مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال هشتم، شماره 1، بهار 1392، صفحات 230-219

تهیه و ارزیابی ویژگی‌های نانولیپوزوم‌های حاوی ایکوزاپنتاانوئیک اسید و دوکوزاهگزاانوئیک اسید به روش‌های اکستروژن و سونیکاسیون میله‌ای

زهرا هادیان[1]، محمد علی سحری[2]، حمیدرضا مقیمی[3]، محسن برزگر[4]، سلیمان عباسی[4]

1- دانشجوی دکتری تخصصی تکنولوژی مواد غذایی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس و عضو هیات علمی گروه تحقیقات صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
2- نویسنده مسئول: استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس پست الکترونی: sahari@modares.ac.ir
3- استاد گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی
4-دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس

تاریخ دریافت: 91/11/9 تاریخ پذیرش: 92/2/20

چکیده

سابقه و هدف: تحقیقات موجود حاکی از رابطه‌ای معکوس میان مصرف اسیدهای چرب غیراشباعی امگا 3 و خطر ناشی از بیماری قلبی عروقی (Cardiovascular disease) است و مصرف مکمل‌های حاوی ایکوزاپنتاانوئیک اسید EPA (Eicosapentaenoic acid) و دوکوزاهگزاانوئیک اسید DHA (Docosahexaenoic acid) در پیشگیری از این بیماری توصیه شده است. نانوحامل‌های لیپوزومی می‌توانند علاوه بر افزایش پایداری اسیدهای چرب غیراشباعی امگا 3 موجب زیست دسترسی بیشتر آن‌ها شوند. این پژوهش با هدف تهیه‌ی نانولیپوزوم‌های حاوی EPA و DHA به روش‌های اکستروژن و سونیکاسیون میله‌ای و ارزیابی ویژگی‌های آن‌ها انجام شد.

مواد و روش‌ها: ابتدا لیپوزوم خالی از فسفولیپید دی‌پالمیتوئیل‌فسفاتیدیل‌کولین DPPC به روش فیلم لایه نازک تهیه شد. پس از درون‌پوشانی EPA و DHA به روش‌های اکستروژن و سونیکاسیون میله‌ای، نانولیپوزوم‌ها از لحاظ اندازه‌ی ذره ای، توزیع اندازه‌ی ذره‌ای، پتانسیل زتا، شکل، درصد درون‌پوشانی اسیدهای چرب و ترکیبات آلدئیدی فرّار بررسی شدند.

یافته‌ها: با وجود شباهت مقادیر میانگین اندازه‌ی ذره ای، توزیع اندازه‌ی ذره ای و پتانسیل زتا، کارایی درون‌پوشانی EPA و DHA در نانولیپوزوم‌های تهیه شده به روش سونیکاسیون میله‌ای افزایش معنی‌داری نسبت به روش اکستروژن داشت ($p<0/01$). مطالعات میکروسکپ الکترونی عبوری، نانولیپوزوم‌های تهیه شده به هر دو روش را کروی و هموژن نشان داد. نانولیپوزوم های تهیه شده به روش سونیکاسیون توزیع اندازه‌ی ذره‌ای مناسب با میانگین 2/3 ± 90/1 نانومتر و پتانسیل زتا 2/4 ± 43/8- میلی ولت داشتند. درصد درون‌پوشانی EPA و DHA به ترتیب 5/2 ± 56/9 درصد و 1/8 ± 38/6 درصد بود. ترکیب آلدئیدی فرّار اصلی در هر دو روش پروپانال (به عنوان شاخص اکسیداسیون ثانویه‌ی اسیدهای چرب امگا 3) بود.

نتیجه گیری: روش سونیکاسیون میله‌ای برای لیپوزوم‌های از قبل تهیه شده به درون‌پوشانی قابل توجه EPA و DHA در غشای نانولیپوزومی در مقایسه با روش اکستروژن منجر شد. بارگذاری بهینه‌ی EPA و DHA در لیپوزوم علاوه بر این که به ویژگی‌های فیزیکی‌شیمیایی این ترکیبات بستگی دارد، بلکه ترکیب غشای دولایه و روش ساخت آن از عوامل مؤثر و مهم هستند. بنابراین، درون‌پوشانیِ توأم EPA و DHA در نانولیپوزوم‌های از قبل تهیه شده به روش سونیکاسیون میله‌ای می‌تواند یک حامل مناسب با کارایی لازم برای بررسی‌های بیشتر و انجام مطالعات آینده برای سایر ترکیبات زیست فعال ارائه کند.

واژگان کلیدی: نانولیپوزوم، ایکوزاپنتاانوئیک اسید، دکوزاهگزاانوئیک اسید، اکستروژن، سونیکاسیون میله‌ای

• مقدمه

اسیدهای چرب غیراشباعی با پیوندهای متعدد در شکل‌های آلفالینولئیک اسید (LNA, 18:3 n-3) ایکوزاپنتاانوئیک اسید (EPA, 22:6 n-3) و دوکوزاهگزاانوئیک اسید (DHA, 22:6 n-3) وجود دارند. طی چند دهه‌ی اخیر، مطالعات بالینی روی انسان‌ها ثابت کرده که اصلاح محتوای اسیدهای چرب رژیم غذایی می‌تواند بر نمایه‌ی لیپوپروتئین/ لیپید مؤثر باشد. از دهه‌ی 1970 مطالعات متعددی در زمینه‌ی اثرات سودمند مشتقات اسیدهای چرب امگا 3 در پیشگیری از بیماری‌ها به ویژه بیماری قلبی عروقی صورت گرفته و محققان را در جهت

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

ارائه‌ی فرمولاسیون‌ها و مکمل‌های رژیمی این ترکیبات با استفاده از روش‌های مختلف مانند ریزپوشینه کردن ترغیب کرده است.

بررسی‌های متعدد انجام شده در جوامع مختلف نشان می‌دهد که مصرف روزانه 1 گرم روغن ماهی (حاوی 840 میلی‌گرم DHA+ EPA) میزان مرگ ناگهانی بیماران مبتلا به بیماری عروق قلبی را به طور چشمگیری کاهش می‌دهد. بنابراین، مصرف این مکمل را همراه با داروهای ضدانعقادی توصیه کرده‌اند (3-1). *سازمان غذا و داروی آمریکا* (FDA) به دلیل وجود ترکیباتی مانند بی‌فنیل‌های‌پلی‌کلرینه (Polychlorinated biphenyls = PCBs)، جیوه و سایر آلاینده‌ها در ماهی، دریافت این اسیدهای چرب را صرفاً از طریق مصرف ماهی توصیه نمی‌کند و به دلیل اثربخشی مصرف مکمل‌های حاوی EPA و DHA در پیشگیری از بیماری قلبی عروقی در افراد دارای تری‌گلیسرید بالا Lovaza (Omacor) را به عنوان یک مکمل دارویی اسیدهای چرب امگا 3 تأیید کرده است (6-4).

ماهیت غیراشباعی EPA و DHA موجب حساسیت این اسیدهای چرب به اکسیداسیون در شرایط محیطی است. هیدروپراکسیدها محصولات حاصل از اکسیداسیون اولیه‌ی EPA و DHA هستند که به ترکیبات ثانویه‌ی اکسیداسیون مانند ترکیبات آلدئیدی فرار تجزیه می‌شوند. با استفاده از کپسول یا درون‌پوشانی این اسیدهای چرب می‌توان سدی برای جلوگیری از واکنش این ترکیبات با عوامل کاهنده ایجاد کرد. در طراحی کپسول باید مکان‌هایی را برای شناختن سلول هدف و پایداری در برابر تغییرات pH دستگاه گوارش را با افزودن ترکیبات شیمیایی یا سایر گروه‌های محافظت‌کننده فراهم کرد. امروزه، لیپوزوم‌ها به عنوان سیستم‌های حامل، محدوده‌ی وسیعی از ترکیبات زیست فعال هستند که در صنایع غذایی، دارویی و کشاورزی کاربردهای مختلفی دارند (9-7). لیپوزوم‌ها وزیکول‌های بسیار کوچکی هستند که از یک حفره‌ی مرکزی حاوی آب یا محلول آبی یا یک یا چند دولایه‌ی فسفولیپیدی تشکیل شده‌اند. بنابراین، می‌توانند انواع بیوملکول‌ها را در خود بارگذاری کنند و پایداری آن‌ها را افزایش دهند. لیپوزوم ها از لیپیدهای طبیعی ساخته می شوند. پس سمی نیستند و ضمن داشتن زیست تخریب‌پذیری (biodegradable) مناسب موجب تحریک سیستم ایمنی نمی‌شوند. از دیگر مزایای لیپوزوم‌ها می‌توان به ویژگی انحلال‌پذیری، آزاد سازی کنترل شده، جهت دار و هدفمند انواع ترکیبات آب‌گریز و آب‌دوست، نفوذ و عبور آسان‌تر از غشا اشاره کرد. تحقیقات نشان داده که فسفولیپیدها فعالیت آنتی‌اکسیدانی دارند و با این اثر سینرژیستی از روغن ماهی محافظت می‌کنند. به‌علاوه، درون‌پوشانی اسیدهای چرب امگا 3 در لیپوزوم موجب بهبود پایداری آن‌ها نسبت به اکسیداسیون می‌شود. با افزایش پایداری و کاهش بوی نامطلوب ناشی از ترکیبات فرار اکسیداسیون ثانویه، بوی روغن ماهی بهبود می‌یابد. صرف نظر از نحوه‌ی رساندن لیپوزوم ها به بافت هدف، لیپوزوم می‌تواند در شرایط مناسب پایداری ترکیب محبوس شده در داخل آن را بیشتر کند و میزان کافی از آن برای اثربخشی وجود خواهد داشت. به دلیل مزایای بسیار، استفاده از لیپوزوم‌ها به عنوان حامل‌های مناسب بیوملکول‌های متعدد و هم چنین با تأیید مزایای اثرات درمانی ترکیبات بارگذاری شده در لیپوزوم‌ها نسبت به مصرف شکل آزاد آن‌ها FDA فراورده‌های متعددی از این حامل‌ها را تأیید کرده است (13-10).

روش های گوناگونی برای ساخت لیپوزوم ها وجود دارد، مانند: آب‌پوشانی لایه نازک (thin layer film hydration)، تزریق اتانول، حذف مواد شوینده، روش حرارتی و تبخیر فاز معکوس (reverse phase evaporation) می‌باشند (15، 14). پژوهش‌های انجام شده نشان داده که روش‌های مورد استفاده برای تهیه‌ی لیپوزوم‌ها اثر چشمگیری بر ویژگی‌های فیزیکی مانند اندازه و کارایی درون‌پوشانی ترکیبات زیست فعال دارد. ویژگی‌های فیزیکی لیپوزوم‌ها نقش مهمی در تبیین کاربرد آن‌ها ایفا می‌کند. اندازه‌ی ذره‌ای و شارژ سطحی ذرات از مهم‌ترین عوامل دستیابی به یک فراورده‌ی پایدار هستند. با کاهش اندازه‌ی ذره‌ای می‌توان مساحت سطحی ویژه را افزایش داد و به یک ترکیب زیست فعال با دسترسی زیست‌مطلوب دست یافت (18، 17).

روش‌های اکستروژن و سونیکاسیون میله‌ای روش‌های مناسبی برای کاهش اندازه‌ی ذره‌ای لیپوزوم ها هستند. روش اکستروژن برای تهیه‌ی سوسپانسیون‌های وزیکولی نسبتاً هموژن لیپوزوم‌های تک‌جداره‌ی کوچک و بزرگ با اندازه‌ی ذرات 50 - 25 nm به کار می‌رود. در این روش یک پراکندگی رقیق از وزیکول‌های چندجداره‌ی بزرگ MLVs (Multilamellar Vesicles) به دفعات مکرر در دمای حدود 10°C بالاتر از دمای انتقال فاز فسفولیپید و تحت فشار پایین از منافذ غشای پلی‌کربنات رد می‌شود. این منافذ تقریباً سیلندری شکل بوده و وزیکول‌ها که از

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

این منافذ، بزرگ‌تر هستند، هنگام عبور از آن‌ها دچار کاهش اندازه می‌شوند. وزیکول‌هایی که کوچک‌تر از منافذ هستند، بدون تغییر از آن رد می‌شوند. در روش سونیکاسیون میله‌ای، پراکندگی‌های رقیق حاوی MLVs تحت تأثیر امواج فراصوت پروب قرار می‌گیرند که با اعمال فشار موضعی باعث به کاهش اندازه‌ی ذرات MLVs و تشکیل وزیکول‌های کوچک‌تر تک‌جداره یا چندجداره می‌شود (21-19).

هدف از این تحقیق، امکان تهیه‌ی فرمولاسیون نانولیپوزومی EPA و DHA اسید با استفاده از دو روش اکستروژن و سونیکاسیون میله‌ای و ارزیابی این روش‌ها با بررسی ویژگی‌های فیزیکی‌شیمیایی لیپوزوم‌های تهیه شده شامل: تعیین اندازه، توزیع اندازه‌ی ذره‌ای PDI (polydispersity index)، پتانسیل زتا (potential zeta)، شکل و کارایی درون‌پوشانی اسیدهای چرب بود. به منظور بررسی میزان اثر درون‌پوشانی ساختار فسفولیپیدی تهیه شده بر پایداری EPA و DHA و محافظت از اکسیداسیون آن‌ها ترکیبات فرار آلدئیدیِ حاصل از اکسیداسیون ثانویه (پروپانال، پنتانال، هگزانال و هپتانال) تعیین شد.

• مواد و روش‌ها

لیپیدهای مورد استفاده در این تحقیق شامل دی‌پالمیتوئیل‌فسفاتیدیل‌کولین DPPC، دی‌استئاریل-فسفاتیدیل‌کولین DSPC و دی‌لورئیل فسفاتیدیل اتانول‌آمین DLPE با خلوص 90% از شرکت *Lipoid* (آلمان) تهیه شد. EPA و DHA با خلوص 99%، بافرفسفات (pH =7/4)، سفادکس G-50 و 2- و 5- دی‌متیل‌فوران از شرکت *Sigma* (آمریکا) خریداری شد. کاغذ صافی پلی‌کربنات از شرکت *Maidstone* (انگلستان) پروپانال، پنتانال، هگزانال، هپتانال، ان‌دودکان با خلوص 99% ، برن‌تری‌فلوراید 12%، پنتادکانوئیک اسید و سایر مواد شیمیایی با خلوص از شرکت *Merck* (آلمان) تهیه شد. این پژوهش به روش اکتشافی (Exploratory survey) انجام شد.

مراحل تهیه‌ی فرمولاسیون لیپوزومی

روش ساخت لیپوزوم و انتخاب فرمول بهینه: لیپوزوم‌های MLV بر اساس روش آب‌پوشانی لایه نازک بنگهام (Bangham thin-film hydration) تهیه شدند (22). پس از استفاده از فسفولیپیدهای مختلف DLPE، DSPC و DPPC در تهیه‌ی فرمولاسیون‌های لیپوزومی و ارزیابی نتایج حاصل از اندازه‌ی ذره‌ای و کارایی درون‌پوشانی، فسفولیپید DPPC در تهیه‌ی فرمولاسیون بهینه به کار رفت. به منظور تهیه لیپوزوم‌های MLV به روش آب‌پوشانی لایه نازک، ابتدا با توزین دقیق DPPC (25/7 میلی‌گرم به ازای هر میلی‌لیتر) و افزودن حلال‌های کلروفرم و متانول (نسبت 2 به 1) کاملاً حل شد. سپس حلال آلی در دستگاه روتاری evaporator با سرعت 150 rpm در دمای 50°C و تحت خلأ تبخیر شد و با تشکیل فیلم نازک لیپیدی، تبخیر حداقل به مدت 2 ساعت ادامه یافت. پس از افزودن بافرفسفات (50mM, pH = 7/4) و اسیدهای چرب امگا 3 به صورت محلول اتانولی با غلظت مشخص، هیدراتاسیون با سرعت 90 rpm در دمای حدود 50°C به مدت دو ساعت انجام شد. در این مرحله به منظور ارزیابی فرمولاسیون‌های لیپوزومی مختلف تهیه شده با فسفولیپیدهای DPEA، DSPC و DPPC متعاقب عبور آنها از اکسترودر بر اساس شاخص‌های اندازه‌ی ذره‌ای، پتانسیل زتا و کارایی درون‌پوشانی اسیدهای چرب امگا 3 مقایسه شدند. از میان فرمولاسیون‌ها لیپوزوم‌های تهیه شده به روش آب‌پوشانی لایه نازک بارگذاری شده از DHA و EPA با نسبت ثابت (مولی DPPC:Omega 3 70:30) انتخاب شد. با توجه به نتایج حاصل به ویژه درصد درون‌پوشانی، در مرحله‌ی بعدی تحقیق برای انتخاب روش بهینه تهیه فرمولاسیون از دو روش کاهش اندازه‌ی ذره‌ای در 9 تکرار استفاده شد.

کاهش اندازه‌ی ذره‌ای لیپوزوم ها: برای داشتن وزیکول‌هایی با اندازه‌ی ذره‌ای مشخص از دو روش اکستروژن و سونیکاسیون میله‌ای استفاده شد. در روش اکستروژن به منظور دستیابی به وزیکول‌هایی با اندازه‌ی ذره‌ای مشخص (حدود 100 نانومتر) لیپوزوم های درشت و چندلایه (MLVs) حاوی DHA و EPA از اکسترودر (Lipex, Northern Lipids Inc ، کانادا) مجهز به صافی‌های غشایی از جنس پلی‌کربنات دارای منافذ 100 و 200 نانومتر در دمای 50°C تحت فشار 200 کیلوپاسکال عبور داده شد (19).

در روش دیگر به منظور ارزیابی کارایی امواج فراصوت در ریز کردن ذرات لیپوزومی از سونیکاتور میله‌ای (Hielscher UP200H, Treptow ، آلمان) به عنوان جایگزین روش اکستروژن استفاده شد. ابتدا روش ساخت از نظر متغیرهای زمان، دما، Duty cycle و دامنه بهینه شد. پس از مرحله‌ی هیدراتاسیون با بافر فسفات (50 mM, pH = 7/4) ریز کردن لیپوزوم‌های MLV و تبدیل آن‌ها به لیپوزوم‌های تک لایه با

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

استفاده از دستگاه سونیکاتور میله‌ای (قطر 7mm) دارای فرکانس پایین (24 KHz) دارای حداکثر طول موج 210 µm و حداکثر توان خروجی 460 W) انجام شد. ریز کردن لیپوزوم‌ها در مدت 10 دقیقه، طی 5 چرخه‌ی 2 دقیقه‌ای با فاصله‌ی 1 دقیقه استراحت در دمای 4°C انجام شد. سپس DHA و EPA به لیپوزوم‌ها اضافه شد و درون‌پوشانی اسیدهای چرب با غلظت نهایی 15 mM توسط روتاری چرخان در دمای حدود 50°C به مدت 1 ساعت صورت گرفت (10). نمونه‌های شاهد روغن حاوی اسیدهای چرب امگا 3 بود.

خالص‌سازی لیپوزوم‌ها: روش‌های متعددی برای خالص‌سازی لیپوزوها وجود دارد. در این تحقیق، جدا کردن اسیدهای چرب آزاد با عبور لیپوزوم‌ها از ستون کروماتوگرافی حاوی ژل Sephadex G50 (طول 20cm سانتیمتر و قطر 1/5cm) انجام شد (23).

تعیین توزیع اندازه‌ی ذره‌ای (PDI) : دستگاه زتاسایزر برای تعیین توزیع اندازه‌ی ذرات در ابعاد نانو از روش تفرق نور پویا (Dynamic light scattering) استفاده می‌کند. به حرکت تصادفی ذرات درون دیسپرسانت بر اثر اعمال نیرو از سوی ملکول‌های دیسپرسانت، حرکت براونی گفته می‌شود. بین حرکت براونی ذرات یا به عبارت دیگر پارامتر ضریب نشر انتقالی با اندازه‌ی ذرات رابطه‌ای وجود دارد. به وسیله‌ی رابطه‌ی موجود بین حرکت براونی و اندازه ذرات که به معادله‌ی استوک- انیشتین (معادله 1) معروف است و هم‌چنین با به دست آوردن ضریب نشر انتقالی می‌توان به توزیع اندازه‌ی ذرات نمونه‌ی مورد آزمایش دست یافت. همان طور که در معادله‌ی 1 دیده می‌شود، برای محاسبه‌ی اندازه‌ی ذرات شاخص‌های ضریب نشر انتقالی ذره، ویسکوزیته و دمای مطلق مورد نیاز است. در این آزمون، دستگاه زتاسایزر با محاسبه‌ی پارامتر ضریب نشر انتقالی که با اندازه‌گیری حرکت براونی ذرات حاصل می‌شود، توزیع اندازه‌ی ذرات را محاسبه می‌کند.

معادله (1)

$$d(H)=\frac{kT}{3\pi\eta D}$$

در این معادله d(H): اندازه‌ی هیدرودینامیکی، K: ثابت بولتزمن، D: ضریب نشر ذره‌ی انتقالی، η: ویسکوزیته و T: دمای مطلق است (24).

اندازه‌ی ذره‌ای و توزیع اندازه‌ی ذره‌ای لیپوزوم‌ها پس از رقیق کردن نمونه به میزان 10 برابر با بافر به روش تفرق نور پویا (Dynamic light scattering) توسط دستگاه Zetasizer Nano ZS (مدل 1000HSa ، انگلستان) در *دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی* انجام شد.

تعیین پتانسیل زتای سطح لیپوزوم‌ها: زمانی که میدان الکتریکی در سراسر یک الکترولیت اعمال می‌شود، ذرات باردار معلق درون الکترولیت جذب الکترود با بار مخالف می‌شوند. در این زمان، نیروهایی در برابر این جابجایی مقاومت و با حرکت ذرات باردار مخالفت می‌کنند. وقتی بین نیروی جابه جایی ذرات و نیروی مخالف حرکت ذرات تعادل برقرار شود، ذرات با سرعت ثابتی درون الکترولیت حرکت می‌کنند. دستگاه زتاسایزر، اندازه‌ی پتانسیل زتا را با روش محاسبه‌ی تحرک الکتروفورتیک ذرات گزارش می‌دهد. تمایل ذرات دارای بار یکسان به دفع یکدیگر رابطه مستقیمی با پتانسیل زتا دارد. به طور کلی، مرز پایداری و ناپایداری سوسپانسیون را می‌توان برحسب پتانسیل زتا تعیین کرد (25).

در این مطالعه، پتانسیل زتای سطح لیپوزوم‌ها به روش Laser Doppler Micro-electrophoresis توسط دستگاه Nano ZS Zetasizer در *دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی* انجام شد. لیپوزوم‌ها توسط بافر فسفات (50mM, pH = 7/4) به میزان 10 برابر رقیق شد و ارزیابی در زاویه‌ی پراکنش °173، طول موج هلیوم- تنگستن nm 633 و دمای 25°C صورت گرفت.

بررسی کارایی درون‌پوشانی: بررسی کارایی درون‌پوشانی با تعیین میزان اسیدهای چرب به روش کروماتوگرافی گازی پس از استخراج و متیلاسیون بر اساس روش‌های *Folch* و *Metcalfe* (27، 26) و اندازه‌گیری غلظت فسفولیپید طبق روش *Stewart* (28) انجام شد. به منظور محاسبه‌ی کارایی درون‌پوشانی طبق معادله 2 نسبت وزنی اسید چرب به لیپید در لیپوزوم (C) محاسبه و به نسبت وزنی اسید چرب افزوده شده به لیپید اولیه (C_0) تقسیم و در عدد 100 ضرب شد.

معادله (2)

$$EE(\%)=\frac{C_0}{C\times 100}$$

تعیین مقدار اسیدهای چرب DHA و EPA : مقدار DHA و EPA با استفاده از دستگاه GC مجهز به آشکارساز یونیزه‌کننده‌ی شعله‌ای (UNICAM 4600, SB Analytical، انگلستان) دارای ستون موئینه از جنس سیلیس ذوب شده

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

BPX-70 به طول 30m و قطر داخلی 0/25mm و ضخامت 0/22µm در *دانشگاه تربیت مدرس* تعیین شد. دمای آون در برنامه‌ریزی دمایی از 50°C تا 160°C با سرعت 5°C در دقیقه و سپس با سرعت 20°C در دقیقه به 200°C رسید. فشار سر ستون (گاز حامل هلیوم) psi 20 بود. دمای آشکار ساز و محل تزریق به ترتیب 300°C و 250°C بود. پس از استخراج اسیدهای چرب، استر متیل اسیدهای چرب بر اساس روش تری‌فلوئور بر متانولی تهیه شد. شناسایی اسیدهای چرب در مقایسه‌ی زمان بازداری (Retention time) آن با استاندارد داخلی پنتادکانوئیک اسید صورت گرفت.

تعیین مقدار اسپکتروفتومتریک فسفولیپید ها: به منظور تعیین درصد لیپید های قابل بازیافت پس از گذر از مراحل تهیه توسط هر دو روش اکستروژن و سونیکاسیون لیپوزوم‌ها، مقدار فسفولیپید ها بر اساس روش *Stewart* تعیین شد.

میکروسکوپ الکترونی عبوری (Transmission electron microscopy) : بررسی شکل و اندازه‌ی لیپوزوم‌های حاوی اسیدهای‌چرب با رنگ‌آمیزی منفی توسط میکروسکپ الکترونی عبوری (مدل EM10 Ziess, آلمان) انجام شد. پس از قرار دادن سوسپانسون لیپوزومی رقیق شده با بافر فسفات روی گرید مسی فرموار کربن (مش 200) با گلوتارآلدئید 2/5 درصد ثابت شد. سپس نمونه‌ی فیکس شده با محلول آبی یورانیل استات 1% (تثبیت‌کننده‌ی منفی کاتیونیِ متصل‌شونده به گروه فسفات فسفولیپیدها و دارای نفوذ بسیار کم به درون غشا دولایه) به مدت 2 دقیقه رنگ‌آمیزی شد و با برداشتن اضافه‌ی رنگ توسط کاغذ صافی در دمای محیط خشک شد. در خاتمه از نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده با میکروسکوپ الکترونی دارای ولتاژ 80 kV تصویر گرفته شد (29).

تعیین ترکیبات فرار آلدئیدی به روش HS-LPME: ماهیت غیراشباعی EPA و DHA موجب حساسیت این اسیدهای چرب به اکسیداسیون می‌شود که با تعداد موقعیت‌های bis-allylic موجود در آن‌ها مرتبط است. هیدروپراکسیدها محصولات اولیه‌ی اکسیداسیون EPA و DHA هستند که در مراحل بعد به ترکیبات ثانویه‌ی اکسیداسیون مانند ترکیبات آلدئیدی فرار تجزیه می‌شوند. ارزیابی اثر فرمولاسیون لیپوزومی بر پایداری EPA و DHA از طریق شاخص‌های حاصل از تجزیه‌ی اکسیداتیو این اسیدهای چرب صورت گرفت. پس از استخراج ترکیبات آلدئیدی فرار پروپانال، پنتانال، هگزانال و هپتانال به روش HS-LPME (Headspace liquid-phase microextraction) شناسایی و اندازه‌گیری آن‌ها با دستگاه کروماتوگرافی گازی طیف‌سنجی جرمی (7890A GC system/5975C inert MSD, Agilent Technologies، آمریکا) در *دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی* انجام شد. استخراج ترکیبات آلدئیدی فرار از لیپوزوم‌های حاوی اسیدهای چرب امگا 3 در شرایط بهینه انجام گرفت، برای اندازه‌گیری ترکیبات آلدئیدی، مقدار مشخصی از سوسپانسیون لیپوزومی به ویال استخراجی انتقال یافت. در مرحله‌ی بعد به آن آب مقطر اضافه شد و به مدت 10 دقیقه درون حمام آب 40°C با سرعت 70 rpm هم زده شد. سپس با وارد کردن سرنگ هامیلتون حاوی ان-دودکان و 2- و 5- دی متیل فوران درون ویال، قطره معلق حلال در نوک سوزن و در فاصله‌ی 1 cm از سطح لیپوزوم‌ها در فضای فوقانی آن قرار گرفت. پس از گذشت 10 دقیقه محتویات درون سرنگ به درون دستگاه GC/MS تزریق شد. منحنی کالیبراسیون با استفاده از محلول‌های استاندارد ترکیبات آلدئیدی فرار در غلظت‌های 200 - 0/02 ng/ml رسم شد و نسبت سطح منحنی این ترکیبات به استاندارد داخلی به عنوان سطح زیر منحنی نسبی در نظر گرفته شد. برای تعیین تکرارپذیری، ترکیبات آلدئیدی فرار یک نمونه سوسپانسیون لیپوزومی، در سه نوبت استخراج و به دستگاه تزریق شد. بهینه‌سازی متغیرهای مورد نظر (دمای نمونه، زمان استخراج، سرعت هم زدن و مقدار کلرید سدیم) انجام گرفت و سطوح برای دمای محلول نمونه: 30-50°C، زمان استخراج: 5-20 دقیقه، سرعت هم زدن: 400 -1000 rpm و مقدار کلرید سدیم صفر تا 3 گرم به دست آمد (31، 30). نمونه ها تا زمان آزمایش در فریزر نگهداری شدند.

تجزیه و تحلیل آماری: برای تجزیه‌ی آماری داده‌ها از آنالیز واریانس یک‌طرفه ANOVA استفاده شد. مقایسه‌ی میانگین‌ها به روش حداقل تفاوت‌های معنی‌دار (LSD) با استفاده از نرم افزار SAS 9.1.3 در سطح معنی‌داری درصد $p< 0/01$ انجام شد.

• یافته‌ها

هدف از این تحقیق، مقایسه‌ی دو روش اکستروژن و سونیکاسیون میله‌ای و تعیین اثرات هر یک از آن‌ها بر ویژگی‌های لیپوزوم‌های متشکل از فسفولیپیدهای DPPC، DHA و EPA بود. جدول 1 نتایج آزمایش‌های اندازه‌ی

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

ذره‌ای، توزیع اندازه‌ی ذره‌ای، پتانسیل زتا و کارایی درون‌پوشانی اسیدهای چرب امگا 3 را در لیپوزوم‌های تهیه شده با 9 تکرار برای هر روش نشان می‌دهد.

میانگین اندازه‌ی ذره‌ای و PDI لیپوزوم‌های تهیه شده به روش‌های اکستروژن و سونیکاسیون میله‌ای به ترتیب 3/5± 99/7 نانومتر، 0/04 ±0/1 و 2/3 ± 90/1 نانومتر، 0/02 ±0/14 بود. اندازه‌ی ذره‌ای و PDI به دست آمده از دو روش اختلاف معنی‌داری را نشان داد (p< 0/01).

میانگین پتانسیل زتای نانولیپوزوم‌های تهیه شده به روش‌های اکستروژن و سونیکاسیون میله‌ای به ترتیب 1/7±42/4- میلی‌ولت و 2/4 ±43/8- میلی‌ولت بود و اختلاف معنی‌داری را نشان نداد (p> 0/01).

میزان درون‌پوشانی DHA و EPA در لیپوزوم‌های تهیه شده به روش‌های اکستروژن و سونیکاسیون میله‌ای به ترتیب 3/8 ± 51/8 درصد، 3/7 ± 38 درصد و 1/1 ± 13/2 درصد، 1/3 ± 6/5 درصد بود. میزان درون‌پوشانی DHA و EPA در لیپوزوم‌های تهیه شده به دو روش اختلاف معنی‌داری را نشان داد (p>0/01). اندازه‌ی ذره‌ای و PDI لیپوزوم‌های تهیه شده به دو روش سونیکاسیون میله‌ای و اکستروژن در محدوده‌ی مناسب بودند.

شکل 1 تصویر لیپوزوم‌های درون‌پوشانی شده از DHA و EPA را به وسیله‌ی میکروسکوپ الکترونی عبوری نشان می‌دهد. شکل 2 گروماتوگرام مربوط به ترکیبات فرار شناسایی شده با GC/MS است. میزان هر یک از ترکیبات آلدئیدی فرار استخراج شده از نمونه‌های لیپوزوم‌های درون‌پوشانی شده از DHA و EPA در جدول 2 آورده شده است. مقایسه‌ی مقادیر آلدئیدهای فرار شناسایی شده در دو روش نشان داد که پروپانال، هگزانال و پنتانال اختلاف معنی‌داری نداشتند (p> 0/01)، در حالی که آلدئید هپتانال اختلاف معنی‌دار داشت (p< 0/01). در این تحقیق، پروپانال در میان ترکیبات حاصل از اکسیداسیون ثانویه ترکیب آلدئیدی اصلی شناسایی شده به روش GC/MS در مقادیر 96/5±0/5 µg/kg تا 136±0/06 µg/kg بود. میزان پنتانال، هگزانال و هپتانال در لیپوزوم‌های تهیه شده به روش اکستروژن به ترتیب 1/8 ± 9/3 µg/kg، 10/9±1/6 µg/kg و 4/3±0/7 µg/kg و در لیپوزوم‌های تهیه شده به روش سونیکاسیون میله‌ای به ترتیب 1/2 ±9/2 µg/kg، 9/7±1/0 µg/kg و 3/6±0/6 µg/kg بود. میزان میانگین مجموع ترکیبات فرار آلدئیدی شناسایی شده در نمونه‌های لیپوزومی تهیه شده به روش سونیکاسیون میله‌ای کمتر از نمونه‌های تهیه شده به روش اکستروژن بود.

جدول 1. اندازه‌ی ذره‌ای، توزیع اندازه‌ی ذره‌ای، پتانسیل زتا و کارایی درون‌پوشانی EPA و DHA نانولیپوزوم‌های تهیه شده به روش‌های مختلف (n=9 و SD ± میانگین)

روش تهیه لیپوزوم ها	اندازه‌ی ذره‌ای (nm)	توزیع اندازه‌ی ذره‌ای	پتانسیل زتا (mV)	کارایی درون‌پوشانی (%) DHA	کارایی درون‌پوشانی (%) EPA
اکستروژن	99/7 ± 3/5[a]	0/10 ± 0/04[b]	-42/4 ± 1/7[a]	13/2 ± 1/1[b]	6/5 ± 1/3[b]
سونیکاسیون میله‌ای	90/1 ± 2/3[b]	0/14 ± 0/02[b]	-43/8 ± 2/4[a]	56/9 ± 5/2[a]	38/6 ± 1/8[a]

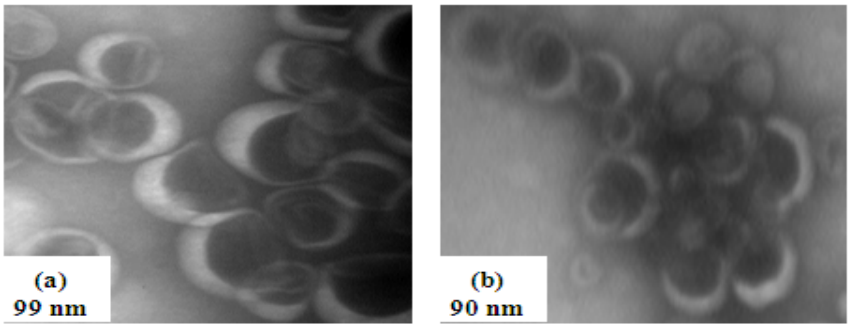
حروف متفاوت در یک ستون به معنی تفاوت معنی‌دار آماری است (p<0/01)

جدول 2. ترکیبات آلدئیدی فرار شناسایی شده به روش HS-LPME/ GC-MS از نانولیپوزوم‌های تهیه شده به روش‌های مختلف (µg/kg ± SD و n=9)

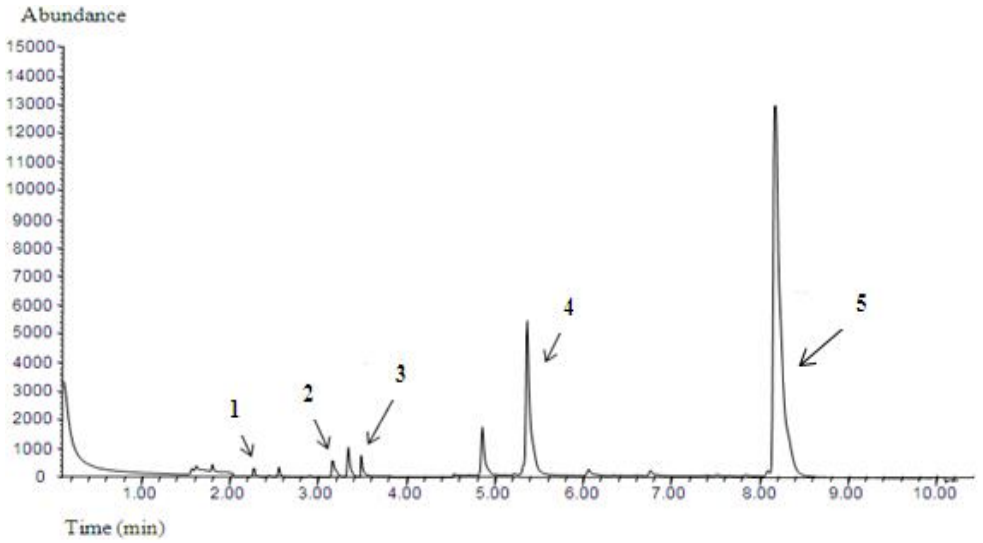
روش تهیه لیپوزوم ها	پروپانال	پنتانال	هگزانال	هپتانال	مجموع ترکیبات آلدئیدی فرار
اکستروژن	83/7 ± 4/4[b]	9/3 ± 1/8[a]	10/9 ± 1/6[a]	4/3 ± 0/7[b]	107/3 ± 6/9[b]
سونیکاسیون میله‌ای	81/1 ± 1/1[c]	9/2 ± 1/2[a]	9/7 ± 1/0[b]	3/6 ± 0/6[c]	103/6 ± 2/2[c]
شاهد (روغن حاوی اسیدهای چرب امگا 3)	189/5 ± 2/2[a]	10/8 ± 3/2[b]	4/6 ± 0/5[c]	5/4 ± 0/2[a]	223/2 ±2/9[a]

حروف متفاوت در یک ستون به معنی تفاوت معنی‌دار آماری است (p<0/01)

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]



شکل 1. تصاویر TEM نانولیپوزم‌های تهیه شده به روش‌های اکستروژن (a) و سونیکاسیون میله‌ای (b) (بزرگنمایی 80000x)



شکل 2. گروماتوگرام GC-MS ترکیبات فرار فرمولاسیون نانولیپوزمی تهیه شده به روش سونیکاسیون میله‌ای
1. پروپانال RT: 2/25، 2. پنتانال RT: 2/25، 3. استاندارد داخلی RT: 3/55، 4. هگزانال RT: 5/4، 5. هپتانال RT:8/25

• بحث

در این تحقیق DHA و EPA در نانولیپوزوم‌های DPPC بر اساس روش فیلم نازک تهیه شد. تحقیقات نشان می‌دهد که روش سونیکاسیون در عین سادگی، میزان درون‌پوشانیِ قابل قبولی دارد (32).

نتایج این تحقیق نشان داد که اندازه‌ی ذره‌ای لیپوزوم‌های تهیه شده با سونیکاسیون میله‌ای حدود 90 نانومتر و دارای PDI حدود 0/1 بود که نشان‌دهنده‌ی اندازه‌ی ذره‌ای مناسب و یکنواختی توزیع ذرات است و با نتایج *Rasti* در سال 2012 مطابقت دارد (15).

بررسی‌ها درباره‌ی اندازه‌ی ذره‌ای و توزیع اندازه‌ی ذره‌ای نشان می‌دهد که بهترین لیپوزوم‌ها دارای اندازه‌ی ذره‌ای کمتر از 200 نانومتر و PDI در محدوده‌ی 0/1 هستند. اندازه‌ی ذره‌ای لیپوزوم‌های حاصل از امواج فراصوت کاهش معنی‌داری نسبت به روش اکستروژن داشت. بنابراین، اندازه‌ی ذره‌ای و PDI لیپوزوم‌های تهیه شده به هر دو روش در محدوده‌ی مناسب بودند. پژوهش‌های انجام شده نشان

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

می‌دهد که روش‌های مورد استفاده برای تهیه لیپوزوم‌ها اثر چشمگیری بر ویژگی‌های فیزیکی مانند اندازه و کارایی درون‌پوشانی ترکیبات زیست فعال دارد. یکی دیگر از ویژگی‌های فیزیکی مهم لیپوزوم‌ها پتانسیل زتا است که عملکرد لیپوزوم را در شرایط بیولوژیک پیش‌بینی می‌کند، نمایانگر بار سطحی وزیکول‌ها است و شاخصی برای پایداری یک سامانه‌ی کلوئیدی است (34-32، 18، 17). ذراتی که پتانسیل زتای آن‌ها از 30 میلی‌ولت بیشتر یا از 30- میلی‌ولت کمتر باشد، دارای پایداری هستند. یکی از ویژگی‌های کلیدی اسیدهای چرب در لایه‌ی فسفولیپید غشاء یونیزاسیون سطحی است. وقتی میزان اسید چرب بسیار کم است، در pH~ 7/4 در شکل آزاد آن است که احتمالاً به طور کامل یونیزه شده است (بار آن منفی است). ارتباط فسفولیپید از طریق یون فسفات با گروه کربوکسیل مجاور آن است که به افزایش pK_a کربوکسیل اسید چرب منجر می‌شود. پتانسیل زتای کمتر از 30- میلی‌ولت نمایانگر پایداری الکترواستاتیک بهینه‌ی یک سوسپانسیون است. زیرا با ایجاد دافعه میان ذرات باردار تمایل طبیعی آن‌ها به تجمع یا چسبیدن کاهش می‌یابد (35). در مطالعه‌ی حاضر، میانگین پتانسیل زتا حدود 43- میلی‌ولت بود و اختلاف معنی‌داری را بین دو روش نشان نداد. این نتایج با تحقیق انجام شده توسط *Jenap* در سال 2012 همسویی دارد.

Hamilton در سال 1999، *Habib* در سال 2012 و *Schwenk* در سال 2012 در پژوهش‌های خود نشان دادند که پایین‌تر بودن pK_a مربوط به DHA و EPA آزاد نسبت به pH محیط اطراف موجب پروتونیزه شدن50% شکل غیریونیزه آن می‌شود. در نتیجه، به راحتی و بدون وجود ممانعت‌های الکتروشیمیایی درون غشای دولایه‌ی لیپیدی تحرک داشته و در صورت از دست دادن یون هیدروژن از غشا جدا می‌شوند. این جابه جایی به غلظت اسیدهای چرب و تغییرات pH ارتباط دارد و با نتایج پتانسیل زتای به دست آمده در این تحقیق همسویی دارد (38-36).

در روش سونیکاسیون، مقدار DHA موجود در لیپوزوم حدود 57 % میزان اولیه به دست آمد. در حالی که پس از عبور از غشای اکسترودر، این مقدار به حدود 13% کاهش یافت. نتایج نشان می‌دهد که فرایند اکستروژن باعث کاهش شدید درون‌پوشانی می‌شود. بخشی از آن می‌تواند به دلیل خروج اسیدهای چرب حین تغییر شکل لیپوزوم‌ها برای عبور از منافذ غشا باشد. بارگذاری نامناسب اسیدهای چرب امگا 3 در لیپوزوم‌های تهیه شده با وجود استفاده از فسفولیپید یکسان مسئله از دست رفتن آن‌ها را طی فرایند ساخت مطرح می‌سازد. با توجه به ثابت بودن نسبت مولی 70:30 ترکیب فرمولاسیون DPPC: n-3 FAs و غلظت نهایی 50 میلی‌مول، کارایی سونیکاتور میله‌ای به عنوان جایگزینی برای روش اکستروژن در بارگذاری اسیدهای چرب امگا 3 به طور معنی‌داری بیشتر بود ($p< 0/01$). گزارش‌ها نشان می‌دهد که درون‌پوشانی ترکیبات چربی دوست در غشای دو لایه‌ی لیپوزوم ها تا حد زیادی به نوع لیپیدهای تشکیل دهنده‌ی لیپوزوم و روش‌های آماده‌سازی آن‌ها بستگی دارد. انتخاب ترکیب لیپیدی برای ساخت هر لیپوزوم باید با ترکیب حامل مورد نظر متناسب باشد. طبق گزارش‌های موجود، میزان انحلال اسیدهای چرب با زنجیره‌ی بلند، بسیار کم و در حد 10^{-10} مول است و بارگذاری ترکیبات با ماهیت هیدروفوبیک مانند DHA و EPA در غشای لیپوزوم با توجه به شکل‌های یونیزه و غیریونیزه آن‌ها صورت می‌گیرد. بالاتر بودن درصد درون‌پوشانی DHA نسبت به EPA با گزارش *Araseki* در سال 2002 و *Onuki* در سال 2006 مطابقت دارد (41-39).

مطالعات میکروسکپ الکترونی عبوری با قدرت تفکیک بسیار بالا، شکل نانولیپوزوم‌های تهیه شده به هر دو روش را کروی، منظم و هموژن نشان داد. توزیع ذره‌ای مناسب و یکنواخت تأکیدی بر اندازه‌گیری به روش پراکندگی نور بود که مشابه نتایج *Bibi* در سال 2011 است (42).

اسیدهای چرب DHA و EPA نسبت به اکسیداسیون بسیار حساس هستند و طی فراوری به دلیل ماهیت غیراشباعی متحمل تغییراتی می‌شوند. این اسیدهای چرب با قرار گرفتن در معرض نور، پرواکسیدان‌ها و درجه حرارت بالا به سرعت اکسیده می‌شوند و محصولات اکسیداتیو اولیه به وجود می‌آیند. تغییرات حسی ناشی از تجزیه‌ی هیدروپراکسیدها به فراورده‌های ثانویه مثل آلدئیدها، کتن‌ها، اسیدها و الکل با طول زنجیر و درجه‌ی غیراشباعی اسیدهای چرب متناسب است. برخی از این ترکیبات، حد آستانه‌ی بویایی بسیار پایینی دارند و بنابراین، با غلظت بسیار کم بر کیفیت حسی اثر می‌گذارند و منجر به طعم و بوی ناخوشایند می‌شوند (43)، میزان ترکیبات آلدئیدی فرار در نمونه‌ی شاهد تأکیدی بر حساسیت بالقوه این اسیدهای چرب به شرایط محیطی و اثربخشی درون‌پوشانی نانولیپوزومی در پایداری اکسیداتیو DHA و EPA است.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

مطالعات انجام شده توسط *Nara* طی سال‌های 8-1997، *Khan* در سال 2000، *Cansell* در سال 2001، *Moussaoui* در سال 2002، *Lyberg* در سال 2005 و *Rasti* در سال 2012 نشان داده که فسفولیپیدها و درون‌پوشانی با لیپوزوم‌ها موجب افزایش پایداری اکسیداتیو اسیدهای چرب امگا 3 می‌شوند که با یافته‌های تحقیق حاضر مشابهت دارند (47-44، 15، 12، 11).

فسفولیپیدها از ترکیبات مهم غشاهای بیولوژیکی هستند، دو زنجیره‌ی آسیمتریک هیدروکربنی دارند که یکی اشباع و دیگری دارای یک یا چند پیوند دوگانه‌ی سیس غیر اشباع است. زنجیره‌ی هیدروکربن غیر اشباع DHA و EPA خمیدگی بارزی در محل پیوند دوگانه‌ی سیس دارد که از مجاورت فشرده و جهت‌گیری منظم زنجیره‌های هیدروکربنی فسفولیپیدها جلوگیری می‌کند و در نتیجه، موجب افزایش سیالیت غشاهای بیولوژیک می‌شود. رادیکال اکسیژن می‌تواند به سادگی پیوند دوگانه‌ی سیسِ زنجیره‌ی غیراشباع را اکسید کند (48). بالاترین میزان ترکیبات آلدئیدی فرار شناسایی شده در نانولیپوزوم‌ها مربوط به پروپانال به عنوان شاخص تجزیه‌ی اسیدهای چرب امگا 3 است. میزان آن در مقایسه با حد آستانه‌ی تعیین شده بسیار ناچیز است و با نتایج تحقیقات انجام شده توسط *Sega* در سال 2011 همسویی دارد (49، 44).

در مجموع، یافته‌های حاصل از این تحقیق نشان می‌دهد که روش سونیکاسیون میله‌ای برای لیپوزوم‌های از قبل تهیه شده باعث درون‌پوشانی قابل توجه DHA و EPA در غشای نانولیپوزومی در مقایسه با روش اکستروژن می‌شود زیرا بارگذاری بهینه‌ی DHA و EPA در لیپوزوم علاوه بر این که به ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی این ترکیبات بستگی دارد، بلکه ترکیب غشای دولایه و روش ساخت آن از عوامل مؤثر و مهم است. بنابراین، درون‌پوشانی توأم DHA و EPA در نانولیپوزوم‌های از قبل تهیه شده به روش سونیکاسیون میله‌ای علاوه براین که می‌تواند یک حامل مناسب با کارایی لازم جهت بررسی‌های بیشتر فراهم نماید، روشی مناسبی را برای درون پوشانی سایر ترکیبات زیست فعال ارائه می‌نماید.

سپاسگزاری

مقاله‌ی حاضر حاصل رساله‌ی دکترای تخصصی تکنولوژی مواد غذایی مصوب دانشکده‌ی کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس است که از حامیان تشکر می‌شود. این مطالعه با حمایت مالی *دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی* در تأمین بخشی از هزینه‌ها در قالب طرح تحقیقاتی شماره‌ی 6202 *انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور* و همکاری *ستاد ویژه‌ی توسعه فناوری نانو معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری* انجام شد. هم‌چنین از ریاست محترم و کارکنان دانشکده‌ی داروسازی به ویژه آزمایشگاه‌های آن به خاطر همکاری در اجرای این تحقیق سپاسگزاری می‌شود.

• References

1. Anderson AS. Fish risks and benefits. J Hum Nutr Dietet 2004; 17(5): 411-12.
2. Elizondo E, Moreno E, Cabrera I. Liposomes and other vesicular systems: structural characteristics, methods of preparation, and use in nanomedicine. Mol Biol Transl Sci 2011; 104:1-52.
3. Swanson D, Block R, Mousa SK. Omega-3 fatty acids EPA and DHA: health benefits throughout life. Advan Nutr 2012; 3(1):1–7.
4. Nicholson T, Khademi H, Moghadasian MH. The role of marine n-3 fatty acids in improving cardiovascular health: a review. J Func Foods 2013 (In Press).
5. Crépet A, Tressou J, Verger P, Leblanc JC. Management options to reduce exposure to methyl mercury through the consumption of fish and fishery products by the French population. Regul Toxicol Pharmac 2005; 42(2): 179-89.
6. Schacky CV. The omega-3 index as a risk factor for coronary heart disease Prostaglandins and other. Lipid Mediat 2011; 96:94-8
7. Zuidam NJ, Nedovic VA. Encapsulation technologies for active food ingredients and food Processing. New York: Springer; 2010.
8. Siriwardhana N, Kalupahana NS, Moustaid-Moussa N. Health benefits of n-3 polyunsaturated fatty acids: Eicosapentaenoic Acid and Docosahexaenoic Acid. Advan Food Nutr Res 2012.
9. Mozafari MR, Johnson C, Hatziantoniou S, Demetzoz C. Nanoliposomes and their applications

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

in food nanotechnology. J Lipos Res 2008; 18(4): 309-27.

10. Brandl M. Liposomes as drug carriers: a technological approach. Biotechnol Ann Rev 2001; 7: 59-85.

11. Lyberg AM, Fasoli E. Adlercreutz P. Monitoring the oxidation of docosahexaenoic acid in lipids. Lipids 2005; 40(9):969–979.

12. Khan, MA, Shahidi F. Tocopherols and phospholipids enhance the oxidative stability of borage ***and*** evening primrose triacylglycerols. J Food Lipids 2000; 7(3):143–150.

13. Barenholz Y. Liposome application: problems and prospects. Curr Opin Coll Interface Sci 2001; 7(1): 66-77.

14. Lasic DD. Liposomes: from physics to applications. Amsterdam: Elsevier; 1993.

15. Rasti B, Jinap S, Mozafari MR, Yazid AM. Comparative study of the oxidative and physical stability of liposomal and nanoliposomal polyunsaturated fatty acids prepared with conventional and Mozafari method. Food Chem 2012; 135(4):2761-70.

16. Wallance JMW, McCabe AJ, Robson PJ, Keogh, MK, Murray, CA, Kelly PM, et al. Bioavailability of n-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) in foods enriched with microencapsulated fish oil. Ann Nutr Metab 2000; 44: 157-162.

17. Elizondo E, Moreno E, Cabrera I, Córdoba A, Sala S, Veciana J, et al. Liposomes and other vesicular systems: structural characteristics, methods of preparation, and use in nanomedicine. Prog MolBiol Trans Sci 2011; 104:1-52.

18. Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Prust JE, Benoit JP. Physicochemical stability of colloidal lipid particles. Biomat 2003; 24(23):4283–300.

19. Mayer LD, Bally MB, Hope MJ, Cullis PR. Techniques for encapsulating bioactive agents into liposomes. Chem Phys Lipids 1986b; 40(2-4): 333-45.

20. Mayer LD, Hope MJ, Cullis PR. Vesicles of variable sizes produced by a rapid extrusion procedure. Biochem Biophys Acta 1986a; 858(1):161-8.

21. Hope MJ, Bally MB, Mayer LD, Janoff AS, Cullis PR. Generation of multilamellar and unilamellar phospholipid vesicles. Chem Phys Lipids 1986; 40:89-107.

22. Bangham A, Standish M, Watkins, J. Diffusion of univalent ions across the lamellae of swollen phospholipids. J Mol Biol 1965; 13(1): 238-52.

23. Sorensen EN, Weisman G, Vidaver GA. A sephadex column procedure for measuring uptake and loss of low molecular weight solutes from small, lipid-rich vesicles. Anal Biochem 1977; 82(2): 376-84.

24. Dynamic light scattering: an introduction in 30 minutes. Available at: http:www.malvern.com.

25. Zetasizer nano user manual MAN0317 Issue 4.0 2008. Available at: http:www.malvern.com.

26. Metcalfe LD, Schmitz AA, Pelka JR. Rapid preparation of fatty acid esters from lipids for gas chromatographic analysis. Anal Chem 1966; 38(3): 514-5.

27. Folch J, Lees M, Sloane-Stanley G. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. J Biol Chem 1957; 226(1): 497-509.

28. Stewart JCM. Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. Anal Biochem 1980; 104(1): 10-14.

29. Ruozi B, Belletti D, Tombesi A, Tosi G, Bondioli L, Forni F, et al. AFM, ESEM, TEM, and CLSM in liposomal characterization: a comparative study. Int J Nanomed 2011; 6: 557–63.

30. Theis AL, Waldack AJ, Hansen SM, Jeannot MA. Headspace solvent microextraction. Anal Chem 2001; 73(23): 5651-4.

31. Bicchi C, Cordero C, Liberto E, Sgorbini B, Rubiolo P. Headspace sampling of the volatile fraction of vegetable matrices. J Chrom A 2008; 1184(1): 220-33.

32. Vemuri S, Rhodes CT. Preparation and characterization of liposomes as therapeutic delivery systems: a review. Pharmac Acta Helvet 1995; 70: 95–111.

33. Nagayasu A, Uchiyama K, Kiwad H. The size of liposomes: a factor which affects their targeting efficiency to tumors and therapeutic activity of liposomal antitumor drugs. Adv Drug Deliv Rev 1999; 40: 75–87.

34. Maestrelli F, Gonzălez-Rodrŕguez ML, Rabasco AM, Mura P. Effect of preparation technoque on the properties of liposomes encapsulating ketoprofen-cyclodextrin complexes aimed for transdermal delivery. Int J Pharmac 2006; 312: 53-60.

35. Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust J-E, Benoit J-P. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. Biomat 2003; 24(23): 4283-300.

36. Hamilton JA. Transport of fatty acids across membranes by the diffusion mechanism. Prostag, Leuko and Essen Fatty Acids 1999; 60(5&6): 291-7.

37. Habib MA, Moghaddam B, Kirby DJ, Mohammed AR, Perrie Y. The role of lipid geometry in

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

designing liposomes for the solubilisation of poorly water soluble drugs. Int J Pharmac 2012 [In press].

38. Schwenk RW, Holloway GP, Luiken JFP, Bonen A, Glatz JFC. Fatty acid transport across the cell membrane: Regulation by fatty acid transporters. Prostag, Leuko Essen Fatty Acids 2012; 82:149–54.

39. Araseki M, Yamamoto K, Miyashita K. Oxidative stability of polyunsaturated fatty acid in phosphatidylcholine liposomes. Biosci Biotechnol Biochem 2002; 66(12): 2573-7.

40. Onuki Y, Morishita M, Chiba Y, Tokiwa S, Takayama K. Docosahexaenoic acid and eicosapentaenoic acid induce changes in the physical properties of a lipid bilayer model membrane. Chem Pharmac Bull 2006; 54(1): 68-71.

41. Drummond DC, Noble CO, Hayes, ME, Park JW, Kirpotin DB. Pharmacokinetics and in vivo drug release rates in liposomal nanocarrier development. J Pharmac Sci 2008; 97(11): 4696-40.

42. Vorum H, Brodersen R, Kragh-Hansen U, Pedersen AO. Solubility of long-chain fatty acids in phosphate buffer at pH 7.4. Biochem Biophys Acta 1992; 1126(2):135-42.

43. Bibi S, Kaur R, H-Lacey M, EMcNeil S, Wilkhu J, Lattmann E, et al. Microscopy imaging of liposomes: from covers lips to environmental SEM. Int J Pharmac 2011; 417: 138-150.

44. Kamal-Eldin A. Lipid oxidation pathway. Uppsala(Sweden): The AOCS Press; 2003.

45. Nara E, Miyashita K, Ota T. Oxidative stability of liposomes prepared from soybean PC, chicken egg PC, and salmon egg PC. Biosci Biotechnol Biochem 1997; 61:1736-38.

46. Nara E, Miyashita K, Ota T. Nadachi Y. The oxidative stabilities of polyunsaturated fatty acids in salmon egg phosphatidylcholine liposomes. Fish Sci 1998; 64 (2):282-6.

47. Nacka F, Cansell M, Gouygou JP, Gerbeaud C, Meleard P, Entressangles B. Physical and chemical stability of marine lipid-based liposomes under acid conditions. Coll Surf B 2001; 20: 257-66.

48. Moussaoui N, Cansell, M, Denizot A. Marinosomes, marine lipid-based liposomes: physical characterization and potential application in cosmetics. Int J Pharmac 2002; 242:361-65.

49. Sega LC, Rukke EO, Liland KH, Kirkhos B, Egelandsdal B, Karlsen J, et al. Oxidative stability of polyunsaturated edible oils mixed with microcrystalline cellulose. J Am Oil Chem Soc 2011; 88(12): 1883–95.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]

Preparation and characterization of nanoliposomes containing docosahexaenoic and eicosapentaenoic acids by extrusion and probe sonication

*Hadian Z[1], Sahari MA[*2], Moghimi HR[3], Barzegar M[4], Abbasi S[4]*

1- Ph.D Student of Food Technology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University and Researcher of National Nutrition and Food Technology Research Institute, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

*2- *Corresponding author: Prof, Dept. of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran, Email: sahari@modares.ac.ir*

3 Prof, Dept. of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

4- Associate Prof. Dept. of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Tarbiat Modares University, Tehran, Iran

Received 28 Jan, 2013 **Accepted 10 May, 2013**

Background and objective: Available evidence indicates that ther is an inverse relationship between the consumption of omega-3 polyunsaturated fatty acids (PUFA) and risk of cardiovascular disease (CVD). Based on this, dietary supplementation with eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid is recommended as a preventive measure for CVD. Liposomal nanocarriers can increase stability and improve bioavailability of omega-3 polyunsaturaed fatty acids (PUFAs). Therefore, this study was initiated to prepare and characterize co-encapsulated liposomes containing DHA and EPA by extrusion and probe sonication.

Materials and Methods: After preparing empty liposomes (that is, with no di-palmitoyl phosphatidyl choline (DPPC)) using the thin-layer filmt technique, DHA and EPA were encapsulated by extrusion and probe sonication. The physicochemical characteristics of the optimized liposomes (DHA/EPA), such as particle size, zeta potential, encapsulation efficiency, and volatile aldehyde compounds, were then determined.

Results: The results indicated that, despite similarities in the average particle size, particle size distribution and the zeta potential in nanolysosomes produced by the two methods, the encapsulation efficiency for DHA and EPA of the probe sonicated liposomes was significantly higher than that of the extruded liposomes ($p < 0.01$). Transmission electron microscopy images of both liposomes showed that they were both spherical in shape and maintained high structural integrity. The sonicated liposomes showed a narrow size distribution with an average diameter of 90.1 ± (2.3) nm and a zeta potential of -43.8 ± (2.4) mV, the encapsulation efficiency for DHA and EPA being 56.9 ± 5.2% and 38.6 ± 1.8%, respectively. Propanal, an indicator of secondry oxidation of omega-3 fatty acids, was the major volatile aldehyde product formed in nanoliposomes prepared with both methods.

Conclusion: It can be concluded that probe ultrasound of pre-formed nanoliposomes facilitates more effective encapsulation of DHA and EPA into the nanoliposomal membrane, as compared with the extrusion method. Optimum loading of DHA and EPA is not solely dependent on their physiochemical properties; other important contributing factors are bilayer composition and method of preparation. Co-encapsulated DHA/EPA in pre-formed liposomes, presented a promising formulation capable of effective reversal of bioactive resistance.

Keywords: Nanoliposome, Eicosapentaenoic acid, Docosahexaenoic acid, Extrusion, Probe sonication

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-11-16]