مقاله تحقیقی

مقایسه روشهای اندازه گیری درصد انکپسولاسیون هیدروکینون در یک سیستم لیپوزومی

رابعه خوشنویس زاده

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین-پیشوا، ایران

مسئول مکاتبات: آدرس الکترونیکی: r.khoshnevis@iauvaramin.ac.ir, biologybiophysics@gmail.com

محل انجام تحقیق: دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

تاریخ دریافت: ۹۵/۹/۱۱ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۲۸

چکیده

یکی از پارامترهای مهم توصیف کننده فرمولاسیون لیپوزومی هیدروکینون درصد انکپسولاسیون است. برای ارز درصد هیدروکینون بدام افتاده در ساختار لیپوزوم ابتدا نیاز به جداسازی لیپوزوم از ماتریکس دربرگیرنده آن است. تک های جداسازی متنوعی وجود دارد که در این مطالعه از سه تکنیک سانتریفیوژ با و بدون شستشو و دیالیز استفاده شد تکنیکهای آزمایشگاهی روشی مناسب است که پاسخ هایی با تکرارپذیری بالا ارائه دهد. محاسبات آماری نشان داد د انکپسولاسیون به روش مستقیم که حاصل جداسازی با استفاده از تکنیک های دیالیز و سانتریفیوژ بدون شستشو بو ترتیب با انحراف معیارهای ۶.۱ و ۸.۲ بالاترین پراکندگی را داشته در حالی که انحراف معیار در تکنیک سانتریفیو شستشو ۵.۲ بوده است. درصد انکپسولاسیون هیدروکینون به روش غیرمستقیم بهترین تکرارپذیری را نشان داد که با گیری از دو تکنیک سانتریفیوژ و فیلتراسیون سانتریفیوژی انحراف معیار با مقادیر ۲.۸ و ۲.۱ بدست آمد. به نظر می تیمارهایی که موجب رقیق شدن فرمولاسیون هیدروکینون میگردد منجر به نشت هیدروکینون شده و کاهش د انکپسولاسیون را بهمراه دارد از این رو اندازه گیری درصد انکپسولاسیون هیدروکینون به روش غیرمستقیم بهتر بود، با توجه به قیمت مناسب و سهولت دسترسی، از تکنیک سانتریفیوژ برای گزارش درصد انکپسولاسیون هیدروکینو نیروی rcf ۴۵۰۰۰ و زمان ۳۰ دقیقه استفاده شد.

واژگان کلیدی: هیدروکینون، لیپوزوم، تکنیک جداسازی، سانتریفیوژ

فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران
جلد ۱۱- شماره ۴- زمستان ۱۳۹۵

مقدمه

در سال های اخیر استفاده از سامانه های دارورسان بدلیل مزایایی مثل رهایش آهسته دارو، افزایش غلظت دارو در بافت هدف و کاهش اثرات جانبی دارو گسترش یافته است(۱-۳). لیپوزوم ها یکی از سامانه های دارورسان هستند که از کنار هم قرار گرفتن فسفولیپیدها در قالب یک ساختار کروی یک یا چند لایه (۲) قادر به حمل داورهای کوچک تا بزرگ (۴) و آبدوست تا آبگریز است(۵). لیپوزوم ها قابلیت عبور از لایه های پوستی را داشته از این رو در فرمولاسیون های پوستی بکار گرفته می شوند(۶). برخی بیماری های پوستی مثل ملا، کوالاسما و کک و مک که در آنها میزان پیگمان س بالاست به کمک داروهایی مثل هیدروکینون درمان شوند(۸-۷). هیدروکینون مولکول کوچک (وزن مولک ۱۱۰ کیلودالتون) دی فنلی است (۹) که کاربرد زیادی در عکاسی (۱۰)، صنایع لاستیک سازی (۱ پزشکی بعنوان مهارکننده آنزیم تایروزیناز (۱۲) می با بهره گیری از فرمولاسیون لیپوزومی هیدروکینون تواند راندمان درمان بیماری های هایپرپیگمانتاسیو افزایش دهد اما هر فرمولاسیون لیپوزومی د

ویژگیهای بیوفیزیکی مثل درصد انکپسولاسیون، اندازه، مقدار بار، تعداد لایه های تشکیل دهنده، میزان رهایش دارو، پایداری شیمیایی و فیزیکی است که گزارش برخی از این ویژگی مثل درصد انکپسولاسیون در هر مطالعه ای ضروری است. از آنجا که هنگام تهیه فرمولاسیون لیپوزومی الزاما همه مولکول های دارویی وارد لیپوزوم نمی شوند نیاز است که داروهای رها در محلول را که وارد لیپوزوم نشده اند از فرمولاسیون لیپوزومی جدا کرد. روش جداسازی در گزارش دقیق درصد انکپسولاسیون موثر بوده و باید آسان، سریع و بدون اثر بر خواص فرمولاسیون لیپوزومی (۱۳) باشد. در این مطالعه به اثر انواع روش های جداسازی پرداخته شده و دقیق ترین آنها جهت ارزیابی درصد انکپسولاسیون بیان می شود.

مواد و روش ها

مواد

فسفولیپید S100 (فسفاتیدیل کولین) از شرکت لیپویید، کلسترول، متابی سولفید سدیم، منوسدیم دی هیدروژن فسفات و کلروفرم (گرید آزمایشگاهی) از شرکت مرک و آلفاکتوفرول استات از اپلیکم و متانول از شیمی پارس خریداری شد.

تجهیزات

از دستگاه uv اسپکتروفتومتری دو پرتویی Cecill9500 برای اندازه گیری مقدار هیدروکینون استفاده شد. در تهیه لیپوزوم از روتاری تبخیرکننده BUSCHI مدل R-210 جهت حذف حلال آلی و از دستگاه هموژنایزر IKA T10 برای هم اندازه کردن ذرات لیپوزومی استفاده شد. همه اندازه گیری وزن مواد بوسیله ترازوی شیمادزو با دقت ۰.۱ میلی گرم صورت گرفت. کیسه دیالیز بکار گرفته شده دارای cut off دوازده هزار دالتون و لوله های سانتریفیوژی فیلتردار با cut off ده هزار دالتون بودند. برای کم کردن سایز و پراکندگی اندازه لیپوزوم ها از کاغذهای غشایی با منافذ ۱۰۰۰ و ۸۰۰ نانومتر و دستگاه اکسترودر QF4 Swagelok استفاده شد. دستگاه سانتریفیوژ 3K30 سیگما برای برخی جداسازی ها استفاده شد. و جهت اندازه گیری اندازه اندازه ذرات لیپوزومی دستگاه نانوسایز Malvern بکار گرفته شد.

تهیه لیپوزوم هیدروکینون

پس از حل کردن فسفولیپید S100 (۷،۸٪)، کلسترول (۱،۵٪)، آلفاکتوفرول (۰،۱۷٪) و هیدروکینون (۰،۵٪) (وزنی بر حجمی) در ۱۵ میلی لیتر مخلوط متانول و کلروفرم در بالون ۲۵۰ میلی لیتری از روتاری جهت حذف حلال و تهیه فیلم خشک فسفولیپیدی استفاده شد(۱۴). ۱۰ میلی لیتر بافر منوسدیم دی هیدروژن فسفات ۰.۰۱ مولار و pH ۶ حاوی متابی سولفیدسدیم ۰.۱ ٪ کم کم به فیلم خشک فسفولیپیدی اضافه شده و با دست تکان داده شده سپس ورتکس کرده و در نهایت ۵ دقیقه هموژنایزر با سرعت ۲۰۰۰ دور بر دقیقه جهت شکل گیری ساختارهای لیپوزومی و یکدست کردن آنها استفاده شد. از آنجا که پراکندگی اندازه در هنگام تهیه لیپوزوم ها زیاد است برای کم کردن پراکندگی اندازه و همچنین اندازه ذرات لیپوزومی از کاغذهای غشایی پلی کربنات دارای قطر منافذ ۱۰۰۰ و ۸۰۰ نانومتر استفاده شد.

اندازه گیری اندازه ذرات لیپوزومی

یک میلی لیتر از محلول لیپوزومی توسط بافر منوسدیم دی هیدروژن فسفات ۰.۰۱ مولار و pH ۶ پنجاه برابر رقیق شده و با دستگاه پارتیکل سایز آنالایزر اندازه گیری می شود.

اندازه گیری مقدار هیدروکینون در فرمولاسیون لیپوزومی

مقدار هیدروکینون درون لیپوزوم ها پس از جدا کردن داروی آزاد (آن بخش از داروی هیدروکینون که وارد لیپوزوم ها نشده اند) از فرمولاسیون، با متانول رقیق شده و در طول موج ۲۹۰ نانومتر با دستگاه uv اسپکتروفتومتری اندازه گیری شد (۱۵).

اندازه گیری درصد انکپسولاسیون

دو روش مستقیم و غیرمستقیم برای گزارش درصد انکپسولاسیون وجود دارد. در روش مستقیم پس از جداسازی آن بخش از فرمولاسیون که حاوی لیپوزوم های هیدروکینون است (اگر روش جداسازی سانتریفیوژ

باشد از پلت استفاده می شود) آن را با متانول رقیق کرده و مستقیما مقدار هیدروکینون درون لیپوزوم ها بدست می آید. در روش غیرمستقیم پس از بکارگیری روش جداسازی، آن بخش از فرمولاسیون که حاوی داروی آزاد است(اگر روش جداسازی سانتریفیوژ باشد از سوپرناتانت استفاده می شود) جهت اندازه گیری هیدروکینون استفاده شده و مقدار حاصل آن از مقدار داروی بکار رفته در تهیه فرمولاسیون کاسته می شود؛ سپس از فرمول های زیر برای گزارش درصد انکپسولاسیون استفاده می شود:

در روش مستقیم

$$\text{درصد انکپسولاسیون} = \frac{\text{مقدار داروی اندازه گیری شده در پلت}}{\text{مقدار کل داروی استفاده شده در تهیه فرمولاسیون}} \times \%100$$

در روش غیرمستقیم

$$\text{درصد انکپسولاسیون} = \frac{\text{مقدار داروی اندازه گیری شده در سوپرناتانت} - \text{مقدار کل داروی استفاده شده در تهیه فرمولاسیون}}{\text{مقدار کل داروی استفاده شده در تهیه فرمولاسیون}} \times \%100$$

روش های جداسازی

سانتریفیوژ همراه باشستشو(مستقیم)

۲ میلی لیتر از فرمولاسیون لیپوزومی هیدروکینون به مقادیر ۱، ۲، ۴ و ۸ برابر توسط بافر فسفات رقیق شده و با نیروی rcf ۴۵۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد، سپس سوپرناتانت با کمک سمپلر از پلت جدا و با بافر فسفات شستشو داده شده و دوباره تحت شرایط قبل سانتریفیوژ شد و دوباره پس از جدا کردن سوپرناتانت، پلت با بافر شسته شد. عملیات سانتریفیوژ و شستشو ۳ بار انجام شد تا در نهایت سوپرناتانت نهایی از پلت جدا شد و جهت اندازه گیری مقدار هیدروکینون از پلت استفاده شد.

سانتریفیوژ بدون شستشو(مستقیم و غیرمستقیم)

۲ میلی لیتر از فرمولاسیون لیپوزومی هیدروکینون به مقادیر ۱، ۲، ۴ و ۸ برابر توسط بافر فسفات رقیق شده و سه بار با نیروی rcf ۴۵۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد سپس هیدروکینون درون هم سوپرناتانت و هم پلت اندازه گیری شد.

دیالیز

۱۰ میلی لیتر فرمولاسیون لیپوزومی هیدروکینون در کیسه دیالیز ریخته شده و در یک بشر یک لیتری پوشانده شده که حاوی بافر منوسدیم دی هیدروژن فسفات ۰.۰۰۵ مولار و pH ۵ بود به مدت ۱۲ ساعت بر روی استریر در دمای ۴ درجه قرار داده شد سپس ۶ ساعت در مجاورت بافر مونوسدیم دی هیدروژن فسفات ۰.۰۰۱ مولار و pH ۵ دیالیز ادامه پیدا کرد تا در نهایت ۶ ساعت آخر را با بافر منوسدیم دی هیدروژن فسفات ۰.۰۰۰۵ مولار و pH ۵ فرایند دیالیز به پایان رسید. آنگاه از محتویات کیسه دیالیز جهت اندازه گیری مقدار هیدروکینون به روش مستقیم استفاده شد.

فیلتراسیون سانتریفیوژی

۵ میلی لیتر از فرمولاسیون لیپوزومی هیدروکینون در مخزن لوله فیلتراسیون سانتریفیوژی ریخته شد و با سرعت rpm ۱۰۰۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ شد سپس سوپرناتانت جدا شده از فرمولاسیون که در پایین لوله جمع شده است برای اندازه گیری مقدار هیدروکینون به روش غیرمستقیم استفاده شد.

اندازه گیری انحراف معیار

همه آزمایشات جداسازی ۶ بار تکرار شد و در نهایت میانگین و انحراف معیار هر روش بدست آمد.

نتایج

اندازه ذرات لیپوزومی

پس از ۵۰ برابر رقیق سازی نمونه لیپوزومی اندازه ذرات ۸۰۰ نانومتر بدست آمد که پراکندگی توزیع اندازه ای آن ۲.۸ بود.

محاسبه درصد انکپسولاسیون در روش جداسازی سانتریفیوژ همراه با شستشو(مستقیم)

در این روش چندین رقت از نمونه ها تهیه شد و پس از هر بار سانتریفیوژ شستشو داده شده و در نهایت مقدار هیدروکینون درون پلت اندازه گیری شد. غلظت هیدروکینون پس از رقیق سازی نمونه ها با متانول از طریق تکنیک اسپکتروفتومتری در طول موج ۲۹۰ نانومتر و رسم نمودار استاندارد بدست آمد. به ترتیب نمونه هایی که با نسبت های ۱، ۲، ۴ و ۸ رقیق شده بودند متوسط مقدار هیدروکینون در پلت حاصل از آنها ۱.۹۶، ۰.۸۲، ۰.۳۱ و ۰.۱۱ میلی گرم بر میلی لیتر اندازه گیری شد. برای همسان کردن غلظت همه نمونه، غلظت هر نمونه در معکوس رقیق سازی آن ضرب شد که در جدول ۱ مشاهده می شود. در نهایت با استفاده از فرمول درصد انکپسولاسیون به روش مستقیم با توجه به غلظت هر نمونه میزان درصد انکپسولاسیون محاسبه شد که در جدول ۱ مشاهده می شود.

جدول ۱ - درصد انکپسولاسیون لیپوزوم هیدروکینونی در روش جداسازی سانتریفیوژی همراه با شستشو (مستقیم).

درصد انکپسولاسیون	غلظت هیدروکینون ضرب معکوس رقت (میلی گرم بر میلی لیتر)	غلظت هیدروکینون درون پلت(میلی گرم بر میلی لیتر)	مقدار رقیق سازی
۳۹٪	۱.۹۶	۱.۹۶	۱
۳۳٪	۱.۶۴	۰.۸۲	۲
۲۵٪	۱.۲۴	۰.۳۱	۴
۱۸٪	۰.۸۸	۰.۱۱	۸

محاسبه درصد انکپسولاسیون در روش جداسازی سانتریفیوژ بدون شستشو(مستقیم و غیرمستقیم)

نمونه ها در رقت های مختلف تهیه شده و بدون هیچ گونه شستشویی سه بار تحت شرایط توضیح داده شده در قسمت قبل سانتریفیوژ شدند سپس بخش پلت و سوپوناتانت از هم جدا شدند. و در متانول حل شده و شدت جذب هر نمونه در ۲۹۰ نانومتر بررسی شد و مقدار هیدروکینون در پلت (مستقیم) و همچنین در سوپرناتانت (غیرمستقیم) محاسبه شد. متوسط مقدار هیدروکینون در پلت نمونه هایی که ۱، ۲، ۴ و ۸ برابر رقیق شده بودند به ترتیب ۳.۴۷، ۱.۴۶، ۰.۶۵ و ۰.۱۸ میلی گرم بر میلی لیتر بود که برای همسان کردن غلظت ها با توجه به شدت رقیق سازی، مقدار هیدروکینون بدست آمده در عکس رقت ها ضرب شد و مقادیر ۳.۴۷، ۲.۹۲، ۲.۶ و ۱.۴۴ میلی گرم به میلی لیتر بدست آمد. همین روند برای بدست آوردن مقدار هیدروکینون در سوپرناتانت نیز طی شد که برای رقتهای ۱، ۲، ۴ و ۸ به ترتیب ۲.۴۹، ۲.۷، ۲.۹۵ و ۳.۲ میلی گرم بر میلی لیتر بدست آمد و درصد انکپسولاسیون بر اساس سوپرناتانت محاسبه شد (جدول ۳). همچنین غلظت هیدروکنیون در پلت و سوپرناتانت را برای محاسبه مقدار کل هیدروکینون در فرمولاسیون جمع زده شد که در جدول ۲ آمده است.

جدول ۲: درصد انکپسولاسیون لیپوزوم هیدروکینونی در روش جداسازی سانتریفیوژی بدون شستشو(مستقیم).

مقدار کل	هیدروکینون در سوپرناتانت(میلی گرم بر میلی لیتر)	درصد انکپسولاسیون	غلظت هیدروکینون ضرب معکوس رقت (میلی گرم بر میلی لیتر)	هیدروکینون در پلت(میلی گرم بر میلی لیتر)	مقدار رقیق سازی
۵.۹۶	۲.۴۹	۷۱٪	۳.۴۷	۳.۴۷	۱
۵.۶۲	۲.۷	۶۰٪	۲.۹۲	۱.۴۶	۲
۵.۵۵	۲.۹۵	۵۳٪	۲.۶	۰.۶۵	۴
۴.۶۴	۳.۲	۲۹٪	۱.۴۴	۰.۱۸	۸

جدول ۳ - درصد انکپسولاسیون با روش جداسازی سانتریفیوژ بدون شستشو (غیرمستقیم).

درصد انکپسولاسیون	غلظت هیدروکینون ضرب معکوس رقت (میلی گرم بر میلی لیتر)	هیدروکینون در سوپرناتانت(میلی گرم بر میلی لیتر)	مقدار رقیق سازی
۴۸٪	۲.۴۹	۲.۴۹	۱
۴۴٪	۲.۷	۱.۱۳۵	۲
۳۹٪	۲.۹۵	۰.۷۳	۴
۳۲٪	۳.۲	۰.۴۱	۸

درصد انکپسولاسیون با روش جداسازی دیالیز

پس از ۲۴ ساعت دیالیز، مقدار هیدروکینون درون کیسه با حل کردن حجم مشخصی از آن در متانول و بررسی شدت جذب در طول موج ۲۹۰نانومتر اندازه گیری شد که به روش مستقیم درصد انکپسولاسیون آن بدست آمد و مقدار آن ٪۷ بود.

درصد انکپسولاسیون با روش جداسازی فیلتراسیون سانتریفیوژی

پس از اتمام سانتریفیوژ مقدار هیدروکینون در سوپرناتانت جمع آوری شده در انتهای لوله فیلتراسیون سانتریفیوژی اندازه گیری شد و مقدار درصد انکپسولاسیون از روش غیر مستقیم محاسبه شد که ٪۴۷ بود.

بحث

از بهترین روش های جداسازی فرمولاسیون های لیپوزومی، فیلتراسیون سانتریفیوژی است که میتواند ذرات لیپوزومی را از محلول فرمولاسیون جدا کند. برای انکه منافذ غشا لوله فیلتراسیون سانتریفیوژ قبل از عبور کل فرمولاسیون توسط ذرات لیپوزومی بسته نشود فرمولاسیون ها رقیق شدند (۱۴). در این مطالعه از طریق چند تکنیک جداسازی اثر رقیق سازی بر ارزیابی درصد انکپسولاسیون بررسی شد. فرمولاسیون های لیپوزومی به نسبتهای ۱، ۲، ۴ و ۸ رقیق شده و عملیات جداسازی به کمک تکنیک سانتریفیوژ با روش های مستقیم همراه با شستشو، بدون شستشو و غیرمستقیم انجام شد که نتایج آن در جداول ۱، ۲ و ۳ آمده است. هر سه جدول نشان میدهد با رقیق تر شدن فرمولاسیون درصد انکپسولاسیون کاهش یافته است. به نظر میرسد رقیق سازی منجر به نشت دارو از ساختار لیپوزومی می شود بنابراین عملیات رقیق سازی برای ارزیابی این فرمولاسیون مناسب نیست. در مطالعات دیالیز که محیط اطراف کیسه دیالیز بسیار رقیق است درصد انکپسولاسیون ٪۷ بدست آمد. برخی محققین نشان دادند که عملیات دیالیز باعث نشت مولکول های کوچک غیر الکترولیت می شود (۱۶،۱۷). از این رو نشت هیدروکینون از لیپوزوم درتکنیکهایی که فرمولاسیون لیپوزومی را رقیق می کند باعث افزایش شاخص پراکندگی پاسخ ها می گردد و پارامتر تکرار پذیری را کاهش میدهد به همین دلیل روندهای رقیق سازی و یا شستشو باعث نشت هیدروکینون می شود. برای انکه رقیق سازی کمتری طی عملیات جداسازی صورت گیرد از تکنیک سانتریفیوژ به روش مستقیم و بدون شستشو استفاده شد. برای ارزیابی این روش مقدار دارو هم درون پلت و هم سوپرناتانت اندازه گیری شد و انتظار می رفت که جمع این مقادیر برابر با کل دارو در فرمولاسیون باشد. همانطور که در جدول ۲ مشاهده می شود درصد انکپسولاسیون در این روش بیشتر از روش همرا با شستشو است و مجموع داروی درون پلت و سوپرناتانت بیش از کل فرمولاسیون است یعنی پلت به همراه کمی سوپرناتانت بوده است که باعث افزایش کاذب درصد انکپسولاسیون شده است و بیشترین انحراف معیار را در میان تکنیک های بکار گرفته شده نشان می دهد(جدول۵) به همین دلیل برای اندازه گیری درصد انکپسولاسیون هیدروکینون نمی توان از روش مستقیم استفاده کرد. از این رو از روش های غیر مستقیم استفاده شد. هیدروکینون کپسوله نشده بطور یکنواخت در فضای سوپرناتانت حل شده است بنابراین با اندازه گیری هیدروکینون آزاد و کاستن از مقدار هیدروکینون کل، میتوان درصد انکپسولاسیون را بدست آورد. در این

مطالعه، محلول شفاف سوپرناتانت با کمک سانتریفیوژ از پلت جدا شد. مقدار داروی درون سوپرناتانت ۲.۴۹ میلی گرم بر میلی لیتر و در کل فرمولاسیون ۴.۸۴ میلی گرم بر میلی لیتر بود و درصد انکپسولاسیون ۴۸٪ بدست آمد (جدول ۳).

از روش غیرمستقیم به کمک تکنیک فیلتراسیون سانتریفیوژی برای محاسبه درصد انکپسولاسیون استفاده شد. این بار پس از کمی جمع اوری سوپرناتانت شفاف در انتهای لوله فیلتراسیون سانتریفیوژی مقدار هیدروکینون ازاد ۲.۵۳ میلی گرم بر میلی لیتر بدست آمد که با توجه به مقدار کل هیدروکینون (۴.۸۴ میلی گرم بر میلی لیتر) درصد انکپسولاسیون ۴۷٪ بدست آمد.

همانطور که مشاهده میشود نتایج روش غیرمستقیم در دو تکنیک سانتریفیوژ و فیلتراسیون سانتریفیوژی تقریبا یکسان است (جدول ۴) و انحراف معیار کوچکتری نسبت به بقیه روش ها دارد (جدول ۵) بنابراین بدلیل آنکه بهره گیری از یک روش ساده و ارزان قیمت یکی از اهداف طراحی آزمایش است، برای ارزیابی درصد انکپسولاسیون هیدروکینون در فرمولاسیون لیپوزومی می توان از تکنیک سانتریفیوژ به روش غیرمستقیم استفاده کرد.

جدول ۴: مقایسه درصد انکپسولاسیون در روش های مختلف جداسازی.

۴۷٪	فیلتراسیون سانتریفیوژی
۳۹٪	سانتریفیوژ به همراه شستشو (مستقیم)
۷۱٪	سانتریفیوژ بدون شستشو (مستقیم)
۴۸٪	سانتریفیوژ بدون شستشو (غیرمستقیم)
۷٪	دیالیز

جدول ۵: انحراف معیار انواع روش های بکار گرفته شده.

انحراف معیار	تکنیک	نوع روش اندازه گیری درصد انکپسولاسیون
۲.۵	سانتریفیوژ همرا با شستشو	مستقیم
۶.۱	دیالیز	
۸.۷	سانتریفیوژ بدون شستشو	
۲.۱	فیلتراسیون سانتریفیوژی	غیرمستقیم
۲.۸	سانتریفیوژ	

در روند بهینه سازی شرایط سانتریفیوژ از سرعتها و زمانهای مختلفی استفاده شد که در نهایت با توجه به بزرگ بودن ذرات لیپوزومی (۸۰۰ نانومتر)، نیروی ۴۵۰۰۰rcf و زمان ۳۰ دقیقه بهترین شرایط جداسازی را فراهم کرد.

برای انتخاب تکنیک جداسازی فرمولاسیون های لیپوزومی باید به ویژگیهای فرمولاسیون مثل اندازه ذرات و دارو توجه کرد. مولکولهای کوچک هیدروکینون (۱۱۰ کیلودالتون) با ضریب توزیع ۰.۵۴ طی روندهای ازمایشگاهی احتمال نشت بالایی از لیپوزوم دارند. از این رو برخی روندهای جداسازی مثل رقیق سازی یا شستشو و تکنیک هایی مثل دیالیز برای جداسازی آنها مناسب نیستند و این نوع روش ها از تکرارپذیری کمتری در پاسخ ها برخوردار بوده و انحراف معیار آنها بزرگتر است. در این مطالعه همچنین دیده شد که مقدار هیدروکینون کل پس از تهیه فرمولاسیون کاهش میابد بنابراین لازم است جهت گزارش درصد انکپسولاسیون مقدار داروی کل نیز اندازه گیری گردد. در مجموع اندازه گیری درصد انکپسولاسیون هیدروکینون که مولکولی کوچک و محلول در آب است از طریق تکنیک در دسترسی مثل سانتریفیوژ به روش غیرمستقیم میسر می شود.

تقدیر و تشکر

از دانشکده داروسازی مشهد برای همکاری در اجرای این پروژه تشکر و قدردانی می شود.

منابع مورد استفاده

1. Goyal, P., Goyal, K., Vijaya Kumar, S. G., Singh, A., Katare, O. P., Nath Mishra, D., 2005. Liposomal drug delivery systems-clinical applications. Acta Pharm 55: 1-25.
2. Schaeffer, H., Krohn, D., 1982. Liposomes in topical drug delivery. Invest Ophthalmol Vis Sci 22(2): 220-227.
3. Lasic D., 1998. Novel applications of liposomes. Tibtech 16: 307-321.
4. Samad, A. L., Sultana, Y., Aqil, M., 2007. Liposomal drug delivery systems: an update review. Curr Drug Deliv 4(4): 297-305.
5. Riaz, M., 1996. Liposomes preparation methods. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences 19(1): 65-77.
6. Fang, J. U., Hwang, T. L., Huang, Y. L., 2006. Liposomes as vehicles for enhancing drug delivery via skin routes. Current Nanoscience 2: 55-70.
7. Katsambas, A., Antoniou, C., 1995. Melasma classification and treatment. J Eur Acad Dermatol Venereol 4: 217–223.
8. Amer, M., Metwalli, M., 1998. Topical hydroquinone in the treatment of some hyperpigmentary disorders. Int J Dermatol 37: 449-450.
9. Hudnal, P., 2012. Hydroquinoe. Ullmann's Encyclopedia Industrial Chemistry 18: 473-480.
10. Corominas, B. G., Icardo, M. C., Zamora, L. L., Mateo, J. V. G., Calatayud, J. M., 2004. A tandem-flow assembly for the chemiluminometric determination of hydroquinone. Talanta 64: 618-625.
11. Emma, S., John, A. G., 1999. Determination of hydroquinone in air by high performance liquid chromatography. Ann Occup Hyg 43: 131-141.
12. Palumbo, A., d'Ischia, M., Misuraca, G., Prota, G., 1991. Mechanism of inhibition of melanogenesis by hydroquinone. Biochim Biophys Acta 1073(1): 85-90.
13. Thies, R., Wayne Cowens, D., Cullis, P., Bally, M., Mayer, L., 1996. Method for rapid separation of liposome-associated doxorubicin from free doxorubicin in plasma. Analytical Biochemistry 188: 65-71.
14. Szoka, F., Papahadjopoulos, D., 1980. Comparative properties and methods of preparation of lipid vesicles (liposomes). Annu Rev Biophys Bioeng 9: 467-508.
15. Khoshneviszadeh, R., Fazly Bazzaz, B. S., Housaindokht, M. R., Ebrahim-Habibi, A., Rajabi, O., 2015. UV spectrophotometric determination and validation of hydroquinone in liposome. Iran J Pharm Res 14(2): 473-8.
16. Duzgunes, N., 2005. Methods in enzymology: Liposomes, Part E. Academic Press. 391:106.
17. Bangham, A. D., Cohen, B. E., 1972. Diffusion of small non-electrolytes across lipospme membrane. Nature 236: 173-174.
18. Sunkara, P. S., 1984. Novel approaches to cancer chemotherapy. Harourt Brace Jovanovich, pp. 218.
19. Çağdaş, M., Demir Sezer, A., Bucak, S., 2014. Liposomes as potential drug carrier systems for drug delivery. http://dx.doi.org/10.5772/58459.