مقاله تحقیقی

تهیه و تعیین ویژگی های بیوفیزیکی لیپوزوم هیدروکینون

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: ۹۵/۷/۱۲ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۱۸

فصلنامه علمی پژوهشی دانش زیستی ایران
جلد ۱۰- شماره ۴- زمستان ۱۳۹۴

چکیده

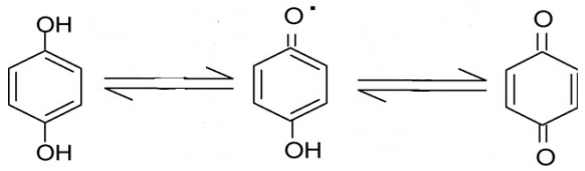
هیدروکینون دارویی است که در درمان لکه های پوستی استفاده می شود این دارو در قالب فرمولاسیون کرمی تجاری شده است اما بدلیل بالا بودن راندمان درمان فرمولاسیون های لیپوزومی در این مطالعه سعی شد تا فرمولاسیون لیپوزومی هیدروکینون به شکل بهینه ای تهیه شود از این رو اثر عوامل مختلفی مثل روش تهیه و نوع بافر بر روی خواص بیوفیزیکی لیپوزوم مورد بررسی قرار گرفت. دو روش تبخیر فاز حلال و آبگیری-آبدهی مجدد برای تهیه فرمولاسیون لیپوزومی هیدروکینون استفاده شد همچنین اثر دو نوع بافر دی هیدروژن فسفات منو سدیم و بافر ۴-(۲-هیدروکسی اتیل)۱-۱پیپرازین اتان سولفونیک اسید بر روی برخی از ویژگی های فرمولاسیون ارزیابی شد. نمونه های لیپوزومی که به روش تبخیر فاز حلال تهیه شده بودند دارای درصد انکپسولاسیون ۴۵٪، اندازه ذره ای ۸۲۰ نانومتر و پراکندگی اندازه ذره ای ۰/۴۲ بود و بعد از ۱۶ روز رسوبات در فرمولاسیون مشاهده شد و بعد از ۲۴ ساعت دیالیز درصد انکپسولاسیون به ۱۶٪ تقلیل یافت. در روش آبگیری-آبدهی مجدد درصد انکپسولاسیون ۲۵٪، اندازه ذره ای ۳۵۰ نانومتر و پراکندگی اندازه ذره ای ۰/۳۶ بود و ۳۰ روز پس از تهیه فرمولاسیون رسوبات در آن مشاهده شد. در این روش پس از دیالیز مقدار داروی انکپسوله به ۳٪ کاهش پیدا کرد. فرمولاسیون تهیه شده از بافر ۴-(۲-هیدروکسی اتیل)۱-۱پیپرازین اتان سولفونیک اسید دارای اندازه ذره ای ۵۲۰ نانومتر و پایداری فیزیکی بیش از یک ماه بوده است. روش تبخیر فاز حلال منجر به تولید درصد انکپسولاسیون بالاتری نسبت به روش آبگیری-آبدهی مجدد شد اما در روش آبگیری-آبدهی مجدد که اندازه ذرات کوچکتر بود پایداری فیزیکی فرمولاسیون طولانی تر بوده و از این منظر بر روش تبخیر فاز حلال برتری داشت بافر ۴-(۲-هیدروکسی اتیل) ۱-۱پیپرازین اتان سولفونیک اسید نیز نسبت به بافر فسفات فرمولاسیون پایدارتر و ذرات کوچکتری را بوجود آورد.

واژه های کلیدی: لیپوزوم، هیدروکینون،خصوصیات بیوفیزیکی

مقدمه

هیدروکینون مولکولی با ساختار فنلی است که به اکسیداسیون حساس بوده و در حضور اکسیژن و محیط بازی سریعا به بنزوکینون تبدیل می شود (شکل ۱)(۱). این ماده خاصیت دپیگمانتاسیون داشته که با مهار انزیم تایروزیناز مانع تولید ملانین شده (۲) و در درمان کک و مک، ملاسما و کوالاسما موثر است (۳،۴). این مولکول در قالب فرمولاسیون های کرمی، لوسیون، ژله ای و محلول به شکل تجاری در دسترس بیماران قرار گرفته است. در سال های اخیر فرمولاسیون های جدیدی با نام حامل های دارویی گسترش یافته است که با آزادسازی آهسته دارو، کاهش اثرات سمی دارو، قابلیت هدف یابی سلول یا ارگان

خاص راندمان درمان را افزایش داده اند (۵-۷). از جمله حامل های دارویی ذرات کروی تشکیل یافته از فسفولیپید، بنام لیپوزوم است که در سال ۱۹۸۰ توسط بنگهام و همکارانش تهیه شد. تحقیقات بر روی فرمولاسیون های موضعی لیپوزومی نشان داده است که استفاده از این حامل دارویی راهکار مناسبی برای افزایش عبور داروهای پوستی از سد لایه شاخی پوست بوده و نفوذپذیری دارو را به اعماق لایه های پوست میسر می سازد (۸).



شکل ۱ - تبدیل هیدروکینون به بنزوکینون (۱).

هر فرمولاسیون دارای ویژگی هایی است که توسط آنها توصیف می شود در فرمولاسیون های لیپوزومی خواصی مثل درصد انکپسولاسیون، اندازه ذرات لیپوزومی، پراکندگی اندازه ذره ای، پایداری شیمیایی دارو و پایداری فیزیکی فرمولاسیون است که تحت تاثیر نحوه تهیه، درصد مواد استفاده شده و تیمارهای تکمیلی قرار گرفته و ویژگی های آن را منجر می کند. در این تحقیق بر آن شدیم تا فرمولاسیون جدیدی از هیدروکینون را در قالب فرمولاسیون لیپوزومی تهیه کرده و اثر عوامل مختلف بر روی آن را مورد ارزیابی قرار دهیم.

مواد و روش ها

کلسترول، ویتامین E، هیدروکینون، ساکاروز، متابی سولفید سدیم، کلروفرم و دی هیدروژن فسفات منوسدیم از شرکت آلمانی مرک، فسفاتیدیل کولین سویا (S100) از شرکت لیپویید، بافر ۴-(۲-هیدروکسی اتیل)۱-۱پیپرازین اتان سولفونیک اسید از سیگما و متانول از شرکت پارس خریداری شد.

دستگاه های مورد استفاده در این تحقیق شامل روتاری BUCHI و هموژنایزر IKA 10 ساخت آلمان، ورتکسVELEP ایتالیا، سانتریفیوژ 3K30 سیگما، فریز داریر Heto Dry Winer دانمارک، میکروسکوپ نوری Olympus ژاپن مجهز به دوربین، UV اسپکتروفتومتری CECIL 9500 و دستگاه تفرق نور پویا Nano-ZS مالورن ساخت انگلیس بوده است.

تهیه لیپوزوم به روش تبخیر فاز حلال

۷/۸٪ وزنی/حجمی (همه نسبت ها بر اساس وزنی/حجمی است) فسفولیپید، ۱/۹٪ کلسترول، ۰/۵٪ هیدروکینون و ۰/۴ ٪ ویتامین E در بالون ته گرد ریخته و به آن مخلوط ۸ به ۲ کلروفرم و متانول اضافه شد تا همه مواد در آن حل شود سپس بالون به روتاری که در حمام آب ۴۵ درجه قرار گرفته بسته شد و پس از برقراری خلا، با سرعت rpm ۳ چرخید. پس از حذف کامل حلال یک لایه فیلم خشک فسفولیپیدی تشکیل شد که با افزودن آهسته بافر به همراه ورتکس محلول لیپوزومی شکل گرفت (۹).

تهیه لیپوزوم به روش آبگیری-آبدهی مجدد

۷٪/۸ فسفولیپید، ۱/۹٪ کلسترول، ۰/۵٪ هیدروکینون و ۰/۴ ٪ ویتامین E در بالون مذکور ریخته شد و تا مرحله تشکیل فیلم خشک فسفولیپیدی مثل روش تبخیر فاز حلال پیش رفت. سپس محلول بافری حاوی ساکاروز و هیدروکینون آهسته و همراه با ورتکس به فیلم خشک فسفولیپیدی اضافه شد تا محلول لیپوزوم هیدروکینون تهیه شود. این محلول لیپوزومی ابتدا در دمای ۴ درجه و بعد ۲۰- قرار داده شد تا کاملاً یخ بزند سپس به مدت ۲۴ ساعت به دستگاه لیوفیلیزاتور بسته شد تا بخش آبی فرمولاسیون حذف شود. آنگاه آب مقطر دیونیزه آهسته و همراه با ورتکس به لیپوزوم لیوفلیزه اضافه شد تا در نهایت محلول لیپوزومی شکل گرفت (۹).

تهیه لیپوزوم در دو نوع بافر

به روش تبخیر فاز حلال تا مرحله تشکیل فیلم خشک فسفولیپیدی کار دنبال شد در مرحله افزودن بافر از دو نوع

بافر دی هیدروژن فسفات منو سدیم (۰/۰۱ مولار و ۵/۵ pH) و بافر ۴-(۲-هیدروکسی اتیل)۱-۱پیپرازین اتان سولفونیک اسید (pH ۶/۵) استفاده شد.

اندازه گیری درصد انکپسولاسیون

نمونه ها ۳ بار تحت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ با شتاب g ۴۵۰۰۰ در دمای ۴ درجه قرار گرفتند و پس از آخرین دور، سوپرناتانت از پلت‌ها جدا شده و مقدار هیدروکینون درون سوپرناتانت اندازه‌گیری شد (۱۰) سپس سوپرناتانت با متانول رقیق شده و مقدار جذب آن توسط دستگاه UV اسپکتروسکوپی در طول موج ۲۹۳ نانومتر اندازه گیری شد و غلظت هیدروکینون درون سوپرناتانت بر اساس نمودار غلظت های استاندارد هیدروکینون محاسبه گشت سپس از طریق فرمول زیر درصد انکپسولاسیون محاسبه شد (۱۱).

$$\text{درصد انکپسولاسیون} = \frac{(\text{مقدار کل دارو} - \text{مقدار داروی درون سوپرناتانت})}{\text{مقدار کل دارو}} * 100\%$$

اندازه گیری اندازه ذرات و پراکندگی اندازه ذره ای

هر نمونه لیپوزومی ۵۰ برابر با همان بافری که تهیه شده بود رقیق گشت و توسط دستگاه تفرق نور پویا اندازه و پراکندگی آن را گزارش شد.

اندازه گیری پایداری فیزیکی دارو

هر روز شکل ظاهری فرمولاسیون ها مبنی بر تشکیل رسوب بررسی گردید.

اندازه گیری میزان نشت پذیری توسط روش دیالیز

دو محلول های لیپوزومی تهیه شده از روش های تبخیر فاز حلال و آبگیری-آبدهی مجدد درون کیسه های دیالیز با cut off ۱۲۰۰۰دالتون ریخته و پس از بستن دو سر کیسه توسط گیره های مخصوص، در یک لیتر بافر فسفات دی هیدروژن منو سدیم pH ۵ و غلظت ۰/۰۰۵ مولار غوطه ور شد. این مجموعه توسط کاغذ فویل پوشانده شده و درون یخچال بر روی دستگاه استریر قرار گرفت. پس از ۱۲ ساعت محلول بافری با بافر فسفات دی هیدروژن منو سدیم pH ۵ و غلظت ۰/۰۰۱ مولار تعویض شد و پس از ۶ ساعت این بافر با همین بافر ولی غلظت ۰/۰۰۰۵ مولار تعویض گشت. بعد از ۲۴ ساعت دیالیز، حجم محلول درون کیسه اندازه گیری شده و سپس مقدار هیدروکینون درون کیسه توسط روش UV اسپکتروفتومتری اندازه گیری شد.

ارزیابی شکل لیپوزوم

نمونه های لیپوزومی تهیه شده به روش های تبخیر فاز حلال و آبگیری-آبدهی مجدد روی لام گسترش داده شد و با بزرگنمایی ۱۰۰*۱۰ مشاهده شد.

نتایج

درصد انکپسولاسیون

مقدار داروی محصور شده در لیپوزوم های تهیه شده به روش تبخیر فاز حلال ۴۵٪ و در روش آبگیری-آبدهی مجدد مقدار ۲۵٪ بوده است.

اندازه ذرات لیپوزومی

اندازه ذرات لیپوزومی در لیپوزوم های تشکیل شده به روش تبخیر فاز حلال و در بافر فسفات ۸۲۰ نانومتر با پراکندگی اندازه ذره ای ۰/۴۲ و در روش آبگیری-آبدهی مجدد اندازه ذرات ۳۵۰ نانومتر و پراکندگی اندازه ذره ای ۰/۳۶ بوده است. در فرمولاسیون تهیه شده به روش تبخیر فاز حلال در بافر ۴-(۲-هیدروکسی اتیل)۱-۱پیپرازین اتان سولفونیک اسید اندازه ذرات ۵۲۰ نانومتر حاصل شد.

پایداری فیزیکی

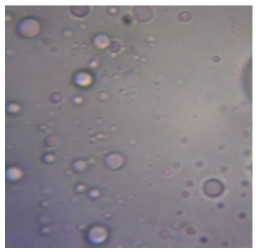
به مدت ۳۰ روز فرمولاسیون لیپوزومی به روش آبگیری-آبدهی مجدد پایدار بود و فرمولاسیون تهیه شده به روش تبخیر فاز حلال در بافر فسفات ۱۶ روز و در ۴-(۲-هیدروکسی اتیل)۱-۱پیپرازین اتان سولفونیک اسید بیش از یک ماه اندازه گیری شد.

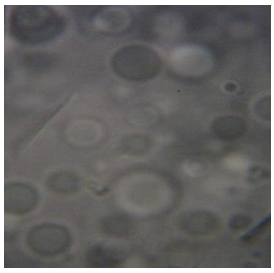
اندازه گیری میزان نشت پذیری

پس از ۲۴ ساعت دیالیز مقدار داروی باقیمانده در لیپوزوم های تهیه شده به روش تبخیر فاز حلال ۱۶٪ و به روش آبگیری-آبدهی مجدد مقدار ۳٪ بدست آمد.

تصویر میکروسکوپ نوری

تصویر دو فرمولاسیون تهیه شده از طریق روش های آبگیری-آبدهی مجدد و تبخیر فاز حلال توسط میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین در شکل ۲ مشاهده می شود.





روش DRV	تبخیر فاز حلال

شکل ۲ - تصویر میکروسکوپی دو فرمولاسیون با بزرگنمایی ۱۰۰.

بحث

بافر ۴-(۲-هیدروکسی اتیل)۱-۱پیپرازین اتان سولفونیک اسید از بهترین بافرها در مطالعات بیولوژیک است به نظر می‌رسد این بافر نقش محافظتی در برابر اکسیداسیون فسفولیپیدها ایفا کرده و منجر به پایداری شیمیایی و فیزیکی محلول لیپوزومی می‌شود (۱۲). معلوم شده که غلظت بافر هر چه بیشتر شود سرعت هیدرولیز زیادتر می گردد (۱۳)، از این رو محلول‌های لیپوزومی در غلظت‌های بافری کمتر از ۰/۰۵مولار تهیه می‌شوند. نتیجه هیدرولیز فسفولیپیدها ناپایداری فیزیکی محلول لیپوزومی است. در این مطالعه نیز پایداری فیزیکی محلول لیپوزومی در بافر ۴-(۲-هیدروکسی اتیل)۱-۱پیپرازین اتان سولفونیک اسید بیشتر از فسفات بوده است. علت دیگر این پایداری می‌تواند اندازه ذرات در دو محلول مذکور باشد بطوریکه اندازه بزرگ ذرات لیپوزومی در بافر فسفات میل به تجمع ذرات لیپوزومی را افزایش می‌دهد و سپس فیوژن و رسوب را منجر می‌شود. در این مطالعه از بافر دی هیدروژن فسفات منوسدیم به جای نوع دی سدیم آن استفاده شد زیرا معلوم شده است که در بافر سیترات سه بار منفی و تریس یک بار مثبت به ترتیب سرعت هیدرولیز فسفولیپیدها بالاتر از بافر دو بار منفی سیترات و بی بار تریس است (۱۴). از این رو در این مطالعه نیز از بافر فسفاتی استفاده شد که بار کمتری داشته باشد.

پراکندگی و اندازه ذرات در روش تبخیر فاز حلال بزرگتر از روش آبگیری-آبدهی مجدد است بعبارتی روش آبگیری-آبدهی مجدد می‌تواند فرمولاسیون همگن‌تری را فراهم کند. لیپوزوم‌های تهیه شده به روش آبگیری-آبدهی مجدد بدلیل پراکندگی و اندازه کوچکتر فرایند تجمع نیز در آن‌ها دیرتر رخ داده و پایداری فیزیکی بیشتری دارند همانطور که در این مطالعه نیز مشاهده شد تقریباً پایداری فیزیکی محلول تهیه شده با روش آبگیری-آبدهی مجدد دو برابر روش تبخیر فاز حلال است. اما در روش آبگیری-آبدهی مجدد از آنجا که محلول حاوی هیدروکینون کم کم به فیلم خشک فسفولیپیدی اضافه می‌شود درصد انکپسولاسیون کمتر از روش تبخیر فاز حلال است. نشت هیدروکینون پس از ۲۴ ساعت دیالیز در روش آبگیری-آبدهی مجدد بیشتر از تبخیر فاز حلال است که ممکن است بدلیل کوچک بودن اندازه لیپوزوم‌ها تعداد لایه‌های آن نیز کاهش یافته و امکان نشت مولکول‌های هیدروکینون بیشتر شده باشد.

به نظر می رسد با استفاده از بافر ۴-(۲-هیدروکسی اتیل)۱-۱پیپرازین اتان سولفونیک اسید و روش آبگیری-آبدهی مجدد می توان لیپوزوم هایی با اندازه کوچکتر تهیه کرد که منجر به افزایش پایداری فیزیکی فرمولاسیون لیپوزومی می شود ولی اندازه کوچکتر درصد انکپسولاسیون را پایین آورده و از سوی دیگر امکان نشت دارو را افزایش

می دهد بنابراین با توجه به هدف مطالعه یکی از این شرایط می تواند مناسب باشد.

تقدیر و تشکر

از همکاری جناب آقای دکتر امید رجبی و سرکار خانم دکتر بی بی صدیقه فضلی بزاز در دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد قدردانی می شود.

منابع مورد استفاده

1. DeCaprio, A. P., 1999. The toxicology of hydroquinone - relevance to occupational and environmental exposure. Critical Reviews in Toxicology 29: 283-330.
2. Palumbo, A., d'Ischia, M., Misuraca, G., Prota, G., 1991. Mechanism of inhibition of melanogenesis by hydroquinone. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects 1073(1): 85-90.
3. Mills, O. H., Kligman, A. M., 1978. Ultraviolet phototherapy and photochemotherapy of acne vulgaris. Archives of Dermatology 114(2): 221-223.
4. Chavin, W., Jelonek, E. J., Reed, A. H., Binder, L. R., 1980. Survival of mice receiving melanoma transplants is promoted by hydroquinone. Science 208 (4442): 408-410.
5. Goyal, P., Goyal, K., Vijaya Kumar, S. G., Singh, A., Katare, O. P., Nath Mishra, D., 2005. Liposomal drug delivery systems – Clinical applications. Acta Pharmaceutica 55: 1-12.
6. Schaeffer, H., Krohn, D., 1982. Liposomes in topical drug delivery. Investigative Ophthalmology Visual Science 22 (2): 220-227.
7. Lasic D., 1998. Novel applications of liposomes. TIBTECH 16: 307-321.
8. Fang, J. U., Hwang, T. L., Huang, Y. L., 2006. Liposomes as vehicles for enhancing drug delivery via skin routes. Current Nanoscience 2: 5570-5582.
9. Mozafari, M. R., 2005. Liposomes: an overview of manufacturing techniques. Cellular and Molecular Biology Letters 10(4): 711-723.
10. Khoshneviszadeh, R., Bazzaz, B. S. F., Housaindokht, M. R., Ebrahim-Habibi, A., Rajabi, O., 2016. A comparison of explanation methods of encapsulation efficacy of hydroquinone in a liposomal system. Journal of Paramedical Sciences 7(2): 23-28.
11. Khoshneviszadeh, R., Bazzaz, B. S. F., Housaindokht, M. R., Ebrahim-Habibi, A., Rajabi, O., 2015. UV spectrophotometric determination and validation of hydroquinone in liposome. Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR 14(2): 473-479.
12. Fiorentini, D., Landi, L., Barzanti, V., Cabrini, L., 1989. Buffers can modulate the effect of sonication on egg lecithin liposomes. Free Radical Research Communications 6(4): 243-250.
13. Grit, M., Crommelin, D. J., 1993. Chemical stability of liposomes: implications for their physical stability. Chemistry and Physics of Lipids 64(1): 3-18.
14. Grit, M., Smidt, J. H., Struijke, A., Crommelin, D. J., 1989. Hydrolysis of phosphatidylcholine in aqueous liposome dispersions. International Journal of Pharmaceutics 50(1): 1-6.