

# بهینه‌سازی فرایند انکپسوله سازی دارو در میکروذره‌های کروی چیتوسان با استفاده از روش الکترواسپری هم‌محور

بهناز مولوی، علیرضا حبیبی\*<sup>+</sup>

کرمانشاه، دانشگاه رازی، دانشکده فنی مهندسی، گروه مهندسی شیمی، صندوق پستی ۶۷۱۴۹۶۷۳۴۶

علی فتاحی

کرمانشاه، دانشگاه علوم پزشکی کرمانشاه، دانشکده داروسازی، صندوق پستی ۶۷۱۵۴۷۱۴۱

**چکیده:** میکرو و نانو ذره‌ها در دهه‌های اخیر به‌عنوان حامل‌های زیست‌تخریب‌پذیر (داربست) برای تحویل و رهش کنترل‌شده‌ی عامل‌های درمانی گوناگونی مانند داروها، پروتئین‌ها، سلول‌ها و ژن‌ها، گسترش پیدا کردند. در این پژوهش، تولید میکروذره‌های کروی چیتوسان و بارگذاری هم‌زمان رتینوئیک اسید در این میکروذره‌های کروی بر پایه‌ی روش الکترواسپری هم‌محور به روش آماری سطح پاسخ مورد بررسی قرار گرفت. نتیجه‌های آزمایشگاهی نشان داد که اندازه‌ی ذره‌ها و ریخت‌شناسی آن‌ها تحت تأثیر شرایط عملیاتی، از جمله استفاده از غلظت چیتوسان ( $X_1$ )، سرعت جریان رتینوئیک اسید ( $X_2$ )، نسبت چیتوسان به رتینوئیک اسید ( $X_3$ ) و میزان شدت نیرومحرکه الکتریکی ( $X_4$ ) است. بهترین میانگین قطر و توزیع اندازه‌ای ذره‌ها در غلظت چیتوسان ۳۷/۷٪، شدت جریان رتینوئیک اسید ۰/۱ mL/h، نسبت چیتوسان به رتینوئیک اسید ۶ و ولتاژ ۱۰/۷ kV به دست آمد. پایداری میکروذره‌های کروی چیتوسان تولیدشده در محیط کشت برای مدت ۱۰ روز مورد بررسی واقع شد که این پایداری مناسب میکروذره‌های کروی امکان استفاده‌ی آن‌ها را در آزمایش‌های درون تنی می‌دهد.

**واژه‌های کلیدی:** میکروذره‌های کروی؛ الکترواسپری هم‌محور؛ چیتوسان؛ انکپسوله سازی دارو؛ رتینوئیک اسید؛ روش آماری سطح پاسخ.

**KEYWORDS:** Microspheres; Coaxial electrospraying; Chitosan; Drug encapsulation; Retinoic acid; Response surface methodology.

## مقدمه

برای غلبه بر این مشکل، گسترش سامانه‌های هدفمند دارورسانی برای رسانش مولکول‌های فعال زیستی به محل موردنظر است [۱، ۲]. در سال‌های اخیر توجه به سامانه‌های دارورسانی مانند میکرو و نانو داروها به‌منظور درمان بیماری‌ها

از آنجایی که بیش‌تر داروها در مرحله‌ی درمان به دلیل نبود توانایی در رسیدن به محل اثر از کارایی دلخواه برخوردار نیستند و نیز بخش مهمی از داروهای تجویز شده بانفوذ به بافت‌های سالم بدن باعث عوارض جانبی شدید در آن‌ها می‌شوند، یک رویکرد مؤثر

\*عهدہ دار مکاتبات

+E-mail: a.habibi@razi.ac.ir

بر اساس این مطالعه با تنظیم پارامترهای عملیاتی همچون غلظت پلی لاکتید کوگلیکولید و اختلاف میدان الکتریکی توانستند بازده انکپسولاسیون دارو را به حدود ۱۰٪ افزایش دهند. همچنین با بررسی سرعت رهایش دارو از ذره‌های تولیدشده در این روش مشخص شد که رهایش دارو از ذره‌های کوچک در مقایسه با ذره‌های بزرگ بیش‌تر است و بنابراین می‌توان روند رهایش دارو را در این روش با تنظیم اندازه‌ی ذره‌های تولیدی کنترل نمود [۱۱]. در سال ۲۰۱۱ میلادی نیز عنایتی و همکاران با بررسی روش الکترواسپری هم‌محور توانستند ضمن مطالعه اثر میزان هوادهی بر هیدرودینامیک ذره‌های تشکیل‌شده از جنس پلی‌متیل سیل سسیکواسان<sup>(۲)</sup> که یک پلیمر زیست‌تخریب‌پذیر آب‌گریز است، اندازه ذره‌های تولیدی را به  $0.4 \mu\text{m}$  کاهش دهند [۱۲]. در سال ۲۰۱۳ میلادی، سی و همکاران به بررسی اثر اختلاف ولتاژ اعمال‌شده بر ساخت میکروذره‌های پلی لاکتید کوگلیکولید با روش الکترواسپری هم‌محور پرداختند و در ولتاژ  $0.5 \text{ kV}$  حالت قطره‌ای، در ولتاژ  $1.5 \text{ kV}$  حالت مخروطی، در ولتاژ  $3 \text{ kV}$  مخروط پایدار و در ولتاژ  $5 \text{ kV}$  حالت چند مخروطی گزارش شد [۱۳].

چیتوسان یک پلیمر داستیله شده طبیعی پلی‌کاتیونی است که از واحدهای N استیل-D-گلوکز آمین و D-گلوکز آمین تشکیل شده است. چیتوسان از طریق گروه‌های آمین خود در واکنش‌های شیمیایی گوناگون قابلیت واکنش دارد و از این رو به‌عنوان یک پلیمر زیست‌تخریب‌پذیر و سازگار با بدن مورد پژوهش و بررسی است تا از آن در ساخت انواع داربست موردنیاز در انکپسوله سازی دارو استفاده شود. در سال ۲۰۱۱ میلادی، پارک و همکاران با استفاده از روش الکترواسپری با نازل هم‌محور ساخت میکروذره‌های چیتوسان-فوکویدان<sup>(۳)</sup> را بررسی کردند. در مطالعه آن‌ها، محلول‌های آبی فوکویدان و چیتوسان به ترتیب به‌عنوان محلول داخلی و خارجی نازل هم‌محور در بارگذاری داروی آلفا-لیپوئیک‌اسید<sup>(۴)</sup> بدون هیچ‌گونه انعقادی در نوک نازل با موفقیت استفاده شد [۱۴]. هدف پژوهش حاضر، بررسی تولید میکروذره‌های چیتوسان با استفاده از روش الکترواسپری هم‌محور برای استفاده در انتقال هدفمند دارو است. یکی از مشکل‌های عمده در بارگذاری داروهای آب‌گریز در میکرو/نانوذره‌های پلی‌ساکاریدی مانند ریزذره‌های چیتوسان، حلالیت کم این داروها در محیط آبی است که پلیمر در آن حل شده است. در این مطالعه برای اولین بار بارگذاری داروی آب‌گریز

به دلیل اثر درمانی بیش‌تر، سمیت کم‌تر، راحتی بیمار و نیز تجمع دارو در محل اثر از اهمیت زیادی برخوردار بوده است [۴، ۳].

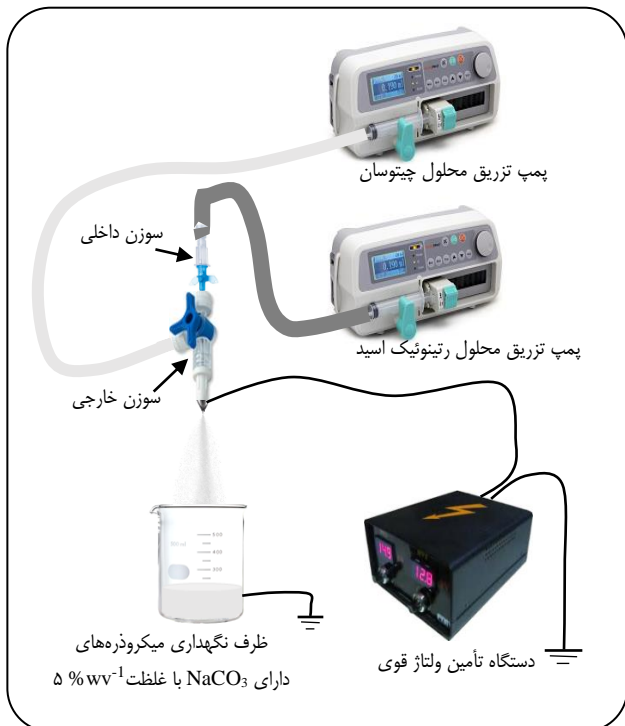
در گذشته، روش امولسیون رایج‌ترین روش برای انکپسوله سازی سلول‌ها و داروها بود. اما امروزه بارگذاری عوامل درمانی در میکرو و نانو ذره‌ها با بازده انکپسولاسیون بالا، توزیع یکنواخت اندازه‌ی ذره‌ها و محافظت مؤثر از مواد زیستی فعال با به‌کارگیری روش‌های جدید از اهمیت برخوردار است [۵]. روش الکترواسپری که از آن با نام الکتروهیدرودینامیک نیز یاد می‌شود روشی کارآمد برای تولید ریز کپسول‌ها با کاربرد انکپسوله سازی دارو و یا سلول است که در آن، امولسیون اولیه با عبور از یک نازل تحت تأثیر میدان الکتریکی اعمال‌شده به‌صورت پاششی خارج می‌شود و سپس این ذره‌ها در یک ظرف، جمع‌آوری و تثبیت می‌شوند [۶]. در یک دهه گذشته، تلاش‌ها در جهت تولید میکرو و نانو ذره‌های چندلایه موجب ابداع روشی بر پایه الکترواسپری موسوم به الکترواسپری هم‌محور شده است که گزارش‌های علمی از پتانسیل بالای آن برای غلبه بر محدودیت‌های دیگر روش انکپسولاسیون حکایت دارد [۷]. روش الکترواسپری هم‌محور تحت تأثیر نوع طراحی نازل و پارامترهای عملیاتی گوناگون عملکرد متفاوتی در تولید ریز ذره‌ها از خود نشان داده است. برخی پژوهشگران از سوزن داخلی هم‌سطح سوزن خارجی استفاده کرده‌اند [۸]، درحالی‌که عده‌ای دیگر توصیه کردند که برای ایجاد ذره‌های ریز با اندازه یکنواخت لازم است تا سوزن داخلی قدری بیرون‌تر یا داخل‌تر از سوزن بیرونی قرار گیرد [۹، ۱۰]. نکته‌ی مهم دیگر در روش الکترواسپری هم‌محور، محل قرارگیری ظرف جمع‌آوری ذره‌ها و نیز ترکیب محلول ظرف جمع‌آوری است که بسته به نوع دارو و پلیمر مورد استفاده متفاوت است. در سال ۲۰۱۰ میلادی، عنایتی و همکاران با استفاده از روش الکترواسپری هم‌محور موفق به ساخت میکرو و نانو ذراتی از پلی لاکتید کوگلیکولید اسید با قطر میانگین  $100 \text{ nm}$  تا  $2.5 \mu\text{m}$  برای بارگذاری ۶۵-۷۰٪ داروی استرادیول<sup>(۱)</sup> شدند. در این مطالعه از یک نازل سه سوزنی هم‌محور استفاده شد که از سوزن مرکزی و بیرونی به ترتیب برای انتقال محلول پلیمر و دارو استفاده شد و سوزن میانی به‌صورت غیرفعال بود [۱۰]. سی و همکاران در سال ۲۰۱۰ میلادی تولید تک‌مرحله‌ای ذره‌های پلی لاکتید کوگلیکولید یکنواخت برای پوشش‌دهی دارو را با استفاده از روش الکترواسپری هم‌محور مورد بررسی قرار دادند.

(۱) Oestradiol

(۲) Poly methyl silsesquioxane

(۳) Fucoidan

(۴)  $\alpha$ -Lipoic Acid (ALA)



شکل ۱- شمای دستگاه الکترواسپری هم‌محور مورد استفاده در این پژوهش.

اعمال میدان الکتریکی موجب افزایش سرعت جریان عبوری مواد از سوزن‌ها و در نتیجه خروج آن‌ها به شکل پاششی از نازل شد. این ذره‌های پاشیده شده در یک ظرف شیشه‌ای که به فاصله ۶ cm از نازل قرار داشت و دارای محلول سدیم کربنات  $5\% \text{w/v}$  به عمق ۴ cm، جمع‌آوری و تثبیت شد. برای تهیه محلول رتینوئیک اسید، این ماده در حلال کلروفورم با غلظت  $40 \text{ mg/mL}$  حل شد و به‌منظور جلوگیری از اکسایش در برابر نور، با پوشش آلومینیومی به‌طور کامل پوشش داده شد. محلول چیتوسان نیز ابتدا با انحلال این ماده در محلول  $1\% \text{v/v}$  استیک اسید و سپس خنثی‌سازی حالت اسیدی با استفاده از محلول  $\text{NaOH}$ ، در حدود  $6/8-6/5$  به دست آمد. به علت استفاده از حلال کلروفورم، شلنگ مورد استفاده در دستگاه از جنس تفلون انتخاب شد و برای تزریق محلول رتینوئیک اسید از سرنگ بدون پیستون پلاستیکی در پمپ سرنگی استفاده شد.

#### طراحی آزمایش‌ها و تحلیل آماری نتیجه‌ها

به‌منظور بررسی تأثیر پارامترهای عملیاتی بر اندازه و شکل ظاهری ذره‌های تشکیل شده از فرایند الکترواسپری هم‌محور برای انکپسوله سازی رتینوئیک اسید در داربست چیتوسان

در ریزذره‌های آب‌دوست به روش هسته - پوسته‌ای مدنظر قرار گرفته است. از آنجا که داروی آب‌گریز در هسته ریزذره‌ها قرار می‌گیرد، میزان بارگذاری دارو در این روش به میزان حلالیت دارو در آب، محدود نخواهد شد. برای این منظور آل - ترانس رتینوئیک اسید که یک پیش‌ساز فعال ویتامین A با اثرهای آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی است و نسبت به سایر ایزومرهای طبیعی ویتامین A پایدارتر بوده و قابلیت نفوذ بیشتر را به سلول‌های بدن دارد، به‌عنوان دارو مدل انتخاب شد و با استفاده از روش سطح پاسخ نتیجه‌های به‌دست‌آمده از طراحی آزمایش‌ها به روش مرکب مرکزی موردسنجش آماری قرار گرفت تا با در نظر گرفتن عامل-هایی همچون غلظت چیتوسان، سرعت جریان رتینوئیک اسید، نسبت چیتوسان به رتینوئیک اسید و اختلاف پتانسیل الکتریکی اعمال‌شده، شرایط بهینه برای تولید کوچک‌ترین میکروذره‌های کروی یکنواخت که قابلیت بارگذاری رتینوئیک اسید را دارند، تعیین شود.

#### بخش تجربی

##### مواد شیمیایی

رتینوئیک اسید مورد استفاده از شرکت داروپخش ایران تهیه شد و همچنین چیتوسان مورد استفاده از فراورده‌های شرکت چینی Yuhuan Marine Biochemistry Co. با وزن مولکولی  $100 \text{ kDa}$  خریداری شد. حلال‌های مورد استفاده شامل کلروفورم، استیک اسید و مواد شیمیایی مصرفی شامل هیدروکسید سدیم، سدیم کربنات و تری پلی فسفات از فراورده‌های شرکت مرک آلمان استفاده شد.

##### دستگاه الکترواسپری

دستگاه الکترواسپری مورد استفاده در این پژوهش همان‌گونه که در شکل ۱ نمایش داده شده است شامل یک دستگاه ولتاژ قوی ساخت شرکت فناوران نانومقیاس با توانایی اعمال ولتاژ  $30-0 \text{ kV}$ ، دو عدد پمپ سرنگی ساخت شرکت فناوران نانومقیاس، یک ظرف شیشه‌ای به‌عنوان جمع‌کننده، الکتروود و سیستم اتصال زمین بود. در این سامانه، محلول رتینوئیک اسید و چیتوسان به وسیله دو پمپ سرنگی جداگانه به درون یک جت هم‌محور که متشکل از دو سوزن با اندازه‌های مختلف بود، فرستاده شد. به‌طوری‌که محلول رتینوئیک اسید از سوزن داخلی و محلول چیتوسان به‌عنوان پلیمر زیستی تشکیل‌دهنده داربست در فضای بین دو سوزن جاری بود.

بارگذاری شده، میکروذره‌ها دارای رتینوئیک اسید پس از تولید با استفاده از محلول  $1\% \text{v/v}$  استیک اسید در یک دستگاه همگن‌ساز تخریب شدند تا داروی بارگذاری شده به طور کامل آزاد شود. سپس محلول به دست آمده با نسبت برابر با کلروفورم مخلوط شد و با استفاده از دکاتور دو فاز تشکیل شده از هم جدا شد. مقدار جذب رتینوئیک اسید با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر فرابنفش در طول موج  $365 \text{ nm}$  در برابر شاهد کلروفورم اندازه‌گیری شد. سپس با استفاده از منحنی کالیبراسیون غلظت - جذب، غلظت دارو در محلول کلروفورم تعیین شد و مقدار بارگذاری دارو از رابطه (۲) تعیین شد:

$$\text{مقدار داروی موجود در فرمولاسیون} \times 100 = \frac{\text{مقدار داروی موجود در فرمولاسیون}}{\text{مقدار داروی اولیه به کاررفته در فرمولاسیون}} \times \text{درصد بارگذاری دارو} \quad (2)$$

برای تعیین رهش دارو، نمونه‌های قرار داده شده در محیط کشت DMEM دارای سدیم آزید  $0.1\%$  به روش بالا استخراج شدند و سپس مقدار رتینوئیک اسید در کلروفورم به روش اسپکتروفوتومتری تعیین و سپس میزان رهش دارو بر اساس معادله (۳) گزارش شد:

$$\text{مقدار داروی موجود در فرمولاسیون} \times 100 = \frac{\text{مقدار داروی استخراج شده}}{\text{مقدار داروی موجود در فرمولاسیون}} \times \text{درصد رهش دارو} \quad (3)$$

## نتیجه‌ها و بحث

### طراحی نازل و جمع‌کننده در الکترواسپری هم‌محور

در پژوهش حاضر، برای تهیه نازل الکترواسپری از ترکیب سوزن‌های حیوانی با اندازه‌های گوناگون مورد استفاده قرار گرفت که در جدول ۲ آورده شده است. نتیجه‌های کار حاضر نشان داد که اختلاف بیش‌تر در اندازه‌ی بین سوزن‌های داخلی و خارجی نازل دستگاه الکترواسپری اجازه‌ی حرکت مناسب محلول پلیمر چیتوسان به ویژه در غلظت‌های بالا که گرانیوی محلول بیش‌تر است را فراهم می‌کند. همچنین این امر، باعث کاهش بسته شدن سوزن‌ها در حین فرایند و در نتیجه تولید میکروذره‌های کروی با اندازه‌های یکنواخت‌تری شد، به طوری که بهترین عملکرد سیستم الکترواسپری در طراحی نازل A به دست آمد. همچنین در طراحی این نازل، سوزن داخلی به میزان  $0.5 \text{ mm}$  بیرون‌تر از سوزن خارجی قرار داده شد.

متغیرهای کمی مستقلی شامل غلظت چیتوسان ( $X_1$ )، سرعت جریان رتینوئیک اسید ( $X_2$ )، نسبت چیتوسان به رتینوئیک اسید ( $X_3$ ) و اختلاف ولتاژ الکتریکی ( $X_4$ ) به عنوان عامل تأثیرگذار فرایند هر یک در سه سطح آورده شده در جدول ۱ مورد بررسی واقع شد. بر پایه روش مرکب مرکزی، تعداد ۳۰ آزمایش برای پیش‌بینی روند تغییر متغیرهای پاسخ به انجام رسید. ۶ عدد از این آزمایش‌ها در نقطه‌ی مرکزی و به منظور تعیین میزان خطا مورد استفاده قرار گرفت و از معادله چندجمله‌ای درجه دوم زیر برای پیش‌بینی روند تغییر اندازه ذره‌ها استفاده شد [۱۵].

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^k \beta_i X_i + \sum_{i=1}^k \beta_{ii} X_i^2 + \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^k \beta_{ij} X_i X_j + \varepsilon \quad (1)$$

که  $Y$  متغیر وابسته مورد مطالعه در پژوهش حاضر، اندازه ذره‌های تشکیل شده است،  $\beta_0$  یک مقدار ثابت و تعیین اندازه ذره‌های به دست آمده به هنگامی است که متغیرهای مستقل در سطح میانی استفاده شده‌اند. ثابت‌های  $\beta_i$ ،  $\beta_{ii}$  و  $\beta_{ij}$  به ترتیب نشانگر بزرگی اثر هر یک از متغیرهای مستقل، اثر غیرخطی هر یک از آن‌ها و برهمکنش بین متغیرهای مورد مطالعه است.  $\varepsilon$  نیز بیانگر میزان خطا است. میزان تأثیر این ثابت‌ها در پیش‌بینی رفتار متغیر وابسته با استفاده از آنالیز تحلیل واریانس<sup>(۱)</sup> (آزمون F) و میزان سطح اطمینان<sup>(۲)</sup>  $95\%$  با به کارگیری نرم‌افزار دیزاین اکسپرت<sup>(۳)</sup> تعیین شد.

### روش‌های سنجش

پس از انجام هر آزمایش، ۱۵۰ عدد از ذره‌های تشکیل شده در ظرف جمع‌آوری مورد عکس‌برداری میکروسکوپی با بزرگنمایی ۱۰۰ برابر (Nikon, Eclipse TS100, Japan) قرار گرفت. سپس قطر میانگین ذره‌ها با استفاده از نرم‌افزار /یمیج جی محاسبه شد. به منظور بررسی میزان پایداری میکروذره‌های تولید شده در شرایط بهینه، نمونه میکروذره‌های به دست آمده برای چند روز در محیط کشت DMEM قرار داده شد تا پایداری آن‌ها در محیط همانند بدن بررسی شود. به این منظور میکروذره‌های ساخته شده ابتدا با آب مقطر شستشو داده شد و سپس در محیط کشت DMEM دارای سدیم آزید  $0.1\%$  رها شد. عکس‌برداری از نمونه در این محیط کشت برای مدت ۱۰ روز و با فاصله زمانی معین انجام شد. برای تعیین مقدار داروی

(۱) Analysis of variance (ANOVA)

(۲) Confidence level

(۳) Design expert

جدول ۱- سطح‌های متغیرهای مستقل و طراحی آزمایش‌ها به روش مرکب مرکزی برای ساخت میکروذره‌های چیتوسان به روش الکترواسپری هم‌محور.

متغیرهای مستقل <sup>۱</sup>				
شماره آزمایش	X <sub>۱</sub> : غلظت چیتوسان (%w/v)	X <sub>۲</sub> : سرعت رتینوئیک اسید (ml h <sup>-1</sup> )	X <sub>۳</sub> : نسبت چیتوسان به رتینوئیک اسید	X <sub>۴</sub> : اختلاف ولتاژ الکتریکی (kV)
۱	۲ (-۱)	۰٫۵ (+۱)	۶ (+۱)	۸ (-۱)
۲	۴ (+۱)	۰٫۵ (+۱)	۶ (+۱)	۸ (-۱)
۳	۲ (-۱)	۰٫۳ (۰)	۴ (۰)	۱۰ (۰)
۴	۳ (۰)	۰٫۳ (۰)	۲ (-۱)	۱۰ (۰)
۵	۴ (+۱)	۰٫۳ (۰)	۴ (۰)	۱۰ (۰)
۶	۲ (-۱)	۰٫۱ (-۱)	۶ (+۱)	۱۲ (+۱)
۷	۴ (+۱)	۰٫۱ (-۱)	۶ (+۱)	۸ (-۱)
۸	۲ (-۱)	۰٫۵ (+۱)	۶ (+۱)	۱۲ (+۱)
۹	۳ (۰)	۰٫۱ (-۱)	۴ (۰)	۱۰ (۰)
۱۰	۳ (۰)	۰٫۳ (۰)	۴ (۰)	۱۰ (۰)
۱۱	۳ (۰)	۰٫۳ (۰)	۴ (۰)	۱۰ (۰)
۱۲	۴ (+۱)	۰٫۱ (-۱)	۲ (-۱)	۱۲ (+۱)
۱۳	۳ (۰)	۰٫۵ (+۱)	۴ (۰)	۱۰ (۰)
۱۴	۳ (۰)	۰٫۳ (۰)	۴ (۰)	۱۲ (+۱)
۱۵	۴ (+۱)	۰٫۵ (+۱)	۲ (-۱)	۱۲ (+۱)
۱۶	۴ (+۱)	۰٫۱ (-۱)	۲ (-۱)	۸ (-۱)
۱۷	۴ (+۱)	۰٫۵ (+۱)	۶ (+۱)	۱۲ (+۱)
۱۸	۲ (-۱)	۰٫۵ (+۱)	۲ (-۱)	۱۲ (+۱)
۱۹	۳ (۰)	۰٫۳ (۰)	۴ (۰)	۸ (-۱)
۲۰	۳ (۰)	۰٫۳ (۰)	۴ (۰)	۱۰ (۰)
۲۱	۲ (-۱)	۰٫۵ (+۱)	۲ (-۱)	۸ (-۱)
۲۲	۲ (-۱)	۰٫۱ (-۱)	۶ (+۱)	۸ (-۱)
۲۳	۳ (۰)	۰٫۳ (۰)	۶ (+۱)	۱۰ (۰)
۲۴	۳ (۰)	۰٫۳ (۰)	۴ (۰)	۱۰ (۰)
۲۵	۴ (+۱)	۰٫۵ (+۱)	۲ (-۱)	۸ (-۱)
۲۶	۳ (۰)	۰٫۱ (-۱)	۲ (-۱)	۸ (-۱)
۲۷	۴ (+۱)	۰٫۱ (-۱)	۶ (+۱)	۱۲ (+۱)
۲۸	۳ (۰)	۰٫۱ (-۱)	۴ (۰)	۱۰ (۰)
۲۹	۳ (۰)	۰٫۳ (۰)	۴ (۰)	۱۰ (۰)
۳۰	۲ (-۱)	۰٫۱ (-۱)	۲ (-۱)	۱۲ (+۱)

<sup>۱</sup> برای تبدیل مقادیر واقعی (X) به مقادیر کد شده (X̄) از تبدیل زیر استفاده شد: 
$$X = \frac{2x - (x_{high} + x_{low})}{x_{high} - x_{low}}$$
 که در آن X<sub>high</sub>, X<sub>low</sub> به ترتیب کمترین و بیشترین سطح هر یک از متغیرهای مستقل مورد مطالعه است. مقادیر داخل پرانتز نشانگر مقدار کد شده هر متغیر در هر آزمایش هستند.

جدول ۲- اندازه‌ی روزنه سوزن‌های مورداستفاده در روش الکترواسپری هم‌محور.

مشاهدات	سوزن خارجی	سوزن داخلی	طراحی
پاشش بدون گرفتگی	۱۴ G (OD: ۲,۱۱ mm و ID: ۱,۶ mm)	۲۲G (OD: ۰,۷۲ mm و ID: ۰,۴۱ mm)	A
گرفتگی نازل	۱۴ G (OD: ۲,۱۱ mm و ID: ۱,۶ mm)	۲۰ G (OD: ۰,۹۱ mm و ID: ۰,۶ mm)	B
گرفتگی دهانه نازل	۱۶ G (OD: ۱,۶۵ mm و ID: ۱,۱۹ mm)	۲۰ G (OD: ۰,۹۱ mm و ID: ۰,۶ mm)	C
گرفتگی نازل	۱۶ G (OD: ۱,۶۵ mm و ID: ۱,۱۹ mm)	۲۲G (OD: ۰,۷۲ mm و ID: ۰,۴۱ mm)	D

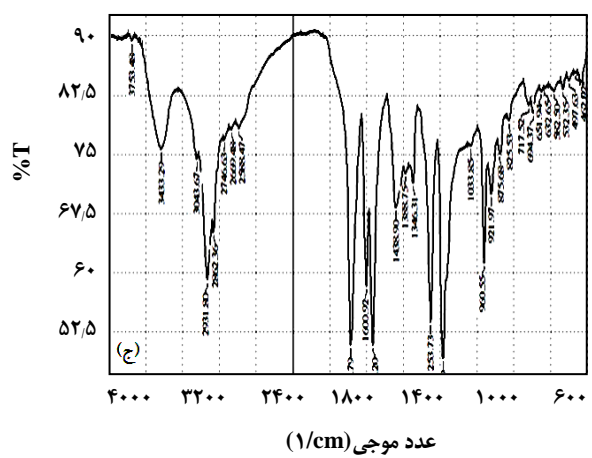
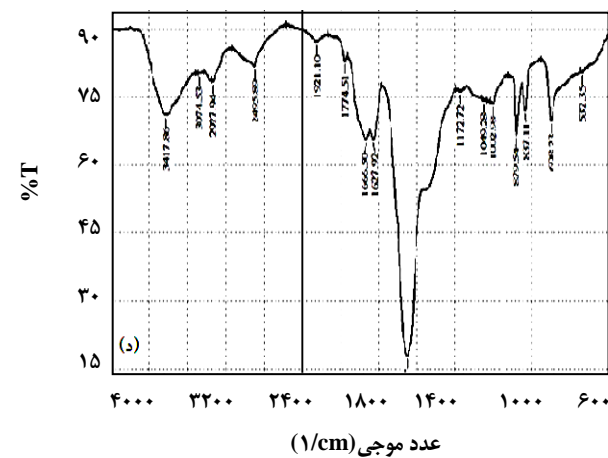
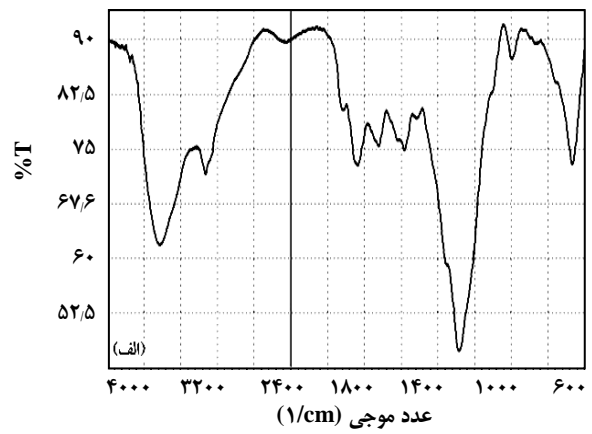
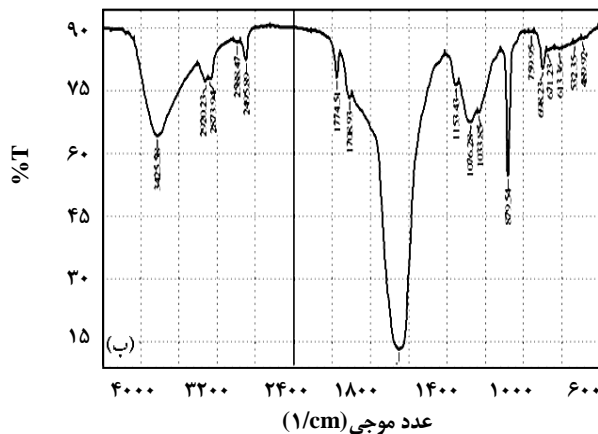
ماده پوشش‌دهنده و دارو رتینوئیک اسید اتفاق نیفتاده است. به عبارت بهتر پوشیده شدن پیک‌های رتینوئیک اسید در میکروذره‌های کروی بارگذاری شده، فرضیه‌ی بارگذاری دارو در هسته و عدم برهم‌کنش یونی دارو در میکروذره‌های چیتوسان را تأیید می‌نماید.

### تحلیل نتیجه‌ها با استفاده از روش سطح پاسخ

نتیجه‌های به‌دست‌آمده از انجام آزمایش‌ها بر اساس طراحی آزمایش‌های مرکب مرکزی در شکل ۳ ارایه شده است. سیاه شدن بخش مرکزی میکروذره‌های مربوط به بارگذاری رتینوئیک اسید در میکروذره‌ها است، زیرا رتینوئیک اسید حساس به نور است و در صورت قرار گرفتن در معرض نور، سیاه‌رنگ می‌شود. با توجه به این نتیجه‌ها، بسته به شرایط، اندازه ذره‌های تشکیل شده از  $5966 \mu\text{m}$  در آزمایش شماره ۳ تا  $2800 \mu\text{m}$  در آزمایش شماره ۲ تغییر کرده است. همچنین با توجه به شکل ۴، ذره‌های تشکیل شده به لحاظ شکل ظاهری و یکنواختی اندازه بسیار وابسته به شرایط فرایند بودند. به عنوان نمونه، در آزمایش شماره ۳ اگرچه اندازه ذره‌های کوچک و توزیع اندازه ذره‌ها از پراکندگی کمی برخوردار بود اما رتینوئیک اسید بارگذاری شده بسیار محدود بود. همچنین میزان بارگذاری دارو در آزمایش‌های ۶ و ۲۲ اندک و در آزمایش‌های ۷ و ۱۳ مناسب بود. این نتیجه‌ها گویای تغییر شرایط بارگذاری دارو با تغییر شرایط عملیاتی موردمطالعه در روش الکترواسپری هم‌محور است. با توجه به پیچیدگی رفتاری این فرایند، استفاده از روش آماری مرکب مرکزی می‌تواند ابزار قدرتمندی برای پیش-بینی رفتار سامانه و در نتیجه بهینه‌سازی آن باشد.

بنابراین یکی از اهداف کار حاضر دستیابی به یک رابطه ریاضی برای توصیف تغییرهای متغیر پاسخ با تغییر هر یک از متغیرهای مستقل بود. برازش داده‌های تجربی ارایه شده در شکل ۳ با مدل چندجمله‌ای درجه دوم مطابق معادله (۱)، موجب به دست آمدن معادله (۴) بر اساس مقدرهای کد شده متغیرهای مستقل به‌صورت زیر شد.

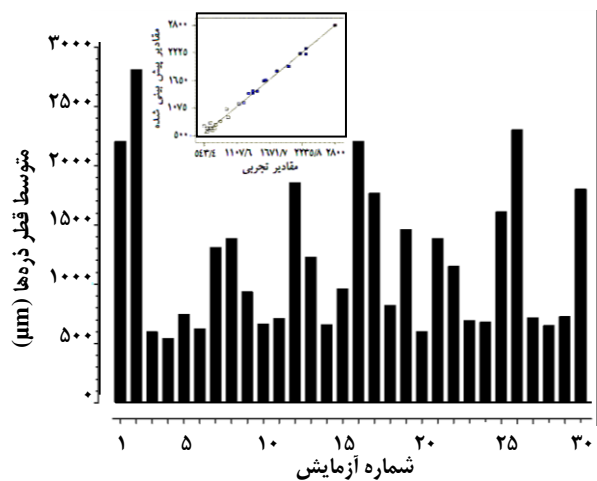
برای جمع‌آوری میکروذره‌های کروی تشکیل شده در ظرف جمع کننده از ماده‌ای مناسب به‌منظور ایجاد پیوند عرضی با چیتوسان استفاده شد. اساس این روش استفاده از کاتیون‌های دو یا سه‌ظرفیتی برای ایجاد پیوند عرضی است که موجب تشکیل میکروذره‌های کروی در ظرف جمع‌آوری می‌شوند. در پژوهش حاضر از سدیم کربنات ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) که توانایی تشکیل پیوند عرضی با چیتوسان دارد برای این منظور استفاده شد. عکس‌برداری میکروسکوپ نوری از میکروذره‌های کروی تشکیل شده در محیط سدیم کربنات نشان داد که توانایی تشکیل ساختار مناسب با استحکام نسبی برای انکپسوله سازی دارو دارا است. در حقیقت سدیم کربنات پس از حل شدن در آب، یون‌های  $\text{OH}^-$  ایجاد می‌کند که این یون‌ها با نفوذ به درون چیتوسان موجب ایجاد لایه‌ی رسوبی به دلیل تشکیل پیوندهای عرضی برای تشکیل میکروذره‌های نامحلول می‌شوند. برای بررسی بهتر چگونگی تشکیل میکروذره‌ها از چیتوسان (شکل ۲ الف)، میکروذره‌های چیتوسان بدون رتینوئیک اسید (شکل ۲ ب)، رتینوئیک اسید (شکل ۲ ج)، و میکروذره‌های چیتوسان دارای رتینوئیک اسید (شکل ۲ د)، آنالیز FT-IR گرفته شد. با مقایسه طیف چیتوسان و میکروذره‌های کروی چیتوسان بدون رتینوئیک اسید مشخص شد که اگرچه طیف ارتعاش‌های به نسبت همانندی دیده می‌شود اما برخی پیک‌های جدید به ویژه در  $1675 \text{ cm}^{-1}$  پس از تشکیل میکروذره‌ها ظاهر می‌شود. این پیک‌های جدید تأییدکننده‌ی انجام واکنش بین چیتوسان و کربنات سدیم در ظرف جمع‌آوری هستند. از سوی دیگر طیف‌های رتینوئیک اسید و میکروذره‌های دارای رتینوئیک اسید در شکل ۲ (ج و د) تفاوت چشمگیری را نشان می‌دهند، اما شباهت زیادی بین طیف‌های شکل (۲ ب) و (۲ د) وجود دارد. این نتیجه‌ها نشان‌گر آن است که از یک فرایند فیزیکی برای پوشش‌دهی دارو استفاده شده است و واکنش شیمیایی در حین میکروانکپسوله سازی دارو بین



شکل ۲- طیف FT-IR از چیتوسان (الف)، میکروذرات چیتوسان بدون رتینوئیک اسید (ب)، رتینوئیک اسید (ج) و میکروذره‌های چیتوسان بارگذاری شده با رتینوئیک اسید (د).

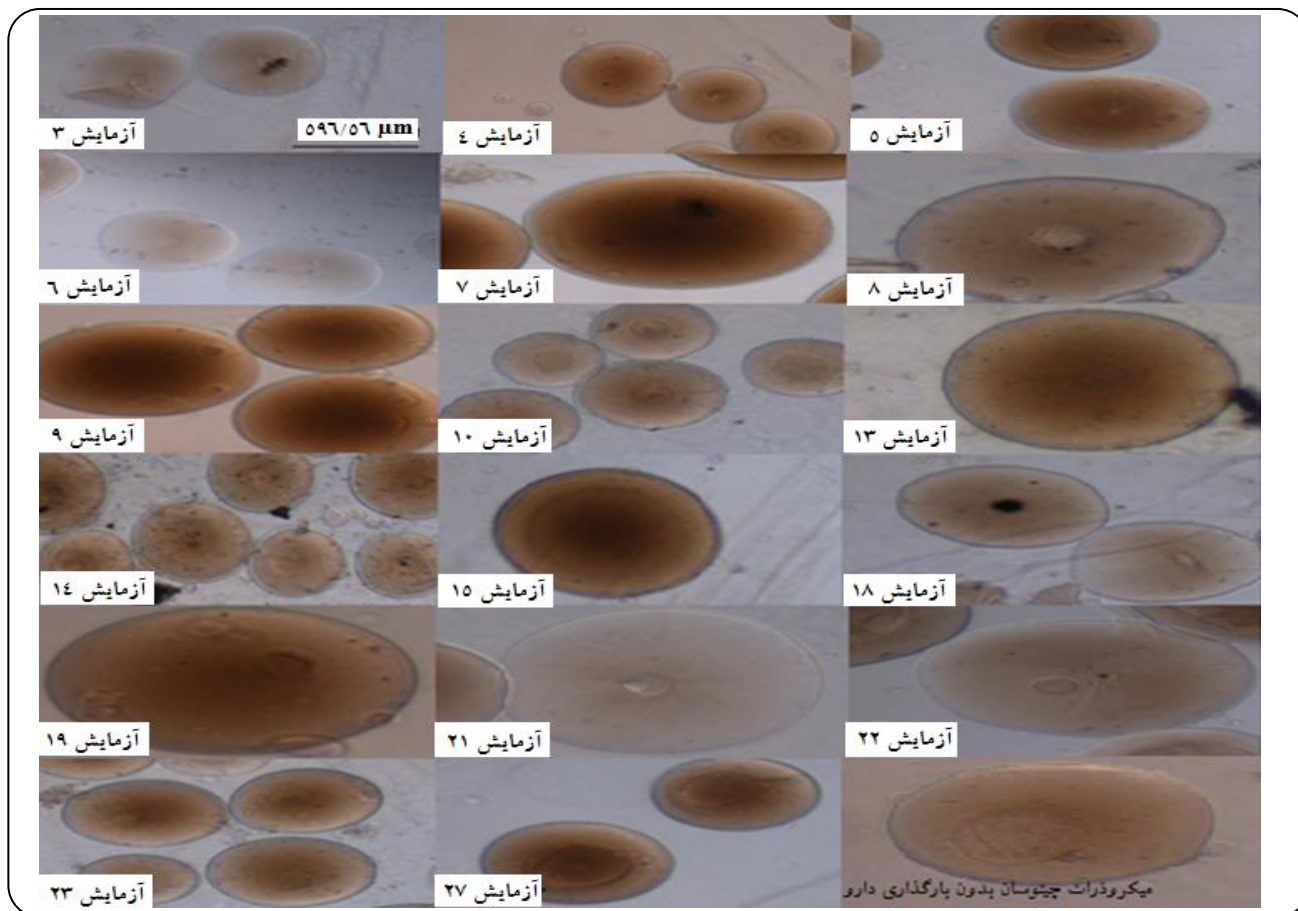
$$\begin{aligned}
 & 653,09 + 75,45X_1 + \quad (4) \\
 & 67,53X_2 - 45,32X_3 - 328,61X_4 + 92,62X_1X_2 + \\
 & 83,36X_1X_3 - 43,78X_1X_4 + 491,27X_2X_3 - 55,37X_2X_4 - \\
 & 47,39X_3X_4 + 462,17X_3^2 + 438,07X_4^2
 \end{aligned}$$

برای تعیین ضریب‌های این معادله، از آزمون آماری مقدار F برای تحلیل واریانس استفاده شد و مقدار F مدل که برابر با ۱۴۱/۸۲ محاسبه شد نشان از مناسب بودن معادله برازش شده از نظر آماری در سطح اطمینان ۹۵٪ بود (جدول ۳). آنالیز ANOVA نشان داد که تنها ضریب غیر مؤثر در توصیف اندازه میکروذره‌های تشکیل شده مربوط به اثر غیرخطی غلظت چیتوسان ( $X_1^2$ ) و نسبت چیتوسان به رتینوئیک اسید ( $X_3^2$ ) است که از معادله نهایی حذف شده‌اند و سایر عامل‌ها به دلیل دارا بودن



شکل ۳- نتیجه‌های تجربی آزمایش‌های طراحی شده در جدول ۱ و مقایسه این داده‌ها با مقدارهای پیش‌بینی شده توسط معادله (۴).





شکل ۴- عکس میکروسکوپی میکروذرات تولیدشده با استفاده از روش الکترواسپری هم‌محور در شرایط عملیاتی مختلف ارائه‌شده در جدول ۱.

در معادله‌ی (۴) می‌توان فهمید که اختلاف پتانسیل میدان الکتریکی بیشترین تأثیر را بر میانگین قطر میکروذره‌ها دارد و علامت منفی ضریب  $X_4$  در معادله حاکی از آن است که با افزایش ولتاژ، اندازه‌ی میکروذره‌های کروی تولیدشده کاهش می‌یابد. در حقیقت اختلاف ولتاژ اعمال‌شده بین نازل و ظرف جمع‌آوری در روش الکترواسپری هم‌محور نقش مهمی را در تشکیل جت پاششی پایدار از امولسیون بازی می‌کند. استفاده از جریان الکتریکی سبب می‌شود که سطح خارجی مایع در دهانه‌ی نازل، تحت تأثیر و کنترل میدان الکتریکی ایجادشده، با نیروی مشخصی به سمت پایین کشیده و سرانجام با غلبه این نیرو بر کشش سطحی و پاره شدن سطح مایع، قطره ایجاد شود. حالت پایدار مخروط جت تنها در یک بازه‌ی مشخص از ولتاژ اعمال‌شده تشکیل می‌شود. در یک بازه بهینه از ولتاژ، با افزایش ولتاژ اندازه‌ی قطره‌های تشکیل‌شده کاهش یافته و ذره‌های یکنواخت‌تری تشکیل می‌شود [۱۶]. در سیستم الکترواسپری هم‌محور نیز حالت پایدار مخروط جت

مقدار  $p$  کمتر از  $0.105$  با سطح اطمینان  $95\%$  مؤثر تشخیص داده‌شده و در معادله (۴) باقی ماندند [۱۵]. با توجه به ضریب‌های تعیین‌شده برای عوامل بررسی‌شده در معادله باقی‌مانده مشخص شد که اندازه ذره‌ها بیشترین تأثیر را از نیروی محرکه الکتریکی مورد استفاده در الکترواسپری می‌گیرند به طوری که اندازه ذره‌ها  $63\%$  تحت تأثیر اختلاف پتانسیل الکتریکی،  $15\%$  تحت تأثیر غلظت چیتوسان،  $13\%$  متأثر از سرعت جریان رتینوئیک اسید و سرانجام  $9\%$  تحت تأثیر نسبت چیتوسان به رتینوئیک اسید است. مقدارهای ضریب هم‌بستگی ( $R^2$ ) برابر  $0.9901$ ، ضریب هم‌بستگی تعدیل‌شده ( $adj-R^2$ ) برابر  $0.9831$  و ضریب هم‌بستگی پیش‌بینی ( $pre-R^2$ ) برابر  $0.9589$  برای معادله به‌دست‌آمده معیاری از برازش خوب مدل بر داده‌های آزمایشگاهی هستند به طوری که مقایسه نتیجه‌های تجربی و پیش‌بینی‌شده در شکل ۲ بیانگر درجه‌ی بالایی از توانایی پیش‌بینی اندازه ذره‌های تولیدشده توسط روش پاسخ سطح است. با توجه به مقدار عددی ضریب پارامتر  $X_4$



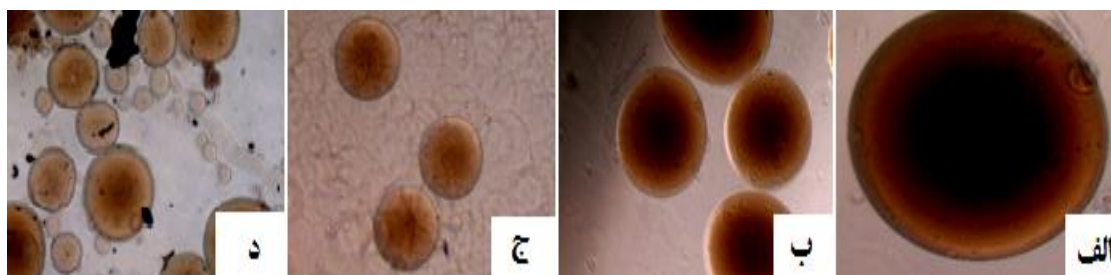
جدول ۳- جدول آنالیز واریانس برای مدل چندجمله‌ای درجه‌ی دوم برازش شده در پژوهش حاضر.

منبع	مجموع مربعات	درجه آزادی	متوسط مربعات	مقدار F	مقدار P
مدل	$1,142 \times 10^{+5}$	۱۲	$9,514 \times 10^{+5}$	۱۴۱,۸۲	$< 0,0001$
$X_1$	$1,025 \times 10^{+5}$	۱	$1,025 \times 10^{+5}$	۱۵,۲۷	۰,۰۰۱۱
$X_2$	۸۲۰۹۶,۲۲	۱	۸۲۰۹۶,۲۲	۱۲,۲۴	۰,۰۰۲۸
$X_3$	۳۶۹۷۱,۱۵	۱	۳۶۹۷۱,۱۵	۵,۵۱	۰,۰۳۱۳
$X_4$	$1,944 \times 10^{+5}$	۱	$1,944 \times 10^{+5}$	۲۸۹,۷۶	$< 0,0001$
$X_1 X_2$	$1,373 \times 10^{+5}$	۱	$1,373 \times 10^{+5}$	۲۰,۴۶	۰,۰۰۰۳
$X_1 X_3$	$1,112 \times 10^{+5}$	۱	$1,112 \times 10^{+5}$	۱۶,۵۷	۰,۰۰۰۸
$X_1 X_4$	۳۰۶۶۲,۶۴	۱	۳۰۶۶۲,۶۴	۴,۵۷	۰,۰۴۷۳
$X_2 X_3$	$3,862 \times 10^{+5}$	۱	$3,862 \times 10^{+5}$	۵۷۵,۶۷	$< 0,0001$
$X_2 X_4$	۴۹۰۵۰,۰۷	۱	۴۹۰۵۰,۰۷	۷,۳۱	۰,۰۱۵۰
$X_3 X_4$	۳۵۹۳۹,۶۳	۱	۳۵۹۳۹,۶۳	۵,۳۶	۰,۰۳۳۴
$X_2^2$	$7,358 \times 10^{+5}$	۱	$7,358 \times 10^{+5}$	۱۰۹,۶۸	$< 0,0001$
$X_4^2$	$6,610 \times 10^{+5}$	۱	$6,610 \times 10^{+5}$	۹۸,۵۴	$< 0,0001$
باقیمانده	$1,140 \times 10^{+5}$	۱۷	۶۷۰۷,۹۷		
عدم تطبیق	$1,034 \times 10^{+5}$	۱۲	۸۶۱۷,۷۲	۴,۰۶	۰,۰۶۶۴
خطای مطلق	۱۰۶۲۲,۸۸	۵	۲۱۲۴,۵۸		
کل	$1,153 \times 10^{+5}$	۲۹			
$R^2$	۰,۹۹۰۱	adj- $R^2$	۰,۹۸۳۱	pre- $R^2$	۰,۹۵۸۹
ضریب دقت	۴۱,۰۹۸	ضریب تغییرهای (%)	۶,۸۶		

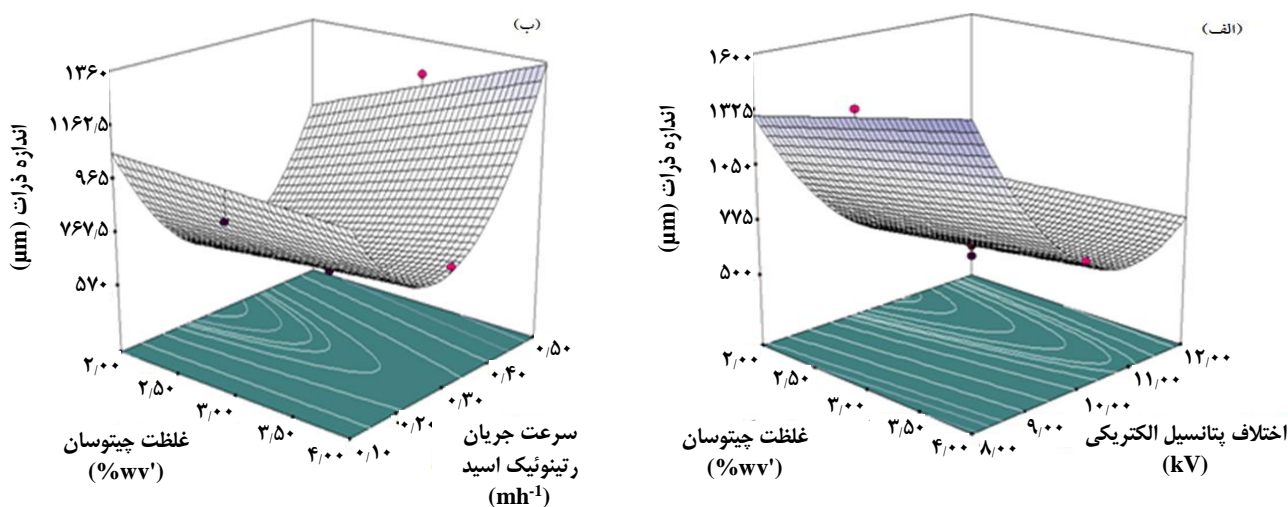
تشکیل شده از یکنواختی برخوردار نبود. در سال ۲۰۰۷ میلادی اکسایشی و همکاران به نتیجه‌ی مشابهی رسیدند که با افزایش ولتاژ از ۸ به ۱۵/۵ kV ریزش امولسیون از نازل از حالت قطره‌ای به حالت مخروطی تغییر می‌یافت و حفظ مخروط تیلور پایدار جت دستیابی پایدار و پیوسته از ذراتی با پراکندگی اندازه یکنواخت، ضروری است [۱۷]. می و همکاران (سال ۲۰۰۸ میلادی) نیز مشاهده کردند که با افزایش ولتاژ اعمال شده چهار مرحله‌ی حالت چکیدن، حالت مخروطی، حالت پایدار مخروطی جت، حالت چند جتی ایجاد می‌شود [۸].

اثر تداخلی غلظت چیتوسان و سرعت رتینوئیک اسید در شکل ۶ الف نمایش داده شده است. همان‌گونه که مشخص است

توسط هر دو محلول داخلی و خارجی نازل تشکیل می‌شود که به‌طور معمول به‌صورت یک‌شکل متقارن است. در اینجا، مخروط تیلور در بازه‌ی تغییرهای ولتاژ ۱۲-۸ kV ایجاد شد اما در ولتاژ ۱۲ kV این مخروط در حین فرایند الکترواسپری پایدار بود. همان‌گونه که در شکل ۵ (الف) نمایش داده شده است، در ولتاژ ۸ kV ریزش قطره‌ای از نازل موجب تشکیل ذره‌های درشت شده است، ولی با افزایش ولتاژ تا ۱۲ kV با حفظ حالت مخروط پایدار تیلور اندازه ذره‌های تشکیل شده کاهش یافت (شکل ۵ ب و ج). در ولتاژ بالاتر همانند ولتاژ ۱۴ kV نیرو محرکه جریان برای خروج از نازل به‌اندازه‌ای افزایش می‌یابد که حالت مخروط تیلور بهم می‌ریزد و یک حالت چند مخروطی دیده شد. در این حالت، میکروذره‌های



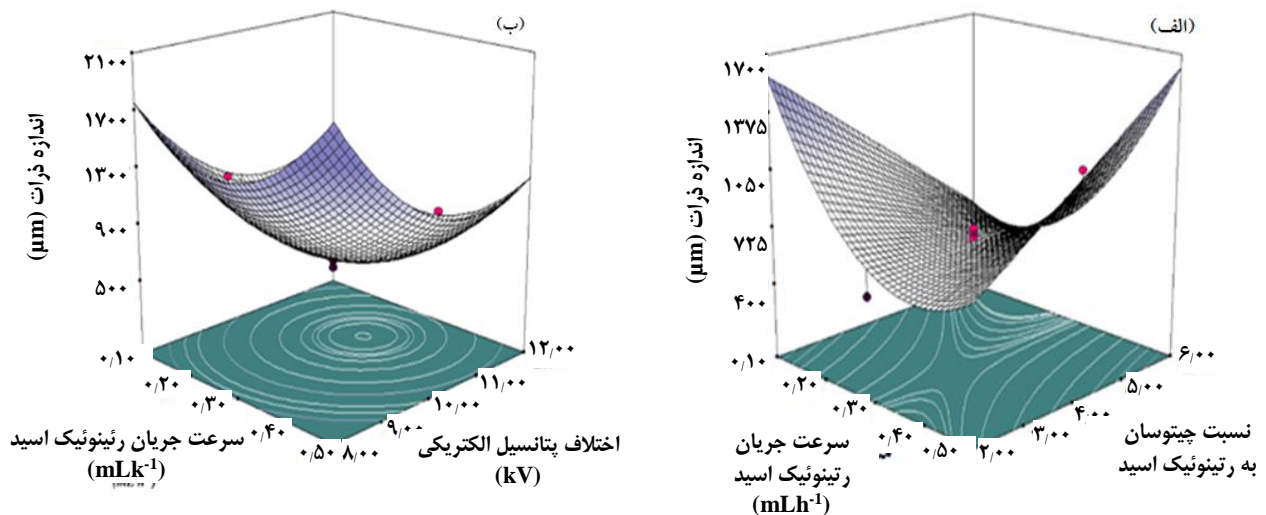
شکل ۵- اثر اختلاف ولتاژ میدان الکتریکی بر اندازه و کیفیت میکروذره‌های تشکیل شده به روش الکترواسپری هم‌محور (الف) ولتاژ ۸ kV، (ب) ولتاژ ۱۰ kV، (ج) ولتاژ ۱۲ kV و (د) ولتاژ ۱۴ kV.



شکل ۶- وابستگی اندازه میکروذره‌های چیتوسان برای انکپسوله سازی رتینوئیک اسید در روش الکترواسپری هم‌محور به صورت تابعی از تغییرهای غلظت چیتوسان و اختلاف پتانسیل الکتریکی هنگامی که شدت جریان دارو و نسبت چیتوسان به رتینوئیک اسید به ترتیب در مقادیرهای ۰/۳ و ۴ ثابت بودند (الف) وابستگی اندازه ذرات تابعی از غلظت چیتوسان و سرعت جریان رتینوئیک اسید هنگامی که اختلاف پتانسیل الکتریکی و نسبت چیتوسان به رتینوئیک اسید به ترتیب در مقادیرهای ۱۰ kV و ۴ ثابت نگه داشته شده بودند (ب).

گزارش شده است [۱۸، ۱۹]. نکته قابل تأمل دیگر آن است که میزان تأثیر افزایش غلظت چیتوسان بر اندازه ذره‌های تشکیل شده وابستگی زیاد به سرعت جریان رتینوئیک اسید داشت به طوری که وقتی سرعت جریان رتینوئیک اسید زیاد شد افزایش غلظت چیتوسان به مراتب اثر بیش تری بر اندازه ذره‌ها گذاشت. این مطلب نشان از اثر تداخلی این دو عامل بر اندازه ذره‌های تشکیل شده دارد. شکل ۶ (ب) اثر تداخلی غلظت چیتوسان و ولتاژ را نشان می‌دهد. در غلظت‌های پایین چیتوسان و ولتاژهای بالا، قطر میکروذره‌های کروی تشکیل شده کم‌تر است. به طوری که با افزایش ولتاژ و رسیدن به نقطه‌ی پایدار جت، مخروط تیلور به قطره‌هایی با بار زیاد شکسته می‌شود

با افزایش غلظت چیتوسان و شدت جریان رتینوئیک اسید، قطر میکروذره‌های کروی افزایش یافته است. غلظت چیتوسان بر ویسکوزیته محلول تأثیرگذار است، هرچه ویسکوزیته محلول بیشتر باشد، غلبه‌ی میدان الکتریکی برای جریان دادن سیال از درون جت کاهش می‌یابد و ذره‌های با قطره‌های بزرگ‌تر پاشیده می‌شوند. از سوی دیگر شدت جریان در سوزن داخلی نقش مهمی در ثبات مخروط جت و به تبع اندازه‌ی قطره‌ها پاشیده شده دارد، به طوری که با افزایش شدت جریان رتینوئیک اسید غلبه‌ی میدان برای رانش محلول کم شده و اندازه‌ی ذره‌ها افزایش می‌یابد. اثر افزایش غلظت بر روی افزایش اندازه‌ی میکروذره‌های کروی در کارهای پیشین



شکل ۷ - وابستگی اندازه میکروذرات چیتوسان برای انکپسوله سازی رتینوئیک اسید در روش الکترواسپری هم‌محور به صورت تابعی از تغییر سرعت جریان دارو و نسبت چیتوسان به رتینوئیک اسید هنگامی که غلظت چیتوسان و اختلاف پتانسیل الکتریکی به ترتیب در مقدارهای  $10 \text{ kV}$  و  $3\% \text{ w/v}$  ثابت بودند (الف). اندازه ذره‌ها به صورت تابعی از سرعت جریان دارو و اختلاف پتانسیل الکتریکی هنگامی که غلظت چیتوسان و نسبت چیتوسان به رتینوئیک اسید به ترتیب در مقادیر  $3\% \text{ w/v}$  و  $4\%$  ثابت بودند (ب).

در این مورد رسیدند که در یک شدت جریان ثابت از سوزن داخلی، افزایش شدت جریان در سوزن بیرونی باعث افزایش قطر میکروذرات کروی می‌شود [۱۴]. اثر تداخلی دیگر مؤثر در این روش انکپسوله سازی، اثر برهم‌کنشی دو عامل سرعت جریان رتینوئیک اسید و ولتاژ بود که در شکل ۷ ب نشان داده شده است. رفتار غیرخطی هردوی این عوامل موجب شده است تا شکل اثر برهم‌کنشی این عوامل به صورت ناوریسی باشد به این معنی که برای دستیابی به کوچک‌ترین اندازه ذرات حد میانی این عوامل دلخواه است.

سرانجام اثر تغییر همزمان دو عامل نسبت چیتوسان به رتینوئیک اسید و ولتاژ اعمال شده در شکل ۸ نشان از اثر غالب ولتاژ به عنوان عامل مؤثر در این فرایند بر روی اندازه ذرات تشکیل شده دارد. توجه کنید که اثر عامل نسبت چیتوسان به رتینوئیک اسید نیز همانند غلظت رتینوئیک اسید دارای رفتار خطی است و این نشان از این مطلب دارد که تغییرات گرانیوی سیالات هنگام عبور از جت الکترواسپری هم‌محور در بازه مورد مطالعه دارای اثری خطی بر روی اندازه ذرات تشکیل شده داشته است.

#### بهینه‌یابی شرایط تشکیل میکروذره‌ها

بر اساس نتیجه‌های تجربی به دست آمده و استفاده از معادله برازش شده در روش پاسخ سطح، این امکان وجود دارد که

و سرانجام قطره‌هایی با اندازه‌ی میکرو به دست می‌آید. در سال ۲۰۰۹ میلادی عنایتی و همکاران در طی آزمایش به نتیجه‌ی همانند رسیدند که با افزایش ولتاژ، میانگین قطر میکروذره‌ها کاهش می‌یابد و در نقطه‌ی جت ذراتی با اندازه‌ی کم و پراکندگی اندازه‌ی مناسب تشکیل می‌شود [۱۰]. نکته چشمگیر دیگر اثر خطی غلظت چیتوسان بر اندازه ذره‌های تشکیل شده است که در شکل ۶ ب به روشنی دیده می‌شود. با مراجعه به معادله (۴) دیده می‌شود که در مدل برازش شده اثر غیرخطی این پارامتر حذف شده است و از این رو رفتار خطی اثر غلظت چیتوسان بر اندازه ذرات توسط معادله (۴) پیش‌بینی شده است. اما در مقابل وجود ضریب  $X_2^2$  با مقدار  $438707$  در معادله (۴) توصیف‌کننده رفتار غیرخطی دیده شده در شکل (۶ ب) به هنگام تغییر ولتاژ میدان الکتریکی بر اندازه ذرات تشکیل شده است.

شکل ۷ الف اثر تداخلی شدت جریان رتینوئیک اسید و نسبت چیتوسان به رتینوئیک اسید را بر روی اندازه ذرات تشکیل شده نشان می‌دهد. در شدت جریان‌های پایین، قطر میکروذرات کم‌تر است و افزایش دبی چیتوسان باعث افزایش اندازه‌ی میکروذرات می‌شود. مراجعه به معادله (۴) این نکته را آشکار می‌سازد که برهم‌کنش بین این دو پارامتر قوی‌ترین اثر تداخلی مؤثر موجود در روش الکترواسپری هم‌محور مطالعه شده بوده است. در سال ۲۰۱۰ میلادی، پارک و همکاران به نتیجه‌ی همانندی

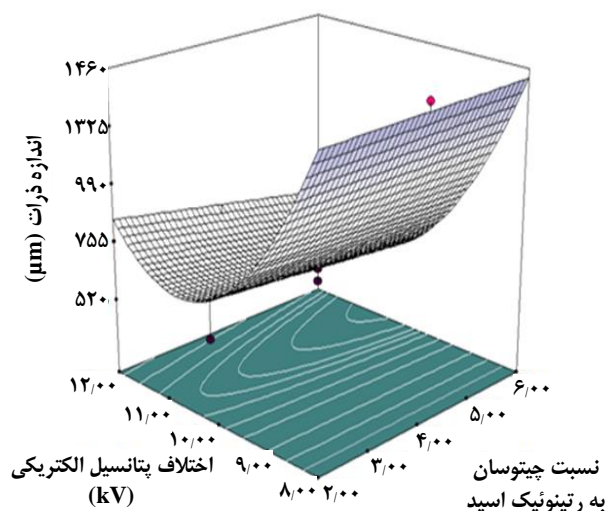
جدول ۴- معیارهای بهینه‌سازی فرایند و مقایسه شرایط بهینه پیش‌بینی شده و نتیجه تجربی.

نام پارامتر	هدف	حد پایین	حد بالا	وزن پایین	وزن بالا	اهمیت
غلظت چیتوسان (% w/v)	در محدوده	۳	۴	۱	۱	۳
سرعت جریان رتینوئیک اسید (mL/h)	در محدوده	۰/۱	۰/۵	۱	۱	۳
نسبت چیتوسان به رتینوئیک اسید	در محدوده	۲	۶	۱	۱	۳
نیرو محرکه الکتریکی (kV)	در محدوده	۸	۱۲	۱	۱	۳
میانگین قطر ذرات ( $\mu\text{m}$ )	کمینه باشد	۳۰۰	۱۰۰۰	۱	۱	۴

مطلوبیت	غلظت چیتوسان (% w/v)	سرعت جریان رتینوئیک اسید (mL/h)	نسبت چیتوسان به رتینوئیک اسید (-)	نیرو محرکه الکتریکی (kV)	قطر میکروذرات ( $\mu\text{m}$ )
پیش‌بینی شده	۳	۰/۱۸	۶	۱۰/۸	۳۷۱/۶
تجربی	۳	۰/۱	۶	۱۰/۷	۴۰۵/۶

دستیابی به پاسخ مناسب در بازه‌ی تعیین شده وجود ندارد. معیارهای مورد استفاده برای بهینه‌سازی شرایط تشکیل میکروذرات چیتوسان به روش الکترواسپری هم‌محور در جدول ۴ آورده شده است. معیار بهینه‌سازی، در نظر گرفتن بازه آزمایش شده برای هر یک از پارامترهای مستقل و تشکیل میکروذرات با کم‌ترین اندازه در بازه  $300-1000 \mu\text{m}$  بود. این نتیجه‌ها نشان داد که برای دستیابی به قطر متوسط میکروذرات در حدود  $370 \mu\text{m}$ ، نیاز است تا متغیرهای این فرایند در شرایط زیر قرار داشته باشند: غلظت رتینوئیک اسید ۳% w/v، سرعت جریان رتینوئیک اسید  $1/8 \text{ mL/h}$ ، نسبت رتینوئیک اسید به چیتوسان ۶ و اختلاف پتانسیل الکتریکی  $10/8 \text{ kV}$ . این شرایط بهینه، به‌طور تجربی مورد بررسی قرار گرفت و نتیجه‌های ارایه شده در جدول ۴ نشان می‌دهد که متوسط اندازه ذرات به‌طور تجربی  $405/6 \mu\text{m}$  بوده است. بنابراین مطالعه آماری حاضر از توان بالایی برای پیش‌بینی رفتار این فرایند برخوردار بوده است.



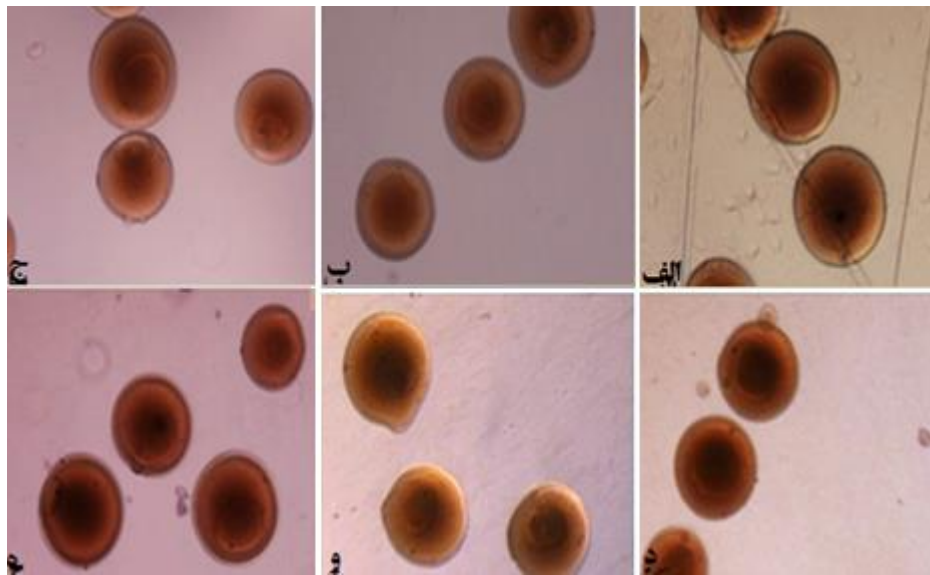
شکل ۸ - اندازه ذره‌های چیتوسان تشکیل شده به صورت تابعی از اثر تداخلی اثر تداخلی اختلاف پتانسیل الکتریکی و نسبت چیتوسان به رتینوئیک اسید هنگامی که غلظت چیتوسان و شدت جریان رتینوئیک اسید به ترتیب در مقادیر  $3 \text{ \% w/v}$  و  $0/3 \text{ mL/h}$  ثابت نگه داشته شدند.

#### میزان بارگذاری، پایداری و رهایش دارو از میکروذرات

برای انجام سنجش پایداری، نمونه‌ی بهینه با غلظت چیتوسان  $3 \text{ \% w/v}$  با سرعت جریان رتینوئیک اسید  $0/1 \text{ mL/h}$ ، نرخ جریان چیتوسان  $0/6 \text{ mL/h}$  و اختلاف ولتاژ  $10 \text{ kV}$  تهیه شد و بعد از شستشوی در محیط کشت DMEM دارای سدیم آزید و

شرایط بهینه برای تولید میکروذرات کروی تعیین شود. در نرم‌افزار تخصصی *Design expert* امکان انجام بهینه‌سازی عددی با استفاده از تابع مطلوبیت<sup>(۱)</sup> فراهم است. تابع مطلوبیت می‌تواند مقداری از صفر تا یک داشته باشد. مقدار یک نشان‌دهنده‌ی یک حالت ایده‌آل است و مقدار صفر نشان‌گر این است که

(1) Desirability



شکل ۹- تصویر میکروسکوپی ذره‌های کروی در سنجش پایداری. الف) پس از تولید، ب) بعد از ۲ روز، ج) بعد از ۴ روز، د) بعد از ۶ روز، ه) بعد از ۸ روز، و) بعد از ۱۰ روز.

می‌تواند شاهدهی از کاهش کلیرانس دارو در جریان خون باشد. پیش از این بارگذاری دارو آب‌گریز پایترین<sup>(۳)</sup> در ساختار چیتوسان اصلاح شده با پاراکوماریک اسید<sup>(۴)</sup> به میزان ۸۰٪ گزارش شده بود [۲۲]. همچنین به تازگی بارگذاری ترکیبات پلی فنولی توت‌فرنگی در نانو ذره‌های چیتوسان با بازده ۲۱٫۱۸٪ گزارش شده است [۲۳].

### نتیجه‌گیری

بر اساس نتیجه‌های پژوهش حاضر، روش الکترواسپری هم‌محور از پتانسیل بالایی برای بارگذاری داروی رتینوئیک اسید در میکروذرات کروی چیتوسان برخوردار است به طوری که تغییر شرایط عملیاتی تأثیر بسزایی بر روی اندازه ذره‌ها و یکنواختی آن‌ها دارد. آنالیز واریانس نتیجه‌های تجربی نشان داد که اختلاف پتانسیل الکتریکی بیش‌ترین تأثیر را بر روی اندازه ذرات تشکیل‌شده خواهد داشت و پس‌از آن غلظت چیتوسان و سرعت جریان رتینوئیک اسید و سپس نسبت چیتوسان به رتینوئیک اسید موثر هستند. همچنین برهم‌کنش عوامل یادشده در اندازه ذرات تشکیل‌شده مؤثر است. معادله‌ی به دست آمده برای میانگین قطر میکروذرات تولیدشده به صورت تابع درجه دوم پیش‌بینی شد.

در پوشش آلومینیومی به‌منظور جلوگیری از اکسایش دارو در برابر نور قرار گرفت. شکل ۹ الف) عکس میکروسکوپی نمونه میکروذره‌ها در هنگام تولید است. درحالی‌که شکل‌های ۹ ب) ج) د) ه) و) این ذرات را در روز دوم، چهارم، ششم، هشتم و دهم پس از قرار گرفتن در محیط کشت نشان می‌دهد. این شکل‌ها نشان‌گر آن است که میکروذرات تولیدشده باگذشت زمان دچار تغییر شکل و واپاشی نشده‌اند به طوری که بعد از ۱۰ روز هیچ‌گونه تغییر شکل غیردلخواهی در نمونه دیده نشد. همچنین نتیجه‌های آزمایش میزان بارگذاری دارو نشان داد که ۱۵٪ از رتینوئیک اولیه با ساختار هسته - پوسته‌ای در میکروذرات چیتوسان بارگذاری شده است. پیش از این بارگذاری داروی آب‌گریز سیپروفلوکساسین<sup>(۱)</sup> در ساختار نشاسته/ آلژینات به میزان ۹٫۸٪ گزارش شده است [۲۰]. نتیجه رهایش دارو نیز نشان داد که حدود ۶۸٪ از رتینوئیک اسید طی سه روز از ساختار چیتوسان در شرایط آزمایشی *In-vitro* رهاسازی می‌شود. طبیعت آب‌گریز و بلوری شدن دارو در هسته‌ی میکروذرات شاید موجب رهایش کند و طولانی‌مدت دارو در پژوهش حاضر شده است [۲۱]. رهایش کند دارو یک برتری برای مطالعات درون‌تنی به حساب می‌آید و همچنین رهایش کند دارو،

(۱) Ciprofloxacin

(۲) Piperine

(۳) *p*-coumaric acid



برای مدت ۱۰ روز و رهایش آهسته دارو از ساختار میکروذرات پتانسیل استفاده‌ی این میکروذرات کروی را در آزمایش‌های درون تنی تأیید می‌کند.

شرایط بهینه به دست آمده بر اساس این مدل درجه دوم نشان داد که در غلظت چیتوسان ۳٪ w/v، سرعت جریان رتینوئیک اسید ۰/۱ L/h، نسبت چیتوسان به رتینوئیک اسید ۶ و ولتاژ ۱۰/۷ kV میکروذرات کروی یکنواختی با اندازه ۴۰۵/۶ μm تولید شد. پایداری میکروذره‌های کروی تولیدشده در محیط شبیه‌سازی شده

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۱۲/۱۶؛ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۵/۱۱

## مراجع

- [۱] امید، مرضیه؛ شجاع الساداتی، سید عباس؛ مرسلی، علی؛ بررسی بارگذاری و رهایش کنترل شده یک داروی ضد آریتمی قلبی در یک چارچوب فلز آلی، نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران. (۲) ۳۳: ۲۱ تا ۲۵ (۱۳۹۳).
- [2] Strebhardt K., Ullrich A., Paul Ehrlich's Magic Bullet Concept : 100 Years of Progress. *Nat. Rev. Cancer*, **8**: 473–480 (2008)
- [۳] سروشنیا، آرزو؛ گنجی، فریبا؛ تقیزاده، سید مجتبی، تأثیر متغیرهای فرمول‌بندی بر عبورپوستی میکرو امولسیون دسموپرسین استات. نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران، (۲) ۳۳: ۲۷ تا ۳۲ (۱۳۹۳).
- [4] Weigl B., Domingo G., LaBarre P., Gerlach J., Towards Non- and Minimally Instrumented, Microfluidics-based Diagnostic Device, *Lab. Chip.*, **8**(12): 1999-2014 (2008)
- [5] Roosta S., Hashemianzadeh S.M., Ketabi S., Encapsulation of Cisplatin as an Anti-Cancer Drug into Boron-nitride and Carbon Nanotubes: Molecular Simulation and Free Energy Calculation, *Mater. Sci. Eng., C* **67**: 98-103 (2016)
- [6] Zamani M., Prabhakaran M. Ramakrishna P.S., Advances in Drug Delivery via Electrospun and Electrospayed Nanomaterials, *Int. J. Nanomedicine*, **8**: 2997–3017 (2013)
- [7] Loscertales I.G., Barrero A., Guerrero I., Cortijo R., Marquez M., Ganan-Calvo A.M., Micro/Nano Encapsulation via Electrified Coaxial Liquid Jets, *Science*, **295**(5560): 1695-1698 (2002)
- [8] Mei F., Chen D.R., Operational Modes of Dual-capillary Electro spraying and the Formation of the Stable Compound Cone-jet Mod, *Aerosol Air Qual. Res.*, **8**(2): 218–232 (2008)
- [9] Chang M.W., Stride E., Edirisinghe M., A New Method for the Preparation of Monoporous Hollow Microspheres, *Langmuir*, **26**(7): 5115–5121 (2010).
- [10] Enayati M., Ahmad Z., Stride E., Edirisinghe M., One-step Electrohydrodynamic Production of Drug-loaded Micro-and Nanoparticles, *J. R. Soc. Interface*, **7**: 667–675 (2010)
- [11] Lee Y.H., Mei F., Bai M.Y., Zhao S., Chen D.R., Release Profile Characteristics of Biodegradable-polymer-coated Drug Particles Fabricated by Dual-capillary Electro spray, *J. Control. Release*, **145**: 58–65 (2010)
- [12] Enayati M., Farook U., Edirisinghe M., Stride E., Electrohydrodynamic Preparation of Polymeric Drug-carrier Particles: Mapping of the Process, *Int. J. Pharm.*, **404**: 110–115 (2011).

- [13] Si T., Zhang L., Li G., Roberts C.J., Yin X., Xu R., [Experimental Design and Instability Analysis of Coaxial Electrospray Process for Microencapsulation of Drugs and Imaging Agents](#), *J. Biomed. Opt.*, **18**: 075003 (2013)
- [14] Park S., Hwang S., Lee J., [pH-responsive Hydrogels from Moldable Composite Microparticles Prepared by Coaxial Electro-spray Drying](#), *Chem. Eng. J.*, **169**: 348–357 (2011).
- [15] Varmira K., Habibi A., Moradi S. Bahramian E., [Statistical Optimization of Airlift Photobioreactor for High Concentration Production of Torularhodin Pigment](#), *Biocatal. Agric. Biotechnol.*, **8** 197–203 (2016).
- [16] Zhang, L. Huang J., Si T., Xu R.X., [Coaxial Electrospray of Microparticles and Nanoparticles for Biomedical Applications](#), *Expert Rev. Med. Devices*, **9**(6): 595-612 (2012)
- [17] Xie J., Ng W J., Lee L.Y., Wang C.H., [Encapsulation of Protein Drugs in Biodegradable Microparticles by Co-axial Encapsulation and Release Studies of Strawberry Polyphenols in Biodegradable Chitosan Nanoformulation Electrospray](#), *J. Colloid Interface Sci.*, **317**: 469-476 (2008)
- [18] Park I., Kim W., Kim S.S., [Multi-jet Mode Electrospray for Non-conducting Fluids Using Two Fluids and a Coaxial Grooved Nozzle](#), *Aerosol Sci. Technol.*, **45**: 629-634 (2011)
- [19] Xu Y., Hanna M.A., [Morphological and Structural Properties of Two-phase Coaxial Jet Electrospayed BSA-PLA Capsules](#), *J. Microencapsul.*, **25**: 469-477 (2008)
- [20] Christe Sonia Mary M., Sasikumar, S., [Sodium Alginate/Starch Blends Loaded with Ciprofloxacin Hydrochloride as a Floating Drug Delivery System - In Vitro Evaluation](#), *Iran J. Chem. Chem. Eng. (IJCCE)*, **34**(2): 25-31 (2015)
- [21] Kim D.G., Choi C., Jeong Y-I., Jang M.K., Nah J.W., Kang S.K., Bang M.S., [All-trans Retinoic Acid-associated Low Molecular Weight Water-soluble Chitosan Nanoparticles Based on Ion Complex](#), *Macromol. Res.*, **14**: 66-72 (2006)
- [22] Pengpong T., Sangvanich P., Sirilertmukul K., Muangsin N., [Design, Synthesis and in vitro Evaluation of Mucoadhesive p-coumarate-thiolated-chitosan as a Hydrophobic Drug Carriers](#), *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, **86**(3): 487–497 (2014)
- [23] Pulicharla R., Marques C., Das R.K., Rouissi K., Brar S.K., [Encapsulation and Release Studies of Strawberry Polyphenols in Biodegradable Chitosan Nanoformulation](#), *Int. J. Biol. Macromol.*, **88**: 171-178 (2016)