia of the People's Republic of China. China: People's Medical Publishing House; 2005.
7. Dong Y, Ng WK, Shen S, Kim S, Tan RB. Preparation and characterization of spironolactone nanoparticles by antisolvent precipitation. Int J Pharm 2009; 375(1-2): 84-88.
8. Ghadiri M, Fatemi S, Vatanara A, Doroud D, Najafabadi AR, Darabi M, et al. Loading hydrophilic drug in solid lipid media as nanoparticles: Statistical modeling of entrapment efficiency and particle size. Int J Pharm 2012; 424(1): 128-137.
9. Akbari J, Saeedi M, Morteza-Semnani K, Rostamkalaei SS, Asadi M, Asare-Addo K, et al. The design of naproxen solid lipid nanoparticles to target skin layers. Colloids Surf B Biointerfaces 2016; 145: 626-633.
10. Zeng JS, Yin ZL, Chen WY. Trans. Nonferrous Met. Soc China 2015; 17(2007): S1172-S1176.

11. Khalil RM, El-Bary AA, Kassem MA, Ghorab MM, Ahmed MB. Solid lipid nanoparticles for topical delivery of meloxicam: development and in vitro characterization. *Europ Sci J (ESJ)* 2013; 9(21).
12. Witorini M, Mäder K. Solid lipid nanoparticles: production, characterization and applications. *Adv Drug Deliv Rev* 2012; 64(Suppl): 83-101.
13. Olton M. Afrasiabi H, Tafagodi M, Sajadi SA. Design knowledge of Pharmaceutical forms. Mashhad: Ferdowsi University of Mashhad; 2006.
14. Samein LH. Preparation and Evaluation of Nystatin-Loaded Solid-Lipid-Nanoparticles for Topical Delivery. *Int J Pharm Sci* 2014; 6(2): 592-597.
15. Negi JS, Chattopadhyay P, Sharma AK, Ram V. Development of solid lipid nanoparticles (SLNs) of lopinavir using hot self nano-emulsification (SNE) technique. *Eur J Pharm Sci* 2013; 48(1-2): 231-239.