مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران
سال نهم، شماره 4، زمستان 1393، صفحات 76-63

تهیه نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین E به عنوان حامل‌های DHA و EPA و ارزیابی پایداری فیزیکی آنها

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

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: ایکوزاپنتاانوئیک اسید (EPA) و دوکوزاهگزاانوئیک 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 فرمولاسیون های 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 ($P\leq 0/01$). 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 تایید 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: DHA، EPA، لیپوزوم، پایداری فیزیکی، ویتامین E

• مقدمه

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

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

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-09-16]

عامل طعم نا مطلوب 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 درون‌پوشانی، 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 دی امین 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 (4-3).

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 ضداکسایش 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 40-30 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 (7-6).

نانوفناوری دارای ظرفیت بالقوه بالایی در فناوری و علم موادغذایی است. لیپوزوم ها متشکل از لیپیدهای قطبی در اندازه 20 نانومتر تا چند صد میکرومتر هستند و قادرند طیفی وسیع از ترکیبات فراسودمند را درون پوشانی نمایند. لیپوزوم-ها با وجود زیست سازگاری توام با ماهیت دوگانه دوستی و اندازه کوچکتر به عنوان سامانه های انتقال بسیار مناسب ترکیبات مختلف مطرح می‌باشند. از مزایای متعدد لیپوزوم ها 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، لیپوزوم های 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 نحوه‌ی چیدمان اتم‌های DHA باشد (9). تحقیقات اخیر انجام شده توسط کالریمتری روبشی تفاضلی تأثیر جذب و برهمکنش اسیدهای‌چرب 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.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-09-16]

• مواد و روش‌ها

در این تحقیق از فسفولیپید DPPC با خلوص بالای 90 درصد (Lipoid KG, Germany) استفاده شد، ایکوزاپنتاانوئیک اسید و دکوزاهگزاانوئیک اسید با خلوص بیش از 99 درصد، ویتامین E (α-DL-توکوفرول) با خلوص 96%، بافرفسفات (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)، پنتادکاانوئیک 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 µm 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 لیپوزوم ها از ستون کروماتوگرافی حاوی ژل Sephadex G50 (طول 20 سانتیمتر و قطر 1/5 سانتیمتر) انجام شد (16). به این ترتیب لیپوزوم های SUVs حامل DHA و EPA با نسبت مولی 10 :20 :70 با غلظت نهایی لیپید 25/7 میلی گرم 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 ریخت شناسی 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 پالمیتواولئین که به آن DHA و EPA خالص معادل مقادیر موجود در فرمولاسیون‌های F_1 –F_4 به آن اضافه شد (BOO) و فرمولاسیون شاهدی بر پایه روغن پالمیتواولئین که به آن DHA و EPA خالص و ویتامین E معادل مقادیر موجود در فرمولاسیون‌های F_1 –F_2 به آن افزوده شد (BOOE).

طیف سنجی همبستگی فوتون (Photon correlation spectroscopy): قطر هیدرودینامیک و توزیع اندازه ذرات لیپوزوم های خالص شده به روش SEC با روش طیف سنجی همبستگی فوتون (Zetasizer Nano ZS ZEN 3600, Malvern Instruments Corp., Worcestershire, UK) که 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 DHA و EPA (درصد): کارایی درون پوشانی وزیکول‌های SUVs حاوی DHA و EPA 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

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-09-16]

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

معادله (1)

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

$W_{Entrapped}$ 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 اسیدهای‌چرب از رنگ‌آمیزی منفی با میکروسکوپ الکترونی عبوری (Germany, EM10 Zeiss) استفاده شد. پس از قرار دادن سوسپانسون لیپوزومی رقیق شده با بافر فسفات روی گرید مسی فرموار کربن (مش 200)، با گلوتارآلدئید 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 DSC-60 (Shimadzu, Japan) 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 جریان50 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 توام با بررسی ریخت شناسی انجام گرفت. فرمولاسیون‌های لیپوزومی در ویال‌های شیشه‌ای تحت فشار گاز ازت دربندی شدند و در دماهای 1°C ± 4 (یخچال)، 1°C ± 30 و 1°C ± 40 (انکوباتور) و رطوبت نسبی 5 ± 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 تجزیهٔ آماری داده‌ها با استفاده از تجزیه واریانس ANOVA انجام شد. مقایسهٔ میانگین‌ها به روش حداقل تفاوت‌های معنی‌دار (least significance difference) با استفاده از نرم افزار SAS ویرایش 9.1.3 انجام شد. برای تجزیهٔ 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. مقایسهٔ 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

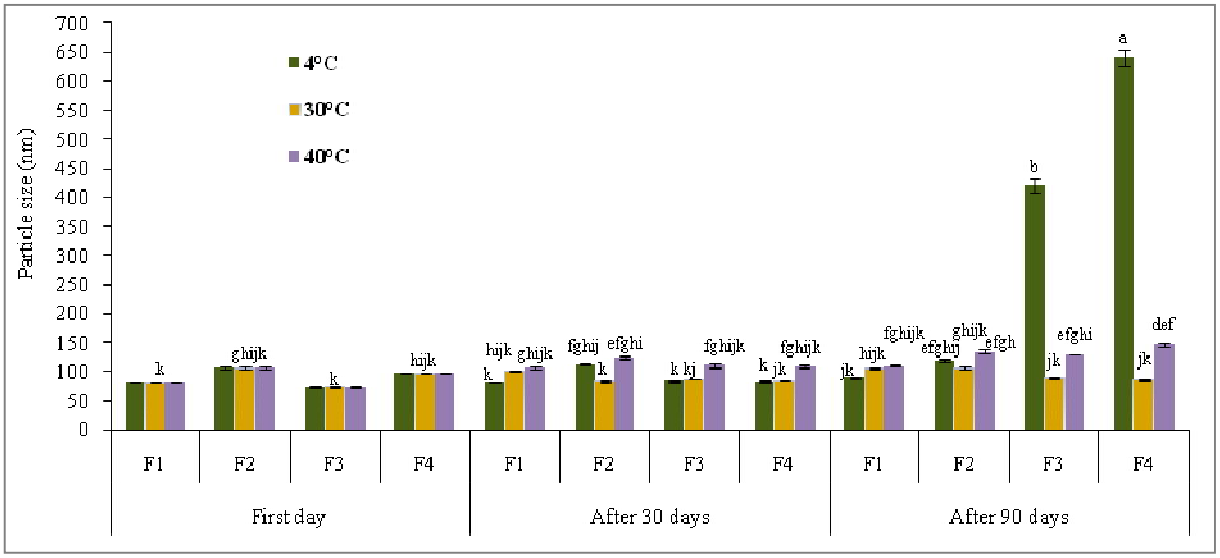
اثر متغیرهای فرمولاسیون، زمان و دما بر اندازه ذرات و توزیع اندازه ذرات: شکل 1 مقایسه تغییرات میانگین اندازه ذرات فرمولاسیون‌های F1-F4 در مدت زمان نگهداری است. میانگین اندازه ذرات فرمولاسیون لیپوزومی F1 (حاوی DHA، EPA و ویتامین E) پس از 90 روز نگهداری در دماهای 4، 30 و 40°C افزایش یافت و از 0/8±82/1 نانومتر در روز نخست به ترتیب به 1/2 ±88/8، 1/4 ±105/2 و 1/3 ±110/5 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°C از 2 ±107/2 نانومتر به ترتیب به 3/4 ±115/3 و 2±119/3 نانومتر افزایش یافت و در دمای 30°C در حد 1±107/3 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 1/3±73/40 نانومتر به 12/3±419/5، 1/2±88/3 و 3/3±129/7 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.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-09-16]

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 ($P\leq0/01$). 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.

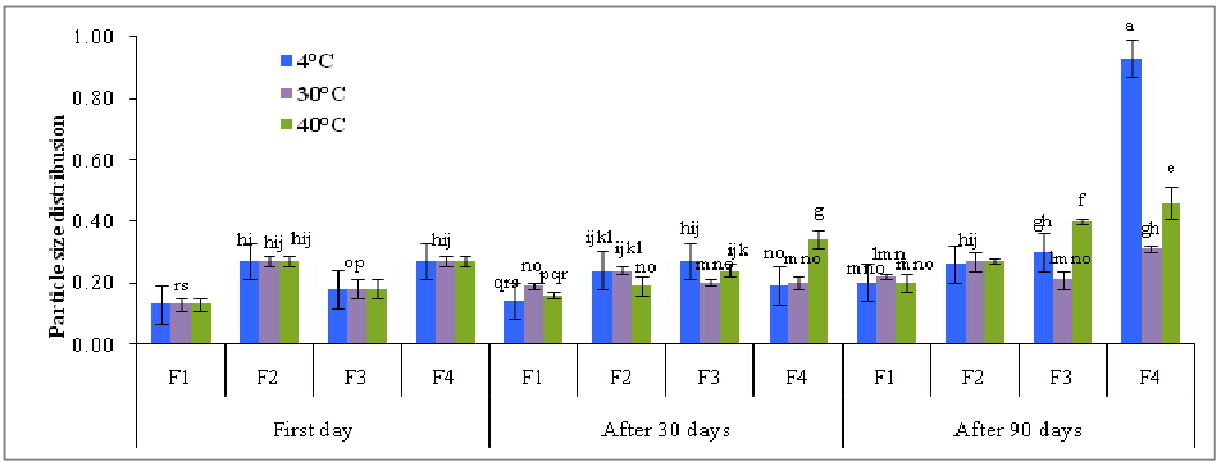
مقایسه میانگین اندازه ذرات لیپوزم خالی بعد از نگهداری در دماهای 4، 30 و 40°C در دوره زمانی 90 روز روند افزایشی داشت و به ترتیب 6/7±149/9 نانومتر، 3/4±177/9 نانومتر و 33/1±650/4 نانومتر تعیین شد ($P\leq 0/01$).

روند تغییرات میانگین توزیع اندازه ذرات فرمولاسیون‌های F1-F4 در شکل 2 نشان داده شده است. فرمولاسیون F1 پس 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 ($P\leq0/01$). 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.



شکل 1: مقایسه پایداری اندازه ذرات فرمولاسیون‌های لیپوزومی و لیپوزوم خالی در دماها و زمان‌های مختلف نگهداری (n=3 و SD ± 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

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-09-16]



شکل 2: مقایسه پایداری توزیع اندازه ذرات فرمولاسیون های لیپوزومی و لیپوزوم خالی در دماها و زمان‌های مختلف نگهداری (n=3 و SD ± 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

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

میزان DHA و EPA (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 DHA و EPA، 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 DHA و EPA 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 DHA و EPA فرمولاسیون‌های لیپوزومی نشان می‌دهند. پس از گذشت 90 روز نگهداری فرمولاسیون‌های لیپوزومی در دماهای مختلف از کارایی درون پوشانی EPA و DHA کاسته شد.

جدول 1: کارایی درون پوشانی، اندازه ذرات و توزیع اندازه ذرات نانولیپوزوم‌ها (n=3 و SD ± 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±0/6^{a*}	81/9±1/4^{d}	82±0/8^{b}	0/13±0/02^{a}
F_2(DPPC+E+DHA+EPA+ ME/P)	84/9±0/8^{b}	77/8±0/4^{c}	107/2±1/8^{d}	^{c}0/27±0/02
F_3 (DPPC +DHA+EPA)	75/1±1/9^{a}	68/3±1/2^{b}	73/4±1/3^{a}	0/18±0/03^{b}
F_4 (DPPC +DHA+EPA+ ME/P)	76/5±1/9^{a}	40/9±0/4^{a}	97/3±0/2^{c}	0/27±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 ($P < 0/01$).

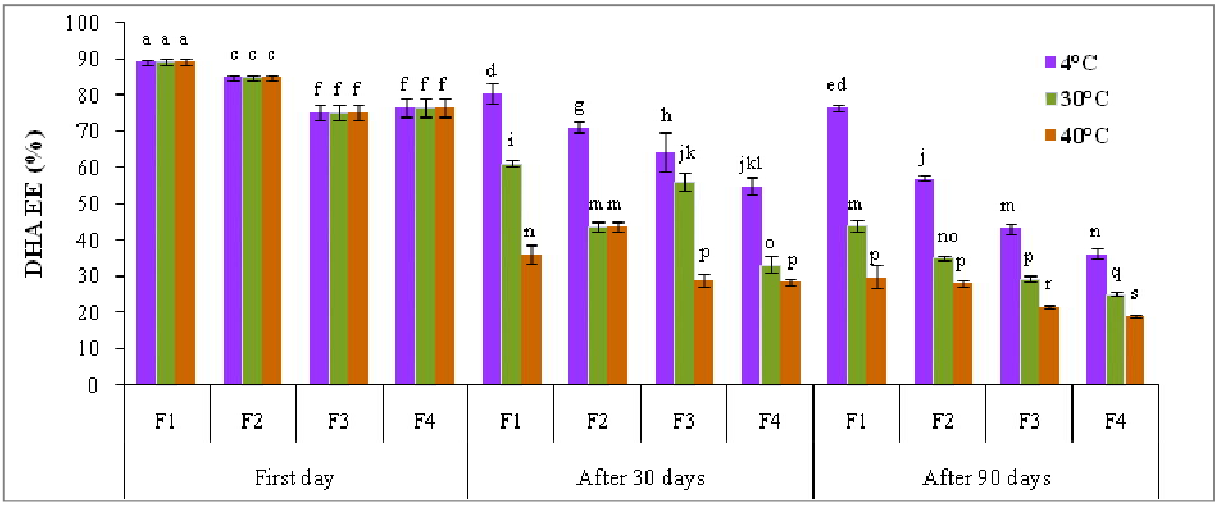
[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-09-16]

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 (n=3 و SD ± میانگین)

فرمولاسیون	میزان EPA			میزان DHA		
	1	30	90	1	30	90
F_1	91/3±0/9^{a*}	81/5±1/8^{b}	67/9±2/4^{d}	94/4±1/7^{a}	66/3±1/6^{c}	47/8±2/3^{d}
F_3	80/8±1/1^{b}	72/8±2/3^{c}	54/5±0/5^{e}	89/7±1/3^{b}	50/5±1/7^{e}	35/2±0/5^{f}

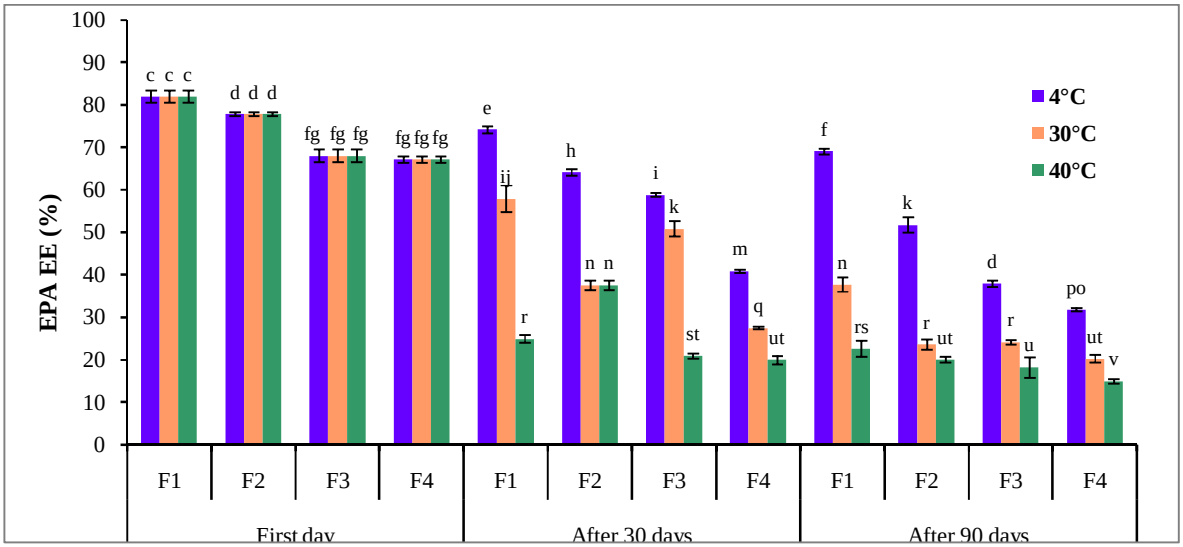
F1: لیپوزم حاوی امگا 3 و ویتامین E ، F3: لیپوزم حاوی امگا 3.

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



شکل 3: مقایسه کارایی درون پوشانی DHA فرمولاسیون های لیپوزومی در دماها و زمان‌های مختلف نگهداری (n=3 و SD ± 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 4: مقایسه کارایی درون پوشانی EPA فرمولاسیون های لیپوزومی در دماها و زمان‌های مختلف نگهداری (n=3 و SD ± 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

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-09-16]

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 در پایان زمان نگهداری در دماهای مذکور به ترتیب به حدود 48، 20 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 F_1 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.

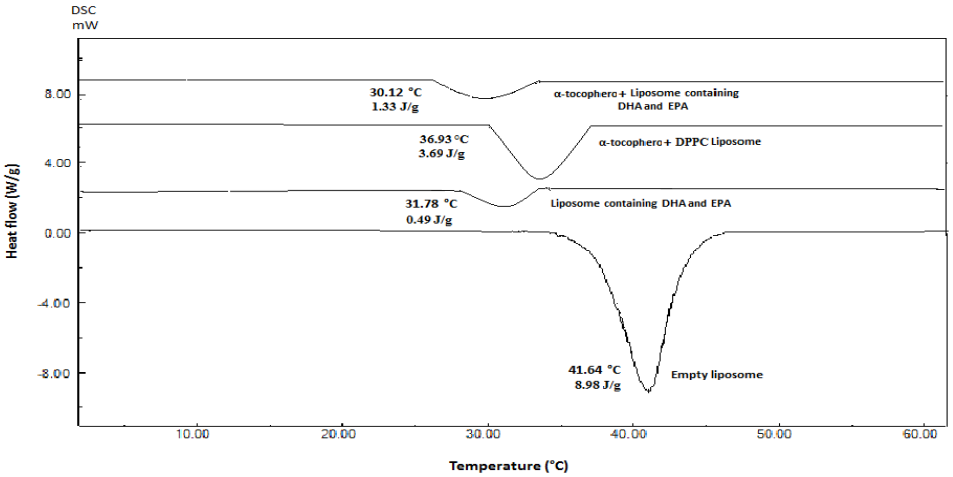
جدول 3: مقایسه میانگین اثر متقابل زمان و دما بر میزان DHA و EPA (درصد) شناسایی شده به وسیله GC/FID در فرمولاسیون‌های شاهد (n=3 و SD ± میانگین)

فرمولاسیون	دما (°C)	زمان (روز)		
		1	30	90
		میزان DHA		
BOO*	4	77/5±1/2	54/4±3/2	27/9±0/7
	30	77/5±1/2	27/5±1/1	5/9±0/3
	40	77/5±1/2	4/9±0/3	ND[a]
BOOE**	4	86/5±0/6	79±0/02	43/۰±0/15
	30	86/5±0/6	14/7±0/04	14/9±0/1
	40	86/5±0/6	10/1±1/1	ND
		میزان EPA		
BOO	4	85/6±2/8	66/8±0/4	33/1±0/2
	30	85/6±2/8	30/7±0/6	7/9±0/2
	40	85/6±2/8	7/2±0/5	ND
BOOE	4	95/0±3/5	87/6±4/1	47/5±1/2
	30	95/0±3/5	56/1±4/1	20/0±1/5
	40	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 F_1 –F_4 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 F_1 –F_2 به آن اضافه شد.

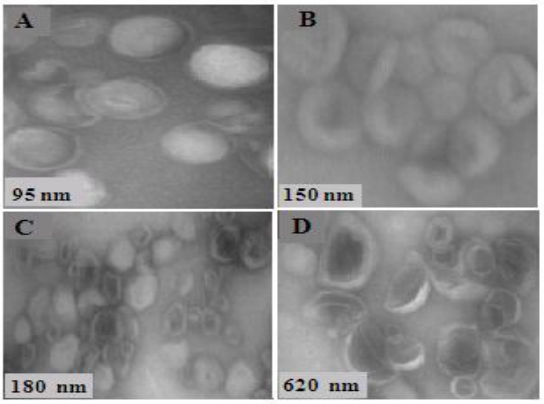
a. Not Detected: ND: اسیدهای چرب شناسایی نشد.



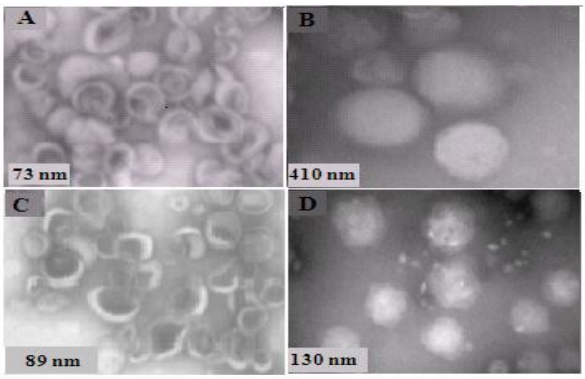
شکل 5: منحنی‌های ترموگرام DSC لیپوزوم خالی، لیپوزوم بارگذاری شده حاوی اسیدهای چرب امگا 3، لیپوزوم حاوی ویتامین E و لیپوزوم بارگذاری شده حاوی اسیدهای چرب امگا 3 و ویتامین E

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-09-16]

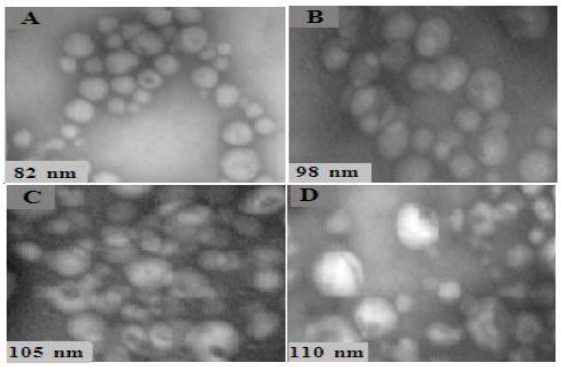
تصـــاویر TEM لیپـــوزوم: اشـکال 6 تـا 8 تصـویربرداری میکروسکوپ الکترونی عبوری لیپوزوم خالی (DPPC خـالص) نمونه شاهد (تصاویر 6a، 6b، 6c و 6d)، لیپوزوم حاوی DHA و EPA فاقد ویتـامین E (تصـاویر 7a، 7b، 7c و 7d) و لیپـوزوم ادغام شده با ویتامین E (تصـاویر 8a، 8b، 8c و 8d) در زمـان صفر و پس از گذشت 90 روز نگهداری در دماهـای مختلـف را نشان می‌دهند. همان طور که از مقایسـه تصـاویر TEM انـواع فرمولاسیون های لیپوزومی مشهود است نمونه‌های تازه تهیـه شده کروی، منظم و همگن بودند و نتـایج ارزیـابی فیزیکـی را تأیید کردند. با گذشـت زمـان تغییـرات نسـبتاً محسوسـی در ریخت شناسی و اندازه لیپوزوم‌ها مشاهده شد.



شکل6: تصاویر لیپوزوم‌های خالی تازه تهیه شده (A) با بزرگنمایی 80000 و پس از 90 وز 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)



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

انـــدازه ذرات و توزیـــع انـــدازه ذرات: در ایـن تحقیـق لیپوزوم‌های از پیش ساخته شده حاصـل از روش هیدراسـیون لایه نـازک اصـلاحی پـس از افـزودن ویتـامین E و ترکیبـات محافظ تحت سونیکاسـیون میلـه‌ای قـرار گرفـت و بارگـذاری DHA و EPA، به وسیله انکوباسـیون انجـام شـد. یافتـه‌هـای حاصل از این بررسی موید درون‌پوشانی این ترکیبات آب گریز در سـاختار نـانولیپوزومی تشـکیل یافتـه بـود. نتـایج تجزیـه واریانس داده‌ها نشان داد کـه اثـرات متقابـل بـین متغیرهـای اصلی (فرمولاسیون، زمان و دما) در سطوح مختلـف معنـی‌دار بودند. تمامی تیمارهای تازه تهیه شده (F_1-F_4) دارای میانگین اندازه ذرات و توزیع اندازه ذرات مناسب و بـه ترتیـب کمتـر 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 کلیـه فرمولاسـیون‌هـای لیپـوزومی حـاوی ویتـامین E و بـدون آن بـا نمونـه‌هـای شـاهد پـس از نگهداری به مدت 90 روز در دماهـای مختلـف معنـی‌دار بـود ($P\leq 0/01$). میانگین اندازه ذرات لیپوزم خالی بعد از نگهـداری در زمان‌ها و در دوره زمانی مختلف روند افزایشی معنی‌داری را نشان داد، مقایسه این مقادیر نشانه کـاهش پایـداری فیزیکـی لیپوزوم خالی است که منجر به تجمع یا امتزاج آن‌ها گردیـده است که با یافته‌های سایر محققین مطابقـت مـی‌نمایـد (24). مطالعه پایداری فیزیکی لیپوزوم از اهمیت به سزایی برخـوردار است، تغییر در اندازه ذرات در اثر پدیده‌هـای تجمـع و امتـزاج روی می‌دهد. عوامل مختلفی ماننـد ترکیبـات لیپیـدی مـورد استفاده مانند کلسترول، شرایط فرمولاسیون مانند pH، قدرت یونی، دما و ترکیبات بافر به نحوی در پایـداری لیپـوزوم مـؤثر

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-09-16]

هستند (26، 25). تشکیل کلوئیدها 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 ترموتروپیک 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 آب گریز بودن، غلظت و نوع فسفولیپید، ترکیبات لیپیدی فرمولاسیون و موارد دیگر می‌باشد (8، 25-23). غشاء دو لایه لیپیدی با وجود برهمکنش‌های غیرکووالانسی قادر است انواع ترکیبات آب گریز 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 معنی داری 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 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 آب گریزتر شدن توام با نفوذپذیری کمتر و در نتیجه افزایش بارگذاری آن می باشد (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 (مشتقات 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 (30-29). ترکیبات آب گریز مانند EPA و DHA با داشتن ضریب پخش‌پذیری میان 1-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 کلوئیدی و فیزیکی در مجموع مرتبط با ثابت ماندن توزیع اندازه ذره‌ای می‌باشد. به علاوه در کلوئیدهای حلال گریز همجوشی لیپوزوم‌ها موجب نشت مواد درون پوشانی شده یا مولکول‌های مجتمع می‌شود (33-31). 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 موید ساختار لیپیدی این سامانه همانند تمام کلوئیدهای 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

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-09-16]

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°C و 36/3°C تغییر یافت این روند کاهشی 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 دربرداشت (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 وزیکول‌ها باشد. حضور اسیدهای چرب امگا 3 در دو لایه لیپیدی منجر به تغییر آرایش مولکول‌های DPPC و با برهمکنش فیمابین 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 اسیدهای‌چرب امگا 3 بر غشاهای مدل دی‌میریستوئیل 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°C به 36/93°C و 30/12°C تقلیل یافت و یک پیک پهن مشاهده شد که نشانه برهمکنش میان این آنتی اکسیدان با مولکول‌های فسفولیپید و تشکیل آرایش مولکولی جدید توام 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 نانولیپوزم 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 مراحل مختلف، در اثر وقوع برهمکنش میان اسیدهای چرب امگا 3 با غشاء دو لایه لیپیدی DPPC توأم با کاهش نظم زنجیره آسیل 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 (38-36).

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 کلوئیدی با تصویربرداری به وسیله انواع روش‌های میکروسکوپیک ارزیابی و تایید شده است (41-39). 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 (410-89 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 (110-82 نانومتر) وجود داشت. بنابراین ارزیابی ریخت شناسی انجام شده با نتایج ویژگی‌های فیزیکی فرمولاسیون ها همسو بود.

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

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-09-16]

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

• References

1. 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.
2. 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
3. Duhem N, Danhier F, Préat V. Vitamin E-based nanomedicines for anti-cancer drug delivery. J Control Release 2014; 182: 33-44.
4. Jones D.S. Pharmaceutics-Dosage Form and Design. Pharmaceutical Press UK 2008; Pp: 296.
5. Barrow CJ, Nolan C, Holub BJ. Bioequivalence of encapsulated and microencapsulated fish-oil supplementation. J of Funct Foods 2009; 1: 38–43.
6. 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.
7. Karthik P, Anandharamakrishnan 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.
8. Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Prust JE, Benoit JP. Physicochemical stability of colloidal lipid particles. Biomaterials 2003; 24(23): 4283-300.
9. 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.
10. 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.
11. 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.
12. Grit M, Crommelin DJ. Chemical stability of liposomes: implications for their physical stability. Chem Phys Lipids 1993; 64(1-3): 3-18.
13. 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.
14. 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.
15. Panicker L. Effect of propyl paraben on the dipalmitoyl phosphatidic acid vesicles. J Colloid Interf Sci 2007; 311: 407-416.
16. 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.
17. Deshiikan SR, Papadopoulos KD. Modified booth equation for the calculation of zeta potential. Colloid Polym. Sci. 1998; 276: 117–124.
18. Metcalfe L, Schmitz A. The rapid preparation of fatty acid esters for gas chromatographic analysis. Anal Chem 1961; 33(3): 363-364.
19. 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.
20. Stewart, J.C.M. (1980). Colorimetric determination of phospholipids with ammonium ferrothiocyanate. Anal Biochem, 104(1): 10-14.
21. 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.
22. 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.
23. 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.
24. 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.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-09-16]

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, Préat 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. Sułkowski W.W, Pentaka D, Korus W, Sułkowska 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. 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: 557-63.

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-09-16]

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

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

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

[Downloaded from nsft.sbmu.ac.ir on 2026-09-16]