

## بررسی ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی نانولیپوزوم‌های حاوی بتا-سیتواسترول

عاطفه پورجاهد<sup>\*</sup>، حبیب اله عباسی<sup>۱</sup> و نسیم صفاریان<sup>۲</sup>

تاریخ دریافت: ۹۷/۶/۲۶ تاریخ پذیرش: ۹۷/۸/۱۲

<sup>۱</sup> استادیار گروه مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی جندی شاپور دزفول

<sup>۲</sup> همکار طرح پژوهشی، دانش آموخته شیمی کاربردی

\*مسئول مکاتبه: Email: atpourjahed@jso.ac.ir

### چکیده

**زمینه مطالعاتی:** در سال‌های اخیر، از فیتواسترول‌ها، به منظور کاهش جذب کلسترول در رژیم غذایی استفاده شده است. نقطه ذوب بالا و نامحلول بودن آن‌ها در آب و روغن، افزودن فیتواسترول‌ها را به مواد غذایی با مشکل مواجه می‌کند. هدف: هدف از این پژوهش بهبود خصوصیات فیزیکی و شیمیایی فیتواسترول‌ها به کمک نانولیپوزوم‌ها است. روش کار: در این مطالعه، نانولیپوزوم‌های حاوی بتا-سیتواسترول از غلظت‌های مختلف لسیتین سویا و کلسترول به روش هیدراسیون لایه نازک تهیه شد و برای کاهش اندازه ذره از هموژنایزر اولتراسونیک استفاده گردید. طیف‌سنجی مادون قرمز (FTIR) برای مطالعه برهم‌کنش گروه‌های عاملی مواد افزودنی مختلف در ترکیب نانولیپوزوم‌ها استفاده گردید. نتایج نشان داد که برهم‌کنش بین بتا-سیتواسترول و نانولیپوزوم‌ها از نوع پیوند هیدروژنی است. میانگین قطر حجمی ذرات، شاخص پراکندگی، پتانسیل زتا، پایداری فیزیکی و pH نانولیپوزوم‌های تولید شده بررسی گردید. نتایج: میانگین قطر حجمی ذرات بین ۹۰ تا ۱۰۰ نانومتر بود. افزودن کلسترول به نمونه‌ها، میانگین قطر حجمی نانولیپوزوم‌ها را به مقداری کم و به صورت معناداری ( $P < 0.05$ ) افزایش داد، با این حال، موجب کاهش معنادار پتانسیل زتا ( $P < 0.05$ ) و پایداری بیشتر نمونه‌ها در دماهای مختلف گردید. همچنین pH نمونه‌ها به محدوده خنثی نزدیک بود که ثابت می‌کند استفاده از این نانولیپوزوم‌ها تاثیری در تغییر pH مواد غذایی ندارد. نتیجه گیری نهایی: بهترین نتایج برای نمونه حاوی ۰/۰۶ گرم کلسترول به دست آمد که علیرغم اندازه ذره تا حدودی بزرگ‌تر، از نظر پتانسیل زتا، پایداری فیزیکی و pH، مطلوب‌تر از سایر نمونه‌ها بود.

**واژگان کلیدی:** بتا-سیتواسترول، نانولیپوزوم، اندازه ذره، پایداری

### مقدمه

۲۰۰۷ و ملنیکوف و همکاران ۲۰۰۴؛ فتحی آچاچلوی و همکاران (۱۳۸۸)؛ در سال‌های اخیر، علاقه به استفاده از فیتواسترول‌ها در ترکیبات غذایی به منظور کاهش کلسترول، افزایش یافته است. از طریق رژیم غذایی روزانه

استرول‌ها و استانول‌های طبیعی موجود در غشا سلول‌های گیاهی با نام فیتواسترول شناخته می‌شوند (دوئیچ-کولوزون و همکاران ۲۰۱۱؛ کوگان و همکاران

متوسط- ویتامین سی (لی و همکاران ۲۰۱۵)، روغن دارچین (سوی و همکاران ۲۰۱۶)، پلی‌فنول‌های شامل کاتچین (گادکاری و همکاران ۲۰۱۵ و تی‌سای و همکاران ۲۰۱۶)، کورکومین (فنگ و همکاران ۲۰۱۷ و ژائو و همکاران ۲۰۱۸) و ترکیبات فعال دیگر مورد توجه و استفاده قرار گرفته است.

نانولیپوزوم‌ها ساختارهای کلوئیدی هستند که از یک یا چند کره هم‌پوشان متشکل از دو لایه چربی، به وجود می‌آیند که محیط‌های آبی را احاطه می‌کنند. این ساختار لیپوزوم‌ها خصوصیات ویژه‌ای، مانند آب‌بندی شدن خودبه‌خودی در محیط آبی، را برای آن‌ها ایجاد می‌کند که آن‌ها را حامل مناسبی برای ترکیبات فعال در زمینه پزشکی، ایمونولوژی، تشخیص، مواد آرایشی، پاک‌سازی و صنایع غذایی می‌سازد (کریمی و همکاران ۲۰۱۸).

نانولیپوزوم‌ها در مقایسه با لیپوزوم‌ها، مساحت سطح بیشتر را فراهم آورده، و دسترسی زیستی و هدف‌مندی مواد درون‌پوشانی شده را بهبود می‌بخشند (محمدی و همکاران ۲۰۱۵).

نانولیپوزوم‌ها پتانسیل خوبی برای درون‌پوشانی و پایدار کردن ملکول‌ها در برابر محدوده متنوعی از شرایط محیطی و محافظت آن‌ها از تخریب از خود نشان داده‌اند (دوئیچ-کولوزون و همکاران ۲۰۱۱).

روش تهیه ساده، ساختار پایدار، زیست‌سازگاری و زیست‌تخریب‌پذیری، عدم سمیت در مصرف سیستمی و غیرسیستمی، امکان بازده درون‌پوشانی نسبتاً بالا برای ترکیبات چربی‌دوست، آبدوست و دوگانه دوست، از مزایای لیپوزوم‌ها در مقایسه با سایر سیستم‌های رهایش ترکیبات فعال هستند (محمدی و همکاران ۲۰۱۵ و کریمی و همکاران ۲۰۱۸).

در طراحی نانولیپوزوم‌های مورد استفاده در صنایع غذایی، دو پارامتر مهم باید در نظر گرفته شود؛ پارامتر اول، پایداری نانولیپوزوم‌ها (پزشکی و همکاران ۲۰۱۶)، به منظور افزایش زمان ماند و نگهداری در مواد غذایی و پارامتر دوم، ترکیب ساختار آن‌ها (پزشکی و همکاران

مقدار ۵۰۰-۱۸۰ میلی‌گرم فیتواسترول در بدن تامین می‌شود که این میزان برای کاهش کلسترول خون کافی نیست (ملنیکوف و همکاران ۲۰۰۴).

مکانیزم اصلی عملکرد فیتواسترول در کاهش کلسترول، تداخل با انحلال کلسترول در میسل‌های روده است که منجر به کاهش جذب کلسترول می‌گردد (پاراگا و همکاران ۲۰۱۱). این ترکیبات همچنین منجر به کاهش خطر ابتلا به سرطان معده، جلوگیری از رشد تومور، بهبود بیماری‌های التهابی و جلوگیری از تصلب شرایین می‌گردند. مصرف دو تا سه گرم فیتواسترول در روز می‌تواند تقریباً به ده درصد کاهش سطح کلسترول خون و ۱۵ درصد کاهش سطح لیپوپروتئین‌های کم چگالی خون منجر شود (ماتسوکا و همکاران ۲۰۱۵؛ آکودو و فرانچتی ۲۰۱۶؛ گروه CTT ۲۰۱۲ و بهاری و همکاران ۲۰۱۶).

فیتواسترول پودری سفید رنگ، نامحلول در آب و دارای نقطه ذوب بالا است (کوگان و همکاران ۲۰۰۷ و ملنیکوف و همکاران ۲۰۰۴) که به سختی در چربی‌ها و روغن‌ها حل می‌شود (کوگان و همکاران ۲۰۰۷)؛ همین عوامل اضافه کردن فیتواسترول به مواد غذایی را با مشکل مواجه می‌کند.

فسفولیپیدها ترکیبات غشا سلولی دارای یک سر آبدوست و تعداد یک یا بیشتر دم آب‌گریز هستند (دوئیچ-کولوزون و همکاران ۲۰۱۱ و پزشکی و همکاران ۲۰۱۶)؛ که این ترکیبات دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی نیز هستند (پزشکی و همکاران ۲۰۱۶). از این ترکیبات برای تهیه حامل‌هایی با نام نانولیپوزوم استفاده می‌شود که در سال‌های اخیر به عنوان یک ریزحامل مهم در صنایع دارویی و غذایی برای درون‌پوشانی و رهایش ترکیبات فعال آبدوست یا چربی‌دوست مانند ویتامین آ (پزشکی و همکاران ۲۰۱۶)، ویتامین ای و ویتامین سی (مارساناسکو و همکاران ۲۰۱۱)، آسکوربیک اسید (الکساندر و همکاران ۲۰۱۲)، ریزمغذی‌ها (یائو و همکاران ۲۰۱۵)، اسیدهای چرب امگا ۳ ضروری (اکرت و همکاران ۲۰۱۱ و راستی و همکاران ۲۰۱۲)، اسیدهای چرب زنجیره

بررسی قرار گرفت. استفاده از ترکیبات با درجه خوراکی در تهیه نانولیپوزوم‌ها و درون‌پوشانی ترکیب سودمند فیتواسترول، مهم‌ترین مزیت این مطالعه نسبت به سایر پژوهش‌ها است. طبق مطالعاتی که انجام شد، پژوهشی در زمینه درون‌پوشانی فیتواسترول با مواد با درجه خوراکی به دست نیامد. همچنین در این پژوهش، از هموزنایزر اولتراسونیک برای کاهش اندازه ذره و بارگذاری موثرتر فیتواسترول درون نانولیپوزوم‌ها استفاده شد.

#### مواد و روش‌ها

فسفولیپید (لسیتین ال-آلفا گرانولار) با درصد خلوص ۹۹ درصد از Carl Roth، آلمان، خریداری شد. کلاسترول با درصد خلوص ۹۵ درصد از Sigma-Aldrich، آلمان، تهیه شد. همچنین اتانول محصول Merck، آلمان و آب دی‌یونیزه محصول زلال‌طب شیمی، ایران خریداری گردید. فیتواسترول متشکل از بتا- سیتواسترول از Sigma-Aldrich، آلمان، خریداری شد. سایر مواد شیمیایی با درجه خلوص تجزیه‌ای بوده و از Merck، آلمان تهیه شدند.

#### تهیه نانولیپوزوم‌های حاوی فیتواسترول

نانولیپوزوم‌های حاوی فیتواسترول به روش هیدراسیون لایه نازک (عربی و همکاران ۲۰۱۷ و پزشکی و همکاران ۲۰۱۶) و با استفاده از غلظت‌های مناسب لسیتین-کلاسترول تهیه شدند. در این روش، ابتدا لسیتین و کلاسترول به ترتیب با غلظت‌هایی مطابق با جدول ۱ در حلال اتانول ۷۰ درصد حل و به صورت یک لایه نازک روی سطح ظرف ریخته شد؛ اتانول تا زمانی که نمونه‌ها به صورت شفاف درآمد، به محلول اضافه گردید. سپس محلول‌های لیپیدی ریخته شده در آن خلا با دمای ۳۷ درجه سلسیوس خشک گردید و لایه‌های نازکی به دست آمد. از بین نمونه‌های تهیه شده نمونه لایه‌های با ضخامت یکنواخت‌تر و میزان پخش بهتر انتخاب شدند که شامل نمونه‌های ۱، ۲ و ۳ در جدول بودند. سپس لایه‌های نازک لیپیدی آماده شده در فاز آبی (آب دی‌یونیزه) هیدراته شد

است که نباید تغییری در بافت و مزه مواد غذایی ایجاد کند.

کاهش اندازه لیپوزوم‌ها تا حد نانو می‌تواند پایداری آن‌ها را کاهش دهد. به همین دلیل می‌توان با افزودن مواد پایدار کننده، طول عمر و پایداری این نانوحامل‌ها را افزایش داد (مظفری و همکاران ۲۰۰۸).

اضافه کردن کلاسترول به فسفولیپیدها موجب افزایش پایداری نانولیپوزوم از طریق کاهش نفوذپذیری غشای لیپیدی و سخت‌سازی غشا می‌شود (پزشکی و همکاران ۲۰۱۶).

ایزدی و همکاران، غنی‌سازی ماست با فیتواسترول‌ها و بهینه‌سازی شرایط فرآیند آن را مورد بررسی قرار دادند. برای این کار، امولسیون با چهار جز اصلی تهیه و به ماست اضافه گردید. نتایج به دست آمده، نشان داد که غنی‌سازی نمونه‌ها با فیتواسترول موجب کاهش میزان آب اندازی و ویسکوزیته و افزایش قدرت ژل نسبت به نمونه شاهد شد اما تغییری در اسیدیته نمونه‌ها در مقایسه با نمونه شاهد ایجاد نشد (ایزدی و همکاران ۱۳۹۰).

در پژوهشی که توسط پزشکی و همکاران انجام شد، نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین آ پالمیتات از غلظت‌های مختلف لسیتین-کلاسترول با روش هیدراسیون لایه نازک تهیه شد. اندازه ذرات تهیه شده در محدوده ۷۶ تا ۱۱۵ نانومتر و توزیع ذرات تک‌پخش بود. نتایج بررسی‌ها نشان داد که فرمولاسیون ۵۰/۱۰ میلی‌گرم از کلاسترول/لسیتین فرمولاسیون بهینه برای تهیه نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین آ پالمیتات با بازده کپسولاسیون ۱۵/۸ درصد بود (پزشکی و همکاران ۲۰۱۶).

هدف اصلی این پژوهش، درون‌پوشانی فیتواسترول در فرمولاسیون‌های نانولیپوزوم، به منظور بهبود پراکندگی آن در محیط‌های آلی و آبی، انتخاب فرمولاسیون بهینه از میان ترکیب لسیتین سویا-کلاسترول است. از غلظت‌های مختلف کلاسترول به عنوان پایدار کننده، استفاده شد. میانگین قطر حجمی ذرات، شاخص پراکندگی، پتانسیل زتا، پایداری فیزیکی و pH به عنوان پارامترهای مهم مورد

می‌کند. هموژنیزاسیون با استفاده از دستگاه اولتراسوند و احتمالاً تشکیل پیوند هیدروژنی بین نانولیپوزوم‌ها و بتا-سیتواسترول به درون پوشانی آن انجامید که در بخش نتایج بررسی شده است. از آنجا که تولید انرژی توسط اولتراسوند ممکن است به ساختار نانولیپوزوم‌ها آسیب برساند، از حمام یخ برای حفظ ساختار آن‌ها استفاده شد و برای جلوگیری از پارگی غشای نانولیپوزوم‌ها دستگاه دارای بازه‌های توقف سه ثانیه‌ای بین پالس‌ها بود. همچنین پروب اولتراسوند در سوسپانسیون نزدیک سطح نگه داشته شد تا لیپوزوم‌ها به طور مساوی امواج اولتراسوند را دریافت کنند (پزشکی و همکاران ۲۰۱۶).

و سوسپانسیون حاصل شده برای مدت زمان کوتاهی مخلوط گردید. در این مرحله سوسپانسیون حاوی بتا-سیتواسترول به اندازه ۲۰ درصد وزنی از مجموع وزن لسیتین-کلاسترول به نمونه‌ها اضافه گردید. اضافه کردن بتا-سیتواسترول در مرحله هیدراسیون، برای جلوگیری از تداخل آن در پیوند تشکیل شده بین لسیتین و کلاسترول بود؛ سپس برای کاهش اندازه ذره لیپوزوم‌های تهیه شده از دستگاه هموژنایزر اولتراسونیک، مدل UHP-400 محصول شرکت توسعه فناوری مافوق صوت استفاده شد. این دستگاه دارای توان ۴۰۰ وات بوده و زمان هر پالس آن ۶۰ ثانیه است. کل مدت زمان هموژنیزاسیون ۱۰ دقیقه بود. استفاده از هموژنایزر اولتراسونیک به تشکیل نانولیپوزوم‌های با اندازه کوچک‌تر و تک‌دیواره کمک

جدول ۱- غلظت نمونه فیلم‌های تهیه شده برای سنتز نانولیپوزوم

Table 1- Concentration of prepared film samples for nanliposome synthesis

Sample	Lecithin (gr)	Cholesterol (gr)	Ethanol (ml)	$\beta$ - sitosterol (gr)	Water (ml)
1	0.5	0.04	10	0.108	10
2	0.5	0.05	12	0.11	10
3	0.5	0.06	14	0.112	10
4	0.5	0.07	15	0.114	10
5	0.5	0.09	20	0.118	10

یک بار مصرف قرار گرفت و نتایج به کمک نرم‌افزار ثبت گردید.

#### اندازه‌گیری pH

مقادیر pH برای نمونه‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به کمک دستگاه pH متر محصول کمپانی WTW مشخص شد تا میزان تاثیر احتمالی نمونه‌ها در pH نمونه‌های غذایی بررسی شود. همه اندازه‌گیری‌ها سه بار تکرار شد و متوسط اندازه pH گزارش گردید.

#### پایداری فیزیکی

پایداری نانولیپوزوم‌های تهیه شده بر اساس دما و سانتیفریوژن کردن بررسی شد. نانولیپوزوم‌ها در دماهای مختلف (۴، ۲۵ و ۳۷ درجه سانتی‌گراد) نگهداری شد و جدایش فازی، تجمع و رسوب‌دهی آن‌ها هم به روش مشاهداتی و هم به کمک بررسی میانگین قطر حجمی ذرات بررسی شد. اندازه قطر حجمی سه نمونه نانولیپوزوم در

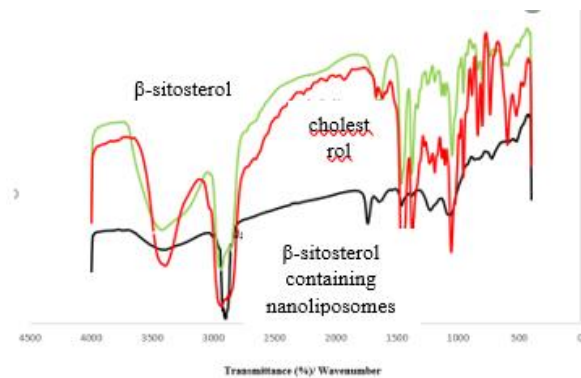
#### طیف‌سنجی مادون قرمز

از طیف‌سنجی مادون قرمز (FT-IR) برای تعیین برهم‌کنش گروه‌های عاملی مواد افزودنی استفاده شد. طیف‌ها با استفاده از دستگاه طیف‌سنج FT-IR، مدل MOD SRG1100G, S/N SRG1100C محصول شرکت BOMEM کانادا در رزولوشن  $4\text{ cm}^{-1}$  در محدوده فرکانسی  $4000\text{ cm}^{-1}$  و  $400\text{ cm}^{-1}$  با استفاده از روش پلت KBr با نسبت نمونه به KBr برابر ۱۰:۱۰۰ انجام شد.

#### تعیین پتانسیل زتا و اندازه ذره

پتانسیل زتا، میانگین قطر حجمی ذرات و شاخص پراکندگی نمونه‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد به کمک دستگاه Zen 3600-Zetasizer محصول کمپانی Malvern اندازه‌گیری شد. ابتدا مقدار مشخصی از نمونه بین ۴ الی ۵ سی سی از نمونه درون سلول‌های زتا

(۲۰۱۵) و همچنین باند OH در ساختار کلسترول (پزشکی و همکاران ۲۰۱۶) است که در ساختار نانولیپوزوم ثابت کننده ایجاد پیوند هیدروژنی بین لسیتین، کلسترول و بتا-سیتواسترول است.



شکل ۱- طیف مادون قرمز مربوط به کلسترول، بتا-سیتواسترول و نانولیپوزوم‌های تهیه شده حاوی بتا-سیتواسترول

Figure 1- FT-IR spectroscopy of cholesterol,  $\beta$ -sitosterol and  $\beta$ -sitosterol contained nanoliposomes

### پتانسیل زتا و اندازه ذره

تاثیر غلظت‌های مختلف لسیتین و کلسترول بر میانگین قطر حجمی ذرات، شاخص پراکندگی و پتانسیل زتا نانولیپوزوم‌ها بررسی شد. میانگین قطر حجمی و شاخص پراکندگی نانولیپوزوم‌ها در جدول ۲ برحسب ترکیب لسیتین و کلسترول نشان داده شده است. اندازه نانولیپوزوم می‌تواند بر اساس تغییر شرایط فیزیکی مانند دما، شرایط شیمیایی مانند pH و همچنین نوع فسفولیپید، نوع ماده حمل شونده و نوع ماده پایدار کننده متفاوت باشد (تیلور و همکاران ۲۰۰۸ و شاکر و همکاران ۲۰۱۷). استفاده از هموژنایزر اولتراسونیک به تشکیل نانولیپوزوم‌های تک دیواره و با اندازه ذره پایین (حدود ۱۰۰ نانومتر و پایین‌تر) کمک می‌کند (ملنیکوف و همکاران ۲۰۰۴). در این نمونه‌ها کلسترول با هدف پایدار کردن غشا لیپوزومی به فسفولیپید افزوده شد و موجب سخت شدن دیواره و زیکول‌ها گردید (ملنیکوف و همکاران ۲۰۰۴). تحلیل آماری نتایج نشان داد که با افزایش میزان کلسترول

زمان ۲۰ روز پس از سنتز و با شرایط نگهداری در دمای ۴ درجه سلسیوس بررسی گردید. همچنین با استفاده از دستگاه سانتریفیوژ محصول شرکت پل ایده‌آل تجهیز با سرعت بالا در دور ۱۰۰۰۰rpm به مدت ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ گردید و تغییر در همگنی آن‌ها به روش مشاهداتی بررسی شد (مقیمی پور و همکاران ۲۰۱۲).

### تحلیل آماری

تحلیل آماری بر اساس طرح کاملاً تصادفی پس از سه بار تکرار انجام شد. برای تحلیل آماری از روش ANOVA یک طرفه در نرم‌افزار MINITAB نسخه ۱۷ استفاده شد.

### نتایج و بحث

#### طیف سنجی مادون قرمز

طیف سنجی مادون قرمز با هدف بررسی احتمال برهم‌کنش میان بتا-سیتواسترول و حامل‌های نانولیپوزومی تهیه شده انجام شد. طیف مادون قرمز نمونه‌های کلسترول، بتا-سیتواسترول و نانولیپوزوم‌های حاوی بتا-سیتواسترول در شکل ۱ نشان داده شده است. در طیف مادون قرمز همه ترکیبات، جذب در نقاط در محدوده بین  $2850 \text{ cm}^{-1}$  تا  $2870 \text{ cm}^{-1}$  و  $2920 \text{ cm}^{-1}$  تا  $2940 \text{ cm}^{-1}$  مشاهده شد که مربوط به کشش گروه آلکان در ترکیب لسیتین، کلسترول و بتا-سیتواسترول است. همچنین جذب در نقاط  $1739 \text{ cm}^{-1}$  که در طیف مربوط به کلسترول و بتا-سیتواسترول مشاهده نمی‌شود، مربوط به کشش استر آلیفاتیک در ساختار لسیتین و افزایش میزان جذب در نقطه  $1061 \text{ cm}^{-1}$  نشان دهنده کشش گروه  $\text{PO}_2$  در ساختار لسیتین است (انزای و پروکتور ۱۹۹۹). کشش گروه  $\text{CH}_2$  در طیف‌ها با جذب در نقطه  $1463 \text{ cm}^{-1}$  در همه ترکیبات تایید می‌شود. همچنین کشش در ناحیه  $\text{cm}^{-1}$   $1649$  نشان دهنده وجود پیوند دوگانه کربن-کربن در ساختار بتا-سیتواسترول است (پاترا و همکاران ۲۰۱۰ و بولاما و همکاران ۲۰۱۵). کشش ایجاد شده در ناحیه  $\text{cm}^{-1}$   $3420$ - $3400$  مربوط به کشش پیوند OH در ساختار بتا-سیتواسترول (پاترا و همکاران ۲۰۱۰ و بولاما و همکاران

در ترکیب نانولیپوزوم، میانگین قطر حجمی ذرات و همچنین شاخص پراکندگی به طور معناداری ( $p < 0.05$ ) افزایش یافت. اضافه کردن کلاسترول اگرچه موجب افزایش در اندازه ذره و شاخص پراکندگی نانولیپوزوم‌ها شده است، اما این اثرات قابل چشم‌پوشی است. نمونه دارای ۰/۰۴ گرم کلاسترول با میانگین قطر ۹۳/۱۳ نانومتر دارای کوچک‌ترین اندازه ذره، و نمونه دارای ۰/۰۶ گرم کلاسترول با میانگین قطر ۱۰۰/۳ نانومتر دارای بزرگ‌ترین اندازه ذره بود و در مجموع تفاوت قابل ملاحظه‌ای از نظر اندازه ذرات بین سه نمونه مشاهده نشد. این حالت به این دلیل پیش آمد که وقتی ساختارهای لایه‌ای تبدیل به ساختارهای وزیکولی در آب شدند، کلاسترول در فضاهای ملکولی جای گرفت و بنابراین نمی‌توانست تاثیر چندانی در افزایش اندازه ذره داشته باشد و اثر آن فقط در پایدارسازی نانولیپوزوم است. این نتایج، مشابه تحقیقات پزشکی و همکاران (۲۰۱۶) بود که اقدام به درون‌پوشانی ویتامین آ پالمیتات در نانولیپوزوم‌های تهیه شده از کلاسترول-لسیتین نموده بودند؛ همچنین راستی و همکاران (۲۰۱۲) در درون‌پوشانی امگا ۳ در نانولیپوزوم‌ها و الکساندر و همکاران (۲۰۱۲) در تهیه نانولیپوزوم‌های بارگذاری شده با آسکوربیک‌اسید نتایج مشابهی را به دست آورده بودند. در ضمن، اتصال فیتواسترول به عنوان یک استرول به دیواره‌های نانولیپوزوم تاثیر چندانی بر میانگین قطر ذرات نداشت. نتایج نشان داد که با افزایش میزان کلاسترول در ترکیب نانولیپوزوم، شاخص پراکندگی از متوسط ۰/۲۸۲ تا ۰/۲۹۲ افزایش یافت که نشان دهنده افزایش میزان پراکندگی به دلیل افزایش قطر حجمی ذرات است که البته به دلیل تغییرات به میزان ناچیز قابل چشم‌پوشی است. تحلیل آماری نتایج نشان داد که ارتباط معناداری بین افزایش میزان کلاسترول از ۰/۰۴ گرم و ۰/۰۵ گرم به ۰/۰۶ گرم از نظر شاخص پراکندگی وجود داشت و تفاوت معناداری بین شاخص پراکندگی نانولیپوزوم‌های دارای

۰/۰۴ گرم کلاسترول با نمونه دارای ۰/۰۵ گرم کلاسترول مشاهده نشد ( $p < 0.05$ ). جدول ۳ پتانسیل زتا نانولیپوزوم‌ها را برحسب ترکیب لسیتین و کلاسترول نشان می‌دهد. پتانسیل زتا بار الکترواستاتیک سطح ذره است که به عنوان یک مانع انرژی دافعه، پایداری پراکندگی نانولیپوزوم را کنترل کرده و از نزدیک شدن ذرات به یکدیگر و تجمع آن‌ها جلوگیری می‌کند (نگویان و همکاران ۲۰۱۷ و محمدی و همکاران ۲۰۱۴). تحلیل آماری پتانسیل زتا نانولیپوزوم‌ها بر حسب میزان کلاسترول نشان داد که پتانسیل زتا با افزایش میزان کلاسترول به طور معناداری ( $P < 0.05$ ) کاهش یافت و از میانگین ۱۳/۹- در ترکیب دارای ۰/۰۴ گرم کلاسترول به میانگین ۲۲- در ترکیب دارای ۰/۰۵ گرم کلاسترول و با افزایش کلاسترول به مقدار ۰/۰۶ گرم به میانگین ۳۰/۹- رسید که این را می‌توان با حضور یک گروه هیدروکسیل در ساختار کلاسترول ارتباط داد. افزایش میزان کلاسترول در ترکیب نمونه‌ها به طور قابل توجهی موجب کاهش میزان پتانسیل زتا شد. منفی‌تر شدن پتانسیل زتا نشان دهنده افزایش دافعه و در نتیجه پایدارتر شدن نانولیپوزوم‌ها است. مقایسه نتایج پتانسیل زتا و میانگین قطر حجمی ذرات نشان داد که با وجودی که با افزایش میزان کلاسترول در اندازه نانولیپوزوم‌ها بزرگ‌تر شد، با این حال، به دلیل بار منفی ملکول کلاسترول پتانسیل زتا ذرات کاهش یافت. می‌توانست موجب افزایش پایداری نمونه‌ها شود؛ با توجه به این که تفاوت اندازه ذره در نمونه‌ها چندان قابل ملاحظه نبود، اضافه کردن کلاسترول به منظور افزایش پایداری نمونه‌ها مطلوب بود.

جدول ۲- میانگین قطر حجمی و شاخص پراکندگی نانولیپوزوم‌های سنتز شده

Table 2- Mean particle size and polydispersity index (PDI) of nanoliposomes

Sample	Lecithin (gr)	Cholesterol (gr)	Mean particle size (nm)	PDI
1	0.5	0.04	93.13±0.15 <sup>c</sup>	0.282±0.01 <sup>b</sup>
2	0.5	0.05	97.5±0.46 <sup>b</sup>	0.283±0.05 <sup>b</sup>
3	0.5	0.06	100.3±0.33 <sup>a</sup>	0.292±0.02 <sup>a</sup>

جدول ۳- پتانسیل زتا نانولیپوزوم‌های سنتز شده

Table 3- Zeta potential of nanoliposomes

Sample	Lecithin (gr)	Cholesterol (gr)	Zeta potential (mV)
1	0.5	0.04	-13.6±0.25 <sup>a</sup>
2	0.5	0.05	-22±0.58 <sup>b</sup>
3	0.5	0.06	-30.9±0.5 <sup>c</sup>

## اندازه گیری pH

اندازه‌گیری pH نمونه‌های نانولیپوزوم نشان داد که تمامی نمونه‌ها دارای pH مناسب بوده که این اعداد pH بهترین شرایط برای کاربرد موردنظر نانولیپوزوم‌ها را فراهم می‌کنند (جدول ۴). تحلیل آماری نتایج نشان داد که با افزایش کلسترول، pH نمونه‌ها به طور معناداری کاهش یافت ( $P < 0.05$ ).

افزایش میزان کلسترول موجب کاهش pH در محدوده بین ۶/۸۸ تا ۶/۵۱ گشت؛ نزدیک بودن عدد pH به محدوده خنثی در این نمونه‌ها برای ما یک مزیت محسوب می‌شود که نشان می‌دهد در صورت غنی سازی مواد غذایی با این نانولیپوزوم‌ها، این ذرات تاثیر چندانی در pH محیط ماده غذایی ایجاد نخواهند کرد.

جدول ۴- pH نانولیپوزوم‌های سنتز شده

Table 4- pH of nanoliposomes

Sample	Lecithin (gr)	Cholesterol (gr)	pH
1	0.5	0.04	6.82±0.06 <sup>a</sup>
2	0.5	0.05	6.62±0.11 <sup>b</sup>
3	0.5	0.06	6.55±0.04 <sup>b</sup>

## پایداری فیزیکی

از آنجا که تفاوت چگالی زیادی بین فسفولیپیدها و آب وجود ندارد، جدایش فازی نانولیپوزوم‌ها بر اثر گرانش

بسیار آهسته اتفاق می‌افتد و نمونه‌ها تمایل چندانی به ته نشینی سریع ندارند و پایداری مناسبی را در طول زمان از خود نشان می‌دهند (پزشکی و همکاران ۲۰۱۶). تست پایداری فیزیکی نمونه‌های نانولیپوزوم به صورت مشاهداتی انجام شد و پایداری در دماهای ۴، ۲۵ و ۳۷ درجه بررسی گردید. نتایج آزمون مشاهداتی تا قبل از دوفازی، ته‌نشینی یا بهم چسبیدن و تجمع نانولیپوزوم‌ها در جدول ۵ ارائه شده است. همچنین اندازه قطر حجمی سه نمونه نانولیپوزوم در زمان ۲۰ روز پس از سنتز و با شرایط نگهداری در دمای ۴ درجه سلسیوس بررسی گردید. تحلیل آماری تست پایداری فیزیکی نشان می‌دهد که نمونه با درصد کلسترول بالاتر پایداری طولانی‌تری را در دماهای مختلف از خود نشان می‌دهد؛ پایداری فیزیکی نمونه‌ها در دمای ۴ درجه و ۲۵ درجه به صورت معناداری با افزایش میزان کلسترول افزایش می‌یابد ( $P < 0.05$ ) اما در دمای ۳۷ درجه ارتباط معناداری بین نتایج پایداری فیزیکی و میزان کلسترول در ترکیب نانولیپوزوم‌ها به دست نیامد ( $P > 0.05$ ).

به علاوه میانگین قطر حجمی ذرات با گذشت ۲۰ روز پس از نگهداری در دمای ۴ درجه برای نمونه دارای ۰/۰۴ گرم کلسترول به عدد ۳۹۵/۶ نانومتر و شاخص پراکندگی به ۰/۵۴ رسید. در نمونه‌های دارای کلسترول بالاتر، به ترتیب میانگین قطر حجمی ذرات و شاخص پراکندگی ۳۲۸/۱ نانومتر و ۰/۵ در نمونه دارای ۰/۰۵ گرم کلسترول و ۲۹۱/۴ نانومتر و ۰/۴۵۶ برای نمونه دارای ۰/۰۶ گرم کلسترول به دست آمد. این نتایج نقش کلسترول را به عنوان پایدار کننده نانولیپوزوم از طریق سخت کردن دیواره وزیکول تایید می‌کند. حضور کلسترول در ساختار

بوده و کلاسترول نقش یک افزودنی برای پایدار کردن نانولیپوزوم‌ها را داشته و پیش‌بینی می‌شود که تاثیر چندانی در افزایش کلاسترول خون نخواهد داشت.

استفاده از روش هیدراسیون لایه نازک و هموژنایزر اولتراسونیک موجب تشکیل ذره‌هایی با میانگین قطر حجمی حدود ۱۰۰ نانومتر و پایین‌تر شد که البته افزایش کلاسترول تاثیر بسیار ملایم و کمی در افزایش اندازه ذره و توزیع آن داشت؛ در مقابل، افزایش میزان کلاسترول در نمونه‌های تهیه شده موجب کاهش پتانسیل زتا و در نتیجه افزایش پایداری نمونه‌ها شد که نتایج آن در تست پایداری که در دماهای مختلف بررسی شد، کاملاً تایید شده است. همچنین اندازه‌گیری پایداری نمونه‌ها در دماهای مختلف پیش‌بینی شده برای نگهداری و استفاده مطلوب است. اندازه‌گیری قطر حجمی ذرات و شاخص پراکنندگی در زمان ۲۰ روز پس از نگهداری در دمای ۴ درجه تایید کرد که با افزایش میزان کلاسترول پایداری نانولیپوزوم‌ها افزایش یافت. همچنین اضافه کردن کلاسترول تاثیر چندانی بر تغییر pH نمونه‌ها نداشت و pH نانولیپوزوم‌های تهیه شده نزدیک به محدوده خنثی بود.

بهترین نتایج به دست آمده برای نمونه حاوی ۰/۰۶ گرم کلاسترول بوده که علیرغم دارا بودن اندازه ذره تاحدی بزرگ‌تر، دارای پایداری بیشتری نسبت به سایر نمونه‌ها از نظر اندازه پتانسیل زتا و تست پایداری بود.

غشا نانولیپوزومی چگالی ملکول‌های فسفولیپیدی را افزایش می‌دهد ولی با سخت‌سازی دیواره لایه فسفولیپیدی پایداری نانولیپوزوم‌ها را بهینه می‌کند (ماریانچی و همکاران ۲۰۱۴). همچنین با توجه به این که تفاوت چندانی میان اندازه ذره نانولیپوزوم‌ها (جدول ۲) وجود ندارد و پتانسیل زتا (جدول ۳) نمونه‌ها با افزودن کلاسترول کاهش یافته است، می‌توان پایداری شدن نمونه‌ها را با افزایش کلاسترول توجیه کرد. همچنین تمامی نمونه‌ها پس از ۳۰ دقیقه سانتریفیوژ کردن با دور rpm ۱۰۰۰۰ در دمای محیط به حالت دو فازی تبدیل شدند.

جدول ۵- پایداری نانولیپوزوم‌های سنتز شده

Table ۵- Stability of nanoliposomes					
Sam ple	Lecit hin (gr)	Cholest rol (gr)	Stabil ity in 4°C (days)	Stabil ity in 25°C (days)	Stabil ity in 37°C (days)
1	0.5	0.04	23±1 <sup>b</sup>	21±1 <sup>c</sup>	9±2 <sup>a</sup>
2	0.5	0.05	32±2 <sup>a</sup>	25±1 <sup>b</sup>	10±2 <sup>a</sup>
3	0.5	0.06	35±1 <sup>a</sup>	30±1 <sup>a</sup>	12±1 <sup>a</sup>

### نتیجه‌گیری کلی

نتایج طیف‌سنجی FTIR تایید کرد که بتا- سیتواسترول در نانولیپوزوم‌های تهیه شده وجود داشته و پیوند هیدروژنی بین ساختار نانولیپوزوم‌ها و فیتواسترول ایجاد شده است. همچنین از آنجا که میزان کلاسترول اضافه شده، نسبت به مقدار لسیتین و فیتواسترول کم

### منابع مورد استفاده

- فتحی آچاچلویی ب، آزادمراد میرچی ص، سیدشرفی ر، جلالی ح، ۱۳۸۸، جداسازی محصولات اکسیداسیونی فیتواسترول‌ها در روغن‌های گیاهی با کروماتوگرافی ستونی. نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی ایران، ۱۹(۱)، ۱۳-۲۲.
- ایزدی ز، گروسی ق، نصیرپور ع، احمدی ج و بهرامی ب، ۱۳۹۰، بهینه سازی تولید ماست غنی شده با فیتواسترول به منظور کاهش کلاسترول. نشریه پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران، ۷(۲)، ۱۶۳-۱۵۶.
- Acevedo NC and Danielle Franchetti, 2016. Analysis of co-crystallized free phytosterols with triacylglycerols as a functional food ingredient. Food Research International 85: 104-12.
- Alexander MA, Lopez AA, Fang Y and Corredig M, 2012. Incorporation of phytosterols in soy phospholipids nanoliposomes: Encapsulation efficiency and stability. LWT-Food Science and Technology 47: 427-36.
- Arabi MH, Chabok H, Mirzapour A and Shafiee M, 2017. Preparation of nanoliposomes containing Rosmarinus officinalis L essential oil: A comparative study. Bioscience Biotechnology Research Communication 10: 103-08.



- Bahari LAS and Hamishehkar H, 2016. The impact of variables on particle size of solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers; a comparative literature review. *Advanced pharmaceutical bulletin* 6(2): 143-151.
- Bulama, JS, Dangoggo SM and Mathias SN, 2015. Isolation and Characterization of Beta-Sitosterol from ethyl acetate extract of root bark of *Terminalia glaucescens*. *International Journal of Scientific and Research Publications* 5(3):1-3.
- Cui H, Li Wei, Li C, Vittayapadung S and Lin L, 2016. Liposome containing cinnamon oil with antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* biofilm. *Biofouling* 32: 215-25.
- Deutch-Kolevzon R, Aserin A and Garti N, 2011. Synergistic cosolubilization of omega-3 fatty acid esters and CoQ 10 in dilutable microemulsions. *Chemistry and Physics of Lipids* 164: 654-63.
- Eckert GP, Chang S, Eckmann J, Copanaki E, Hagl S, Hener U, Müller WE and Kögel D, 2011. Liposome-incorporated DHA increases neuronal survival by enhancing non-amyloidogenic APP processing, *Biochimica et Biophysica Acta-Biomembranes* 1808: 236-43.
- Feng T, Wei Y, Lee RJ and Zhao L. 2017. Liposomal curcumin and its application in cancer, *International journal of nanomedicine* 12: 6027-44.
- Gadkari PV and Balaraman M, 2015. Extraction of catechins from decaffeinated green tea for development of nanoemulsion using palm oil and sunflower oil based lipid carrier systems, *Journal of Food Engineering* 147: 14-23.
- Karami N, Moghimipour E and Salimi A, 2018. Liposomes as a Novel Drug Delivery System: Fundamental and Pharmaceutical Application. *Asian Journal of Pharmaceutics* 12(1): S31-41.
- Kogan A, Aserin A and Garti N, 2007. Improved solubilization of carbamazepine and structural transitions in nonionic microemulsions upon aqueous phase dilution, *Journal of Colloid and Interface Science* 315: 637-47.
- Li T, Yang S, Liu L, Liu C, Liu W, Zheng H, Zhou W and Tong G, 2015. Preparation and characterization of nanoscale complex liposomes containing medium-chain fatty acids and vitamin C. *International journal of food properties* 18: 113-24.
- Marianecchi C, Di Marzio L, Rinaldi F, Celia C, Paolino D, Alhaique F, Esposito S and Carafa M, 2014. Niosomes from 80s to present: the state of the art. *Advances in colloid and interface science* 205: 187-206.
- Marsanasco M, Márquez AL, Wagner JR, Alonso SDV and Chiamoni NS, 2011. Liposomes as vehicles for vitamins E and C: An alternative to fortify orange juice and offer vitamin C protection after heat treatment. *Food Research International* 44: 3039-46.
- Matsuoka K, Kase A, Matsuo T and Ashida Y, 2015. Competitive solubilization of cholesterol/cholesteryl oleate and seven species of sterol/stanol in model intestinal solution system. *Journal of oleo science* 64: 783-91.
- Mel'nikov SM, Seijen ten Hoorn JWM and Eijkelenboom AP, 2004. Effect of phytosterols and phytosterols on the solubilization of cholesterol by dietary mixed micelles: an in vitro study. *Chemistry and Physics of Lipids* 127: 121-41.
- Moghimipour E, Salimi A and Leis F, 2012. Preparation and evaluation of tretinoin microemulsion based on pseudo-ternary phase diagram. *Advanced pharmaceutical bulletin* 2 (2): 141-7.
- Mohammadi M, Ghanbarzadeh B and Hamishehkar H. 2014. Formulation of nanoliposomal vitamin D3 for potential application in beverage fortification. *Advanced pharmaceutical bulletin* 4: 569-75.
- Mohammadi R, Mahmoudzade M, Atefi M, Khosravi-Darani K and Mozafari MR, 2015. Applications of nanoliposomes in cheese technology. *International journal of dairy technology* 68: 11-23.
- Nguyen TL, Nguyen TH and Nguyen DH, 2017. Development and in vitro evaluation of liposomes using soy lecithin to encapsulate paclitaxel. *International journal of biomaterials*, 2017.
- Párraga I, López-Torres J, Andrés F, Navarro B, Campo JMD, García-Reyes M, Galdón MP, Lloret A, Precioso JC and Rabanales J, 2011. Effect of plant sterols on the lipid profile of patients with hypercholesterolaemia. Randomised, experimental study, *BMC complementary and alternative medicine* 11: 73.

- Patra A, Jha S, Murthy PN and Manik SA 2010. Isolation and characterization of stigmasterol ( $\beta$ -sitosterol) from the leaves of *Hygrophila spinosa* T. Anders, *Int J Pharma Sci Res* 1: 95-100.
- Pezeshky A, Ghanbarzadeh B, Hamishehkar H, Moghadam M and Babazadeh A, 2016. Vitamin A palmitate-bearing nanoliposomes: preparation and characterization, *Food Bioscience* 13: 49-55.
- Rasti B, Jinap S, Mozafari MR and Yazid AM, 2012. Comparative study of the oxidative and physical stability of liposomal and nanoliposomal polyunsaturated fatty acids prepared with conventional and Mozafari methods. *Food chemistry* 135: 2761-70.
- Shaker S, Gardouh AR and Ghorab MM, 2017. Factors affecting liposomes particle size prepared by ethanol injection method, *Research in pharmaceutical sciences* 12 (5): 346-52.
- Taylor TM, Bruce BD, Weiss J and Davidson PM, 2008. *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 inhibition in vitro by liposome-encapsulated nisin and ethylene diaminetetraacetic acid. *Journal of food safety* 28: 183-97.
- Trialsists Cholesterol Treatment, 2012. The effects of lowering LDL cholesterol with statin therapy in people at low risk of vascular disease: meta-analysis of individual data from 27 randomised trials. *The Lancet* 380: 581-90.
- Tsai YJ and Chen BH, 2016. Preparation of catechin extracts and nanoemulsions from green tea leaf waste and their inhibition effect on prostate cancer cell PC-3. *International journal of nanomedicine* 11: 1907-1926.
- Yao M, McClements DJ and Xiao H, 2015. Improving oral bioavailability of nutraceuticals by engineered nanoparticle-based delivery systems, *Current opinion in food science* 2: 14-19.
- Zhao M, Zhao M, Fu C, Yu Y and Fu A, 2018. Targeted therapy of intracranial glioma model mice with curcumin nanoliposomes. *International journal of nanomedicine* 13: 1601-10.

*Journal of Food Researches/vol.30 No.1/ 2020/pp 125-136*  
<https://foodresearch.tabrizu.ac.ir>

## Physical and chemical properties of $\beta$ -sitosterol containing nanoliposomes

A Pourjahed<sup>1\*</sup>, H Abbasi<sup>1</sup> and N Safarian<sup>2</sup>

Received: September 17, 2018 Accepted: November 3, 2018

<sup>1</sup>Assistant Professor, Department of Chemical Engineering, Jundi-Shapur University of Technology, Dezful, Iran

<sup>2</sup>MSc graduated in Applied Chemistry.

\*Corresponding author: E mail: atpourjahed@jsu.ac.ir

**Introduction:** Natural sterols and stanolols in plant cell membranes are known as phytosterols. In recent years, interest in the use of phytosterols in dietary compounds to reduce cholesterol has increased. Diet provides a daily amount of phytoestrol 500-180 mg, which is not enough to lower blood cholesterol. The main mechanism of action of phytosterol in reducing cholesterol is interfering with the dissolution of cholesterol in the intestinal micelles which leads to a decrease in cholesterol absorption. These compounds also reduce the risk of gastric cancer, prevent tumor growth, improve inflammatory diseases, and prevent atherosclerosis. Taking two to three grams of phytosterol per day can lead to approximately a 10% decrease in blood cholesterol levels and a 15% decrease in low density lipoproteins. Phytosterol is a white, water-insoluble, high-melting powder that is difficult to dissolve in fats and oils, which makes it difficult to add phytosterol to foods.

Phospholipids are cell membrane constituents with a hydrophilic end and one or more hydrophobic tails; they also have antioxidant activity. These compounds are used to make carriers called nanoliposomes that have in recent years been an important carrier in the pharmaceutical and food industries for the coating and release of hydrophilic or lipophilic active compounds such as vitamin A, Vitamin E and vitamin C, ascorbic acid, micronutrients, omega-3 essential fatty acids, medium chain fatty acids - vitamin C, cinnamon oil, polyphenols including catechin, curcumin and other active ingredients. Nanoliposomes are colloidal structures formed from one or more spheres consisting of two lipid layers that surround the aquatic environment. This structure of liposomes provides special properties, such as spontaneous sealing in the aqueous medium, which makes them suitable carriers for active compounds in the field of medicine, immunology, diagnosis, substances Manufactures cosmetics, cleaning and food industries. Nanoliposomes provide greater surface area than liposomes, and improve bioavailability and targeted targeting of embedded materials. In the design of nanoliposomes used in the food industry, two important parameters must be taken into account; the first parameter, the stability of nanoliposomes, in order to increase the shelf life and storage of the food and the second parameter, the composition of their structure should not be compromised. Make a difference in the texture and taste of the food.

Reducing the size of liposomes to nanosize can reduce their stability. For this reason, the addition of stabilizers can extend the life and stability of these nanocarriers.

Adding Cholesterol to Phospholipids Increases Stability of Nanoliposomes by reducing lipid membrane permeability and membrane stiffness. Nanoliposomes have shown good potential to encapsulate and stabilize molecules against a wide range of environmental conditions and to protect them from degradation.

The main purpose of this study was to incorporate phytosterol into nanoliposomal formulations in order to improve its dispersion in aqueous and aqueous media, to select the optimal formulation from soybean-cholesterol formulation. Different concentrations of cholesterol were used as stabilizers. Mean particle volume diameter, dispersion index, zeta potential, physical stability and pH were

studied as important parameters. The use of edible grade compounds in the preparation of nanoliposomes and the overlay of the beneficial phytoestrol compound is the most important advantage of this study over other studies. According to studies done, no research into the intrinsic phytosterol content of edible materials was found. In this study, ultrasonic homogenizer was used to reduce particle size and more efficient loading of phytosterol into nanoliposomes.

**Material and methods:** In this study,  $\beta$ -sitosterol containing nanoliposomes were prepared from different concentrations of soy-lecithin and cholesterol by thin layer hydration method. The ultrasonic homogenizer was used to reduce the particle size. Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR) was performed to investigate the possible interaction between beta-cytosterol and the prepared nanoliposomal carriers. Particle size, polydispersity index and zeta potential of nanoliposomes were analyzed according to cholesterol content of samples. Also, pH and stability of nanoliposomes in different temperatures were analyzed according to cholesterol content.

**Results and discussion:** The results demonstrated that the interaction between  $\beta$ -sitosterol and nanoliposomes is a hydrogen bond type. The tension created in the area of the OH bond stretch proved to be a hydrogen bond between lecithin, cholesterol and  $\beta$ -sitosterol. The mean particle diameter, polydispersity index, zeta potential, physical stability and pH of the nanoliposomes were investigated. The size of nanoliposomes can vary depending on the physical conditions such as temperature, chemical conditions such as pH as well as the type of phospholipid, the type of carrier and the type of stabilizer. The mean particle diameter was between 90 and 100 nm. Although the addition of cholesterol to the samples slightly increased the mean particle diameter of nanoliposomes ( $P < 0.05$ ), it reduced the zeta potential ( $P < 0.05$ ) and increased the stability of the samples at different temperatures. Cholesterol addition, although it has led to an increase in the particle size and dispersion index of nanoliposomes, these effects are negligible. Increasing the cholesterol level decreased the pH in the range of 6.88 to 6.51; the proximity of pH to neutral range in these samples is an advantage. The pH of the samples was close to the neutral range, which proves that the use of these nanoliposomes does not affect the pH of the food stuffs. Statistical analysis of physical stability test showed that samples with higher cholesterol percentage showed longer stability at different temperatures.

**Conclusion:** The use of thin layer hydration and ultrasonic homogenizer resulted in the formation of particles with an average volume diameter of about 100 nm and lower which, however, increased cholesterol and had a mild and slight effect on increasing particle size and distribution; In the prepared samples, it reduced the zeta potential and consequently increased the stability of the samples. It is also a measure of the stability of the specimens at different temperatures predicted for optimal storage and use. The best results for a sample containing 0.06 g cholesterol were obtained. Although the size of the particle was slightly larger than other samples, zeta potential, physical stability and pH were more favorable than other ones.

**Keywords:**  $\beta$ -sitosterol, Nanoliposomes, Particle size, Stability