

## مقاله تحقیقی

### تهیه و تعیین ویژگی های بیوفیزیکی لیپوزوم هیدروکینون

#### رابعه خوشنویس زاده

گروه زیست شناسی، دانشکده علوم زیستی، واحد ورامین-پیشوا، دانشگاه آزاد اسلامی، ورامین-پیشوا، ایران

مسئول مکاتبات: آدرس الکترونیکی: [r.khoshnevis@iauvaramin.ac.ir](mailto:r.khoshnevis@iauvaramin.ac.ir), [biologybiophysics@gmail.com](mailto:biologybiophysics@gmail.com)

محل انجام تحقیق: دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۰/۱۸

تاریخ دریافت: ۹۵/۷/۱۲

#### چکیده

هیدروکینون دارویی است که در درمان لکه های پوستی استفاده می شود این دارو در قالب فرمولاسیون کرمی تجاری شده است اما بدلیل بالا بودن راندمان درمان فرمولاسیون های لیپوزومی در این مطالعه سعی شد تا فرمولاسیون لیپوزومی هیدروکینون به شکل بهینه ای تهیه شود از این رو اثر عوامل مختلفی مثل روش تهیه و نوع بافر بر روی خواص بیوفیزیکی لیپوزوم مورد بررسی قرار گرفت. دو روش تبخیر فاز حلال و آگیری-آبدهی مجدد برای تهیه فرمولاسیون لیپوزومی هیدروکینون استفاده شد همچنین اثر دو نوع بافر دی هیدروژن فسفات منو سدیم و بافر ۴- (۲-هیدروکسی اتیل) ۱-پپرازین اتان سولفونیک اسید بر روی برخی از ویژگی های فرمولاسیون ارزیابی شد. نمونه های لیپوزومی که به روش تبخیر فاز حلال تهیه شده بودند دارای درصد انکپسولاسیون ۴۵٪، اندازه ذره ای ۸۲۰ نانومتر و پراکندگی اندازه ذره ای ۰/۴۲ بود و بعد از ۱۶ روز رسوبات در فرمولاسیون مشاهده شد و بعد از ۲۴ ساعت دیالیز درصد انکپسولاسیون به ۱۶٪ تقلیل یافت. در روش آگیری-آبدهی مجدد درصد انکپسولاسیون ۲۵٪، اندازه ذره ای ۳۵۰ نانومتر و پراکندگی اندازه ذره ای ۰/۳۶ بود و ۳۰ روز پس از تهیه فرمولاسیون رسوبات در آن مشاهده شد. در این روش پس از دیالیز مقدار داروی انکپسوله به ۳٪ کاهش پیدا کرد. فرمولاسیون تهیه شده از بافر ۴- (۲-هیدروکسی اتیل) ۱-پپرازین اتان سولفونیک اسید دارای اندازه ذره ای ۵۲۰ نانومتر و پایداری فیزیکی بیش از یک ماه بوده است. روش تبخیر فاز حلال منجر به تولید درصد انکپسولاسیون بالاتری نسبت به روش آگیری-آبدهی مجدد شد اما در روش آگیری-آبدهی مجدد که اندازه ذرات کوچکتر بود پایداری فیزیکی فرمولاسیون طولانی تر بوده و از این منظر بر روش تبخیر فاز حلال برتری داشت بافر ۴- (۲-هیدروکسی اتیل) ۱-پپرازین اتان سولفونیک اسید نیز نسبت به بافر فسفات فرمولاسیون پایداری و ذرات کوچکتری را بوجود آورد.

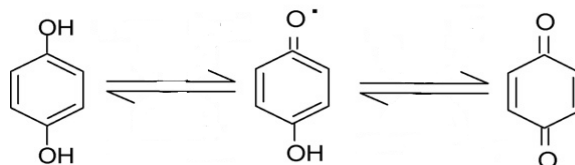
#### واژه های کلیدی: لیپوزوم، هیدروکینون، خصوصیات بیوفیزیکی

#### مقدمه

مک، ملاسما و کوالاسما موثر است (۳،۴). این مولکول در قالب فرمولاسیون های کرمی، لوسیون، ژله ای و محلول به شکل تجاری در دسترس بیماران قرار گرفته است. در سال های اخیر فرمولاسیون های جدیدی با نام حامل های دارویی گسترش یافته است که با آزادسازی آهسته دارو، کاهش اثرات سمی دارو، قابلیت هدف یابی سلول یا ارگان

هیدروکینون مولکولی با ساختار فنلی است که به اکسیداسیون حساس بوده و در حضور اکسیژن و محیط بازی سریعاً به بنزوکینون تبدیل می شود (شکل ۱) (۱). این ماده خاصیت دیپگمانتاسیون داشته که با مهار انزیم تیروزیناز مانع تولید ملانین شده (۲) و در درمان کک و

موضعی لیپوزومی نشان داده است که استفاده از این حامل دارویی راهکار مناسبی برای افزایش عبور داروهای پوستی از سد لایه شاخی پوست بوده و نفوذپذیری دارو را به اعماق لایه های پوست میسر می سازد (۸).



شکل ۱ - تبدیل هیدروکینون به بنزوکینون (۱).

۷/۸٪ وزنی/حجمی (همه نسبت ها بر اساس وزنی/حجمی است) فسفولیپید، ۱/۹٪ کلسترول، ۰/۵٪ هیدروکینون و ۰/۴٪ ویتامین E در بالون ته گرد ریخته و به آن مخلوط ۸ به ۲ کلروفرم و متانول اضافه شد تا همه مواد در آن حل شود سپس بالون به روتاری که در حمام آب ۴۵ درجه قرار گرفته بسته شد و پس از برقراری خلا، با سرعت ۳ rpm چرخید. پس از حذف کامل حلال یک لایه فیلم خشک فسفولیپیدی تشکیل شد که با افزودن آهسته بافر به همراه ورتکس محلول لیپوزومی شکل گرفت (۹).

#### تهیه لیپوزوم به روش آگیری-آبدهی مجدد

۷/۱۸٪ فسفولیپید، ۱/۹٪ کلسترول، ۰/۵٪ هیدروکینون و ۰/۴٪ ویتامین E در بالون مذکور ریخته شد و تا مرحله تشکیل فیلم خشک فسفولیپیدی مثل روش تبخیر فاز حلال پیش رفت. سپس محلول بافری حاوی ساکاروز و هیدروکینون آهسته و همراه با ورتکس به فیلم خشک فسفولیپیدی اضافه شد تا محلول لیپوزوم هیدروکینون تهیه شود. این محلول لیپوزومی ابتدا در دمای ۴ درجه و بعد ۲۰- قرار داده شد تا کاملاً یخ بزند سپس به مدت ۲۴ ساعت به دستگاه لیوفیلیزاتور بسته شد تا بخش آبی فرمولاسیون حذف شود. آنگاه آب مقطر دیونیزه آهسته و همراه با ورتکس به لیپوزوم لیوفلیزه اضافه شد تا در نهایت محلول لیپوزومی شکل گرفت (۹).

#### تهیه لیپوزوم در دو نوع بافر

به روش تبخیر فاز حلال تا مرحله تشکیل فیلم خشک فسفولیپیدی کار دنبال شد در مرحله افزودن بافر از دو نوع

خاص راندمان درمان را افزایش داده اند (۵-۷). از جمله حامل های دارویی ذرات کروی تشکیل یافته از فسفولیپید، بنام لیپوزوم است که در سال ۱۹۸۰ توسط بنگهام و همکارانش تهیه شد. تحقیقات بر روی فرمولاسیون های

هر فرمولاسیون دارای ویژگی هایی است که توسط آنها توصیف می شود در فرمولاسیون های لیپوزومی خواصی مثل درصد انکپسولاسیون، اندازه ذرات لیپوزومی، پراکندگی اندازه ذره ای، پایداری شیمیایی دارو و پایداری فیزیکی فرمولاسیون است که تحت تاثیر نحوه تهیه، درصد مواد استفاده شده و تیمارهای تکمیلی قرار گرفته و ویژگی های آن را منجر می کند. در این تحقیق بر آن شدیم تا فرمولاسیون جدیدی از هیدروکینون را در قالب فرمولاسیون لیپوزومی تهیه کرده و اثر عوامل مختلف بر روی آن را مورد ارزیابی قرار دهیم.

#### مواد و روش ها

کلسترول، ویتامین E، هیدروکینون، ساکاروز، متابی سولفید سدیم، کلروفرم و دی هیدروژن فسفات منوسدیم از شرکت آلمانی مرک، فسفاتیدیل کولین سویا (S100) از شرکت لیپوید، بافر ۴-(۲-هیدروکسی اتیل)-۱-پیرازین اتان سولفونیک اسید از سیگما و متانول از شرکت پارس خریداری شد.

دستگاه های مورد استفاده در این تحقیق شامل روتاری BUCHI و هموژنایزر IKA 10 ساخت آلمان، ورتکس VELEP ایتالیا، سانتریفیوژ 3K30 سیگما، فریز داریر Heto Dry Winer دانمارک، میکروسکوپ نوری Olympus ژاپن مجهز به دوربین، UV اسپکتروفتومتری CECIL 9500 و دستگاه تفرق نور پویا Nano-ZS مالورن ساخت انگلیس بوده است.

#### تهیه لیپوزوم به روش تبخیر فاز حلال

سوپرناتانت از پلت ها جدا شده و مقدار هیدروکینون درون سوپرناتانت اندازه گیری شد (۱۰) سپس سوپرناتانت با متانول رقیق شده و مقدار جذب آن توسط دستگاه UV اسپکتروسکوپی در طول موج ۲۹۳ نانومتر اندازه گیری شد و غلظت هیدروکینون درون سوپرناتانت بر اساس نمودار غلظت های استاندارد هیدروکینون محاسبه گشت سپس از طریق فرمول زیر درصد انکپسولاسیون محاسبه شد (۱۱).

$$\text{درصد انکپسولاسیون} = \frac{(\text{مقدار کل دارو} - \text{مقدار داروی درون سوپرناتانت})}{\text{مقدار کل دارو}} * 100\%$$

بافر دی هیدروژن فسفات منو سدیم (۰/۰۱ مولار و ۵/۵ pH) و بافر ۴- (۲-هیدروکسی اتیل) ۱-پیرازین اتان سولفونیک اسید (۶/۵ pH) استفاده شد.

### اندازه گیری درصد انکپسولاسیون

نمونه ها ۳ بار تحت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ با شتاب ۴۵۰۰۰ در دمای ۴ درجه قرار گرفتند و پس از آخرین دور،

### اندازه گیری اندازه ذرات و پراکندگی اندازه ذره ای

هر نمونه لیپوزومی ۵۰ برابر با همان بافری که تهیه شده بود رقیق گشت و توسط دستگاه تفرق نور پویا اندازه و پراکندگی آن را گزارش شد.

### اندازه گیری پایداری فیزیکی دارو

هر روز شکل ظاهری فرمولاسیون ها مبنی بر تشکیل رسوب بررسی گردید.

### اندازه گیری میزان نشت پذیری توسط دیالیز

دو محلول های لیپوزومی تهیه شده از روش های تبخیر فاز حلال و آبگیری-آبدهی مجدد درون کیسه های دیالیز با cut off ۱۲۰۰۰ دالتون ریخته و پس از بستن دو سر کیسه توسط گیره های مخصوص، در یک لیتر بافر فسفات دی هیدروژن منو سدیم ۵ pH و غلظت ۰/۰۰۵ مولار غوطه ور شد. این مجموعه توسط کاغذ فویل پوشانده شده و درون یخچال بر روی دستگاه استریل قرار گرفت. پس از ۱۲ ساعت محلول بافری با بافر فسفات دی هیدروژن منو سدیم ۵ pH و غلظت ۰/۰۰۱ مولار تعویض شد و پس از ۶ ساعت این بافر با همین بافر ولی غلظت ۰/۰۰۰۵ مولار تعویض گشت. بعد از ۲۴ ساعت دیالیز، حجم محلول درون کیسه اندازه گیری شده و سپس مقدار هیدروکینون درون کیسه توسط روش UV اسپکتروفتومتری اندازه گیری شد.

### ارزیابی شکل لیپوزوم

نمونه های لیپوزومی تهیه شده به روش های تبخیر فاز حلال و آبگیری-آبدهی مجدد روی لام گسترش داده شد و با بزرگنمایی ۱۰۰\*۱۰ مشاهده شد.

### نتایج

#### درصد انکپسولاسیون

مقدار داروی محصور شده در لیپوزوم های تهیه شده به روش تبخیر فاز حلال ۴۵٪ و در روش آبگیری-آبدهی مجدد مقدار ۲۵٪ بوده است.

#### اندازه ذرات لیپوزومی

اندازه ذرات لیپوزومی در لیپوزوم های تشکیل شده به روش تبخیر فاز حلال و در بافر فسفات ۸۲۰ نانومتر پراکندگی اندازه ذره ای ۰/۴۲ و در روش آبگیری-آبدهی مجدد اندازه ذرات ۳۵۰ نانومتر و پراکندگی اندازه ذره ای ۰/۳۶ بوده است. در فرمولاسیون تهیه شده به روش تبخیر فاز حلال در بافر ۴- (۲-هیدروکسی اتیل) ۱-پیرازین اتان سولفونیک اسید اندازه ذرات ۵۲۰ نانومتر حاصل شد.

#### پایداری فیزیکی

به مدت ۳۰ روز فرمولاسیون لیپوزومی به روش آبگیری-آبدهی مجدد پایدار بود و فرمولاسیون تهیه شده به روش تبخیر فاز حلال در بافر فسفات ۱۶ روز و در ۴- (۲-هیدروکسی اتیل) ۱-پیرازین اتان سولفونیک اسید بیش از یک ماه اندازه گیری شد.

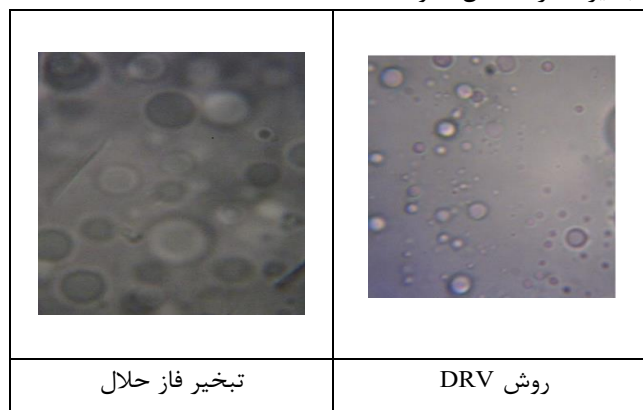
#### اندازه گیری میزان نشت پذیری

پس از ۲۴ ساعت دیالیز مقدار داروی باقیمانده در لیپوزوم های تهیه شده به روش تبخیر فاز حلال ۱۶٪ و به روش آبگیری-آبدهی مجدد مقدار ۳٪ بدست آمد.

## تصویر میکروسکوپ نوری

تصویر دو فرمولاسیون تهیه شده از طریق روش های آبگیری-آبدهی مجدد و تبخیر فاز حلال توسط

میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین در شکل ۲ مشاهده می شود.



شکل ۲ - تصویر میکروسکوپی دو فرمولاسیون با بزرگنمایی ۱۰۰.

## بحث

پراکندگی و اندازه ذرات در روش تبخیر فاز حلال بزرگتر از روش آبگیری-آبدهی مجدد است به عبارتی روش آبگیری-آبدهی مجدد می تواند فرمولاسیون همگن تری را فراهم کند. لیپوزوم های تهیه شده به روش آبگیری-آبدهی مجدد بدلیل پراکندگی و اندازه کوچکتر فرایند تجمع نیز در آن ها دیرتر رخ داده و پایداری فیزیکی بیشتری دارند همانطور که در این مطالعه نیز مشاهده شد تقریباً پایداری فیزیکی محلول تهیه شده با روش آبگیری-آبدهی مجدد دو برابر روش تبخیر فاز حلال است. اما در روش آبگیری-آبدهی مجدد از آنجا که محلول حاوی هیدروکینون کم کم به فیلم خشک فسفولیپیدی اضافه می شود درصد انکپسولاسیون کمتر از روش تبخیر فاز حلال است. نشت هیدروکینون پس از ۲۴ ساعت دیالیز در روش آبگیری-آبدهی مجدد بیشتر از تبخیر فاز حلال است که ممکن است بدلیل کوچک بودن اندازه لیپوزوم ها تعداد لایه های آن نیز کاهش یافته و امکان نشت مولکول های هیدروکینون بیشتر شده باشد.

به نظر می رسد با استفاده از بافر ۴-(۲-هیدروکسی اتیل)-۱-پپرازین اتان سولفونیک اسید و روش آبگیری-آبدهی مجدد می توان لیپوزوم هایی با اندازه کوچکتر تهیه کرد که منجر به افزایش پایداری فیزیکی فرمولاسیون لیپوزومی می شود ولی اندازه کوچکتر درصد انکپسولاسیون را پایین آورده و از سوی دیگر امکان نشت دارو را افزایش

بافر ۴-(۲-هیدروکسی اتیل)-۱-پپرازین اتان سولفونیک اسید از بهترین بافرها در مطالعات بیولوژیک است به نظر می رسد این بافر نقش محافظتی در برابر اکسیداسیون فسفولیپیدها ایفا کرده و منجر به پایداری شیمیایی و فیزیکی محلول لیپوزومی می شود (۱۲). معلوم شده که غلظت بافر هر چه بیشتر شود سرعت هیدرولیز زیادتیر می گردد (۱۳)، از این رو محلول های لیپوزومی در غلظت های بافری کمتر از ۰/۰۵ مولار تهیه می شوند. نتیجه هیدرولیز فسفولیپیدها ناپایداری فیزیکی محلول لیپوزومی است. در این مطالعه نیز پایداری فیزیکی محلول لیپوزومی در بافر ۴-(۲-هیدروکسی اتیل)-۱-پپرازین اتان سولفونیک اسید بیشتر از فسفات بوده است. علت دیگر این پایداری می تواند اندازه ذرات در دو محلول مذکور باشد بطوریکه اندازه بزرگ ذرات لیپوزومی در بافر فسفات میل به تجمع ذرات لیپوزومی را افزایش می دهد و سپس فیوژن و رسوب را منجر می شود. در این مطالعه از بافر دی هیدروژن فسفات منوسدیم به جای نوع دی سدیم آن استفاده شد زیرا معلوم شده است که در بافر سیترات سه بار منفی و تریس یک بار مثبت به ترتیب سرعت هیدرولیز فسفولیپیدها بالاتر از بافر دو بار منفی سیترات و بی بار تریس است (۱۴). از این رو در این مطالعه نیز از بافر فسفاتی استفاده شد که بار کمتری داشته باشد.

از همکاری جناب آقای دکتر امید رجبی و سرکار خانم دکتر بی بی صدیقه فضلی بزاز در دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد قدردانی می شود.

می دهد بنابراین با توجه به هدف مطالعه یکی از این شرایط می تواند مناسب باشد.

### تقدیر و تشکر

#### منابع مورد استفاده

1. DeCaprio, A. P., 1999. The toxicology of hydroquinone - relevance to occupational and environmental exposure. *Critical Reviews in Toxicology* 29: 283-330.
2. Palumbo, A., d'Ischia, M., Misuraca, G., Prota, G., 1991. Mechanism of inhibition of melanogenesis by hydroquinone. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects* 1073(1): 85-90.
3. Mills, O. H., Kligman, A. M., 1978. Ultraviolet phototherapy and photochemotherapy of acne vulgaris. *Archives of Dermatology* 114(2): 221-223.
4. Chavin, W., Jelonek, E. J., Reed, A. H., Binder, L. R., 1980. Survival of mice receiving melanoma transplants is promoted by hydroquinone. *Science* 208 (4442): 408-410.
5. Goyal, P., Goyal, K., Vijaya Kumar, S. G., Singh, A., Katare, O. P., Nath Mishra, D., 2005. Liposomal drug delivery systems – Clinical applications. *Acta Pharmaceutica* 55: 1-12.
6. Schaeffer, H., Krohn, D., 1982. Liposomes in topical drug delivery. *Investigative Ophthalmology Visual Science* 22 (2): 220-227.
7. Lasic D., 1998. Novel applications of liposomes. *TIBTECH* 16: 307-321.
8. Fang, J. U., Hwang, T. L., Huang, Y. L., 2006. Liposomes as vehicles for enhancing drug delivery via skin routes. *Current Nanoscience* 2: 5570-5582.
9. Mozafari, M. R., 2005. Liposomes: an overview of manufacturing techniques. *Cellular and Molecular Biology Letters* 10(4): 711-723.
10. Khoshneviszadeh, R., Bazzaz, B. S. F., Housaindokht, M. R., Ebrahim-Habibi, A., Rajabi, O., 2016. A comparison of explanation methods of encapsulation efficacy of hydroquinone in a liposomal system. *Journal of Paramedical Sciences* 7(2): 23-28.
11. Khoshneviszadeh, R., Bazzaz, B. S. F., Housaindokht, M. R., Ebrahim-Habibi, A., Rajabi, O., 2015. UV spectrophotometric determination and validation of hydroquinone in liposome. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research: IJPR* 14(2): 473-479.
12. Fiorentini, D., Landi, L., Barzanti, V., Cabrini, L., 1989. Buffers can modulate the effect of sonication on egg lecithin liposomes. *Free Radical Research Communications* 6(4): 243-250.
13. Grit, M., Crommelin, D. J., 1993. Chemical stability of liposomes: implications for their physical stability. *Chemistry and Physics of Lipids* 64(1): 3-18.
14. Grit, M., Smidt, J. H., Struijke, A., Crommelin, D. J., 1989. Hydrolysis of phosphatidylcholine in aqueous liposome dispersions. *International Journal of Pharmaceutics* 50(1): 1-6.