

تهیه نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین E به عنوان حامل‌های DHA و

EPA و ارزیابی پایداری فیزیکی آنها

زهره هادیان¹، حمیدرضا مقیمی²، محمد علی سحری³، محسن برزگر⁴

- 1- استادیار انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران
- 2- نویسنده مسئول: استاد گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران. پست الکترونیک: hrmoghimi@yahoo.com
- 3- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران
- 4- دانشیار گروه صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تربیت مدرس، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 93/5/6

تاریخ پذیرش: 93/7/7

چکیده

سابقه و هدف: ایکوزاپنتانویک اسید (EPA) و دوکوزاهگزانویک اسید (DHA) دارای اثرات پیشگیرانه و درمانی در بیماری‌های مختلف به ویژه بیماری‌های عروقی قلب و التهابی هستند. با در نظر گرفتن مزایای کاربرد نانولیپوزوم‌ها به عنوان سامانه‌های حامل ترکیبات زیست فعال، تحقیق حاضر با هدف تهیه و ارزیابی پایداری فیزیکی فرمولاسیون‌های نانولیپوزومی حاوی ویتامین E بارگذاری شده با DHA و EPA انجام گرفت.

مواد و روش‌ها: نانولیپوزوم‌های خالی بر پایه دی پالمیتوئیل فسفاتیدیل کولین (DPPC) با روش اصلاح یافته فیلم نازک لیپیدی و امواج فراصوت تهیه، سپس بارگذاری DHA و EPA با انکوباسیون در دمای حدود 50°C انجام شد. به منظور بهبود پایداری ویتامین E به برخی فرمول‌ها اضافه شد. مطالعه مقایسه‌ای فرمولاسیون‌ها بر اساس ترکیبات ویتامین E و متیل و پروپیل پارابن بر ویژگی‌های آنها از طریق ارزیابی با زتاسایزر، میکروسکوپ الکترونی روبشی (TEM)، کالریمتری روبشی تفاضلی (DSC) و محاسبه درصد کارایی درون پوشانی DHA و EPA صورت گرفت. بررسی پایداری فیزیکی با ارزیابی تغییرات کارایی درون پوشانی، اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات و شکل وزیکول‌های نگهداری شده به مدت 3 ماه در دماهای 4، 30 و 40°C انجام شد.

یافته‌ها: یافته‌ها نشان داد که به طور موفقیت آمیزی بارگذاری DHA و EPA در فرمولاسیون‌های بر پایه ویتامین E انجام شد و فرمولاسیون بهینه دارای کارایی درون پوشانی بالا (89/1±0/6 درصد و 81/96±1/4 درصد)، دارای اندازه ذرات (82±0/8 نانومتر) و توزیع اندازه ذرات (0/13±0/02) مناسب دربرداشتند (P≤0/01). نتایج آزمون‌های ارزیابی پایداری فیزیکی فرمولاسیون نانولیپوزومی حامل DHA و EPA ادغام شده با ویتامین E پس از نگهداری به مدت 3 ماه در دمای 4°C مناسب بود. ارزیابی نانولیپوزوم‌های حامل امگا 3 بر پایه ویتامین E به وسیله DSC و TEM پدیده برهمکنش و انتشار DHA و EPA را در غشاء دولایه لیپیدی تأیید کردند.

نتیجه گیری: یافته‌های حاصل از این تحقیق نشان داد که ادغام ویتامین E در فرمولاسیون نانولیپوزومی اثرات محافظتی و پایدارکننده چشمگیری بر میزان DHA و EPA بارگذاری شده در غشاء دو لایه لیپیدی و پایداری فیزیکی آن در برداشته است. افزودن ترکیبات محافظ به همراه ویتامین E موجب پایداری بیشتر ویژگی‌های فیزیکی فرمولاسیون لیپوزومی حاوی DHA و EPA نسبت به فرمول شاهد نگردید.

واژگان کلیدی: EPA، DHA، لیپوزوم، پایداری فیزیکی، ویتامین E

• مقدمه

DHA و EPA از اسیدهای چرب غیر اشباعی با چندین پیوند دوگانه گروه n-3 مهم موجود در روغن ماهی و مکمل‌های آن هستند (1-2).

DHA و EPA نسبت به اکسایش حساس بوده و در طی فرآوری عملکرد آنها به دلیل ماهیت غیراشباعی متحمل تغییراتی غیرقابل برگشت می‌شود. بسیاری از این ترکیبات

اسیدهای چرب امگا 3 شامل دوکوزاهگزانویک اسید، ایکوزاپنتانویک اسید و لینولنیک اسید دسته‌ای از ترکیبات زیست فعال هستند که در پیشگیری و درمان بیماری‌های عروقی قلب از اهمیت ویژه‌ای برخوردارند. این اسیدهای چرب قادر به مهار تعدادی از عوامل التهابی مربوط به تولید ایکوزانوئیدها مشابه پروستاگلندین‌ها و لکوترئین‌ها می‌باشند.

اندازه 20 نانومتر تا چند صد میکرومتر هستند و قادرند طیفی وسیع از ترکیبات فراسودمند را درون پوشانی نمایند. لیپوزوم‌ها با وجود زیست سازگاری توام با ماهیت دوگانه دوستی و اندازه کوچکتر به عنوان سامانه‌های انتقال بسیار مناسب ترکیبات مختلف مطرح می‌باشند. از مزایای متعدد لیپوزوم‌ها می‌توان به قابلیت احتباس مقادیر زیاد ترکیبات دارویی، افزایش فراهمی ترکیبات در سلول، بافت یا اندام خاص، ماهیت دوگانه دوستی توام با زیست سازگاری، دارا بودن شارژ سطحی مثبت یا منفی، لیپوزوم‌های تک لایه بزرگ با کارایی درون پوشانی بالا، روش‌های ساخت ساده و پایداری مناسب در طول زمان و پایداری ترکیبات محلول در آب در شرایط فعالیت آبی بالا اشاره کرد (8). تحقیقات نقش موثر ایجاد پایداری غشاء فسفولیپیدی متشکل از DPPC برای DHA خالص و روغن ماهی دارای درصدی از DHA و EPA در مقابل عوامل اکساینده را نشان می‌دهد، این ویژگی می‌تواند مربوط به نقش لیپوزوم و نحوه چیدمان اتم‌های DHA باشد (9). تحقیقات اخیر انجام شده توسط کارلمتری روبشی تفاضلی تأثیر جذب و برهمکنش اسیدهای چرب امگا 3 را بر غشاهای دو لایه لیپیدی نشان داده است (10). پایداری فیزیکی سامانه‌های انتقال لیپوزومی یکی از نکات مورد توجه در تمامی مراحل تولید و مصرف آنها یعنی فراوری، نگهداری و انتقال آنها است (11). پایداری لیپوزوم به عوامل متعددی نظیر خواص ترکیب دارویی، اندازه دارو و لیپوزوم، یکسان بودن لیپید و نوع آن، روش تهیه و PH بستگی دارد. پایداری فیزیکی لیپوزوم‌ها با دو شاخص مهم مشتمل بر تغییرات در میانگین اندازه ذرات و توزیع به دلیل تجمع و همجوشی و کاهش میزان درون پوشانی ترکیب اصلی ناشی از نشت ارتباط دارد (12).

با توجه به حساس بودن اسیدهای چرب امگا 3 در برابر شرایط محیطی، مطالعه قبلی ما مبتنی بر ارائه روش تهیه لیپوزوم از پیش ساخته شده و بارگذاری این اسیدهای چرب توام در فرمولاسیونی با ویژگی‌های مناسب بود (13). به دلیل نقش و ماهیت چربی دوستی ویتامین E و خصیصه غیر اشباعی DHA و EPA در راستای ارائه فرمولاسیون لیپوزومی پایدار، هدف نخست این مطالعه تهیه و ارزیابی برخی ویژگی‌های نانولیپوزوم‌های متشکل از DPPC به عنوان حامل DHA و EPA همراه با افزودن ویتامین E و مواد نگهدارنده بود. سپس به بررسی و مقایسه پایداری فیزیکی فرمولاسیون‌های نانولیپوزومی مختلف نگهداری شده در دما و بازه زمانی مشخص پرداخته شد.

عامل طعم نامطلوب و فساد هستند. ترکیبات ضد اکسایش محلول در چربی از قبیل ویتامین E، یوبی‌کینون‌ها، رتینوئیدها، کاروتنوئیدها، فلاونوئیدهای محلول در چربی، ایزوفلاون‌های سویا و ترکیبات ضد اکسایش سنتتیک محلول در چربی مانند BHT و TBHQ را می‌توان به منظور جلوگیری از تشکیل رادیکال‌های آزاد در سامانه‌های انتقال اسیدهای چرب امگا 3 به کار برد. البته امروزه کاربرد ویتامین E و مشتقات آن به دلیل خواص فیزیکوشیمیایی، بیولوژیک و داشتن مزایای متعدد از جمله زیست سازگاری، بهبود قابلیت انحلال ترکیبات آب‌گریز، افزایش میزان درون پوشانی، افزایش بهبود ویژگی‌های زیست دارویی مانند نیمه عمر و بهبود شاخص فعالیت ضد سرطانی ترکیبات دارویی حائز اهمیت است. ضمن این که FDA سلامت آن را تایید کرده است. از نگهدارنده‌های مختلف نیز مانند مشتقات اسید سوربیک، اسید بنزوئیک، اسید پروپیونیک، اتیلن دی‌امین تترا استیک اسید و متیل، اتیل و پروپیل پارابن یا ترکیبی در تهیه فرآورده‌های خوراکی و دارویی به منظور محافظت فرمولاسیون در مقابل رشد ریززنده‌ها استفاده می‌شود (3-4).

نتایج پژوهش‌های انجام شده در زمینه اثر درون پوشانی ترکیبات زیست فعال نشان می‌دهند که درون پوشانی در مقیاس میکرو گرچه می‌تواند منجر به کاهش سرعت اکسایش شوند، با این وجود به دلیل متغیرهای مختلف موجود در سامانه‌های ناهمگن مانند نوع ماتریکس، ترکیبات لیپیدی و روش فراوری پیش‌بینی پایش کامل سرعت اکسایش مشکل به نظر می‌رسد و برای محافظت کامل از مواد ضد اکسایش استفاده می‌شود، از سوی دیگر میزان ترکیبات زیست فعال نسبت به مواد پوشش دهنده کم می‌باشد. در تحقیقات انجام شده کارایی درون پوشانی روغن‌ها در حدود 30-40 درصد بوده اما نحوه توزیع این ترکیبات در میکروکپسول‌ها یکنواخت نبوده است. با استفاده از کپسول یا درون پوشانی این اسیدهای چرب می‌توان سدی را در ممانعت از واکنش این ترکیبات با عوامل کاهنده ایجاد کرد (5). در طراحی کپسول باید مکان‌هایی را برای شناخت سلول هدف و پایداری در برابر تغییرات pH دستگاه گوارش با افزودن ترکیبات شیمیایی یا سایر گروه‌های محافظت کننده فراهم نمود. کارایی درون پوشانی و پایداری در زمان نگهداری میکرو کپسول حاوی روغن امگا 3 از نکات مورد توجه در توسعه سامانه‌های مناسب درون پوشانی است (6-7).

نانوفناوری دارای ظرفیت بالقوه بالایی در فناوری و علم مواد غذایی است. لیپوزوم‌ها متشکل از لیپیدهای قطبی در

• مواد و روش‌ها

در این تحقیق از فسفولیپید DPPC با خلوص بالای 90 درصد (Lipoid KG, Germany) استفاده شد، ایکوزاپنتانویک اسید و دکوزاهگزانویک اسید با خلوص بیش از 99 درصد، ویتامین E (α -DL-توکوفرول) با خلوص 96%، بافر فسفات (pH: 7/4)، سفادکس G-50 و 2 و 5 دی‌متیل-فوران از کمپانی سیگما (Sigma, St. Louis, MO, USA) خریداری شدند. کاغذ صافی پلی‌کربنات از کمپانی (Millipore, UK) تهیه شد. متیل و پروپیل پارابن، برن‌تری-فلوراید 12 درصد (Boron trifluoride)، پنتادکانویک اسید و سایر مواد شیمیایی به کار رفته دارای خلوص بالا بودند (Merck, Darmstadt, Germany). این پژوهش به روش تجربی (Experimental survey) انجام شد.

روش ساخت لیپوزوم: به طور کلی لیپوزوم‌های خالی چند لایه‌ای (Multilamellar Vesicles: MLVs) با استفاده از یک فسفولیپید زویتریونیک با اعمال اصلاحاتی جزئی در روش آب پوشانی لایه نازک ارائه شده توسط بنگهام (Bangham thin-film hydration method) تهیه و سپس به وسیله سونیکاتور میله‌ای نانو لیپوزوم‌های تک لایه‌ای (Single Unilamellar Vesicles: SUVs) تهیه شدند (13). ویتامین E به نسبت 5 درصد وزنی (14) و مواد نگهدارنده متیل پارابن و پروپیل پارابن به ترتیب در حدود 0/2 درصد وزنی-حجمی و 0/02 درصد وزنی-حجمی به کار رفتند (15). به اختصار در تهیه لیپوزوم‌های MLVs به روش آب پوشانی لایه نازک، ابتدا 25 میلی‌گرم DPPC با افزودن حلال‌های کلروفرم و متانول (با نسبت 2 به 1) کاملاً حل شد و سپس حلال آلی در دستگاه تبخیرکننده چرخان با سرعت 150 rpm در دمای 50°C و تحت خلاء تبخیر گردید و با تشکیل فیلم نازک لیپیدی، تبخیر حداقل به مدت 2 ساعت ادامه یافت. کاهش اندازه MLVs با دستگاه سونیکاتور میله‌ای (Hielscher UP200H, Treptow, Germany) دارای فرکانس ثابت 24 KHz، بیشینه دامنه موج 210 μ m و توان خروجی 600 W انجام شد. به طور خلاصه ریز کردن لیپوزوم‌های متشکل از DPPC با قرار دادن میله با قطر 7 میلی‌متر در عمق حدود 1/5 سانتی‌متری ویال شیشه‌ای حاوی 5 میلی‌لیتر لیپوزوم در مدت 10 دقیقه، طی 5 سیکل 2 دقیقه‌ای با فاصله 5 دقیقه استراحت در دمای 50°C انجام گرفت. سپس با افزودن بافر فسفات (20mM, PH = 7/4) و اسیدهای چرب امگا 3 به صورت محلول اتانولی دارای غلظت مشخص، انکوباسیون با سرعت 40 rpm در دمای 50°C به مدت حدود

دو ساعت در دمای بالاتر از دمای انتقال فاز انجام گرفت. خالص سازی بر اساس کروماتوگرافی طرد اندازه (Size exclusion chromatography: SEC) انجام شد، به این ترتیب که اسیدهای چرب محصور شده از آزاد با عبور سوسپانسیون لیپوزوم‌ها از ستون کروماتوگرافی حاوی ژل Sephadex G50 (طول 20 سانتیمتر و قطر 1/5 سانتیمتر) انجام شد (16). به این ترتیب لیپوزوم‌های SUVs حامل EPA و DHA با نسبت مولی 10: 20: 70 با غلظت نهایی لیپید 25/7 میلی‌گرم به ازای هر میلی‌لیتر تهیه شد. فرمولاسیون‌های لیپوزومی F1 تا F4 تهیه (جدول 1) و ویژگی‌های فیزیکی آنها شامل اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات و درصد کارایی درون پوشانی با 3 تکرار اندازه‌گیری شد و به طور همزمان بررسی ریخت‌شناسی با میکروسکوپ الکترونی عبوری (Transmission electron microscopy: TEM) و مطالعه ساختاری آنها با کالریمتری روبشی تفاضلی (Differential scanning calorimetry: DSC) انجام گرفت.

بر اساس طراحی تحقیق 3 نوع فرمولاسیون به عنوان شاهد در نظر گرفته شد که مشتمل بود بر لیپوزوم خالی (EL)، فرمولاسیون شاهد بر پایه روغن پالمیتوئین که به آن EPA و DHA خالص معادل مقادیر موجود در فرمولاسیون‌های F₁-F₄ به آن اضافه شد (BOO) و فرمولاسیون شاهدی بر پایه روغن پالمیتوئین که به آن EPA و DHA خالص و ویتامین E معادل مقادیر موجود در فرمولاسیون‌های F₁-F₂ به آن افزوده شد (BOOE).

طیف سنجی همبستگی فوتون (Photon correlation spectroscopy): قطر هیدرودینامیک و توزیع اندازه ذرات لیپوزوم‌های خالص شده به روش SEC با روش طیف سنجی همبستگی فوتون (Zetasizer Nano ZS ZEN 3600, Malvern Instruments Corp., Worcestershire, UK) عملکرد آن بر اساس حرکت براونی ذرات معلق درون یک فاز مایع است در زاویه پراکنش 173°، طول موج هلیوم-تنگستن 633 nm و دمای 25°C و ثابت اندکس بازتابش 1/33، پس از رقیق کردن نمونه به میزان 10 برابر با بافر فسفات (20 Mm) تعیین شد (17).

تعیین کارایی درون پوشانی EPA و DHA (درصد): کارایی درون پوشانی وزیکول‌های SUVs حاوی EPA و DHA خالص سازی شده با ستون Sephadex G50 پس از تعیین میزان اسیدهای چرب با روش کروماتوگرافی گازی مجهز به آشکارساز یونیزه کننده شعله‌ای (UNICAM 4600, SB Analytical, UK) متعاقب استخراج و متیلاسیون بر اساس

فرمولاسیون‌های لیپوزومی در ویال‌های شیشه‌ای تحت فشار گاز ازت دربندی شدند و در دماهای $1 \pm 4^\circ\text{C}$ (یخچال)، $1 \pm 30^\circ\text{C}$ و $1 \pm 40^\circ\text{C}$ (انکوباتور) و رطوبت نسبی $5 \pm 65\%$ درصد قرار گرفتند (23). در این بازه زمانی پایداری کارایی درون پوشانی DHA و EPA در لیپوزوم‌های نگهداری شده پس از جدا کردن اسیدهای چرب آزاد از لیپوزوم بارگذاری شده محاسبه گردید.

تجزیه و تحلیل آماری: در مراحل تهیه و مقایسه 4 فرمول تجزیه آماری داده‌ها با استفاده از تجزیه واریانس ANOVA انجام شد. مقایسه میانگین‌ها به روش حداقل تفاوت‌های معنی دار (least significance difference) با استفاده از نرم افزار SAS ویرایش 9.1.3 انجام شد. برای تجزیه آماری نتایج پایداری تجزیه واریانس داده‌های به دست آمده در قالب طرح کاملاً تصادفی، با استفاده از طرح عاملی کامل (Full Factorial Design) با منابع تغییر فرمولاسیون، زمان و دما در سطوح مختلف انجام شد. مقایسه میانگین‌های اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات و درصد کارایی درون پوشانی به روش LSD در سطح معنی‌داری درصد $P \leq 0/01$ انجام شد. نمودارها توسط برنامه Microsoft Excel ترسیم شد.

• یافته‌ها

اثر متغیرهای فرمولاسیون، زمان و دما بر اندازه ذرات و توزیع اندازه ذرات: شکل 1 مقایسه تغییرات میانگین اندازه ذرات فرمولاسیون‌های F1-F4 در مدت زمان نگهداری است. میانگین اندازه ذرات فرمولاسیون لیپوزومی F1 (حاوی DHA، EPA و ویتامین E) پس از 90 روز نگهداری در دماهای 4، 30 و $40 \pm 0/8$ افزایش یافت و از $82/1 \pm 0/8$ نانومتر در روز نخست به ترتیب به $88/8 \pm 1/2$ ، $105/2 \pm 1/4$ و $110/5 \pm 1/3$ نانومتر رسید ($P \leq 0/01$). میانگین اندازه ذرات فرمولاسیون لیپوزومی F2 (حاوی DHA، EPA و ویتامین E به همراه ترکیبات نگهدارنده) پس از 90 روز نگهداری در دماهای 4 و 40 ± 2 از $107/2 \pm 2$ نانومتر به ترتیب به $115/3 \pm 3/4$ و $119/3 \pm 2$ نانومتر افزایش یافت و در دمای 30°C در حد $107/3 \pm 1$ نانومتر بود ($P > 0/01$). میانگین اندازه ذرات فرمولاسیون لیپوزومی F3 (دارای DHA و EPA) پس از 90 روز نگهداری در دماهای 4، 30 و 40°C افزایش یافت و به ترتیب از $73/40 \pm 1/3$ نانومتر به $419/5 \pm 12/3$ و $88/3 \pm 1/2$ و $129/7 \pm 3/3$ نانومتر تغییر یافت که تفاوت آماری معنی‌داری را نشان داد ($P \leq 0/01$). به همین ترتیب میانگین اندازه ذرات لیپوزومی F4 (حاوی DHA، EPA و ترکیبات نگهدارنده) پس از 90 روز نگهداری در دماهای 4، 30 و 40°C افزایش یافت.

روش‌های Folch et al (18) و Metcalfe (19) و تعیین مقدار فسفولیپید به روش کالریتریک Stewart (20) انجام شد. کارایی درون پوشانی طبق معادله 1 محاسبه شد:

$$EE\% = \frac{W_{\text{Entrapped}}}{W_{\text{Total}}} \times 100$$

$W_{\text{Entrapped}}$ و W_{Total} به ترتیب اسید چرب امگا 3 محصور شده در لیپوزوم (mg/ml) و کل اسید چرب امگا 3 به کار رفته در تهیه لیپوزوم (mg/ml) بود.

بررسی میکروسکوپ الکترونی عبوری: علاوه بر اندازه ذرات و توزیع اندازه ذرات، بررسی شکل وزیکول‌ها از اهمیت زیادی برخوردار است. برای بررسی ریخت شناسی و اندازه لیپوزوم‌های حاوی اسیدهای چرب از رنگ‌آمیزی منفی با میکروسکوپ الکترونی عبوری (Germany, EM10 Ziess) استفاده شد. پس از قرار دادن سوسپانسیون لیپوزومی رقیق شده با بافر فسفات روی گرید مسی فرموار کربن (مش 200)، با گلوآرآلدئید 2/5 درصد تثبیت شد. سپس نمونه با محلول آبی یورانیل استات 2 درصد به مدت 1 دقیقه رنگ‌آمیزی و در دمای محیط خشک شد. در خاتمه از نمونه‌های رنگ‌آمیزی شده با میکروسکوپ الکترونی دارای ولتاژ 80 kV تصویر گرفته شد (21).

مطالعه گرماسنج روبشی تفاضلی: مطالعه ترموتروپیک لیپوزوم خالی، لیپوزوم ادغام شده با ویتامین E یا DHA و EPA و فرمولاسیون F1 با دستگاه گرماسنج روبشی تفاضلی EPA و فرمولاسیون F1 با دستگاه Shimadzu, Japan) DSC-60 انجام شد. پس از توزین دقیق نمونه‌ها (5 میلی‌گرم) در محفظه‌های آلومینیومی مخصوص و بستن در آنها در کنار یک ظرف خالی استاندارد با سرعت 5°C در دقیقه در بازه دمایی 10°C تا 60°C در دستگاه DSC در مجاورت گاز نیتروژن با جریان 50 میلی‌لیتر در دقیقه حرارت داده شدند تا با حفظ هم‌دمایی تغییرات ساختاری نمونه‌ها بررسی گردد. نمونه‌ها شامل لیپوزوم خالی، لیپوزوم بارگذاری شده حاوی اسیدهای چرب امگا 3، لیپوزوم حاوی ویتامین E و لیپوزوم بارگذاری شده حاوی اسیدهای چرب امگا 3 و ویتامین E برای آنالیز حرارتی تهیه شدند. آزمون‌ها برای هر نمونه با دو تکرار انجام شد (22).

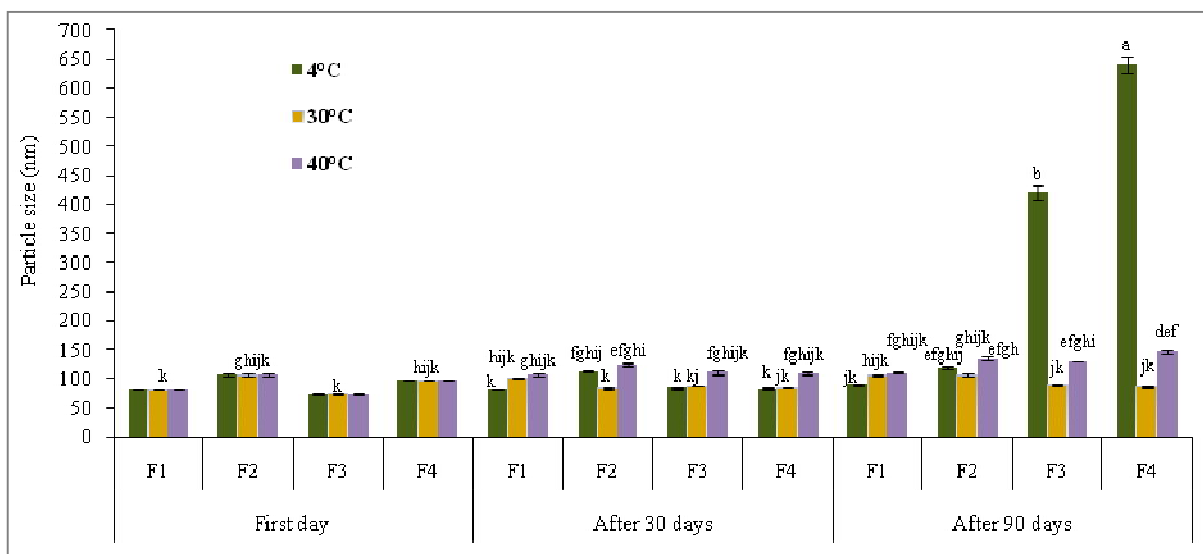
بررسی پایداری لیپوزوم‌ها: بررسی پایداری فیزیکی فرمولاسیون‌های لیپوزومی F1-F4 با پایش تغییرات ویژگی‌های میانگین اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات و کارایی درون پوشانی DHA و EPA در فواصل زمانی 1، 30 و 90 روز با 3 تکرار توأم با بررسی ریخت شناسی انجام گرفت.

از 90 روز نگهداری در دماهای 4، 30 و 40°C از 0/13 به ترتیب به 0/20، 0/22 و 0/20 افزایش یافت. میانگین توزیع اندازه ذرات فرمولاسیون F2 پس از 90 روز نگهداری در دماهای 4، 30 و 40°C به ترتیب 0/26، 0/24 و 0/27 تعیین شد. توزیع اندازه ذرات فرمولاسیون F3 پس از 90 روز نگهداری در دماهای 4، 30 و 40°C افزایش یافت و از 0/18 به ترتیب به 0/3، 0/21 و 0/26 رسید. توزیع اندازه ذرات فرمولاسیون F4 پس از 90 روز نگهداری در دماهای 4، 30 و 40°C نیز تغییراتی در برداشت به طوری که در ابتدا 0/27 بود و سپس به ترتیب به 0/93، 0/31 و 0/46 رسید. مقایسه میانگین توزیع اندازه ذرات فرمولاسیون‌های لیپوزومی حاوی DHA و EPA در پایان 90 روز نگهداری در دماهای 30 و 40°C تفاوت آماری معنی‌داری را نشان داد. بیشترین میزان افزایش در میانگین توزیع اندازه ذرات در لیپوزوم خالی (EL) در دمای 30 و 40°C پس از نگهداری به مدت 90 روز حاصل شد ($P \leq 0/01$). میانگین توزیع اندازه ذرات لیپوزوم خالی در ابتدای مطالعه 0/16 بود که در پایان بازه زمانی 90 روز نگهداری در 4، 30 و 40°C به ترتیب به 0/18، 0/56 و 0/94 افزایش یافت.

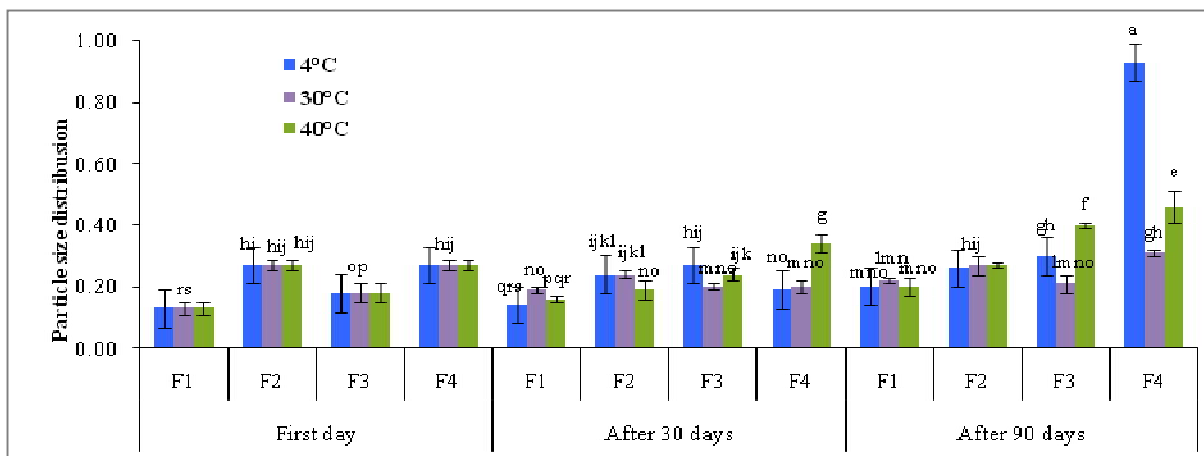
مقایسه نتایج اثرات متقابل متغیرهای فرمولاسیون، زمان و دما بر اندازه ذرات فرمولاسیون‌های مختلف نشان داد که میان فرمولاسیون‌های حاوی ویتامین E (F_1 و F_2) و فاقد آن (F_3) و F_4) با نمونه شاهد پس از 90 روز نگهداری در دماهای 30 و 40°C تفاوت آماری معنی‌دار وجود داشت ($P \leq 0/01$). در مجموع اندازه ذرات فرمولاسیون لیپوزومی حاوی DHA و EPA به همراه 5 مول درصد ویتامین E پس از 90 روز نگهداری در دماهای مختلف در مقایسه با سایر فرمولاسیون‌ها از توزیع مناسبی برخوردار بود. کمترین تغییر در اندازه ذرات فرمولاسیون‌ها در پایان 90 روز نگهداری در دمای 40°C نسبت به زمان اولیه مربوط به فرمولاسیون‌های F_1 و F_2 به دست آمد. کوچکترین اندازه در فرمولاسیون 1 نگهداری شده در دمای 4°C به مدت 90 روز به میزان حدود 89 نانومتر حاصل شد.

مقایسه میانگین اندازه ذرات لیپوزوم خالی بعد از نگهداری در دماهای 4، 30 و 40°C در دوره زمانی 90 روز روند افزایشی داشت و به ترتیب $149/9 \pm 6/7$ نانومتر، $177/9 \pm 3/4$ نانومتر و $650/4 \pm 33/1$ نانومتر تعیین شد ($P \leq 0/01$).

روند تغییرات میانگین توزیع اندازه ذرات فرمولاسیون‌های F1-F4 در شکل 2 نشان داده شده است. فرمولاسیون F1 پس



شکل 1: مقایسه پایداری اندازه ذرات فرمولاسیون‌های لیپوزومی و لیپوزوم خالی در دماها و زمان‌های مختلف نگهداری ($n=3$ و $SD \pm$ میانگین). F1: لیپوزوم حاوی امگا 3 و ویتامین E، فرمولاسیون F2: لیپوزوم حاوی امگا 3، ویتامین E و ترکیبات نگهدارنده، فرمولاسیون F3: لیپوزوم حاوی امگا 3، فرمولاسیون F4: لیپوزوم حاوی امگا 3 و ترکیبات نگهدارنده



شکل 2: مقایسه پایداری توزیع اندازه ذرات فرمولاسیون‌های لیپوزومی و لیپوزوم خالی در دماها و زمان‌های مختلف نگهداری (میانگین \pm SD و $n=3$)

F1: لیپوزوم حاوی امگا 3 و ویتامین E، فرمولاسیون F2: لیپوزوم حاوی امگا 3، ویتامین E و ترکیبات نگهدارنده، فرمولاسیون F3: لیپوزوم حاوی امگا 3، فرمولاسیون F4: لیپوزوم حاوی امگا 3 و ترکیبات نگهدارنده

میزان EPA و DHA (درصد) موجود در سوسپانسیون‌های لیپوزومی قبل از مرحله خالص‌سازی با ستون حاوی سفادکس G50 در طی 90 روز نگهداری در دمای 40°C در جدول 2 نشان داده شده است. به منظور محاسبه کارایی درون پوشانی EPA و DHA، میزان اسیدهای چرب بارگذاری شده و فسفولیپید در انواع فرمولاسیون‌های لیپوزومی در زمان‌های صفر، 30 و 90 روز نگهداری در دماهای مختلف پس از مرحله خالص‌سازی محاسبه گردید. نتایج نشان داد که منابع تغییر فرمولاسیون، زمان و دما متغیر وابسته کارایی درون پوشانی EPA و DHA را تحت تاثیر قرار می‌دهند ($P \leq 0/01$). اشکال 3 و 4 تاثیر زمان‌ها و دماهای مختلف نگهداری را بر درصد کارایی درون پوشانی EPA و DHA فرمولاسیون‌های لیپوزومی نشان می‌دهند. پس از گذشت 90 روز نگهداری فرمولاسیون‌های لیپوزومی در دماهای مختلف از کارایی درون پوشانی EPA و DHA کاسته شد.

اثر متغیرهای فرمولاسیون، زمان و دما بر کارایی درون پوشانی: همان طور که از نتایج جدول 1 مشاهده می‌شود، بیشترین میانگین کارایی درون پوشانی EPA و DHA و کمترین میانگین توزیع اندازه ذرات مربوط به فرمولاسیون F1 است. میانگین کارایی درون پوشانی DHA، در فرمولاسیون‌های لیپوزومی حاوی ویتامین E (F2 و F1) با اختلاف آماری معنی‌دار داشته و به ترتیب حدود $89/1 \pm 1/2$ و $84/8 \pm 1/3$ درصد ($P \leq 0/01$) بوده و در مورد فرمولاسیون‌های فاقد ویتامین E و دارای نگهدارنده و یا بدون آن (فرمول‌های F4 و F3) به ترتیب $75/1 \pm 1/1$ و $76/5 \pm 0/8$ درصد بود ($P \geq 0/01$). در این شرایط میانگین کارایی درون پوشانی EPA در لیپوزوم‌های حاوی ویتامین E (فرمول‌های F1 و F2) به ترتیب حدود $81/96 \pm 0/85$ و $77/68 \pm 0/65$ درصد با اختلاف آماری معنی‌دار حاصل شدند. میانگین کارایی درون پوشانی EPA نمونه‌های فاقد ویتامین E (فرمول‌های F3 و F4) $68/4 \pm 1/1$ و $67/7 \pm 1/4$ درصد تعیین شد ($P > 0/01$).

جدول 1: کارایی درون پوشانی، اندازه ذرات و توزیع اندازه ذرات نانولیپوزوم‌ها ($n=3$ و \pm میانگین)

فرمولاسیون نانولیپوزوم‌ها	کارایی درون پوشانی DHA (درصد)	کارایی درون پوشانی EPA (درصد)	اندازه (nm)	توزیع اندازه ذرات
F ₁ (DPPC+E+DHA+EPA)	$89/1 \pm 0/6^c$	$81/9 \pm 1/4^d$	$82 \pm 0/8^b$	$0/13 \pm 0/02^a$
F ₂ (DPPC+E+DHA+EPA+ ME/P)	$84/9 \pm 0/8^b$	$77/8 \pm 0/4^c$	$107/2 \pm 1/8^d$	$0/27 \pm 0/02$
F ₃ (DPPC +DHA+EPA)	$75/1 \pm 1/9^a$	$68/3 \pm 1/2^b$	$73/4 \pm 1/3^a$	$0/18 \pm 0/03^b$
F ₄ (DPPC +DHA+EPA+ ME/P)	$76/5 \pm 1/9^a$	$40/9 \pm 0/4^a$	$97/3 \pm 0/2^c$	$0/27 \pm 0/02^a$

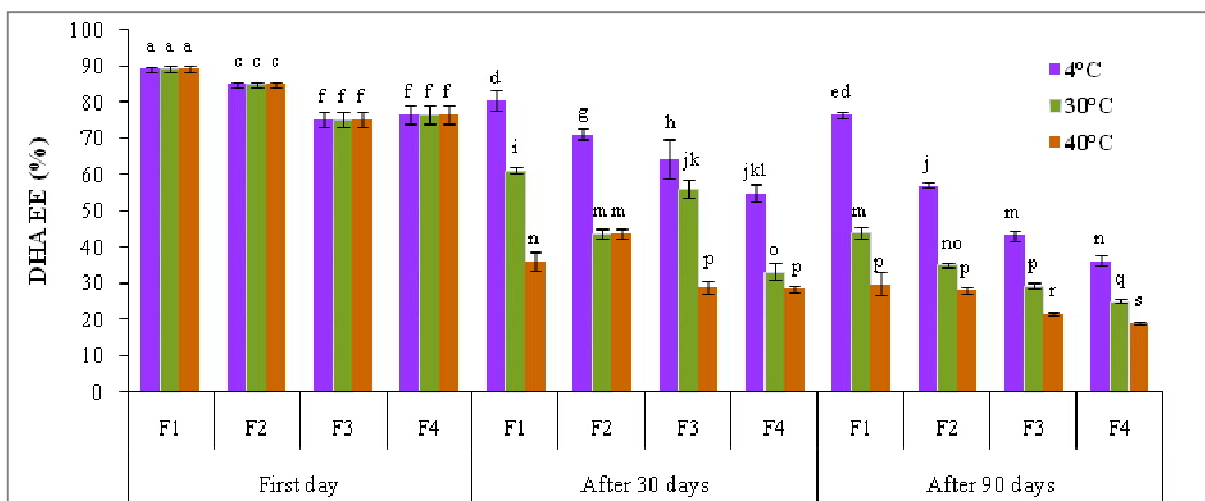
F1: فرمولاسیون لیپوزومی حاوی امگا 3 و ویتامین E، فرمولاسیون F2: فرمولاسیون لیپوزومی حاوی امگا 3، ویتامین E و ترکیبات نگهدارنده، F3: فرمولاسیون لیپوزومی حاوی امگا 3، فرمولاسیون F4: لیپوزوم حاوی امگا 3 و ترکیبات نگهدارنده.

*. حروف متفاوت در هر ستون نشان دهنده تفاوت معنی‌دار آماری است ($P < 0/01$).

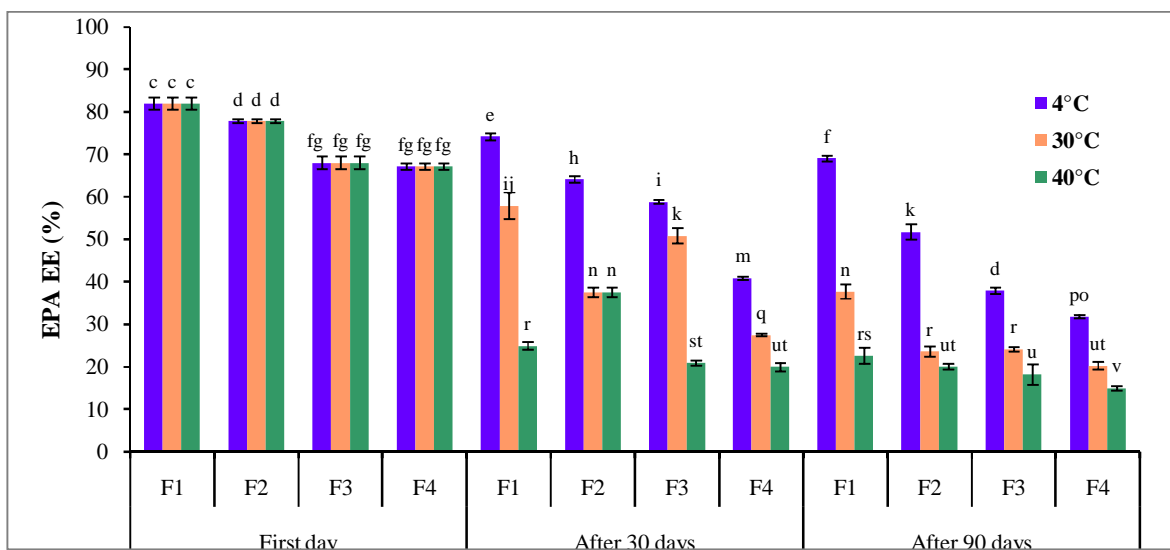
جدول 2: میزان DHA و EPA (درصد) موجود در فرمولاسیون‌های لیپوزومی قبل از مرحله خالص‌سازی در بازه زمانی 90 روز نگهداری در دمای 40°C (SD ± میانگین و n=3)

میزان DHA			میزان EPA			فرمولاسیون
90	30	1	90	30	1	
47/8±2/3 ^d	66/3±1/6 ^e	94/4±1/7 ^a	67/9±2/4 ^d	81/5±1/8 ^b	91/3±0/9 ^{a*}	F ₁
35/2±0/5 ^f	50/5±1/7 ^e	89/7±1/3 ^b	54/5±0/5 ^e	72/8±2/3 ^c	80/8±1/1 ^b	F ₃

F₁: لیپوزوم حاوی امگا 3 و ویتامین E، F₃: لیپوزوم حاوی امگا 3.
* حروف متفاوت در مورد هر متغیر نشان دهنده تفاوت معنی‌دار آماری است (P < 0/01).



شکل 3: مقایسه کارایی درون پوشانی DHA فرمولاسیون‌های لیپوزومی در دماها و زمان‌های مختلف نگهداری (SD ± میانگین و n=3)
F₁: لیپوزوم حاوی امگا 3 و ویتامین E، فرمولاسیون F₂: لیپوزوم حاوی امگا 3، ویتامین E و ترکیبات نگهدارنده، فرمولاسیون F₃: لیپوزوم حاوی امگا 3، فرمولاسیون F₄: لیپوزوم حاوی امگا 3 و ترکیبات نگهدارنده



شکل 4: مقایسه کارایی درون پوشانی EPA فرمولاسیون‌های لیپوزومی در دماها و زمان‌های مختلف نگهداری (SD ± میانگین و n=3)
F₁: لیپوزوم حاوی امگا 3 و ویتامین E، فرمولاسیون F₂: لیپوزوم حاوی امگا 3، ویتامین E و ترکیبات نگهدارنده، فرمولاسیون F₃: لیپوزوم حاوی امگا 3، فرمولاسیون F₄: لیپوزوم حاوی امگا 3 و ترکیبات نگهدارنده

در پایان زمان نگهداری در دماهای مذکور به ترتیب به حدود 20.48 و صفر تقلیل یافت ($P \leq 0/01$).

اثر ترکیبات فرمولاسیون بر رفتار حرارتی لیپوزوم: شکل 5 منحنی‌های ترموگرام DSC لیپوزوم خالی، لیپوزوم همراه ویتامین E، لیپوزوم حاوی DHA و EPA و فرمولاسیون F₁ را نشان می‌دهد. بر اساس نتایج آزمون DSC حضور اسیدهای چرب امگا 3 در دو لایه لیپیدی و برهمکنش آنها منجر به کاهش دمای ذوب فسفولیپید و پهن شدن پیک انتقال فاز گردیده است. حضور ویتامین E با تاثیر بر دمای انتقال فاز اصلی DPPC منجر به کاهش آن گردید. به همین ترتیب با ادغام ویتامین E در فرمولاسیون حاوی اسیدهای چرب امگا 3 این روند کاهشی مشاهده گردید.

مطابق با جدول 3 میزان اولیه DHA در نمونه شاهد BOO (روغن پالم- اولئین حاوی DHA و EPA) حدود 77 درصد بود، پس از 90 روز نگهداری در دماهای 4، 30 و 40°C روند نزولی داشت و به ترتیب به حدود 28 درصد، 6 درصد و صفر رسید و به طور مشابه میزان اولیه EPA (86 درصد) به حدود 33 درصد، 8 درصد و صفر کاهش یافت. در فرمولاسیون BOOE (روغن پالم- اولئین حاوی DHA، EPA و ویتامین E) در ابتدای مطالعه میزان اولیه DHA حدود 86 درصد بود که در بازه زمان نگهداری در دماهای 4، 30 و 40°C مقادیر آن به ترتیب به 43 درصد، 15 درصد و حدود صفر رسید، به همین ترتیب میزان اولیه EPA 95 درصد بود و

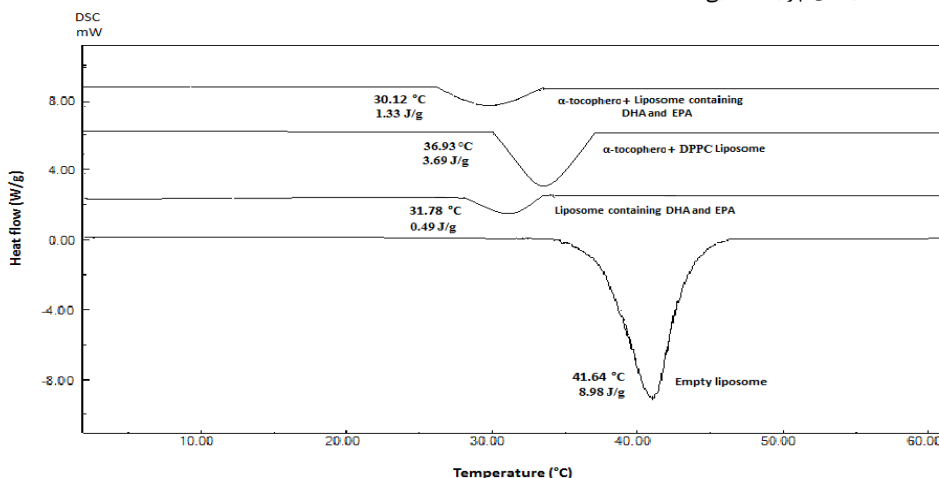
جدول 3: مقایسه میانگین اثر متقابل زمان و دما بر میزان DHA و EPA (درصد) شناسایی شده به وسیله GC/FID در فرمولاسیون‌های شاهد ($n=3$ و $SD \pm$ میانگین)

فرمولاسیون	دما (°C)		
	1	30	90
BOO*	میزان DHA		
	77/5±1/2	54/4±3/2	27/9±0/7
	77/5±1/2	27/5±1/1	5/9±0/3
	77/5±1/2	4/9±0/3	ND ^a
	86/5±0/6	79±0/02	43/0±0/15
	86/5±0/6	14/7±0/04	14/9±0/1
BOOE**	میزان EPA		
	85/6±2/8	66/8±0/4	33/1±0/2
	85/6±2/8	30/7±0/6	7/9±0/2
	85/6±2/8	7/2±0/5	ND
	95/0±3/5	87/6±4/1	47/5±1/2
	95/0±3/5	56/1±4/1	20/0±1/5
	95/0±3/5	12/9±0/4	ND

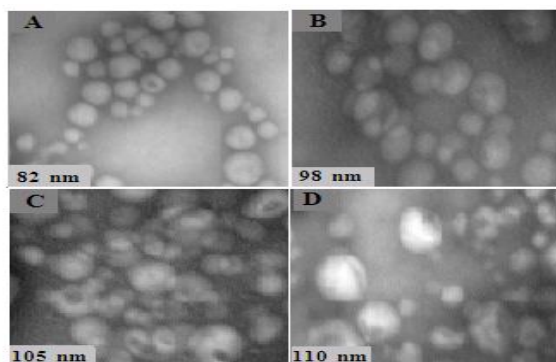
*BOO: نمونه شاهد بر پایه روغن پالم - اولئین است که به آن DHA و EPA خالص معادل مقادیر موجود در فرمولاسیون‌های F₁ - F₄ به آن اضافه شد.

**BOOE: نمونه شاهد بر پایه روغن پالم - اولئین است که به آن DHA و EPA خالص و ویتامین E معادل مقادیر موجود در فرمولاسیون‌های F₁ - F₂ به آن اضافه شد.

a: Not Detected: ND: اسیدهای چرب شناسایی نشد.



شکل 5: منحنی‌های ترموگرام DSC لیپوزوم خالی، لیپوزوم بارگذاری شده حاوی اسیدهای چرب امگا 3، لیپوزوم حاوی ویتامین E و لیپوزوم بارگذاری شده حاوی اسیدهای چرب امگا 3 و ویتامین E



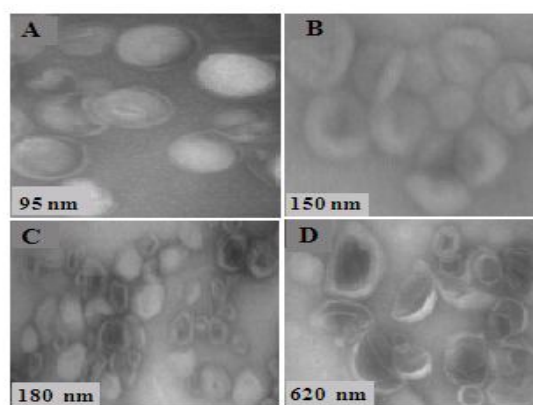
شکل 8: تصاویر لیپوزوم‌های حاوی DHA و EPA همراه ویتامین E در زمان صفر (A) با بزرگنمایی 80000 و پس از نگهداری به مدت 90 روز در دماهای 4°C (B)، 30°C (C) و 40°C (D) (به ترتیب با بزرگنمایی 40000، 80000 و 63000)

• بحث

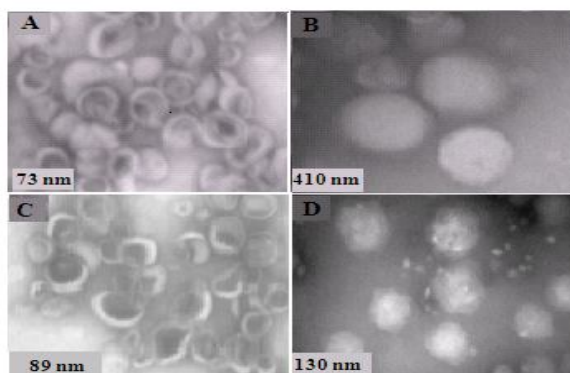
اندازه ذرات و توزیع اندازه ذرات: در این تحقیق لیپوزوم‌های از پیش ساخته شده حاصل از روش هیدراسیون لایه نازک اصلاحی پس از افزودن ویتامین E و ترکیبات محافظ تحت سونیکاسیون میله‌ای قرار گرفت و بارگذاری DHA و EPA، به وسیله آنکوباسیون انجام شد. یافته‌های حاصل از این بررسی موید درون‌پوشانی این ترکیبات آب‌گریز در ساختار نانولیپوزومی تشکیل یافته بود. نتایج تجزیه واریانس داده‌ها نشان داد که اثرات متقابل بین متغیرهای اصلی (فرمولاسیون، زمان و دما) در سطوح مختلف معنی‌دار بودند. تمامی تیمارهای تازه تهیه شده (F₁-F₄) دارای میانگین اندازه ذرات و توزیع اندازه ذرات مناسب و به ترتیب کمتر از 100 نانومتر و کمتر از 0/27 داشتند (اشکال 2 و 1).

مقایسه داده‌های اثرات متقابل متغیرهای اصلی بر میانگین اندازه و توزیع اندازه ذرات کلیه فرمولاسیون‌های لیپوزومی حاوی ویتامین E و بدون آن با نمونه‌های شاهد پس از نگهداری به مدت 90 روز در دماهای مختلف معنی‌دار بود (P<0/01). میانگین اندازه ذرات لیپوزوم خالی بعد از نگهداری در زمان‌ها و در دوره زمانی مختلف روند افزایشی معنی‌داری را نشان داد، مقایسه این مقادیر نشانه کاهش پایداری فیزیکی لیپوزوم خالی است که منجر به تجمع یا امتزاج آن‌ها گردیده است که با یافته‌های سایر محققین مطابقت می‌نماید (24). مطالعه پایداری فیزیکی لیپوزوم از اهمیت به سزایی برخوردار است، تغییر در اندازه ذرات در اثر پدیده‌های تجمع و امتزاج روی می‌دهد. عوامل مختلفی مانند ترکیبات لیپیدی مورد استفاده مانند کلسترول، شرایط فرمولاسیون مانند pH، قدرت یونی، دما و ترکیبات بافر به نحوی در پایداری لیپوزوم مؤثر

تصاویر TEM لیپوزوم: اشکال 6 تا 8 تصویربرداری میکروسکوپ الکترونی عبوری لیپوزوم خالی (DPPC خالص) نمونه شاهد (تصاویر 6a، 6b، 6c و 6d)، لیپوزوم حاوی DHA و EPA فاقد ویتامین E (تصاویر 7a، 7b، 7c و 7d) و لیپوزوم ادغام شده با ویتامین E (تصاویر 8a، 8b، 8c و 8d) در زمان صفر و پس از گذشت 90 روز نگهداری در دماهای مختلف را نشان می‌دهند. همان‌طور که از مقایسه تصاویر TEM انواع فرمولاسیون‌های لیپوزومی مشهود است نمونه‌های تازه تهیه شده کروی، منظم و همگن بودند و نتایج ارزیابی فیزیکی را تأیید کردند. با گذشت زمان تغییرات نسبتاً محسوسی در ریخت شناسی و اندازه لیپوزوم‌ها مشاهده شد.



شکل 6: تصاویر لیپوزوم‌های خالی تازه تهیه شده (A) با بزرگنمایی 80000 و پس از 90 روز نگهداری در دماهای 4°C (B)، 30°C (C) و 40°C (D) (به ترتیب با بزرگنمایی 80000، 25000 و 80000)



شکل 7: تصاویر لیپوزوم‌های حاوی DHA و EPA فاقد ویتامین E تازه تهیه شده (A) با بزرگنمایی 80000 و پس از نگهداری به مدت 90 روز در دماهای 4°C (B)، 30°C (C) و 40°C (D) (به ترتیب با بزرگنمایی 40000، 80000 و 63000)

گروه فسفات فسفولیپید DPPC باشد. مقایسه یافته‌ها نمایانگر نقش مثبت ویتامین E در پایداری غشاء SUVs حامل DHA و EPA است و در راستای گزارش Clares و همکاران مبنی بر ادغام ویتامین E به فرمولاسیون و بهبود استحکام غشاء و آب‌گریزتر شدن توام با نفوذپذیری کمتر و در نتیجه افزایش بارگذاری آن می‌باشد (28).

از علل عدم ثبات کارایی درون پوشانی مولکول بارگذاری شده در سامانه‌های انتقال لیپوزومی تجزیه نوری (فتولیز)، اکسیداسیون و هیدرولیز است. یکی از عوامل مهم کاهش پایداری درون پوشانی EPA و DHA در بازه زمانی مطالعه اخیر عدم کاربرد ترکیبات پایدارکننده مانند کلسترول یا لیپیدهای پایدار شده فضایی (مشتملات پلیمری لیپید) بوده است. پایدارسازی لیپوزوم‌ها در مقابل تغییرات فیزیکی (تجمع یا همجوشی) با استفاده از مقادیر کم لیپیدهای باردار منفی یا اتصال بسپارهای آب دوست مصنوعی به غشاءهای دولایه لیپیدی امکان‌پذیر گردیده است. به طور مشابه وزیکول‌های بر پایه سورفکتانت‌ها نقش محافظتی حامل را برای ترکیبات زیست فعال در غشاء دو لایه وزیکولی ایفا می‌کنند (29-30).

ترکیبات آب‌گریز مانند EPA و DHA با داشتن ضریب پخش‌پذیری میان 1-10 اکتانول و آب، حدود 5 کاملاً در غشاء دو لایه لیپیدی لیپوزوم درون پوشانی می‌شوند. با این وجود پایداری غشاء SUVs به میزان زیادی به دلیل قرارگیری این ترکیبات در بخش دولایه و افزایش همجوشی کاهش می‌یابند. پایداری کلئیدی و فیزیکی در مجموع مرتبط با ثابت ماندن توزیع اندازه ذره‌ای می‌باشد. به علاوه در کلئیدهای حلال گریز همجوشی لیپوزوم‌ها موجب نشت مواد درون پوشانی شده یا مولکول‌های مجتمع می‌شود (31-33). نتایج ارزیابی کارایی درون پوشانی بعد از خالص‌سازی سوسپانسیون لیپوزوم‌ها با این یافته‌ها همسو است (جدول 2). مشاهده اختلاف بارز میان مقادیر DHA و EPA موجود در فرمولاسیون‌های لیپوزومی F1 و F3 در مراحل قبل و بعد از خالص‌سازی در طی 90 روز نگهداری در دمای 40°C موبد ساختار لیپیدی این سامانه همانند تمام کلئیدهای حلال گریز است که از طریق حالت‌های متعدد Metastable تشکیل می‌شوند و در مجموع از نظر ترمودینامیکی ناپایدارند که در نتیجه موجب نشت مقادیر چشمگیر اسیدهای چرب امگا 3 در مدت نگهداری در دمای بالا شد (34).

گرماسنج روبشی تفاضلی: در این تحقیق مطالعات گرماسنجی در محدوده دمایی 10°C- تا 60°C نشان داد که فرمولاسیون لیپوزومی حاوی DHA و EPA با غلظت 15

هستند (25، 26). تشکیل کلئیدها مجتمع توام با افزایش توزیع اندازه ذرات است. با توجه به تحقیقات انجام شده تغییرات در ویژگی‌های فیزیکی مانند اندازه ذرات و توزیع اندازه ذرات این فرمولاسیون لیپوزومی ممکن است به دلیل تجمع لیپوزوم‌ها باشد (27). 28 حذف شد با توجه به نوسان میزان اندازه ذرات و توزیع اندازه ذرات به دست آمده ناپایداری فیزیکی لیپوزوم حاوی DHA، EPA و نگهدارنده در مقایسه با فرمولاسیون‌های حاوی ویتامین E بیشتر بوده است. در گزارشها آمده است که افزودن مشتقات پارابن می‌تواند موجب تغییر عملکرد غشاهای بیولوژیک گردد و ماهیت این برهمکنش بستگی به غلظت آنها دارد. همانطور که بررسی نتایج DSC اثرات پروپیل پارابن با وزیکول‌های MLVs و ULVs متشکل از دی پالمیتوئیل فسفاتیدیک اسید (DPPA) نشان داد که مکانیسم برهمکنش آن مستقل از pH بافر مورد استفاده بوده و بر تغییر فاز ترموتریپیک و تحرک مولکولی غشاء دولایه لیپیدی اثرگذار بوده است (15). این یافته‌ها همسو با نتایج حاصل از مقایسه ویژگی‌های فیزیکی فرمولاسیون‌های حاوی متیل و پروپیل پارابن بررسی اخیر است.

کارایی درون پوشانی DHA و EPA: کارایی درون پوشانی یکی از عوامل مهم و موثر در استفاده کاربردی لیپوزوم است که تحت تاثیر روش و شرایط آماده‌سازی لیپوزوم، ماهیت ترکیب فعال از نظر آب دوستی یا آب‌گریز بودن، غلظت و نوع فسفولیپید، ترکیبات لیپیدی فرمولاسیون و موارد دیگر می‌باشد (8، 23-25). غشاء دو لایه لیپیدی با وجود برهمکنش‌های غیرکووالانسی قادر است انواع ترکیبات آب‌گریز را محصور نماید. تجزیه تحلیل آماری یافته‌های این تحقیق نشان داد که اثرات متقابل متغیرهای فرمولاسیون، زمان و دما بر کارایی درون پوشانی DHA و EPA معنی‌دار شدند ($P \leq 0/01$). میانگین کارایی درون پوشانی DHA و EPA فرمولاسیون‌های لیپوزومی تازه تهیه شده حاوی ویتامین E با نگهدارنده و بدون آن دارای اختلاف آماری معنی‌داری بودند و در مورد فرمولاسیون‌های فاقد ویتامین E و دارای نگهدارنده و یا بدون نگهدارنده این اختلاف آماری مشاهده نشد ($P > 0/01$). این نتایج با یافته‌های مطالعات دیگر داشته است (27). پس از گذشت 3 ماه نگهداری فرمولاسیون‌های لیپوزومی در دماهای مختلف به طور معنی‌داری از کارایی درون پوشانی EPA و DHA کاسته شد (اشکال 3 و 4). یکی از دلایل بالاتر بودن کارایی درون پوشانی لیپوزوم‌های با شارژ منفی در این مطالعه ممکن است به دلیل نیروی جاذبه الکترواستاتیک میان مولکول‌های اسیدهای چرب امگا 3 و

مراحل مختلف، در اثر وقوع برهمکنش میان اسیدهای چرب امگا 3 با غشاء دو لایه لیپیدی DPPC توأم با کاهش نظم زنجیره آسپیل نقطه ذوب آن کاهش یافت. در طی زمان نگهداری دما از عوامل مهم و موثر بر تغییرات ساختار لیپوزومی بود. تغییرات مشاهده شده در ترموگرام‌ها نشانه کاهش دمای تغییر انتقال فاز لیپید فرمولاسیون‌های حاوی اسیدهای چرب امگا 3 و ویتامین E و تاثیر بر نفوذپذیری غشاء دو لایه لیپیدی و کاهش درون پوشانی DHA و EPA در دماها و زمان‌های مختلف نگهداری بوده که با یافته‌های سایر محققین مطابقت می‌نماید (36-38).

ریخت شناسی با TEM: تصاویر تهیه شده از نمونه‌های لیپوزوم خالی و لیپوزوم‌های حاوی DHA و EPA با ویتامین E و بدون آن را در زمان صفر و پس از گذشت 90 روز نگهداری در دماهای مختلف نشان داد که نانولیپوزوم‌های تازه اشکالی کروی، منظم و همگن داشته و با گذشت زمان تغییراتی در این ویژگی‌ها مشاهده شد. بررسی تصاویر میکروسکوپی از لیپوزوم‌های حاوی DHA و EPA با قدرت تفکیک بالای TEM حاکی از تغییر در ریخت شناسی آنها در دماهای مختلف نگهداری است که احتمالاً می‌تواند به دلیل عدم کاربرد ترکیبات پایدارکننده ساختار فیزیکی نانوساختار لیپوزوم باشد، چنانچه در سایر تحقیقات نقش روش تهیه و ترکیبات فرمولاسیون در پایداری ساختار کلئیدی با تصویربرداری به وسیله انواع روش‌های میکروسکوپیکی ارزیابی و تایید شده است (39-41). تغییرات محسوس در اندازه ذرات لیپوزوم‌های خالی متشکل از DPPC در محدوده 620-95 نانومتر در طی نگهداری در دماهای مختلف وجود داشت. لیپوزوم‌های حاوی DHA و EPA فاقد ویتامین E تازه تهیه شده دارای اندازه ذراتی معادل 73 نانومتر بودند و پس از نگهداری به مدت 90 روز در دماهای مختلف این روند نیز افزایشی مشاهده شد (89-410 نانومتر)، به علاوه ساختار ظاهری آنها دستخوش تغییراتی گردیده بود. با ادغام ویتامین E به لیپوزوم‌های حاوی اسیدهای چرب امگا 3 افزایش اندازه ذرات در محدوده نسبتاً کوچکی (82-110 نانومتر) وجود داشت. بنابراین ارزیابی ریخت شناسی انجام شده با نتایج ویژگی‌های فیزیکی فرمولاسیون‌ها همسو بود.

در این تحقیق ادغام ویتامین E اثرات محافظتی و پایدارکننده چشمگیری بر میزان DHA و EPA و پایداری فیزیکی آن در برداشت. ارزیابی پایداری فیزیکی شیمیایی اولین گام در توسعه یک حامل لیپیدی تازه است. با توجه به مزایای بالقوه تغذیه‌ای اسیدهای چرب امگا 3، به منظور کسب

میلی‌مول و ویتامین E با غلظت 5 درصد وزنی موجب کاهش دمای انتقال ذوب DPPC شد (شکل 5). مطابق با تحقیقات انجام شده دمای انتقال فاز غشاء دو لایه فسفولیپیدی DPPC با افزودن 30 مول درصد اسیدهای چرب DHA و EPA به ترتیب به $36/2^{\circ}\text{C}$ و $36/3^{\circ}\text{C}$ تغییر یافت این روند کاهش با پژوهش‌های اخیر مطابقت می‌نماید (22، 13). این پژوهش‌ها نشانگر وقوع برهمکنش و افزایش سیالیت غشاء دو لایه لیپیدی با ادغام و ورود DHA و EPA در لیپوزوم بود و DHA اثری بیشتری در برداشت (22، 13). DHA علی‌رغم این که منجر به سیالیت غشاء دو لایه فسفولیپیدی مرکب از اسیدهای چرب غیراشباع نمی‌شود اما باعث نفوذپذیری بیشتر و حساسیت به امتزاج غشاء دو لایه می‌گردد، در این رابطه یک دلیل می‌تواند عدم توزیع یکنواخت اسید چرب امگا 3 در غشاء دو لایه و زیکول‌ها باشد. حضور اسیدهای چرب امگا 3 در دو لایه لیپیدی منجر به تغییر آرایش مولکول‌های DPPC و با برهمکنش فیما بین آنها دمای ذوب فسفولیپید منجر به کاهش و پهن شدن پیک انتقال فاز می‌گردد. همانطور که منحنی ترموگرام DPPC خالص نشان داد که در دمای انتقال فاز ژل زنجیره‌های هیدروکربنی آن به صورت عمودی قرار گرفته‌اند. بررسی تأثیر جذب و برهمکنش اسیدهای چرب امگا 3 بر غشاهای مدل دی‌میرستوئیل فسفاتیدیل کولین (DMPC) با روش DSC کوتاه شدن پیک انتقال مقدماتی و پهن شدن پیک‌های کالریمتریک را تایید نموده و بیشترین کاهش نقطه ذوب مربوط به DHA و سپس به ترتیب مربوط به اسیدهای چرب DPA و LNA بوده است (35).

با ادغام ویتامین E به فرمولاسیون‌های نانولیپوزوم خالی DPPC و حاوی n-3 FAs دمای انتقال فاز پیک به ترتیب از $41/64^{\circ}\text{C}$ به $36/93^{\circ}\text{C}$ و $30/12^{\circ}\text{C}$ تقلیل یافت و یک پیک پهن مشاهده شد که نشانه برهمکنش میان این آنتی اکسیدان با مولکول‌های فسفولیپید و تشکیل آرایش مولکولی جدید توأم با تغییر در سیالیت ساختار غشاء است. برهمکنش‌های میان DHA و EPA با ساختار لیپیدی DPPC موید اهمیت نقش ترکیب و نسبت لیپید به کار رفته در فرمولاسیون است. از طرفی ادغام ویتامین E در فرمولاسیون اثر بارزی در پایداری فیزیکی نانولیپوزوم بارگذاری شده در برداشته است. نکته مهم دیگر شناسایی مقادیر قابل توجه DHA و EPA موجود در فرمولاسیون‌های لیپوزومی F1 و F3 در مراحل قبل از خالص‌سازی در طی 90 روز نگهداری در دمای 40°C است که اهمیت نقش محافظتی ویتامین E را اثبات می‌نماید. در مجموع با توجه به نتایج حاصل از DSC فرمولاسیون‌ها در

تحقیقاتی شماره‌ی 6202 انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی و همکاری ستاد ویژه توسعه فناوری نانو معاونت علمی و فناوری ریاست جمهوری انجام شد، بدین وسیله از آنان قدردانی می‌شود. همچنین از کارکنان محترم دانشکده داروسازی به ویژه آزمایشگاه‌های آن به خاطر همکاری در اجرای این تحقیق سپاسگزاری می‌نمایم.

اطلاعات بیشتر در گامی بعدی این تحقیق به ارزیابی میزان پتانسیل زتا و پایداری شیمیایی فرمولاسیون‌های نانولیپوزومی حامل EPA و DHA پرداخته خواهد شد.

سپاسگزاری

مقاله حاضر حاصل رساله دکترای تخصصی تکنولوژی مواد غذایی مصوب دانشکده کشاورزی دانشگاه تربیت مدرس می‌باشد. این مطالعه با حمایت مالی دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی در تأمین بخشی از هزینه‌ها در قالب طرح

References

- Nicholson T, Khademi H, Moghadasian MH. The role of marine n-3 fatty acids in improving cardiovascular health: a review. *Food Funct* 2013; 26:4(3):357-6.
- Liao L, Luo Y, Zhao M, Wang Q. Preparation and characterization of succinic acid deamidated wheat gluten microspheres for encapsulation of fish oil. *Colloid Surfaces B* 2012; 92: 305-14
- Duhem N, Danhier F, Préat V. Vitamin E-based nanomedicines for anti-cancer drug delivery. *J Control Release* 2014; 182: 33-44.
- Jones D.S. *Pharmaceutics-Dosage Form and Design*. Pharmaceutical Press UK 2008; Pp: 296.
- Barrow CJ, Nolan C, Holub BJ. Bioequivalence of encapsulated and microencapsulated fish-oil supplementation. *J of Funct Foods* 2009; 1: 38-43.
- Serfert Y, Drusch S, Schwarz K. Chemical stabilization of oils rich in long-chain polyunsaturated fatty acids during homogenization, microencapsulation and storage. *Food Chem* 2009; 113:1106-1112.
- Karthik P, Anandharamkrishnan C. Microencapsulation of docosahexaenoic acid by spray-freeze-drying method and comparison of its stability with spray-drying and freeze-drying methods. *Food Bio Technol* 2013; 5(2): 445-59.
- Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Prust JE, Benoit JP. Physicochemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials* 2003; 24(23): 4283-300.
- Feller SE, Gawrisch K, MacKerell AD. Polyunsaturated fatty acids in lipid bilayers: intrinsic and environmental contributions to their unique physical properties. *J Am Chem Soc* 2002; 124(2): 318-26.
- Nacka F, Cansell M, Méléard P, Combe N. Incorporation of α -tocopherol in marine lipid-based liposomes: In vitro and in vivo studies. *Lipids* 2001; 36(12): 1313-1320.
- Hioki A, Wakasugi A, Kawano K, Hattori Y, Maitani Y. Development of an in Vitro Drug Release Assay of PEGylated Liposome Using Bovine Serum Albumin and High Temperature. *Biol. Pharm. Bull* 2010; 33(9) 1466-1470.
- Grit M, Crommelin DJ. Chemical stability of liposomes: implications for their physical stability. *Chem Phys Lipids* 1993; 64(1-3): 3-18.
- Hadian Z, Sahari MA, Moghimi HR, Barzegar M. Formulation, characterization and optimization of liposomes containing Eicosapentaenoic and Docosahexaenoic acids; A methodology approach. *IJPR* 2014; 13(2): 393-404.
- Moussaoui N, Cansell M, Denizot A. Marinosomes®, marine lipid-based liposomes: physical characterization and potential application in cosmetics. *Int J Pharm* 2002; 242: 361-365.
- Panicker L. Effect of propyl paraben on the dipalmitoyl phosphatidic acid vesicles. *J Colloid Interf Sci* 2007; 311: 407-416.
- Zakir F, Vaidya B, Goyal AK, Malik B, Vyas SP. Development and characterization of oleic acid vesicles for the topical delivery. *Drug Deliv*. 2010; 17(4): 238-48.
- Deshiikan SR, Papadopoulos KD. Modified booth equation for the calculation of zeta potential. *Colloid Polym. Sci*. 1998; 276: 117-124.
- Metcalf L, Schmitz A. The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis. *Anal Chem* 1961; 33(3): 363-364.
- Folch, J., Lees, M., Sloane-Stanley, G. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipids from animal tissues. *J Biochem*, 226(1): 497-509.
- Stewart, J.C.M. (1980). Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. *Anal Biochem*, 104(1): 10-14.
- Ruozi B, Belletti D, Tombesi A, Tosi G, Bondioli L, Forni F, Vandelli MA. AFM, ESEM, TEM, and CLSM in liposomal characterization: A comparative study. *Int J Nanomedicine* 2011; 6: 557-563.
- 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 pharm bull* 2006; 54(1): 68-71.
- Pandita D, Kumar S, Poonia N, Lather V. Solid lipid nanoparticles enhance oral bioavailability of resveratrol, a natural polyphenol. *Food Res Int*. 2014; 62: 1165-1174.
- 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.

25. Epstein H, Gutman D, Einat C-S, Haber H, Elmalak O, Koroukhov N, Haim D, Golomb G. Preparation of alendronate liposomes for enhanced stability and bioactivity: In vitro and In vivo characterization. *AAPS* 2008; 10(4): 505–515.
26. Margin RL, Weinstein JN. In *Liposome Technology*. 3rd ed. Gregoriadis G, editor. Vol. 3. CRC Press; Boca Raton, FL 2006; Pp. 137–155.
27. Duhem N, Danhier F, Pr at V. Vitamin E-based nanomedicines for anti-cancer drug delivery. *J Control Release*. 2014; 182:33-44.
28. Clares B, Gallardo V, Medina MM, Ruiz MA. Multilamellar liposomes of triamcinolone acetonide: preparation, stability, and characterization. *J Liposome Res* 2009; 19 (3): 197-206.
29. Sulkowski W.W, Pentaka D, Korus W, Sulkowska A. Effect of temperature on liposome structures studied using EPR spectroscopy. *Spectroscopy* 2005; 19: 37–42.
30. Zuidam NJ, Gouw HK, Barenholz Y, Crommelin DJ. Physical (in) stability of liposomes upon chemical hydrolysis: the role of lysophospholipids and fatty acids. *Biochim Biophys Acta*. 1995: 1240(1):101-10.
31. Torchilin VP, Weissig V. *Liposomes: A Practical Approach*, 2nd edn. Oxford University Press, Oxford, U.K. New York, 2003; Pp. 396.
32. Winterhalter M, Lasic DD. Liposome stability and formation: experimental parameters and theories on the size distribution. *Chem Phys Lipids* 1993; 64(1-3):35-43.
33. Sabin J, Prieto G, Ruso JM, Hidalgo-Álvarez R, Sarmiento F. Size and stability of liposomes: A possible role of hydration and osmotic forces. *The Eur Physic J E*, 2006; 20: 401-408.
34. Ickenstein L.M, Sandström M.C, Mayer L.D, Edwards K. Effects of phospholipid hydrolysis on the aggregate structure in DPPC/DSPE-PEG2000 liposome preparations after gel to liquid crystalline phase transition. *BBA-Biomembranes* 2006; 1758 (2): 171-180.
35. Sarpietro MG, Roccob F, Micieli D, Giuffridaa MC, Ottimoa S, Castelli F. Absorption of omega-3 fatty acids by biomembrane models studied by differential scanning calorimetry. *Thermochim Acta* 2010; 503–504: 55-60.
36. Stillwell W, Ehringer W, Wassall SR. Interaction of alpha-tocopherol with fatty acids in membranes and ethanol. *Biochim et Bioph Acta* 1992; 1105: 237-244.
37. Bongiorno D, Ceraulo L, Ferrugia L, Filizzola F, Longo A, Mele A, Ruggirello A, Liveri VT. Interactions of alpha-tocopherol with biomembrane models: binding to dry lecithin reversed micelles. *Int J Pharm* 2006; 312(1-2): 96-104.
38. Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Prust JE, Benoit JP. Physicochemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterial* 2003; 24(23): 4283–4300. Xia S, Xu S. Ferrous sulfate liposomes: preparation, stability and application in fluid milk. *Food Res Int* 2005; 38: 289-296.
39. Garg M, Dutta T, Jain NK. Stability study of stavudine-loaded o-palmitoyl-anchored carbohydrate-coated liposomes. *The American Association of Pharmaceutical Scientists Pharm Sci Tech* 2007; 8(2): 1-8.
40. Jousma H, Talsma H, Spies F, Joosten JGH, Junginger HE, Crommelin DJA. Characterization of liposomes. The influence of extrusion of multilamellar vesicles through polycarbonate membranes on particle size, particle size distribution and number of bilayers. *Int J Pharm*. 1987; 35:263–74.
41. Ruozzi B, Belletti D, Tombesi A, Tosi G, Bondioli L, Forni F, Vandelli MA. AFM, ESEM, TEM, and CLSM in liposomal characterization: A comparative study. *Int J Nanomedicine* 2011; 6: 557-63.

Preparation of Nanoliposomes Containing Vitamin E as Carriers for DHA and EPA and Evaluation of Their Physical Stability

Hadian Z¹, Moghimi HR^{*2}, Sahari MA³, Barzegar M⁴

1. Assistant Prof, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Faculty of Nutrition Sciences and Food Technology, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran

2.*Corresponding author: Prof, Dept.of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Shaheed Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran, E-mail: hrmoghimi@yahoo.com

3. Prof. Dept.of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Tarbiat ModaresUniversity, Tehran, Iran

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

Received 28 Jul, 2014

Accepted 29 Sept, 2014

Background and Objectives: Eicosapentaenoic acid (EPA) and docosahexaenoic acid (DHA) have preventative and therapeutic effects against various disorders, especially cardiovascular and inflammatory conditions. Considering the advantages of using nanoliposomes as carrier systems of bioactive compounds, this study was aimed to the development nanoliposomes containing vitamin E loaded with DHA and EPA and evaluation of their physical stability.

Materials and Methods: Preformed nano-liposomes were prepared based on dipalmitoyl-phosphatidylcholine (DPPC) with vitamin E using a modification thin film method and sonication. Loading of EPA and DHA into nano-liposomes was done by incubation. To improve stability, vitamin E was added to some formulae. After formulation, a comparative study was performed between them through evaluation by Zetasizer, transmission electron microscopy (TEM), differential scanning calorimetry (DSC), and calculating the percent of DHA and EPA entrapment efficiency. Physical stability study was carried out by investigating the change in the vesicles' encapsulation efficiency, particle size, size distribution and shape when stored at 4, 30 and 40°C for 3 months.

Results: The results showed that vitamin E-based nanoliposomal formulations successfully entrapped EPA and DHA with high encapsulation efficiencies (81.96±1.4% and 89.1±0.6%), respectively, and appropriate particle size (82±0.8 nm) and PDI (0.13±0.02) were achieved for the optimized formulation. The results of the physical stability tests of the optimized nanoliposome carriers of DHA and EPA incorporated with vitamin E were suitable after a 3-month storage at 4°C. DSC and TEM results confirmed vitamin E-DPPC:Omega 3 interactions and vesicular dispersion phenomenon of DHA and EPA.

Conclusion: The findings of this study showed that incorporation of vitamin E in nanoliposomal formulation had significant protective and stabilizing effects on the DHA and EPA loaded in bilayer membrane lipid and its physical stability. The combination of preservatives and vitamin E in liposome containing EPA and DHA was not more effective on the physical stability of liposome formulation than the control formulation.

Keywords: DHA, EPA, Liposome, Physical Stability, Vitamin E