

Analytical and Experimental Investigation of Liposome Synthesis as Drug Nanocarriers via Microfluidic Method

Parniyan Javadi¹, Mohammad Passandideh-Fard^{1*}, Seyed Ali Mousavi Shaegh^{2,3}

¹ Mechanical Engineering Department, Ferdowsi University, Mashhad, Iran

² Laboratory of Microfluidics and Medical Microsystems, Basic Sciences Research Institute, University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

³ Clinical Research Unit, Ghaem Hospital, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran

ARTICLE INFO

Article Type

Original Research

Article History

Received: May 25, 2025

Revised: July 03, 2025

Accepted: July 13, 2025

ePublished: August 01, 2025

ABSTRACT

Liposomes, as a class of biological nanocarriers, play a key role in modern drug delivery, particularly in cancer therapy. However, controlling their polydispersity index (PDI), a critical parameter influencing liposome performance, remains a challenge. In this study, an analytical model was developed to predict the PDI of liposomes, offering a cost-effective and time-saving alternative to conventional experimental methods such as dynamic light scattering (DLS). The proposed model is grounded in the Gibbs free energy framework, incorporating the bending energy of phospholipid bilayers, the free edge energy, and entropic effects arising from the configurations and dispersion of phospholipid molecules in aqueous solution. Consequently, this analytical framework provides higher accuracy in calculating PDI compared to previous models that neglected entropic contributions. To validate the formulated model, a micromixer was designed and fabricated for liposome production. The synthesized liposomes were characterized using a Zetasizer and DLS technique. The model predicted PDI values of 0.182 and 0.205 for total lipid concentrations of 10 and 20 mol/m³, respectively, with relative errors of 8.91% and 10.52% compared to experimental data. Given the molecular complexities governing liposome formation and the limitations of analytically modeling all associated phenomena, these results are considered satisfactory. Overall, the presented model serves as an effective tool for predicting liposome PDI in drug delivery applications.

Keywords: Liposome, Analytical Model, Polydispersity Index (PDI), Micromixer, Microfluidic Systems

How to cite this article

Javadi P., Passandideh-Fard M., Mousavi Shaegh S.A., Analytical and Experimental Investigation of Liposome Synthesis as Drug Nanocarriers via Microfluidic Method. *Modares Mechanical Engineering*; 2025;25(04):227-240.

*Corresponding author's email: mpfard@um.ac.ir

*Corresponding ORCID ID: 0000-0002-4225-125X



Copyright© 2025, TMU Press. This open-access article is published under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License which permits Share (copy and redistribute the material in any medium or format) and Adapt (remix, transform, and build upon the material) under the Attribution-NonCommercial terms.



بررسی تحلیلی و تجربی تولید لیپوزوم‌ها به عنوان نانوحامل‌های دارویی به روش میکروفلوئیدیک

پرینان جوادی^۱، محمد پسندیده فرد^{۱*}، سید علی موسوی شایق^{۲،۳}

^۱ گروه مهندسی مکانیک، دانشگاه فردوسی، مشهد، ایران

^۲ آزمایشگاه میکروفلوئیدیک و میکروسیستم‌های پزشکی، پژوهشکده علوم پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی، مشهد، ایران

^۳ واحد توسعه تحقیقات بالینی، بیمارستان قائم، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ایران

چکیده

اطلاعات مقاله

نوع مقاله

مقاله پژوهشی

تاریخچه مقاله

دریافت: ۱۴۰۴/۰۳/۰۴

بازنگری: ۱۴۰۴/۰۴/۱۲

پذیرش: ۱۴۰۴/۰۴/۲۲

ارائه آنلاین: ۱۴۰۴/۰۵/۱۰

لیپوزوم‌ها به عنوان یکی از انواع نانوحامل‌های زیستی، نقش مهمی در دارورسانی نوین، به ویژه در درمان سرطان‌ها ایفا می‌کنند. با این حال، کنترل ضریب یکنواختی آن‌ها، به عنوان یکی از پارامترهای کلیدی در عملکرد لیپوزوم‌ها، همچنان چالشی بزرگ به شمار می‌رود. در این پژوهش، یک مدل تحلیلی برای پیش‌بینی ضریب یکنواختی لیپوزوم‌ها توسعه داده شده است. این مدل می‌تواند جایگزینی برای روش‌های آزمایشگاهی پرهزینه و زمان‌بر مانند روش پراکندگی نور دینامیکی باشد. مدل تحلیلی پیشنهادی بر پایه‌ی رابطه‌ی انرژی آزاد گیبس طراحی شده و شامل انرژی خمشی صفحات فسفولیپیدی، انرژی لبه‌های آزاد این صفحات و همچنین اثرات آنتروپی ناشی از آرایش و پخش مولکول‌های فسفولیپید در محلول است؛ بنابراین مدل پیشنهادی در این پژوهش، نسبت به مدل‌های پیشین که این اثرات آنتروپی را در نظر نگرفته‌اند، دقت بالاتری در محاسبه‌ی ضریب یکنواختی ارائه می‌دهد. برای اعتبارسنجی مدل، یک تراشه‌ی میکرومیکسری جهت تولید لیپوزوم‌ها طراحی و ساخته شد. لیپوزوم‌های تولیدشده با استفاده از دستگاه زتاسایزر و روش پراکندگی نور دینامیکی مورد تحلیل قرار گرفتند. مدل پیشنهادی مقادیر ضرایب یکنواختی ۰/۱۸۲ و ۰/۲۰۵ را برای غلظت‌های لیپیدی کل ۱۰ و ۲۰ مول بر مترمکعب پیش‌بینی کرد که به ترتیب با خطاهای نسبی ۸/۹۱٪ و ۱۰/۵۲٪ با داده‌های تجربی مطابقت دارند. با توجه به پیچیدگی‌های مولکولی حاکم بر فرایند تشکیل لیپوزوم‌ها و عدم امکان مدل‌سازی تحلیلی تمامی این پدیده‌ها، نتایج به دست آمده قابل قبول ارزیابی می‌شوند. در مجموع، مدل ارائه شده می‌تواند به عنوان ابزاری کارآمد برای پیش‌بینی ضرایب یکنواختی لیپوزوم‌ها در کاربردهای دارورسانی مورد استفاده قرار گیرد.

کلیدواژه‌ها: لیپوزوم، مدل تحلیلی، ضریب یکنواختی، تراشه میکرومیکسری، سامانه‌های میکروفلوئیدیک

نحوه ارجاع به این مقاله

جوادی پرینان، پسندیده فرد محمد، موسوی شایق سید علی، بررسی تحلیلی و تجربی تولید لیپوزوم‌ها به عنوان نانوحامل‌های دارویی به روش میکروفلوئیدیک، مهندسی مکانیک مدرس. ۲۴۰-۲۲۷(۰۴):۲۵(۰۴). ۱۴۰۴

*پست الکترونیکی نویسنده عهده‌دار مکاتبات: mpfard@um.ac.ir

*شناسه اراکید نویسنده عهده‌دار مکاتبات: ۱۲۵X-۴۲۲۵-۰۰۰۰-۰۰۰۰



۱- مقدمه

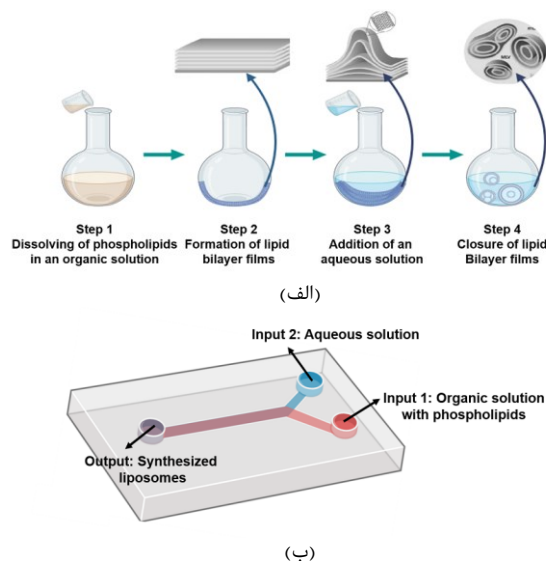
در سال‌های اخیر، با پیشرفت چشمگیر پژوهش‌ها در حوزه بیومکانیک و سامانه‌های میکروفلوئیدیک، علم مهندسی مکانیک به ابزاری قدرتمند در توسعه فناوری‌های میان‌رشته‌ای، به‌ویژه فناوری‌های مرتبط با شیوه‌های دارورسانی نوین، تبدیل شده است. به همین دلیل مهندسان مکانیک با بهره‌گیری از اصول مکانیک سیالات، ترمودینامیک و انتقال جرم، نقش مهمی در طراحی و توسعه‌ی روش‌های نوین دارورسانی ایفا می‌کنند [1]. دارورسانی را می‌توان بر اساس ابزارها، فرمولاسیون‌ها و روش‌ها به دو دسته سنتی و نوین تقسیم‌بندی کرد. روش‌های سنتی دارورسانی، علیرغم کاربرد گسترده، با چالش‌هایی نظیر حلالیت پایین مولکول‌های دارویی، سازگاری ضعیف با سلول‌ها و بافت‌های زیستی، عوارض جانبی جدی و اثربخشی پایین مواجه هستند [2]. این محدودیت‌ها، ضرورت استفاده از فناوری میکروفلوئیدیک را در حوزه دارورسانی نوین بیش از پیش آشکار کرده است.

ارائه‌ی فرمولاسیون‌های دارویی جدید بر مبنای تلفیق داروها با نانوحامل‌ها که از ابتکارات دارورسانی نوین هستند؛ آغازگر تحولی چشمگیر در این حوزه بوده است. نانوحامل‌ها امکان دارورسانی هدفمند، رهاسازی کنترل‌شده، کاهش دوزهای مصرفی و عوارض جانبی مولکول‌های دارویی را فراهم می‌کنند و با بهبود حلالیت و حفظ خواص شیمیایی و بیولوژیکی آن‌ها، عملکرد درمانی را ارتقا می‌دهند [3,4]. در میان انواع مختلف نانوحامل‌های دارویی، لیپوزوم‌ها به دلیل ساختار منحصر به فرد و سازگاری زیستی بالا، توجه بسیاری از پژوهشگران را به خود جلب کرده‌اند. لیپوزوم‌ها، برای نخستین بار در سال ۱۹۶۵ توسط بانگهام و همکاران [5] معرفی شدند. نخستین محصول دارویی لیپوزومی با نام تجاری دوکسیل در سال ۱۹۹۵ توسط سازمان غذا و داروی ایالات متحده مجوز دریافت کرد و برای درمان برخی انواع سرطان مورد استفاده قرار گرفت [6].

اندازه و ضریب یکنواختی (Polydispersity Index) لیپوزوم‌ها از مهم‌ترین مشخصه‌هایی هستند که به‌طور مستقیم بر عملکرد و کارایی آن‌ها به‌عنوان حامل‌های دارویی تأثیر می‌گذارد. برای مثال، لیپوزوم‌هایی با ابعاد بزرگ‌تر از ۱۵۰ نانومتر عمدتاً توسط اندام‌هایی مانند ریه، کبد و طحال به‌عنوان عوامل خارجی شناسایی و از بدن حذف می‌شوند، درحالی‌که لیپوزوم‌های کوچک‌تر از ۵ نانومتر بیشتر از طریق کلیه‌ها دفع می‌گردند [7,8]. همچنین، لیپوزوم‌هایی با ضریب یکنواختی بیشتر از ۰/۳ معمولاً برای کاربردهای دارورسانی مناسب نیستند [9]، زیرا ضریب یکنواختی بزرگ‌تر از این مقدار، نشان‌دهنده‌ی توزیع ناهمگن اندازه لیپوزوم‌هاست. این ناهمگنی می‌تواند پایداری، درصد کپسوله‌سازی داروها و نرخ انتقال آن‌ها از لیپوزوم‌ها به غشاهای سلولی را تحت تأثیر قرار دهد [10]. بنابراین، بدون اطلاعات دقیق درباره‌ی اندازه و ضریب

یکنواختی، استفاده هدفمند از لیپوزوم‌ها به‌عنوان نانوحامل‌های دارویی ممکن نخواهد بود.

روش‌های متعددی برای تولید لیپوزوم‌ها وجود دارد که به‌طور کلی به دو دسته سنتی و میکروفلوئیدیک تقسیم می‌شوند [11,12]. روش‌های سنتی، برخلاف روش‌های میکروفلوئیدیک، فرآیندهایی چندمرحله‌ای هستند. یکی از قدیمی‌ترین روش‌های سنتی تولید لیپوزوم‌ها، روش بانگهام است [13] که با انجام چهار مرحله، مطابق شکل ۱-الف، به تولید لیپوزوم‌ها می‌انجامد. انجام این چهار مرحله زمان‌بر و با هدررفت حجم قابل‌توجهی از مواد اولیه همراه است. علاوه بر این، در روش‌های سنتی، امکان کنترل اندازه و ضریب یکنواختی لیپوزوم‌ها وجود ندارد. این محدودیت سبب می‌شود که برای دستیابی به ابعاد مطلوب، فرایندهای پساپردازشی روی محصول لیپوزومی تولیدشده، انجام شوند. از جمله این فرآیندها می‌توان به اکستروژن از طریق منافذ غشاهای پلی‌کربنات، تیمار فراصوتی و چرخه‌های ذوب و انجماد اشاره کرد [14]. این فرآیندها نه‌تنها هزینه‌ی تجهیزات را افزایش می‌دهند، بلکه ممکن است به ساختار لیپوزوم‌ها یا محتوای دارویی آن‌ها آسیب برسانند.



شکل ۱ روش‌های تولید لیپوزوم‌ها (الف) تولید لیپوزوم‌ها به روش سنتی، (ب) تولید لیپوزوم‌ها به روش میکروفلوئیدیک

Fig. 1 Methods of liposome synthesis

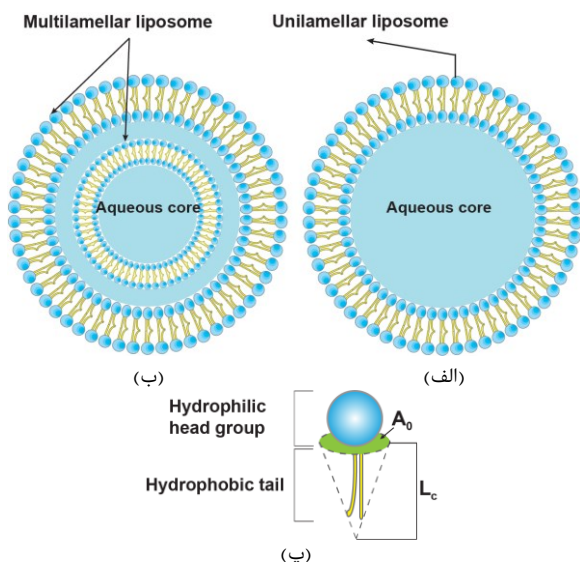
به دلیل این معایب، روش‌های میکروفلوئیدیک برای تولید نانوذرات لیپوزومی توسعه‌یافته‌اند. این روش‌ها تک‌مرحله‌ای، سریع، کم‌هزینه و قادر به کنترل اندازه و ضریب یکنواختی لیپوزوم‌ها هستند و با تنظیم پارامترهایی مانند غلظت مولکول‌های فسفولیپید در حلال آلی، نسبت دبی‌های حجمی محلول آبی به آلی و دبی حجمی کل، امکان کنترل مشخصات ابعادی لیپوزوم‌ها را فراهم می‌کنند [15]. در نتیجه، لیپوزوم‌های تولیدشده دیگر نیازی به فرایندهای پساپردازشی برای بهبود مشخصات ابعادی ندارند. نمونه‌ای از نحوه‌ی تولید لیپوزوم‌ها به

لیپوزوم‌ها طراحی و ساخته شده است. با تولید لیپوزوم‌ها به صورت تجربی، منحنی‌های توزیع اندازه و ضریب یکنواختی آن‌ها بر اساس روش پراکندگی نور دینامیکی و به کمک دستگاه زتاسایزر به دست می‌آیند و سپس دقت مدل تحلیلی بر اساس این داده‌های تجربی ارزیابی می‌شود.

۲- چگونگی تولید لیپوزوم‌ها به عنوان نانوحامل‌های دارویی

لیپوزوم‌ها به عنوان یکی از مهم‌ترین انواع نانوحامل‌های دارویی، ذراتی کروی شکل با یک هسته‌ی آبی و یک یا چندین لایه‌ی متشکل از مولکول‌های فسفولیپید هستند (شکل‌های ۲-الف و ۲-ب). مولکول‌های فسفولیپید همان‌طور که در شکل ۲-پ نشان داده شده است مولکول‌هایی با دو بخش قطبی و غیرقطبی هستند که به ترتیب سر آب‌دوست و دنباله آب‌گریز نیز نامیده می‌شوند. همین ویژگی خاص مولکول‌های فسفولیپید در نهایت منجر به تولید لیپوزوم‌ها می‌شود. لیپوزوم‌ها می‌توانند مولکول‌های دارویی حلال در آب را در هسته آبی و مولکول‌های دارویی حلال در چربی را در پوسته فسفولیپیدی خود کپسوله کنند [20].

به منظور تولید لیپوزوم‌ها به روش میکروفلوئیدیک، ابتدا باید مولکول‌های فسفولیپید در یک حلال آلی، مانند اتانول، حل شوند. سپس، محلول آلی حاصل، با محلولی آبی در یک میکرومیکسر مخلوط می‌شود (شکل ۳-الف). با اختلاط این دو محلول، دنباله‌های آب‌گریز مولکول‌های فسفولیپید برای کاهش سطح تماس با مولکول‌های آب به یکدیگر متمایل شده و توده‌های مولکولی تشکیل می‌دهند.



شکل ۱ طرح‌واره‌هایی از ساختار لیپوزوم‌ها و یک مولکول فسفولیپید (الف) لیپوزوم با یک لایه‌ی فسفولیپیدی، (ب) لیپوزوم با دو لایه‌ی فسفولیپیدی، (پ) یک مولکول فسفولیپید شامل یک سر آب‌دوست و یک دنباله آب‌گریز

Fig. 2 Schematics of liposome structures and a phospholipid molecule

روش میکروفلوئیدیک در شکل ۱-ب نشان داده شده است. در مجموع، با پیشرفت‌های اخیر در حوزه‌ی میکروفلوئیدیک، امروزه این روش‌ها نسبت به روش‌های سنتی گزینه‌هایی کارآمدتر و با پتانسیل توسعه بیشتر محسوب می‌شوند.

در روش‌های میکروفلوئیدیک، لیپوزوم‌ها درون میکرومیکسرهای زیرمجموعه‌ای از سامانه‌های میکروفلوئیدیک هستند، از طریق اختلاط یک محلول آبی با یک محلول آلی (مانند اتانول) حاوی مولکول‌های فسفولیپید تولید می‌شوند [16,17]. روش‌های میکروفلوئیدیک مزایای قابل توجهی نسبت به روش‌های سنتی دارند؛ از این جمله می‌توان به قابلیت کنترل اندازه و ضریب یکنواختی از طریق تنظیم شرایط ورودی میکرومیکسر، کاهش زمان تولید و امکان تولید تک مرحله‌ای اشاره کرد [18].

با این حال چالش اصلی در تولید محصولات دارویی لیپوزومی، اندازه‌گیری دقیق و یا پیش‌بینی این دو مشخصه‌ی ابعادی آن‌ها است. به منظور تعیین اندازه و ضریب یکنواختی لیپوزوم‌های تولید شده چه با روش‌های سنتی و یا میکروفلوئیدیک، شیوه‌های آزمایشگاهی متعددی مانند روش پراکندگی نور دینامیکی و روش میکروسکوپی الکترونی عبوری قابل استفاده هستند [19]. هرچند این روش‌ها می‌توانند با دقت قابل قبولی مشخصه‌های مورد نظر را محاسبه کنند، کل فرآیند شامل تولید لیپوزوم‌ها، تعیین اندازه و ضریب یکنواختی آن‌ها به صورت تجربی و سپس تحلیل نتایج برای ارزیابی ویژگی‌های ابعادی محصول نهایی، فرآیندی زمان‌بر و مبتنی بر آزمون و خطا است. این امر به ویژه در روش‌های سنتی، منجر به هدر رفت مواد اولیه و زمان می‌شود. از سوی دیگر، شبیه‌سازی‌های عددی متداول توسط نرم‌افزارهای تجاری مهندسی، اطلاعاتی درباره‌ی اندازه و ضریب یکنواختی لیپوزوم‌ها ارائه نمی‌دهند؛ بنابراین، ارائه‌ی راهکاری جایگزین، ضروری به نظر می‌رسد. مطالعه فرآیند تولید لیپوزوم‌ها و پیش‌بینی مشخصه‌های ابعادی آن‌ها به روش تحلیلی یکی از این راهکارها است.

هدف این پژوهش، ارائه‌ی مدلی تحلیلی برای پیش‌بینی توزیع اندازه و ضریب یکنواختی لیپوزوم‌ها بر اساس رابطه‌ی انرژی آزاد گیبس است. در این مدل، انرژی آزاد گیبس شامل انرژی خمشی صفحات دولایه‌ی (Bilayer) فسفولیپیدی و انرژی لبه‌های آزاد این صفحات، ناشی از تماس سرهای آب‌گریز مولکول‌های فسفولیپید با مولکول‌های آب، در نظر گرفته شده است. به منظور افزایش دقت مدل تحلیلی پیشنهادی نسبت به مدل‌های پیشین، آنتروپی‌های مرتبط با آرایش و پخش مولکول‌های فسفولیپید در محلول در نظر گرفته شده است. بر این اساس، پیش‌بینی ضریب یکنواختی لیپوزوم‌ها با استفاده از این مدل تحلیلی، تقریب مناسبی از شرایط اولیه‌ی لازم برای تولید لیپوزوم‌هایی با مشخصه‌های ابعادی مطلوب در شرایط واقعی ارائه می‌دهد.

جهت اعتبارسنجی مدل پیشنهادی در این پژوهش، تراشه‌ای میکرومیکسری برای اختلاط محلول‌های آبی و آلی به منظور تولید

ترمودینامیکی و استفاده از روابط انرژی آزاد گیبس و آنتروپی‌های مرتبط با آرایش و پخش مولکولی، مدلی تحلیلی برای یافتن پاسخ این پرسش‌ها ارائه می‌شود. این رابطه سپس با ساخت تراشه میکروفلوئیدیکی و انجام آزمایش جهت تولید لیپوزوم‌ها اعتبارسنجی می‌شود.

۳- مدل تحلیلی

همان‌طور که اشاره شد، اندازه‌ی لیپوزوم‌های تولیدی و ضریب یکنواختی آن‌ها از مهم‌ترین ویژگی‌هایی هستند که در تولید لیپوزوم‌ها باید موردتوجه قرار گیرند. ازاین‌رو، ارائه‌ی روشی برای محاسبه‌ی این موارد همواره یکی از دغدغه‌های اصلی پژوهشگران در حوزه نانوحامل‌های دارویی بوده است. در این بخش، با استفاده از روابط ترمودینامیکی برای سامانه‌ی مولکولی نشان‌داده‌شده در شکل ۳، ابتدا معادله‌ای برای محاسبه‌ی انرژی آزاد گیبس این سامانه ارائه می‌شود. سپس، با بهره‌گیری از این معادله، رابطه‌ای برای تعیین اندازه‌ی لیپوزوم‌های تولیدی استخراج می‌شود. در نهایت، با استفاده از رابطه‌ی به‌دست‌آمده، ضریب یکنواختی لیپوزوم‌های تولیدی محاسبه خواهد شد. انرژی آزاد گیبس برابر است با:

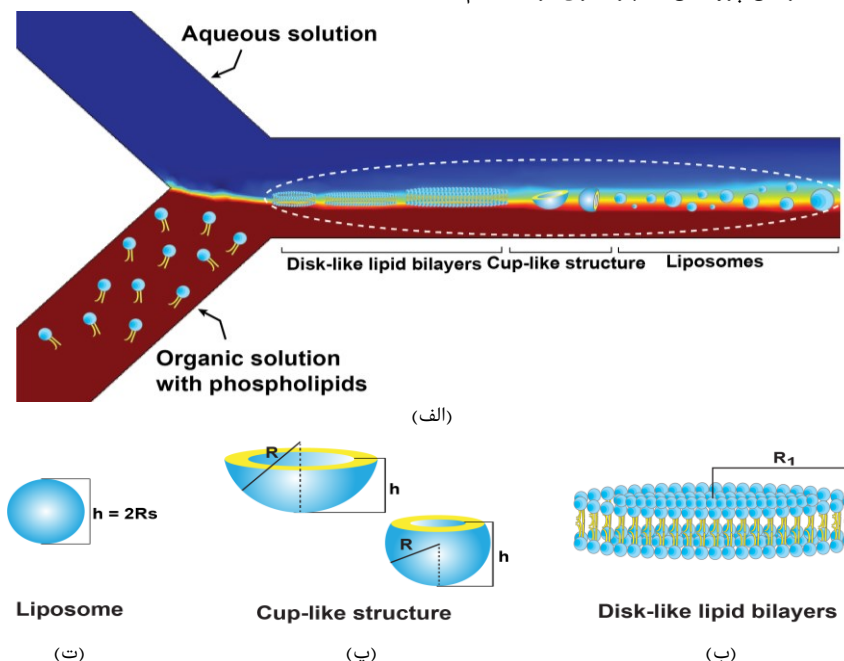
$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S = \Delta U + \Delta(PV) - T\Delta S \quad (1)$$

در این پژوهش، لیپوزوم‌ها درون مخلوطی از آب و اتانول در فشار ثابت تشکیل می‌شوند. باتوجه‌به اینکه هر دو جزء آب و اتانول تقریباً تراکم‌ناپذیر هستند، تغییرات حجمی کل در طی فرایند تشکیل لیپوزوم‌ها ناچیز خواهد بود.

با افزایش اندازه‌ی این توده‌ها، ساختارهای دیسک مانند دولایه مطابق شکل ۳-ب تشکیل می‌شوند. دلیل تمایل مولکول‌های فسفولیپید به تشکیل این ساختارهای دیسک مانند آن است که در یک سطح مقطع مشخص، مساحت پیرامونی چنین ساختارهایی نسبت به سایر اشکال کمترین مقدار را دارد. این امر باعث کاهش تنش‌های بین دنباله‌های آب‌گریز فسفولیپیدها و مولکول‌های آب در لبه‌های آزاد جانبی شده و در نتیجه سطح انرژی کل سیستم در حد کمینه خود قرار می‌گیرد.

با بزرگ‌تر شدن این ساختارهای دیسک‌مانند، تنش در لبه‌های آزاد جانبی افزایش می‌یابد. این افزایش تنش در صفحات دیسک‌مانند فسفولیپیدی سرانجام به حدی می‌رسد که بر مقاومت خمشی این صفحات غلبه کرده و خمش آن‌ها آغاز می‌شود. در اثر این خمش، ابتدا ساختارهای لیوانی شکل مطابق شکل ۳-پ تشکیل می‌شوند. در این مرحله، محلول آبی درون این ساختارها محبوس و هسته‌ی آبی لیپوزوم‌ها تشکیل می‌شوند. سرانجام، با بسته شدن کامل این ساختارهای لیوانی، لیپوزوم‌ها مطابق شکل ۳-ت تشکیل می‌شوند. به این ترتیب با بسته شدن تمام لبه‌های آزاد و تشکیل لیپوزوم‌ها، سیستم به کمینه‌ی جدیدی در سطح انرژی خود می‌رسد. تمامی مراحل ذکرشده در حین تشکیل لیپوزوم‌ها توسط مشاهدات مدل‌سازی‌های دینامیک مولکولی [21] و همچنین نتایج آزمایش‌های پراکندگی پرتو ایکس [22] مورد تأیید و مشاهده قرارگرفته‌اند.

برای پاسخ به پرسش‌هایی مانند «لیپوزوم‌های تولیدشده چه ابعادی دارند؟» و «آیا ضریب یکنواختی و توزیع ابعادی آن‌ها در بازه‌ی مطلوب قرار دارند؟»، در این پژوهش با بهره‌گیری از مفاهیم



شکل ۳ نمایشی از مراحل تشکیل لیپوزوم‌ها (الف) اختلاط محلول آبی و محلول آلی، (ب) تشکیل صفحات دولایه‌ی دیسک مانند، (پ) تشکیل ساختارهای لیوانی شکل، (ت) تشکیل ساختارهای کروی شکل (لیپوزوم‌ها)

Fig. 3 A Schematic of the stages of liposome formation

درحالی که سختی خمشی گاوسین به تغییرات توپولوژیکی این صفحات مربوط است. A_0 نیز سطح هر مولکول فسفولیپیدی است که در شکل ۲-پ نشان داده شده است.

علاوه بر این، $B = \kappa_1 + \kappa_2 + \kappa_3$ است که در آن κ_1 ، κ_2 و κ_3 مدول‌های مرتبه چهارم الاستیسیته‌ی خمشی غیرخطی هستند. مؤلفه‌ی سوم، آنتروپی مربوط به نحوه‌ی چینش و آرایش ساختارهای فسفولیپیدی است و تعداد روش‌های ممکن برای توزیع N مولکول فسفولیپیدی در آرایش‌هایی با تعداد m مولکول و ارتفاع h را توصیف می‌کند. در اینجا، N نشان‌دهنده‌ی مجموع کل مولکول‌های فسفولیپید در تمام آرایش‌های موجود در محلول است. مؤلفه‌ی چهارم که بیانگر آنتروپی پخش است، به درجات آزادی حرکت مولکول‌های فسفولیپید با کسر حجمی کل ϕ در محلول مربوط است و احتمال قرارگیری هر مولکول در یک مکان مشخص (Lattice) در محلول را بیان می‌کند. (اثبات مؤلفه‌های سوم و چهارم رابطه‌ی (۳) در ضمیمه‌ی الف)

برای به‌دست‌آوردن توزیع اندازه‌ی لیپوزوم‌ها که نسبت به سایر آرایش‌ها در حالت انرژی کمینه قرار دارند، باید مشتق رابطه‌ی (۳) نسبت به متغیر مستقل $n_{m,h}$ برابر با صفر قرار داده شود (اثبات و محاسبه‌ی مشتق در ضمیمه‌ی ب). به این ترتیب رابطه‌ی زیر حاصل می‌شود:

$$n_{m,h} = \frac{N\phi}{m} \exp \left\{ \frac{1}{K_B T m} \left[\frac{\alpha}{2} K_B T \ln \left(\frac{m}{2} \right) - \gamma C_{m,h} - \frac{mA_0}{2} \left(\frac{2k_b}{R^2} + \frac{k_G}{R^2} + \frac{B}{R^4} \right) \right] \right\} \quad (4)$$

این رابطه تعداد آرایش‌های شامل m مولکول با ارتفاع h را که انرژی آزاد گیبس آن‌ها نسبت به سایر آرایش‌های مولکولی کمینه است، برحسب شعاع کروی که این ساختار، بخشی از آن است، بیان می‌کند. این شعاع که با R نشان داده می‌شود در شکل ۳-پ نشان داده شده است. با این حال، از آنجا که هدف این پژوهش دستیابی به مدلی برای یافتن تعداد لیپوزوم‌ها (ساختارهای کروی) برحسب شعاع آن‌ها و همچنین ضریب یکنواختی لیپوزوم‌هاست، لازم است مجموعه‌ای از فرضیات بر معادله‌ی (۴) که به صورت کلی برای همه آرایش‌های مولکولی به دست آمده است، اعمال شود. این فرضیات عبارت‌اند از: صفر در نظر گرفتن $\gamma C_{m,h}$ به دلیل نبود لبه‌های آزاد در لیپوزوم‌ها، استفاده از فرض ساده‌ساز $k_G \approx -k_b$ بر اساس مدل پیشنهادی هو و همکاران [24]، در نظر گرفتن $h = 2R_s$ ، تعریف $k_b = c_2 K_B T$ بر اساس مدل دکترووا و همکاران [25] و در نهایت معرفی طول مشخصه‌ی $L_c = \sqrt{B/k_b}$. طول مشخصه‌ی مذکور در شکل ۲-پ نشان داده شده است. علاوه بر این، با توجه به شکل‌های ۳-ب و ۳-ت و با فرض برابری مساحت هر صفحه دولایه‌ی دیسک‌مانند متشکل از m مولکول با مساحت یک لیپوزوم با شعاع R_s ، رابطه‌ای بین تعداد مولکول‌ها با این شعاع به صورت زیر به دست می‌آید:

$$\frac{1}{2} mA_0 = 4\pi R_s^2 \Rightarrow m = \frac{8\pi R_s^2}{A_0} \quad (5)$$

اگرچه در حین تشکیل لیپوزوم‌ها، سازمان‌دهی مجدد مولکولی در مقیاس نانومتری رخ می‌دهد، اما این تغییرات تأثیر قابل‌توجهی بر حجم ماکروسکوپی محلول ندارند؛ بنابراین، در این شرایط عبارت $\Delta(PV)$ در رابطه‌ی (۱) قابل صرف‌نظر کردن است. در نتیجه این رابطه را می‌توان به صورت زیر ساده کرد:

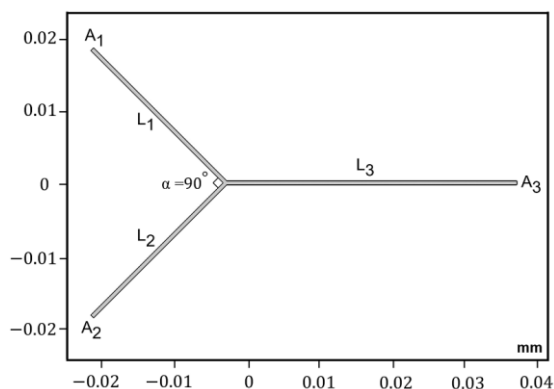
$$\Delta G \approx \Delta U - T\Delta S \quad (2)$$

مؤلفه‌ی نخست در این رابطه به انرژی‌های مؤثر در فرایند تشکیل لیپوزوم‌ها مربوط می‌شود. این انرژی‌ها را می‌توان به دو دسته تقسیم کرد: انرژی مربوط به خمش صفحات دولایه‌ی فسفولیپیدی و انرژی ناشی از لبه‌های آزاد. مؤلفه‌ی دوم نیز به اثرات آنتروپی در فرایند تشکیل لیپوزوم‌ها مربوط است که شامل آنتروپی‌های ناشی از آرایش و پخش مولکول‌های فسفولیپید است. باتوجه به شکل‌های ۳-ب، ۳-پ و ۳-ت، هر آرایش مولکولی در این سامانه را می‌توان به صورت توده‌ای متشکل از m مولکول فسفولیپید با ارتفاع h در نظر گرفت. در صورتی که مولکول‌های فسفولیپید به صورت منفرد در محلول حضور داشته باشند، مقدار m برابر با ۱ خواهد بود. همچنین، تعداد مولکول‌های فسفولیپید در بزرگ‌ترین توده‌ی مولکولی برابر با M است. کمینه‌ی ارتفاع یک آرایش مولکولی زمانی حاصل می‌شود که صفحه‌ی دیسک‌مانند بدون خمش باشد که در این حالت، h برابر با صفر خواهد بود. بیشینه‌ی ارتفاع نیز معادل دو برابر شعاع لیپوزوم تشکیل شده است که با $2R_s$ نشان داده می‌شود. به این ترتیب انرژی آزاد گیبس چنین سامانه‌ای را می‌توان بر اساس رابطه (۳) بیان کرد.

$$G = \sum_{m=1}^M \sum_{h=0}^{2R_s} \gamma \times n_{m,h} C_{m,h} + \sum_{m=1}^M \sum_{h=0}^{2R_s} n_{m,h} \left[\frac{mA_0}{2} \left(\frac{2k_b}{R^2} + \frac{k_G}{R^2} + \frac{B}{R^4} \right) - \frac{\alpha}{2} K_B T \ln \left(\frac{m}{2} \right) \right] - K_B T \left[N \ln(N) - \sum_{m=1}^M \sum_{h=0}^{2R_s} (mn_{m,h}) \ln(mn_{m,h}) \right] - K_B T N \ln(\phi) \quad (3)$$

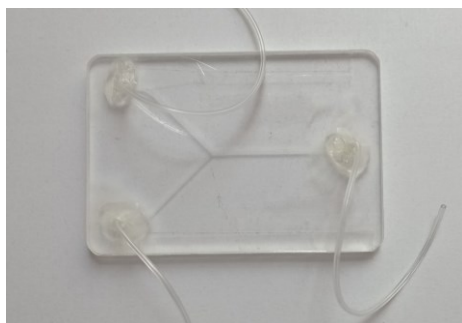
رابطه‌ی (۳) از چهار مؤلفه تشکیل شده است. دو مؤلفه‌ی نخست مربوط به انرژی و دو مؤلفه‌ی بعدی مربوط به آنتروپی در رابطه‌ی (۲) هستند. مؤلفه‌ی اول مجموع انرژی‌های لبه‌های آزاد تمام آرایش‌های مولکولی است که از تماس دنباله‌های آب‌گریز مولکول‌های فسفولیپید تشکیل‌دهنده‌ی این آرایش‌ها با مولکول‌های آب در لبه‌های آزاد ناشی می‌گردد. این مؤلفه برابر است با حاصل ضرب تنش سطحی (γ) در مجموع محیط لبه‌های آزاد ($C_{m,h}$) تمام آرایش‌های مولکولی ممکن که از m مولکول فسفولیپید با ارتفاع h تشکیل شده‌اند. مؤلفه‌ی دوم به انرژی‌های خمشی خطی و غیرخطی اشاره دارد که از مدل پیشنهادی هوانگ و همکاران [23] استخراج شده است. در این مؤلفه، k_b سختی خمشی، k_G سختی خمشی گاوسین، K_B ثابت بولتزمن و T دما بر حسب کلین است. سختی خمشی نشان‌دهنده‌ی مقاومت صفحات دولایه‌ی فسفولیپیدی در برابر خمش از حالت تخت است،

این تراشه از دو لایه‌ی پلیمری پلی‌متیل متاکریلات (PMMA) ساخته شده است. در لایه‌ی زیرین، کانال‌ها و در لایه‌ی بالایی، ورودی‌ها و خروجی با استفاده از ماشین‌کاری دقیق (Micromilling) ایجاد شده‌اند. پس از ماشین‌کاری، هر دو لایه با آب و صابون به‌دقت تمیز و سپس خشک شدند. در مرحله‌ی بعد، لایه‌ها روی یکدیگر قرار داده شدند و با استفاده از دو لایه شیشه و گیره‌های فلزی تحت فشار قرار گرفتند. سپس، مجموعه در کوره‌ی خلأ با فشار ۸۰- کیلوپاسکال و دمای ۱۴۰ درجه سانتی‌گراد، به مدت ۶۰ دقیقه حرارت داده شد تا لایه‌ها به یکدیگر متصل شوند [26,27].



شکل ۴ طرح‌واره‌ی تراشه‌ی میکرومیکسری مورد استفاده در این پژوهش
Fig. 4 Schematic of the micromixer used in this study

پس از اتمام این مرحله، تراشه به تدریج خنک شد و برای بررسی نشتی با آب دیونیزه مورد آزمایش قرار گرفت. تراشه‌ی میکرومیکسری تولید شده، در شکل ۵ نشان داده شده است.



شکل ۵ نمایی از تراشه‌ی میکرومیکسری ساخته شده
Fig. 5 A view of the fabricated micromixer

۴-۱- تجهیزات و مواد لازم

تجهیزات مورد نیاز برای تولید لیپوزوم‌ها شامل این موارد است: دو پمپ، دو سرنگ ۲۰ میلی‌لیتری، دو نیدل (رابط بین سرنگ و میکروتیوبینگ)، دو میکروتیوب، میکروتیوبینگ برای اتصال نیدل‌ها به ورودی‌های میکرومیکسر و اتصال خروجی میکرومیکسر به میکروتیوب جهت جمع‌آوری محصول و تراشه‌ی میکرومیکسری. چیدمان و نحوه‌ی تنظیم این تجهیزات برای شروع آزمایش در شکل ۶ نشان داده شده است.

با اعمال همه‌ی این فرضیات که در جدول ۱ به صورت خلاصه آورده شده‌اند و جاگذاری رابطه‌ی (۵) در رابطه‌ی (۴) داریم:

$$n_{R_s} = N\phi \frac{A_0}{8\pi} \times \frac{1}{R_s^2} \exp\left\{-\frac{c_2 A_0}{2} \times \frac{1}{R_s^2} \left(1 + \frac{L_c^2}{R_s^2}\right) + \frac{A_0}{16\pi} \times \frac{\alpha}{R_s^2} \times \ln\left(\frac{4\pi R_s^2}{A_0}\right)\right\} \quad (6)$$

که در این رابطه میزان α از مدل هوانگ و همکاران [23] استخراج شده است و برابر است با:

$$\alpha = \frac{12 + \frac{30L_c^2}{R_s^2}}{1 + \frac{3L_c^2}{R_s^2} + \sqrt{1 + \frac{12\pi L_c^2}{c_2 A_0} + \frac{6L_c^2}{R_s^2} + \frac{9L_c^2}{R_s^4}}} \quad (7)$$

با استفاده از روابط (۶) و (۷)، می‌توان منحنی‌های توزیع اندازه لیپوزوم‌ها و همچنین ضریب یکنواختی آن‌ها را محاسبه کرد. در این رابطه، n_{R_s} نشان‌دهنده‌ی تعداد لیپوزوم‌ها با شعاع R_s است و همان مدل تحلیلی موردنظر این پژوهش است. برای ساده‌سازی، این رابطه را می‌توان به صورت زیر در نظر گرفت:

$$n_{R_s} = f(R_s) \quad (8)$$

رابطه‌ی (۸) بیان می‌کند که به جز R_s که هدف، بررسی تغییرات آن نسبت به تعداد لیپوزوم‌های دارای این شعاع است، سایر پارامترهای موجود در رابطه (۶) یا قابل محاسبه‌اند و یا از طریق منابع معتبر قابل دسترسی هستند. جزئیات این موضوع در بخش نتایج ارائه خواهد شد.

جدول ۱ خلاصه‌ی فرضیات انجام شده در مدل تحلیلی

Assumptions	Description
$\gamma C_{m,h} = 0$	The absence of free edges in liposomes
$h = 2R_s$	The height of the spherical structures (liposomes) is equal to twice their radius
$k_G = -k_b$	Based on the model by Hu et al [۲۴]
$k_b = c_2 K_B T$	Based on the model by Doktorova et al [۲۵]
$L_c = \sqrt{B/k_b}$	Based on the model by Huang et al [۲۳]
$m = 8\pi R_s^2 / A_0$	Resulting from the equality of the area of a phospholipid bilayer and a liposome

۴-۲- روش تجربی

برای تولید لیپوزوم‌ها در این پژوهش، تراشه‌ی میکرومیکسری با مشخصات هندسی مطابق شکل ۴ طراحی و ساخته شد. ابعاد این میکرومیکسر در جدول ۲ ارائه شده است.

جدول ۲ ابعاد هندسه‌ی میکرومیکسر طراحی شده

Table 2 Geometric dimensions of the designed micromixer

Parameter	Value
A_1, A_2, A_3	0.3 mm ²
L_1	26 mm
L_2	26 mm
L_3	40 mm
α	90°

لازم به ذکر است که سطح مقطع همه‌ی میکروکانال‌های این تراشه‌ی میکرومیکسری، مربعی است.

شامل مولکول‌های فسفولیپون جی ۹۰ و کلسترول برای دو آزمایش با غلظت‌های لیپیدی کل ۲۰ و ۱۰ مول بر مترمکعب در مدت ۱ دقیقه در $10^{-7} \times 5/00$ مترمکعب (۵۰۰ میکرو لیتر) محلول آلی، به ترتیب بر اساس روابط (۹) و (۱۰) محاسبه می‌شوند:

$$n_1 = 20 \left(\frac{\text{mol}}{\text{m}^3} \right) \times 5.00 \times 10^{-7} \left(\frac{\text{m}^3}{\text{s}} \right) = 10.00 \times 10^{-6} (\text{mol}) \quad (9)$$

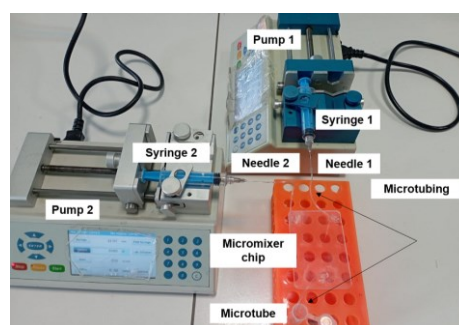
$$n_2 = 10 \left(\frac{\text{mol}}{\text{m}^3} \right) \times 5.00 \times 10^{-7} \left(\frac{\text{m}^3}{\text{s}} \right) = 5.00 \times 10^{-6} (\text{mol}) \quad (10)$$

سپس با در نظر گرفتن عدد آووگادرو به میزان $N_A = 6/02 \times 10^{23}$ تعداد کل مولکول‌های لیپیدی برای دو آزمایش با غلظت‌های لیپیدی کل ۲۰ و ۱۰ مول بر مترمکعب به ترتیب بر اساس روابط زیر محاسبه می‌شوند:

$$N_1 = n_1 \times N_A = 10.00 \times 10^{-6} \times 6.02 \times 10^{23} = 6.02 \times 10^{18} \quad (11)$$

$$N_2 = n_2 \times N_A = 5.00 \times 10^{-6} \times 6.02 \times 10^{23} = 3.01 \times 10^{18} \quad (12)$$

مواد مورد نیاز در این آزمایش، شامل یک فاز آبی و یک فاز آلی است که به ترتیب از طریق سرنگ شماره ۱ و سرنگ شماره ۲ وارد دو ورودی میکرومیکسر می‌شوند. فاز آلی خود شامل مولکول‌های فسفولیپیدی فسفولیپون جی ۹۰ و مولکول‌های لیپیدی کلسترول (به ترتیب با نسبت مولی ۶۰ به ۴۰) حل شده در اتانول مطلق است. فاز آبی نیز شامل بافر ۱۰ مول بر مترمکعب هیستیدین ۵ درصد با پی‌اچ ۶/۵ است.



شکل ۶ نمای از تجهیزات مورد استفاده در آزمایش و نحوه اتصال آن‌ها
Fig. 6 View of equipment for liposome production and their setup

۴-۲- روش تهیه‌ی لیپوزوم‌ها

پیش از آغاز آزمایش، ابتدا بایستی مقادیر نرخ جریان حجمی مورد نیاز بر روی پمپ‌ها تنظیم شوند. برای این منظور، نرخ جریان حجمی پمپ شماره ۱ (متصل به سرنگ حاوی حلال آبی) مطابق شکل ۷-الف روی $25/00 \times 10^{-9}$ مترمکعب بر ثانیه (۱۵۰۰ میکرو لیتر بر دقیقه) و نرخ جریان حجمی پمپ شماره ۲ (متصل به سرنگ حاوی حلال آلی) مطابق شکل ۷-ب روی $8/33 \times 10^{-9}$ مترمکعب بر ثانیه (۵۰۰ میکرو لیتر بر دقیقه) قرار می‌گیرند. این مقادیر بر اساس پژوهش‌های پیشین [28] و تجربه انتخاب شده‌اند.

پس از تنظیم پمپ‌ها، دو سرنگ مجزا با مقادیر کافی از محلول آبی شامل بافر هیستیدین ۵ درصد و محلول آلی حاوی فسفولیپون جی ۹۰ و کلسترول با غلظت لیپیدی کل ۲۰ مول بر مترمکعب پر شدند. سپس، به کمک میکروتیونینگ‌ها، نیدل‌ها به دو ورودی میکرومیکسر متصل شدند و پمپ‌ها نیز به صورت هم‌زمان روشن شدند. در ابتدا، بخشی از قطره‌های اولیه تولید شده جمع‌آوری نشدند، چرا که در لحظات ابتدایی، شرایط تولید لیپوزوم‌ها ممکن است ناپایدار یا غیراستاندارد باشد. سپس به مدت ۱ دقیقه، محصول تولید شده درون یک میکروتیوب جمع‌آوری شد. پس از گذشت این مدت، میزان $0/2 \times 10^{-5}$ مترمکعب (۲۰۰۰ میکرو لیتر) محصول نهایی حاوی لیپوزوم‌های تولید شده به دست آمد. پس از انجام دیالیز بر روی محصول تهیه شده و جداسازی اتانول اضافی، با استفاده از روش پراکندگی نور دینامیکی در دستگاه زتاسایزر، منحنی‌های توزیع اندازه لیپوزوم‌ها و ضریب یکنواختی آن‌ها تعیین شدند. کل این فرایند، بار دیگر با رقیق‌سازی محلول آلی به ۱۰ مول بر مترمکعب تکرار شد. مقدار مول مولکول‌های لیپیدی



(الف)



(ب)

شکل ۷ تنظیم مقادیر نرخ جریان حجمی مورد نیاز بر روی پمپ‌ها (الف) تنظیم نرخ جریان حجمی ورودی محلول آبی (ب) تنظیم نرخ جریان حجمی ورودی محلول آلی

Fig. 8 Adjusting the required volumetric flow rates on the pumps

منحنی، توزیعی مشابه توزیع توابع لاگ-نرمال دارند و بیشینه‌ی آن‌ها در اندازه‌ی تقریبی ۱۰۰ نانومتر مشاهده می‌شود. همان‌طور که در مقدمه نیز اشاره شد، این اندازه برای لیپوزوم‌ها به عنوان حامل‌های دارویی، اندازه‌ای مطلوب به شمار می‌رود. منظور از بیشینه در اینجا، بیشترین فراوانی لیپوزوم‌هایی با اندازه‌ای در حدود ۱۰۰ نانومتر است که در مقایسه با سایر اندازه‌های تولیدشده، بیشترین سهم را دارند.

جدول ۳ مقادیر پارامترهای موجود در رابطه‌ی (۶)

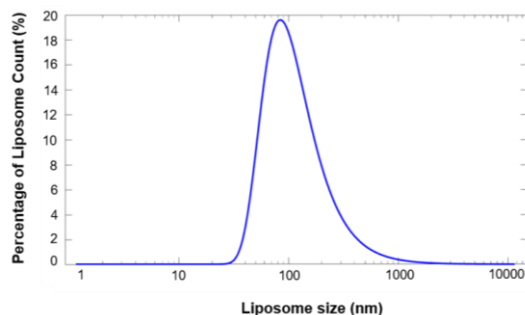
Table ۳ Values of parameters in Eq. (6)

Parameter	Symbol	Total Lipid Concentration 10 mM	Total Lipid Concentration 20 mM
		10 mM	20 mM
Headgroup area	A_0	0.6 nm ²	0.6 nm ²
Critical tail length	L_c	0.6 nm ²	0.6 nm ²
Constant	c_2	24.3	24.3
Total number of lipid molecules	N	3.01×10^{18}	6.02×10^{18}
Volume fraction of lipid molecules	ϕ	0.0015	0.003

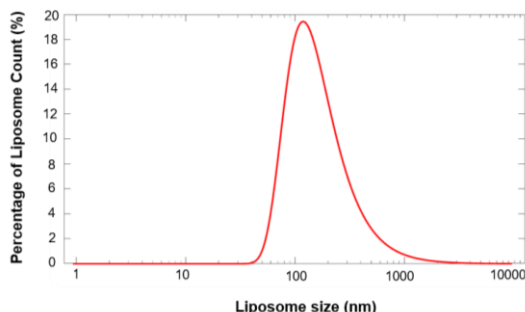
برای کمی‌سازی منحنی‌های توزیع اندازه‌ی لیپوزوم‌ها، پارامتری به نام ضریب یکنواختی به صورت زیر تعریف می‌شود [30]:

$$PDI = \left(\frac{\sigma}{a}\right)^2 \quad (۱۶)$$

در این رابطه، σ انحراف از معیار و a میانگین شعاع همه لیپوزوم‌های تولیدشده است. ضریب یکنواختی برای دو منحنی ترسیم‌شده در شکل‌های ۸-الف و ۸-ب، بر اساس رابطه‌ی (۱۶) و با استفاده از نرم‌افزار متلب و روابط آماری انحراف از معیار و میانگین محاسبه شده است.



(الف)



(ب)

شکل ۸ منحنی‌های توزیع اندازه‌ی لیپوزوم‌ها بر اساس رابطه‌ی تحلیلی (۶) (الف) غلظت لیپیدی کل ۱۰ مول بر مترمکعب، (ب) غلظت لیپیدی کل ۲۰ مول بر مترمکعب

Fig. 8 Liposome size distribution based on Eq. (6)

همچنین، کسر حجمی ترکیبات لیپیدی، شامل مولکول‌های فسفولیپید (فسفولیپون) و کلسترول، از رابطه‌ی زیر محاسبه می‌شود:

$$\phi = \frac{n_{\text{کلسترول}} \times (V_m)_{\text{کلسترول}} + n_{\text{فسفولیپون}} \times (V_m)_{\text{فسفولیپون}}}{V_{\text{tot}}} \quad (۱۳)$$

در این رابطه، $n_{\text{فسفولیپون}}$ و $(V_m)_{\text{فسفولیپون}}$ به ترتیب نشان‌دهنده‌ی تعداد مول‌ها و حجم مولی مولکول‌های فسفولیپون جی ۹۰ هستند. به‌طور مشابه، $n_{\text{کلسترول}}$ و $(V_m)_{\text{کلسترول}}$ بیانگر تعداد مول‌ها و حجم مولی مولکول‌های کلسترول هستند. همچنین، V_{tot} مجموع حجم محلول‌های آلی و آبی واردشده به میکرومیکسر است. مقدار حجم مولی برای فسفولیپون جی ۹۰ و کلسترول به ترتیب ۰.۷۳×۱۰^{-۳} مترمکعب بر مول و ۰.۳۷×۱۰^{-۳} مترمکعب بر مول از جداول ترمودینامیکی استخراج شده‌اند. با در نظر گرفتن نسبت مولی ۶۰ به ۴۰ برای مولکول‌های فسفولیپون جی ۹۰ به کلسترول و با استفاده از روابط (۹) و (۱۰)، کسر حجمی مولکول‌های لیپیدی برای غلظت‌های لیپیدی کل ۲۰ و ۱۰ مول بر مترمکعب به ترتیب به صورت زیر محاسبه می‌شوند:

$$\phi_1 = \frac{10 \times 10^{-6} \times 0.6(\text{mol}) \times 0.73 \times 10^{-3} \left(\frac{\text{m}^3}{\text{mol}}\right)}{0.2 \times 10^{-5}(\text{m}^3)} + \frac{10 \times 10^{-6} \times 0.4(\text{mol}) \times 0.37 \times 10^{-3} \left(\frac{\text{m}^3}{\text{mol}}\right)}{0.2 \times 10^{-5}(\text{m}^3)} = 0.003 \quad (۱۴)$$

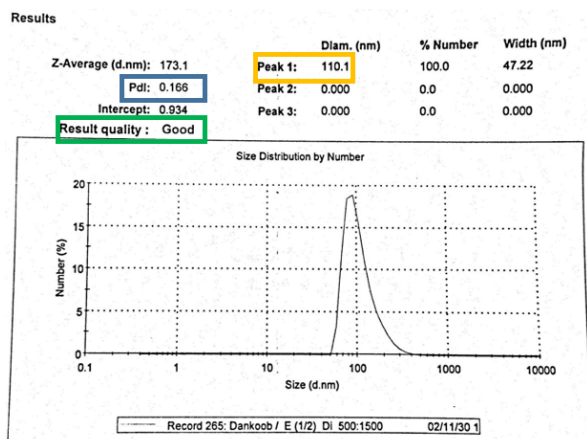
$$\phi_2 = \frac{5 \times 10^{-6} \times 0.6(\text{mol}) \times 0.73 \times 10^{-3} \left(\frac{\text{m}^3}{\text{mol}}\right)}{0.2 \times 10^{-5}(\text{m}^3)} + \frac{5 \times 10^{-6} \times 0.4(\text{mol}) \times 0.37 \times 10^{-3} \left(\frac{\text{m}^3}{\text{mol}}\right)}{0.2 \times 10^{-5}(\text{m}^3)} = 0.0015 \quad (۱۵)$$

۵- نتایج و اعتبارسنجی

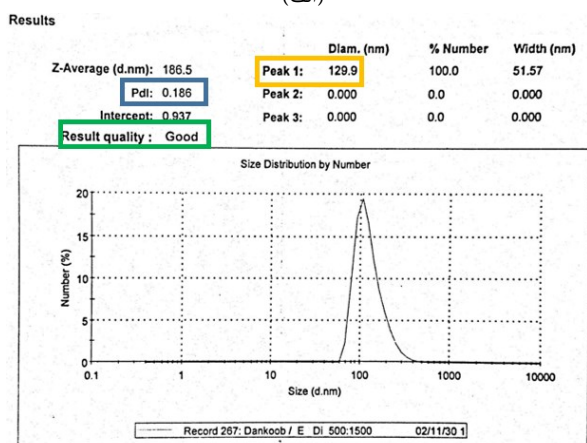
بر اساس مدل تحلیلی ارائه‌شده در رابطه‌ی (۶)، می‌توان منحنی‌های توزیع اندازه‌ی لیپوزوم‌ها و سپس میزان ضریب یکنواختی آن‌ها را به دست آورد. برای ترسیم منحنی توزیع اندازه‌ی لیپوزوم‌ها، ابتدا باید پارامترهای موجود در رابطه‌ی (۶) جاگذاری شوند. این پارامترها شامل A_0 ، L_c و c_2 هستند که مشخصه‌های هندسی و ذاتی مولکول‌های فسفولیپیدی انتخاب‌شده را نشان می‌دهند (شکل ۲-پ). این مقادیر با تغییر نوع مولکول، تغییر می‌کنند و از جداول موجود در مراجع استخراج می‌شوند [25,29]. همچنین، پارامترهای N و ϕ بر اساس مقادیر محاسبه‌شده از روابط (۱۱)، (۱۲)، (۱۴) و (۱۵) جایگذاری می‌شوند. تمامی این مقادیر در جدول ۳ به صورت خلاصه ارائه شده‌اند. با استفاده از رابطه‌ی (۶) و مقادیر مندرج در جدول ۳، منحنی‌های توزیع اندازه لیپوزوم‌های تولیدشده برای دو حالت غلظت لیپیدی کل ۲۰ و ۱۰ مول بر مترمکعب با استفاده از نرم‌افزار متلب ترسیم‌شده‌اند. این منحنی‌ها به ترتیب در شکل‌های ۸-الف و ۸-ب نشان داده شده‌اند. هر دو

بیشینه‌ی منحنی توزیع اندازه‌ی لیپوزوم‌ها نیز در ۱۲۹/۹۰ نانومتر گزارش شده است که نسبت به حالت قبل ۱۷/۹۸٪ افزایش یافته است.

به منظور اعتبارسنجی، مقادیر تجربی ضرایب یکنواختی با مقادیر حاصل از مدل تحلیلی، در جدول ۴ مقایسه شده‌اند و میزان خطای نتایج تحلیلی محاسبه شده است.



(الف)



(ب)

شکل ۹ منحنی‌های توزیع اندازه‌ی ارائه‌شده‌ی دستگاه زتاسایزر (الف) غلظت لیپیدی کل ۱۰ مول بر مترمکعب (ب) غلظت لیپیدی کل ۲۰ مول بر مترمکعب

Fig. 9 Size distribution of liposomes as provided by the Zetasizer

جدول ۴ مقایسه‌ی نتایج آزمایشگاهی ضرایب یکنواختی با نتایج مدل تحلیلی به منظور اعتبارسنجی

Table 4 Comparison of experimental results with the PDI predicted by the analytical model for validation

	PDI for total lipid concentration of 10 mol/m ³	PDI for total lipid concentration of 20 mol/m ³
Experimental results	0.166	0.186
Analytical Model results	0.182	0.205
Relative error	8.91%	10.52%

مقایسه‌ی نتایج تجربی با نتایج مدل تحلیلی نشان می‌دهد که در غلظت‌های لیپیدی کل ۱۰ و ۲۰ مول بر مترمکعب، خطای نتایج حل تحلیلی به ترتیب ۸/۹۱٪ و ۱۰/۵۲٪ است. باتوجه به عوامل

این ضریب برای غلظت‌های لیپیدی کل ۱۰ و ۲۰ مول بر مترمکعب به ترتیب ۰/۱۸۲۶ و ۰/۲۰۵۵ به دست می‌آید. همان‌طور که در مقدمه اشاره شد، ضریب یکنواختی مطلوب برای لیپوزوم‌هایی که به عنوان حامل‌های دارویی مورد استفاده قرار می‌گیرند، باید در محدوده ۰/۳ و کمتر باشد. افزایش این ضریب از مقدار یادشده، نشان‌دهنده‌ی ناهمگونی ابعادی لیپوزوم‌های تولیدشده است که می‌تواند منجر به مشکلاتی نظیر تفاوت در میزان پایداری لیپوزوم‌ها، ظرفیت کپسوله‌سازی مولکول‌های دارویی و همچنین نرخ انتقال دارو به غشاهای سلولی شود.

تاکنون با استفاده از مدل تحلیلی پیشنهادی و نرم‌افزار متلب، منحنی‌های توزیع اندازه لیپوزوم‌ها و ضریب یکنواختی آن‌ها محاسبه شدند. با این حال، لازم است که این مدل تحلیلی، اعتبارسنجی شود. به همین منظور، همان‌طور که در بخش پیشین توضیح داده شد، لیپوزوم‌هایی با دو غلظت لیپیدی کل تولید شدند. پس از تولید لیپوزوم‌ها و برای تعیین منحنی‌های توزیع اندازه و ضریب یکنواختی آن‌ها، از روش پراکندگی نور دینامیکی که اساس کار دستگاه زتاسایزر است، استفاده شد. این روش، غیرمخرب و سریع، قادر به اندازه‌گیری اندازه ذرات در محدوده چند نانومتر تا چند میکرون بدون نیاز به آماده‌سازی پیچیده بر روی نمونه‌ها است. در این دستگاه، نور لیزر به محلول حاوی لیپوزوم‌های تولیدشده تابانده می‌شود و نوسانات نور پراکنده‌شده ناشی از حرکات براونی ذرات تحلیل می‌گردد. تحلیل نورهای پراکنده‌شده توسط پردازشگر دیجیتال انجام می‌شود و در نهایت منحنی‌های توزیع اندازه لیپوزوم‌ها و سایر نتایج روی صفحه‌نمایش کامپیوتر نشان داده می‌شود. نتایج به دست آمده از دستگاه زتاسایزر بر روی نمونه‌های لیپوزومی تولیدشده در این پژوهش در شکل ۹ نشان داده شده‌اند. این نتایج نشان می‌دهند که ضریب یکنواختی برای غلظت لیپیدی کل ۱۰ مول بر مترمکعب برابر با ۰/۱۶۶ است. همچنین، بیشینه‌ی منحنی توزیع اندازه در ۱۱۰/۹۰ نانومتر مشاهده شد که نشان می‌دهد بیشتر لیپوزوم‌ها با این اندازه تولید شده‌اند. از آنجاکه ضریب یکنواختی به دست آمده کمتر از ۰/۳ است، محصول لیپوزومی تولیدشده برای کاربردهای دارورسانی مناسب ارزیابی می‌شود؛ بنابراین، کیفیت کلی محصول تولیدی در سطح «خوب» طبقه‌بندی شده است (شکل ۹-الف).

نتایج به دست آمده از دستگاه زتاسایزر برای حالت دوم آزمایش (غلظت لیپیدی کل ۲۰ مول بر مترمکعب) در شکل ۹-ب نشان داده شده است. در این حالت، ضریب یکنواختی ۰/۱۸۶ گزارش شده که نسبت به حالت قبل ۱۲/۰۵٪ افزایش یافته است. اگرچه افزایش ضریب یکنواختی مطلوب نیست، اما از آنجاکه این مقدار همچنان کمتر از حد مجاز ۰/۳ است، کیفیت محصول در این حالت نیز «خوب» ارزیابی می‌شود. افزایش ضریب یکنواختی در این حالت نشان‌دهنده‌ی پراکندگی بیشتر در توزیع اندازه‌ی لیپوزوم‌های تولیدشده با افزایش غلظت لیپیدی کل است.

تأییدیه اخلاقی: محتویات علمی این مقاله حاصل پژوهش نویسندگان است و در هیچ نشریه ایرانی و غیرایرانی منتشر نشده است.

تعارض منافع: مطالب این پژوهش هیچ تضاد یا تعارض منافی با فرد یا نهادی ندارد.

منابع

- [1] H. Daraee, A. Etemadi, M. Kouhi, S. Alimirzalu, and A. Akbarzadeh, "Application of liposomes in medicine and drug delivery," *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, vol. 44, pp. 381-91, 2016. doi: [10.3109/21691401.2014.953633](https://doi.org/10.3109/21691401.2014.953633)
- [2] P. Trucillo, "Drug carriers: Classification, administration, release profiles, and industrial approach," *Processes*, vol. 9, p. 470, 2021. doi: [10.3390/pr9030470](https://doi.org/10.3390/pr9030470)
- [3] D. Lombardo and M. A. Kiselev, "Methods of Liposomes Preparation: Formation and Control Factors of Versatile Nanocarriers for Biomedical and Nanomedicine Application," *Pharmaceutics*, vol. 14, 2022. doi: [10.3390/pharmaceutics14030543](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030543)
- [4] M. h. Salehi Mojarrad, R. Hasanzadeh Ghasemi, and M. Keramati, "Nano-mechanical Study of a Bio Nano Actuator Under External Forces," *Modares Mechanical Engineering*, vol. 17, pp. 457-462, 2018.
- [5] A. D. Bangham, M. M. Standish, and J. C. Watkins, "Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids," *J Mol Biol*, vol. 13, pp. 238-252, 1965. doi: [10.1016/s0022-2836\(65\)80093-6](https://doi.org/10.1016/s0022-2836(65)80093-6)
- [6] Y. Barenholz, "Doxil(R)--the first FDA-approved nano-drug: lessons learned," *J Control Release*, vol. 160, pp. 117-34, Jun 10 2012. doi: [10.1016/j.jconrel.2012.03.020](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2012.03.020)
- [7] M. J. Ernsting, M. Murakami, A. Roy, and S.-D. Li, "Factors controlling the pharmacokinetics, biodistribution and intratumoral penetration of nanoparticles," *Journal of controlled release*, vol. 172, pp. 782-794, 2013. doi: [10.1016/j.jconrel.2013.09.013](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2013.09.013)
- [8] D. Liu, A. Mori, and L. Huang, "Role of liposome size and RES blockade in controlling biodistribution and tumor uptake of GM1-containing liposomes," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, vol. 1104, pp. 95-101, 1992. doi: [10.1016/0005-2736\(92\)90136-A](https://doi.org/10.1016/0005-2736(92)90136-A)
- [9] M. Danaei, M. Dehghankhold, S. Ataei, F. Hasanzadeh Davarani, R. Javanmard, A. Dokhani, et al., "Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems," *Pharmaceutics*, vol. 10, p. 57, 2018. doi: [10.3390/pharmaceutics10020057](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics10020057)
- [10] D. van Swaay and A. de Mello, "Microfluidic methods for forming liposomes," *Lab Chip*, vol. 13, pp. 752-67, Mar 7 2013. doi: [10.1039/C2LC41121K](https://doi.org/10.1039/C2LC41121K)
- [11] L. A. Meure, N. R. Foster, and F. Dehghani, "Conventional and dense gas techniques for the production of liposomes: a review," *Aaps Pharmscitech*, vol. 9, pp. 798-809, 2008. doi: [10.1208/s12249-008-9097-x](https://doi.org/10.1208/s12249-008-9097-x)
- [12] H. Zhang, J. Yang, R. Sun, S. Han, Z. Yang, and L. Teng, "Microfluidics for nano-drug delivery systems: From fundamentals to industrialization," *Acta Pharm Sin B*, vol. 13, pp. 3277-3299, Aug 2023. doi: [10.1016/j.apsb.2023.01.018](https://doi.org/10.1016/j.apsb.2023.01.018)

متعددی که در ابعاد مولکولی هنگام تشکیل لیپوزوم‌ها در میکرومیکسرها رخ می‌دهند که امکان مدل‌سازی همه آن‌ها در مدل تحلیلی وجود ندارد، این مقادیر خطا قابل قبول هستند. باوجود این مقادیر خطا، ضرایب یکنواختی به‌دست‌آمده از مدل تحلیلی همچنان در محدوده قابل قبول (کمتر یا برابر با ۰/۳) قرار دارند.

۶- نتیجه‌گیری

در سال‌های اخیر، لیپوزوم‌ها به‌عنوان نانوحامل‌های دارویی، با بهره‌گیری از پیشرفت‌های فناوری میکروفلوئیدیک مبتنی بر اصول مهندسی مکانیک، به یکی از ارکان اصلی سامانه‌های نوین دارورسانی تبدیل شده‌اند. استفاده از لیپوزوم‌ها به‌عنوان حامل‌های دارویی، بسیاری از چالش‌های روش‌های سنتی، نظیر حلالیت پایین، راندمان کم و عوارض جانبی خطرناک را برطرف کرده است. بااین‌حال، هر لیپوزومی برای دارورسانی مناسب نیست و مشخصه‌های ابعادی مانند اندازه و ضریب یکنواختی نقش کلیدی در کارآمدی آن‌ها ایفا می‌کنند. تعیین این مشخصه‌ها همچنان یکی از چالش‌های اصلی این حوزه است. روش‌های آزمایشگاهی، مانند روش پراکندگی نور دینامیکی، تنها پس از تولید لیپوزوم‌ها امکان اندازه‌گیری مشخصه‌های ابعادی آن‌ها را فراهم می‌کنند. این محدودیت در فرایند تولید لیپوزوم‌هایی باکیفیت مطلوب برای دارورسانی، به آزمون و خطا، اتلاف زمان و افزایش هزینه‌ها منجر می‌شود.

در این پژوهش، باهدف کاهش آزمون و خطا و هزینه‌ها در فرایندهای تجربی، مدلی تحلیلی مبتنی بر انرژی آزاد گیبس و آنتروپی‌های ناشی از آرایش و پخش مولکول‌های فسفولیپید ارائه شد که قادر به پیش‌بینی توزیع اندازه‌ی لیپوزوم‌ها و ضریب یکنواختی آن‌ها است. برای اعتبارسنجی نتایج مدل تحلیلی، لیپوزوم‌ها با استفاده از یک تراشه‌ی میکرومیکسری در دو غلظت لیپیدی کل ۱۰ و ۲۰ مول بر مترمکعب تولید و منحنی‌های توزیع اندازه و ضریب یکنواختی آن‌ها محاسبه شدند. نتایج تجربی، با استفاده از روش پراکندگی نور دینامیکی در دستگاه زتاسایزر، ضرایب یکنواختی ۰/۱۶۶ و ۰/۱۸۶ را برای غلظت‌های لیپیدی کل ۱۰ و ۲۰ مول بر مترمکعب نشان دادند که بیانگر همگن بودن اندازه‌ی لیپوزوم‌های تولیدشده است. مقایسه‌ی ضرایب یکنواختی حاصل از مدل تحلیلی با داده‌های تجربی، خطاهایی به ترتیب ۸/۹۱٪ و ۱۰/۵۲٪ را برای غلظت‌های ۱۰ و ۲۰ مول بر مترمکعب نشان داد. باتوجه‌به پیچیدگی فرایند تشکیل لیپوزوم‌ها در شرایط واقعی و عدم امکان لحاظ همه‌ی عوامل در مدل تحلیلی، این خطاها قابل قبول ارزیابی می‌شوند. در مجموع، مدل تحلیلی پیشنهادی می‌تواند به‌عنوان ابزاری مؤثر برای تخمین ضریب یکنواختی، به‌عنوان یکی از ویژگی‌های کلیدی در کاربردهای دارورسانی، مورد استفاده قرار گیرد.

- [26] A. Banejad, M. Passandideh-Fard, H. Niknam, M. J. M. Hosseini, and S. A. M. Shaegh, "Design, fabrication and experimental characterization of whole-thermoplastic microvalves and micropumps having micromilled liquid channels of rectangular and half-elliptical cross-sections," *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 301, p. 111713, 2020. [doi: 10.1016/j.sna.2019.111713](https://doi.org/10.1016/j.sna.2019.111713)
- [27] S. A. M. Shaegh, A. Pourmand, M. Nabavinia, H. Avci, A. Tamayol, P. Mostafalu, *et al.*, "Rapid prototyping of whole-thermoplastic microfluidics with built-in microvalves using laser ablation and thermal fusion bonding," *Sensors and Actuators B: Chemical*, vol. 255, pp. 100-109, 2018. [doi: 10.1016/j.snb.2017.07.138](https://doi.org/10.1016/j.snb.2017.07.138)
- [28] A. Ota, A. Mochizuki, K. Sou, and S. Takeoka, "Evaluation of a static mixer as a new microfluidic method for liposome formulation," *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, vol. 11, p. 1229829, 2023. [doi: 10.3389/fbioe.2023.1229829](https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1229829)
- [29] C. V. Kulkarni, "Calculating the 'chain splay' of amphiphilic molecules: Towards quantifying the molecular shapes," *Chemistry and Physics of Lipids*, vol. 218, pp. 16-21, 2019. [doi: 10.1016/j.chemphyslip.2018.11.004](https://doi.org/10.1016/j.chemphyslip.2018.11.004)
- [30] N. Raval, R. Maheshwari, D. Kalyane, S. R. Youngren-Ortiz, M. B. Chougule, and R. K. Tekade, "Importance of physicochemical characterization of nanoparticles in pharmaceutical product development," in *Basic fundamentals of drug delivery*, ed: Elsevier, 2019, pp. 369-400. [doi: 10.1016/B978-0-12-817909-3.00010-8](https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817909-3.00010-8)

ضمیمه‌ی الف

اثبات مؤلفه‌ی سوم در رابطه‌ی (۳):

$$\Omega = \frac{N!}{\prod_{m=1}^M \prod_{h=0}^{2R_s} (mn_{m,h})!} \quad (\text{الف-1})$$

$$S_{con} = K_B \ln \left(\frac{N!}{\prod_{m=1}^M \prod_{h=0}^{2R_s} (mn_{m,h})!} \right) \quad (\text{الف-2})$$

$$S_{con} = K_B \left[\ln N! - \ln \prod_{m=1}^M \prod_{h=0}^{2R_s} mn_{m,h}! \right] \quad (\text{الف-3})$$

$$S_{con} = K_B \left[\ln N! - \sum_{m=1}^M \sum_{h=0}^{2R_s} \ln (mn_{m,h})! \right] \quad (\text{الف-4})$$

$$\begin{aligned} S_{con} &= K_B \left[(N \ln N - N) \right. \\ &\quad \left. - \sum_{m=1}^M \sum_{h=0}^{2R_s} (mn_{m,h} \ln mn_{m,h} - mn_{m,h}) \right] \end{aligned} \quad (\text{الف-5})$$

$$\begin{aligned} S_{con} &= K_B \left[N \ln N - N - \sum_{m=1}^M \sum_{h=0}^{2R_s} (mn_{m,h} \ln mn_{m,h}) \right. \\ &\quad \left. + \sum_{m=1}^M \sum_{h=0}^{2R_s} (mn_{m,h}) \right] \end{aligned} \quad (\text{الف-6})$$

- [13] D. Lombardo and M. A. Kiselev, "Methods of liposomes preparation: formation and control factors of versatile nanocarriers for biomedical and nanomedicine application," *Pharmaceutics*, vol. 14, p. 543, 2022. [doi: 10.3390/pharmaceutics14030543](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14030543)
- [14] K. Osooli-Bostanabad, S. Puliga, D. R. Serrano, A. Bucci, G. Halbert, and A. Lalatsa, "Microfluidic manufacture of lipid-based nanomedicines," *Pharmaceutics*, vol. 14, p. 1940, 2022. [doi: 10.3390/pharmaceutics14091940](https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14091940)
- [15] B. Yu, R. J. Lee, and L. J. Lee, "Microfluidic methods for production of liposomes," *Methods in enzymology*, vol. 465, pp. 129-141, 2009. [doi: 10.1016/S0076-6879\(09\)65007-2](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(09)65007-2)
- [16] M. Bayareh, M. N. Ashani, and A. Usefian, "Active and passive micromixers: A comprehensive review," *Chemical Engineering and Processing - Process Intensification*, vol. 147, p. 107771, 2020. [doi: 10.1016/j.cep.2019.107771](https://doi.org/10.1016/j.cep.2019.107771)
- [17] E. Nematollahi and M. Sefid, "Numerical Study of Mixing Two-Components Non-Newtonian Fluids in Double T-Shaped Micromixers and Multiple T-Shaped with Aligned and Non-Aligned Inputs," *Modares Mechanical Engineering*, vol. 19, pp. 833-844, 2019.
- [18] Z. Li, B. Zhang, D. Dang, X. Yang, W. Yang, and W. Liang, "A review of microfluidic-based mixing methods," *Sensors and Actuators A: Physical*, vol. 344, p. 113757, 2022. [doi: 10.1016/j.sna.2022.113757](https://doi.org/10.1016/j.sna.2022.113757)
- [19] S. Egelhaaf, E. Wehrli, M. Müller, M. Adrian, and P. Schurtenberger, "Determination of the size distribution of lecithin liposomes: a comparative study using freeze fracture, cryoelectron microscopy and dynamic light scattering," *Journal of Microscopy*, vol. 184, pp. 214-228, 1996. [doi: 10.1046/j.1365-2818.1996.1280687.x](https://doi.org/10.1046/j.1365-2818.1996.1280687.x)
- [20] R. Eugster, M. Orsi, G. Buttitta, N. Serafini, M. Tiboni, L. Casettari, *et al.*, "Leveraging machine learning to streamline the development of liposomal drug delivery systems," *Journal of Controlled Release*, vol. 376, pp. 1025-1038, 2024. [doi: 10.1016/j.jconrel.2024.10.065](https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2024.10.065)
- [21] H. Yuan, C. Huang, J. Li, G. Lykotrafitis, and S. Zhang, "One-particle-thick, solvent-free, coarse-grained model for biological and biomimetic fluid membranes," *Physical review E*, vol. 82, p. 011905, 2010. [doi: 10.1103/PhysRevE.82.011905](https://doi.org/10.1103/PhysRevE.82.011905)
- [22] T. Weiss, T. Narayanan, C. Wolf, M. Gradzielski, P. Panine, S. Finet, *et al.*, "Dynamics of the self-assembly of unilamellar vesicles," *Physical review letters*, vol. 94, p. 038303, 2005. [doi: 10.1103/PhysRevLett.94.038303](https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.94.038303)
- [23] C. Huang, D. Quinn, Y. Sadovskiy, S. Suresh, and K. J. Hsia, "Formation and size distribution of self-assembled vesicles," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 114, pp. 2910-2915, 2017. [doi: 10.1073/pnas.1702065114](https://doi.org/10.1073/pnas.1702065114)
- [24] M. Hu, J. J. Briguglio, and M. Deserno, "Determining the Gaussian curvature modulus of lipid membranes in simulations," *Biophysical journal*, vol. 102, pp. 1403-1410, 2012. [doi: 10.1016/j.bpj.2012.02.013](https://doi.org/10.1016/j.bpj.2012.02.013)
- [25] M. Doktorova, D. Harries, and G. Khelashvili, "Determination of bending rigidity and tilt modulus of lipid membranes from real-space fluctuation analysis of molecular dynamics simulations," *Physical Chemistry Chemical Physics*, vol. 19, pp. 16806-16818, 2017. [doi: 10.1039/c7cp01921a](https://doi.org/10.1039/c7cp01921a)

به علت اینکه غلظت مولکول‌های لیپیدی در حلال اندک است و محلول یک محلول رقیق است می‌توان فرض کرد که کسر حجمی غلظت بسیار از یک کوچک‌تر است:

$$\varphi \ll 1 \Rightarrow 1 - \varphi \approx 1 \quad (\text{الف-26})$$

$$\ln(1 - \varphi) = -\varphi - \frac{\varphi^2}{2} - \frac{\varphi^3}{3} - \dots, \quad 0 < \varphi < 1 \quad (\text{الف-27})$$

$$\ln(1 - \varphi) \approx -\varphi \quad (\text{الف-28})$$

$$S_{diss} = -K_B N_{tot} (\varphi \ln \varphi - \varphi) \quad (\text{الف-29})$$

$$S_{diss} = -K_B N_{tot} \varphi \ln \varphi \quad (\text{الف-30})$$

$$S_{diss} = -K_B N \ln \varphi \quad (\text{الف-31})$$

ضمیمه‌ی ب

$$\begin{aligned} \frac{\partial G}{\partial n_{m,h}} = & \gamma C_{m,h} + \frac{mA_0}{2} \left(\frac{2k_b}{R^2} + \frac{k_G}{R^2} + \frac{B}{R^4} \right) \\ & - \frac{\alpha}{2} K_B T \ln \left(\frac{m}{2} \right) \\ & + \frac{\partial}{\partial n_{m,h}} \left(-K_B T N \ln(N) - K_B T N \ln(\phi) \right) \quad (\text{ب-1}) \\ & + \frac{\partial}{\partial n_{m,h}} \left((K_B T) \sum_{m=1}^M \sum_{h=0}^{2R_s} (mn_{m,h}) \ln(mn_{m,h}) \right) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial G}{\partial n_{m,h}} = & \gamma C_{m,h} + \frac{mA_0}{2} \left(\frac{2k_b}{R^2} + \frac{k_G}{R^2} + \frac{B}{R^4} \right) \\ & - \frac{\alpha}{2} K_B T \ln \left(\frac{m}{2} \right) + \frac{\partial}{\partial n_{m,h}} \left(-K_B T N \ln(N\phi) \right) \quad (\text{ب-2}) \\ & + K_B T m \left(\ln(mn_{m,h}) + n_{m,h} \frac{m}{mn_{m,h}} \right) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{\partial G}{\partial n_{m,h}} = & \gamma C_{m,h} + \frac{mA_0}{2} \left(\frac{2k_b}{R^2} + \frac{k_G}{R^2} + \frac{B}{R^4} \right) \\ & - \frac{\alpha}{2} K_B T \ln \left(\frac{m}{2} \right) - K_B T \frac{\partial}{\partial n_{m,h}} (N \ln(N\phi)) \quad (\text{ب-3}) \\ & + K_B T m (\ln(mn_{m,h}) + 1) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & \frac{\alpha}{2} K_B T \ln \left(\frac{m}{2} \right) - \gamma C_{m,h} - \frac{mA_0}{2} \left(\frac{2k_b}{R^2} + \frac{k_G}{R^2} + \frac{B}{R^4} \right) \\ & = -K_B T \frac{\partial}{\partial n_{m,h}} (N \ln(N\phi)) + K_B T m \ln(mn_{m,h}) \quad (\text{ب-4}) \\ & \quad + K_B T m \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & \frac{\alpha}{2} K_B T \ln \left(\frac{m}{2} \right) - \gamma C_{m,h} - \frac{mA_0}{2} \left(\frac{2k_b}{R^2} + \frac{k_G}{R^2} + \frac{B}{R^4} \right) \\ & = -K_B T \frac{\partial}{\partial n_{m,h}} (mn_{m,h} \ln(mn_{m,h} \phi)) \quad (\text{ب-5}) \\ & \quad + K_B T m \ln(mn_{m,h}) + K_B T m \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} S_{con} = & K_B \left[N \ln N - N - \sum_{m=1}^M \sum_{h=0}^{2R_s} (mn_{m,h} \ln mn_{m,h}) \right. \\ & \left. + N \right] \quad (\text{الف-7}) \end{aligned}$$

$$S_{con} = K_B \left[N \ln N - \sum_{m=1}^M \sum_{h=0}^{2R_s} (mn_{m,h} \ln mn_{m,h}) \right] \quad (\text{الف-8})$$

اثبات مؤلفه‌ی چهارم در رابطه‌ی (۳)

$$\varphi = \frac{N_{V_0}}{V_{tot}} \quad (\text{الف-9})$$

$$V_{tot} = v_0 N_{tot} \quad (\text{الف-10})$$

$$N = \varphi N_{tot} \quad (\text{الف-11})$$

$$S_{diss} = K_B \ln(\Omega) \quad (\text{الف-12})$$

$$\Omega = \frac{N_{tot}!}{N! (N_{tot} - N)!} \quad (\text{الف-13})$$

$$\ln \Omega = \ln N_{tot}! - \ln N! - \ln(N_{tot} - N)! \quad (\text{الف-14})$$

$$\begin{aligned} \ln \Omega = & N_{tot} \ln N_{tot} - N_{tot} - (N \ln N - N) \\ & - ((N_{tot} - N) \ln(N_{tot} - N) - (N_{tot} - N)) \quad (\text{الف-15}) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \ln \Omega = & N_{tot} \ln N_{tot} - N_{tot} - N \ln N + N \\ & - (N_{tot} - N) \ln(N_{tot} - N) + N_{tot} - N \quad (\text{الف-16}) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \ln \Omega = & N_{tot} \ln N_{tot} - N \ln N \\ & - (N_{tot} - N) \ln(N_{tot} - N) \quad (\text{الف-17}) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \ln \Omega = & N_{tot} \ln N_{tot} - \varphi N_{tot} \ln(\varphi N_{tot}) \\ & - (N_{tot} - \varphi N_{tot}) \ln(N_{tot} - \varphi N_{tot}) \quad (\text{الف-18}) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \ln \Omega = & N_{tot} \ln N_{tot} - \varphi N_{tot} \ln(\varphi N_{tot}) \\ & - N_{tot} (1 - \varphi) \ln(N_{tot} (1 - \varphi)) \quad (\text{الف-19}) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \ln \Omega = & N_{tot} \ln N_{tot} - \varphi N_{tot} (\ln \varphi + \ln N_{tot}) \\ & - N_{tot} (1 - \varphi) (\ln(1 - \varphi) + \ln N_{tot}) \quad (\text{الف-20}) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \ln \Omega = & N_{tot} \ln N_{tot} - \varphi N_{tot} \ln \varphi - \varphi N_{tot} \ln N_{tot} \\ & - N_{tot} (1 - \varphi) \ln(1 - \varphi) \\ & - N_{tot} (1 - \varphi) \ln N_{tot} \quad (\text{الف-21}) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \ln \Omega = & N_{tot} \ln N_{tot} - \varphi N_{tot} \ln \varphi - \varphi N_{tot} \ln N_{tot} \\ & - N_{tot} (1 - \varphi) \ln(1 - \varphi) \\ & - N_{tot} \ln N_{tot} + \varphi N_{tot} \ln N_{tot} \quad (\text{الف-22}) \end{aligned}$$

$$\ln \Omega = -\varphi N_{tot} \ln \varphi - N_{tot} (1 - \varphi) \ln(1 - \varphi) \quad (\text{الف-23})$$

$$\begin{aligned} S_{diss} = & K_B (-\varphi N_{tot} \ln \varphi \\ & - N_{tot} (1 - \varphi) \ln(1 - \varphi)) \quad (\text{الف-24}) \end{aligned}$$

$$S_{diss} = -K_B N_{tot} (\varphi \ln \varphi + (1 - \varphi) \ln(1 - \varphi)) \quad (\text{الف-25})$$

$$\begin{aligned} & \frac{\alpha}{2} K_B T \ln\left(\frac{m}{2}\right) - \gamma C_{m,h} - \frac{mA_0}{2} \left(\frac{2k_b}{R^2} + \frac{k_G}{R^2} + \frac{B}{R^4} \right) \\ & = -K_B T m \left(\ln(\phi m n_{m,h}) + n_{m,h} \frac{\phi m}{\phi m n_{m,h}} \right) \quad (\text{ب-۶}) \\ & \quad + K_B T m \ln(m n_{m,h}) + K_B T m \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} & \frac{\alpha}{2} K_B T \ln\left(\frac{m}{2}\right) - \gamma C_{m,h} - \frac{mA_0}{2} \left(\frac{2k_b}{R^2} + \frac{k_G}{R^2} + \frac{B}{R^4} \right) \\ & = K_B T m \ln\left(\frac{m n_{m,h}}{N \phi}\right) \quad (\text{ب-۷}) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \ln\left(\frac{m n_{m,h}}{N \phi}\right) &= \frac{1}{K_B T m} \left[\frac{\alpha}{2} K_B T \ln\left(\frac{m}{2}\right) - \gamma C_{m,h} \right. \\ & \quad \left. - \frac{mA_0}{2} \left(\frac{2k_b}{R^2} + \frac{k_G}{R^2} + \frac{B}{R^4} \right) \right] \quad (\text{ب-۸}) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \frac{m n_{m,h}}{N \phi} &= \exp \left\{ \frac{1}{K_B T m} \left[\frac{\alpha}{2} K_B T \ln\left(\frac{m}{2}\right) - \gamma C_{m,h} \right. \right. \\ & \quad \left. \left. - \frac{mA_0}{2} \left(\frac{2k_b}{R^2} + \frac{k_G}{R^2} + \frac{B}{R^4} \right) \right] \right\} \quad (\text{ب-۹}) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} n_{m,h} &= \frac{N \phi}{m} \exp \left\{ \frac{1}{K_B T m} \left[\frac{\alpha}{2} K_B T \ln\left(\frac{m}{2}\right) - \gamma C_{m,h} \right. \right. \\ & \quad \left. \left. - \frac{mA_0}{2} \left(\frac{2k_b}{R^2} + \frac{k_G}{R^2} + \frac{B}{R^4} \right) \right] \right\} \quad (\text{ب-۱۰}) \end{aligned}$$

$$\pi R_1^2 = 4\pi R_s^2 \Rightarrow \frac{1}{2} m A_0 = 4\pi R_s^2 \quad (\text{ب-۱۱})$$

$$m = \frac{8\pi R_s^2}{A_0} \quad (\text{ب-۱۲})$$

فرضیات زیر را در نظر می‌گیریم:

$$h = 2R_s, \quad k_G = -k_b, \quad L_c = \sqrt{\frac{B}{k_b}}, \quad \gamma C_{m,h} = 0$$

$$\begin{aligned} n_{m,R_s} &= \frac{N \phi}{m} \exp \left\{ \frac{\alpha}{2m} \ln\left(\frac{m}{2}\right) \right. \\ & \quad \left. - \frac{mA_0}{2K_B T m} \left(\frac{2k_b}{R_s^2} - \frac{k_b}{R_s^2} + \frac{B}{R_s^4} \right) \right\} \quad (\text{ب-۱۳}) \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} n_{R_s} &= N \phi \frac{A_0}{8\pi} \times \frac{1}{R_s^2} \exp \left\{ -\frac{c_2 A_0}{2} \times \frac{1}{R_s^2} \left(1 + \frac{L_c^2}{R_s^2} \right) \right. \\ & \quad \left. + \frac{A_0}{16\pi} \times \frac{\alpha}{R_s^2} \times \ln\left(\frac{4\pi R_s^2}{A_0}\right) \right\} \quad (\text{ب-۱۴}) \end{aligned}$$