نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی/ جلد ۲۷ شماره ۲/ سال ۱۳۹۶/ صفحات ۱۰۳ تا ۱۱۹

بررسی کارایی روش یک مرحله‌ای و امواج فراصوت در تولید نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین C

سمانه امیری[۱]، محمود رضازاد باری[۲]* و محمد علیزاده خالد آباد[۲]

تاریخ دریافت: ۹٤/۱۰/۲۲ تاریخ پذیرش: ۹۵/۱۱/۲

[۱] دانش آموخته کارشناسی ارشد مهندسی علوم و صنایع غذایی، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

[۲] دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه ارومیه

*مسئول مکاتبه: Email: m.rezazadehbari@urmia.ac.ir

چکیده

امروزه استفاده از نانولیپوزوم‌ها کاربرد گسترده‌ای در تمام صنایع از جمله داروسازی و مواد غذایی دارد. هنگامی‌که به فسفولیپیدها در محلول آبی انرژی مناسبی وارد می‌شود، نانولیپوزوم‌ها تشکیل می‌شوند. در این پژوهش از روش تک مرحله‌ای توأم با امواج فراصوت برای تولید لیپوزوم‌ها استفاده گردید و شاخص‌های کیفی مانند اندازه ذرات، کارایی درون‌پوشانی و پایداری اندازه‌گیری شدند. از طرح آزمایشی ترکیبی برای مطالعه تأثیر نسبت غلظت‌های مختلف فسفولیپید، کلسترول و فیتواسترول پودری (به ترتیب در نسبت‌های ۵۰ تا ۱۰۰ درصد، صفر تا ۵۰ درصد و صفر تا ۵۰ درصد) و زمان‌های مختلف اعمال امواج فراصوت (۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ٤۰ دقیقه) برای بررسی ویژگی‌های عملکردی فرمولاسیون جدید نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین C استفاده گردید. زمان فراصوت بالاتر موجب کم‌ترین میزان انحراف معیار در اندازه ذرات و افزایش درصد کارایی درون‌پوشانی شد. بطورکلی، پایداری با افزایش زمان اعمال امواج فراصوت افزایش یافت (در زمان‌های ۳۵ و ٤۰ دقیقه بیشترین پایداری دیده شد)، ولی در این مورد اثر نسبت‌های مختلف فسفولیپید، کلسترول و فیتواسترول، متفاوت بود. بطور کلی نتایج نشان داد اگرچه روش تک مرحله‌ای توأم با امواج فراصوت با توان پایین جهت ایجاد ویژگی‌های ایده‌آل در نانولیپوزوم‌ها کارآمد نبود ولی جایگزینی کلسترول با فیتواسترول و استفاده از فسفولیپیدهای شیر و حلال خوراکی از قابلیت بالایی برای تولید نانولیپوزوم‌ها برخوردار می‌باشد.

واژگان کلیدی: نانولیپوزوم، روش یک مرحله‌ای، امواج فراصوت با توان پایین، حلال خوراکی، ویتامین C

مقدمه

مواد غذا – دارو[۱] به اجزایی از ماده غذایی گفته می‌شود که علاوه بر داشتن خواص تغذیه‌ای، دارای فعالیت بیولوژیکی ارزشمند و سلامت‌بخش هستند و باعث پیشگیری و یا درمان بیماری‌ها می‌شوند که از آن جمله می‌توان به ویتامین‌ها اشاره کرد (محمدی و همکاران، ۱۳۹۲؛ محمدحسنی و همکاران ۱۳۹۳). آسکوربیک اسید یک ماده مغذی ضروری است که بعنوان افزودنی غذایی، عمدتاً به دلیل ویژگی‌های احیاء کنندگی و آنتی اکسیدانی آن مورد استفاده قرار می‌گیرد (واچترزباخ و همکاران، ۲۰۱۲). ویتامین C آسیب ناشی از

[1] Nutraceutical

رادیکال‌های آزاد را بر روی پوست کاهش داده، پیری را به تأخیر انداخته و تشکیل ملانین را کاهش می‌دهد (یانگ و همکاران، ۲۰۱۳). اما این ویتامین در مقابل هوا، رطوبت، نور، گرما، یون‌های فلزی، اکسیژن و بازها ناپایدار بوده و به سادگی درون ترکیبات غیرفعال بیولوژیکی مانند اگزالیک اسید تخریب می‌شود (یانگ و همکاران، ۲۰۰۳).

درون‌پوشانی عبارت از تکنولوژی به دام انداختن مواد زیست فعال در کپسول‌هایی است که محتویات خود را به صورت کنترل‌شده آزاد می‌کنند و هم‌چنین موجب افزایش پایداری مواد درون‌پوشانی شده با حفظ آن‌ها از تغییرات دمایی، محیطی، آنزیمی و شیمیایی می‌شوند (مظفری و همکاران، ۲۰۰۸؛ حق جو و همکاران، ۱۳۹٤). لیپوزوم‌ها یکی از انواع حامل‌هایی هستند که امروزه به طور گسترده جهت درون‌پوشانی مورد استفاده قرار می‌گیرند. این حامل‌های لیپیدی به دلیل دارا بودن خاصیت آمفی‌فیلیک توانایی به دام انداختن طیف وسیعی از ترکیبات زیست فعال و غذا-داروی آب‌دوست، چربی-دوست و آمفی‌فیل را دارند (قره‌نقده و همکاران، ۱۳۹٦؛ حق جو و همکاران ۱۳۹٤). کلمه لیپوزوم از دو کلمهٔ یونانی Lipos (چربی) و Soma (بدن یا ساختار) تشکیل شده است (مظفری و همکاران، ۲۰۰٦). لیپوزوم‌ها وزیکول‌های میکروسکوپی دارای دو لایهٔ فسفولیپیدی هستند که یک فضای آبی را دربرگرفته‌اند. خاصیت آمفی‌فیلیک فسفولیپیدها باعث تشکیل این ذرات کروی توخالی در محیط آبی می‌شود (پاتل و همکاران، ۲۰۱۲). ضخامت این لیپید دو لایه معمولاً بین ۳ تا ٦ نانومتر بوده و لیپوزوم‌های تشکیل شده، می‌تواند قطری بین ۵۰ نانومتر تا ۵۰ میکرومتر داشته باشد (تایلور و همکاران، ۲۰۰۵؛ دوآ و همکاران، ۲۰۱۲). مکانیسم تشکیل لیپوزوم بر اساس برهم‌کنش‌های آب‌دوستی و آب‌گریزی است که بین فسفولیپیدها و مولکول‌های آب ایجاد می‌شود. هنگامی‌که به فسفولیپیدها انرژی وارد می‌شود فسفولیپیدها بصورت منظم تجمع یافته و انتهای قطبی فسفولیپید به طرف فاز آبی (بیرون و درون) و انتهای غیرقطبی روبروی هم‌دیگر در یک ردیف قرار می‌گیرند ویزیکول‌های بسته (لیپوزوم) تولید می‌شود. در حین این فرآیند مقداری از محیط آبی درون لیپوزوم به دام می‌افتد (داسیلوا و همکاران، ۲۰۱۰). نانولیپوزوم‌ها دارای ویژگی‌های فیزیکی، ساختاری و ترمودینامیک یکسانی با لیپوزوم‌ها هستند ولی نانولیپوزوم‌ها در مقایسه با لیپوزوم‌ها، به علت اندازه ذرات کوچک‌تر، ناحیه سطحی بیش‌تری را فراهم نموده و از این‌رو حلالیت، بهبود قابلیت دسترسی زیستی و رهایش کنترل شده را افزایش می‌دهند (حق جو و همکاران، ۱۳۹٤؛ گویال، ۲۰۰۵؛ ریچاردسون و همکاران، ۲۰۰۷). توانایی کنترل رهاسازی داروها و سایر مولکول‌ها از لیپوزوم‌ها با استفاده از اثرات غیرحرارتی فراصوت با فرکانس پایین قبلاً مطالعه شده و نشان داده شده است که فراصوت با شدت پایین با وجود راحت‌تر کردن رهاسازی دارو اثری بر صحت شیمیایی دارو یا پتانسیل بیولوژیکی آن ندارد (شرودر و همکاران، ۲۰۰۹).

در پژوهشی محمدی و همکاران در سال ۱۳۹۲، نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین D_3 را با غلظت‌های متفاوت لسیتین-کلسترول و روش هیدراسیون لایهٔ نازک و فراصوت تولید کردند. نتایج آن‌ها نشان داد اندازهٔ ذرات و توزیع اندازهٔ ذرات به ترتیب در محدودهٔ ۸۹-۷۸ نانومتر و ۰/۷۷-۰/۸٤ بوده و در همه فرمولاسیون‌ها درصد درون‌پوشانی ویتامین D_3 ٪۹۹ بود. ایشان به طورموفقیت آمیز نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین D_3 را با روش هیدراسیون لایهٔ نازک-سونیکاسیون تولید کرده و ویژگی‌های آن را مورد مطالعه قرار دادند.

در پژوهشی دیگر محمد حسنی و همکاران در سال ۱۳۹۳، سیستم نانولیپوزومی حاوی آنتی-اکسیدان گامااوریزانول را با روش حرارتی اصلاح شده و با استفاده از لسیتین تولید نمودند. تایج این

تحقیق نشان داد اندازه گیری ذرات، متوسط قطر حجمی و توزیع اندازه ذرات (اسپن) به ترتیب در محدوده ۹۰-۱۱۰ نانومتر و ۰/۶۹ -۰/۹۰ بود. همچنین نتیجه گرفتند نمونه‌ها در طی مدت زمان نگهداری در دمای ٤ °C پایدار بوده و افزایش غلظت لسیتین موجب افزایش کدورت سیستم شد.

در مطالعه‌ای که بشیری و همکاران در سال ۱۳۹٤ انجام دادند، سیستم‌های لیپوزومی حامل بتاکاروتن را با روش اصلاح‌شده حرارتی، تهیه کرده و از گاماوریزانول به عنوان یک فیتواسترول، جهت افزایش پایداری ساختار لیپوزوم‌ها استفاده نمودند. نتایج آن‌ها نشان داد در نسبت‌های مختلف لستین به بتاکاروتن، اندازه ذرات درمحدوده ٦٤ نانومتر بدست آمد و در طول ۳۰ روز زمان نگهداری، اندازه ذرات در زیر ۵۰۰ نانومتر باقی ماندند. هم‌چنین در غلظت‌های بالای لستین، درصد درون‌پوشانی بتاکاروتن ۷۷/۲۵ ٪ بود که در طول مدت زمان ۳۰ روز نگهداری به ٦۹/۸۳ ٪ کاهش یافت. ایشان نتیجه گرفتند استفاده از گاماوریزانول در لیپوزوم‌های حاوی بتاکاروتن، موجب افزایش پایداری اندازه ذرات و درصد درون‌پوشانی بتاکاروتن در طول زمان نگهداری گردید.

کلسترول یکی مولکول زیستی و از دسته چربی‌ها (لیپیدها) است که ساختاری چند حلقه‌ای دارد. نقش عمده کلسترول استحکام و انعطاف بخشی به غشاء سلول‌ها است (کایربی و همکاران، ۱۹۸۰). کلسترول عمدتاً برای بهبود ویژگی‌های لایه لایه شدن لیپوزوم‌ها مورد استفاده قرار می‌گیرد. این ماده سیالیت غشایی و پایداری لایه‌ها را بهبود بخشیده و هم‌چنین نفوذپذیری مولکول‌های محلول در آب را از طریق غشاها کاهش می‌دهد (لائوینی و همکاران، ۲۰۱۲؛ سواکووسکی و همکاران، ۲۰۰۵). استرول‌ها و استانول‌های بوجود آمده در گیاهان را با نام فیتواسترول می‌شناسند (بلیتز و همکاران، ۱۹۹۹). فیتواسترول‌ها از نظر تغذیه‌ای و فیزیولوژیکی اهمیت زیادی دارند زیرا فیتواسترول‌ها با قرار گرفتن در گویچه‌های چربی موجود در حفرات روده، از جذب کلسترول‌های صفراوی در روده کوچک جلوگیری می‌نمایند، در نتیجه غلظت کلسترول و LDL را در پلاسمای خون کاهش می‌دهند (قوئیلز و همکاران، ۲۰۰۳؛ بلیتز و همکاران، ۱۹۹۹). در سال‌های اخیر به دلیل مشکلات تغذیه‌ای ناشی از مصرف کلسترول، از فیتواسترول‌ها به عنوان جایگزین استفاده می‌گردد (بشیری و همکاران، ۱۳۹٤).

هدف این پژوهش، تولید نانولیپوزوم های پایدار حاوی ویتامین C با استفاده از روش یک مرحله‌ای وامواج فراصوت با توان پایین، همچنین مقایسه استفاده از فیتواسترول‌ها و کلسترول و استفاده از حلال خوراکی در فرمولاسیون لیپوزومی، جهت کاربرد در بهبود پایداری اکسیداتیو و تولید مواد غذایی فراسودمند بوده و به بررسی ویژگی‌های نانولیپوزوم و کارایی درون-پوشانی و هم‌چنین پایداری آن‌ها پرداخته شده است.

مواد و روش‌ها

مواد

فسفولیپید شیر و کمپسترول[2](با درجه خلوص ۹۹٪ ، شرکت Serva-Feinbiochemica آلمان)، کلسترول[3] و ویتامین C (با درجه خلوص ۹۹٪ ، شرکت Sigma-Aldrich آمریکا)، آب مقطر دوبار تقطیر (شرکت زلال تهران) و هم‌چنین اتانول (با درجه خلوص ۹٦ ٪، صنایع شیمیایی غدیر) به عنوان حلال خوراکی مورد استفاده قرار گرفت.

روش‌ها

روش‌های تولید نانولیپوزوم حاوی ویتامین C

در این تحقیق از روش یک مرحله‌ای فاتوروس و همکاران (۲۰۰۱) و الکساندر و همکاران (۲۰۱۲) با کمی تغییرات استفاده شد. روش یک مرحله‌ای فاقد تولید فیلم لیپیدی در اثر تبخیر حلال بوده و به منظور استفاده در

[2] Campesterol
[3] Cholesterol (3-beta-hydroxy5-cholestene)

ماتریکس‌های غذایی بدلیل عدم وجود باقی مانده حلال آلی توصیه می‌شود.

ابتدا فسفولیپید، کلسترول و فیتواسترول پودری مطابق طرح آماری به ترتیب در نسبت‌های ۵۰ تا ۱۰۰ درصد، – صفر تا ۵۰ درصد و صفر تا ۵۰ درصد با استفاده از ترازوی آزمایشگاهی با دقت ۰/۰۰۰۱ توزین و در ظرفی حاوی مقدار مساوی از آب مقطر و حلال خوراکی حل شدند. سپس سوسپانسیون به منظور تشکیل لیپوزوم-های چند لایه‌ای بر روی هم‌زن مغناطیسی با دور rpm ۶۰۰ به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. پس از آن جهت تبخیر حلال سوسپانسیون درون بن ماری با دمای °C ۷۵ قرارداده شد. بعد از تبخیر اتانول، محلول ۱۰ میلی-لیتر بر میلی‌گرم ویتامین C تهیه شد و به سوسپانسیون اضافه گردید. در نهایت سوسپانسیون جهت کاهش اندازه ذرات لیپوزوم‌ها و به دام انداختن محلول ویتامین C درون نانولیپوزوم‌های تولید شده در زمان‌های مختلف (۲۰، ۲۵، ۳۰، ۳۵، ۴۰ دقیقه) تحت امواج فراصوت (Soniprep 150، شرکت MSE انگلستان، Ultrasonic frequency 23 kHz; Maximum power 150 W; Amplitude 12 µm, Probe 9.5mm) قرار گرفت. جهت جلوگیری از افزایش دمای دستگاه فراصوت و سوسپانسیون دستگاه در فواصل زمانی ۵ دقیقه و به مدت ۱ دقیقه روشن می‌شد. پس از اتمام زمان اعمال امواج فراصوت نمونه‌های همگن برای ته-نشین ساختن ذرات تیتانیوم جدا شده از پروب دستگاه فراصوت و لیپوزوم‌های چند لایه‌ای و بزرگ و هم‌چنین مواد به دام نیفتاده درون سانتریفیوژ با دور rpm ۷۰۰۰ به مدت ۱۰ دقیقه گذاشته شد (فرهنگ و همکاران، ۲۰۱۲). در انتها نمونه‌ها به منظور انجام آزمایشات مربوطه درون یخچال با دمای °C ٤ نگهداری شدند.

تعیین اندازه و توزیع اندازه ذرات

قطر متوسط ذرات به وسیله دستگاه تعیین اندازه ذرات (Partical Sizer Analyazer مدل SALD – 2101) بر اساس روش پراکندگی نور لیزر در دمای محیط (°C ۲۵) با استفاده از روش پراکندگی نور پویا (DLS)[4] اندازه‌گیری شد. دستگاه مورد نظر مجهز به تفرق نور لیزر بود که بر این اساس توزیع اندازه ذرات با اندازه‌گیری تغییرات زاویه‌ای در شدت نور پخش شده پس از عبور از یک نمونه ذره پراکنده مشخص می‌شود. توزیع اندازه ذرات نیز با استفاده از معادله زیر محاسبه شد (محمدی و همکاران، ۱۳۹۲):

معادله (۱)

$$\text{Span} = \frac{D\,(90\%) - D\,(10\%)}{D\,(50\%)}$$

D (۹۰٪): قطری که حجم ذرات کوچک‌تر از آن، ٪ ۹۰ حجم کل ذرات موجود در سیستم را تشکیل می‌دهد.

D (۵۰٪): قطری که حجم ذرات کوچک‌تر از آن، ٪ ۵۰ حجم کل ذرات موجود در سیستم را تشکیل می‌دهد (قطر میانه).

D (۱۰٪): قطری که حجم ذرات کوچک‌تر از آن، ۱۰ ٪حجم کل ذرات موجود در سیستم را تشکیل می‌دهد.

میانگین قطر حجمی (میانگین حجم معادل) نانولیپوزوم-ها بر اساس فرمول زیر محاسبه شد (محمدی و همکاران، ۱۳۹۲):

معادله (۲)

$$\text{میانگین قطر حجمی} = \frac{\text{مجموع تعداد ذرات}}{\text{قطر میانگین ذرات}}$$

تعیین کارایی درون‌پوشانی نانولیپوزوم

کارایی درون‌پوشانی بر اساس روش تیتراسیون اندازه‌گیری شد. ابتدا نمونه‌های تولید شده که دارای رقت ۱۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر بودند به رقت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر رسانده شدند. سپس ۲ میلی‌لیتر نمونه و ۵ میلی‌لیتر از محلول متافسفریک اسید در ارلن به حجم

[4] Dynamic light scattering

۵۰ میلی‌لیتری ریخته و توسط محلول ایندوفنول تا ظهور رنگ صورتی تیتر گردیدند (الکساندر و همکاران، ۲۰۱۲؛ AOAC Official Method 967.21). درادامه با استفاده از معادلهٔ کارایی درون‌پوشانی (محمدی و همکاران، ۱۳۹۲)، درصد ویتامین C درون‌پوشانی شده به دست آمد:

معادله (۳)

$$\text{کارایی درون پوشانی} = \frac{\text{مقدار ویتامین درون پوشانی شده}}{\text{مقدار کل ویتامین اضافه شده}} \times 100$$

تعیین پایداری درون‌پوشانی نانولیپوزوم

اندازه‌گیری پایداری نمونه‌ها بر اساس روش یانگ و همکاران (۲۰۰۳) انجام گرفت. به این صورت که نمونه‌ها به مدت ۲۰ روز در انکوباتور با دمای ۴۲ °C قرار داده شدند و با فواصل زمانی ۱۰ روز یکبار جهت انجام آزمایش پایداری ویتامین C ارزیابی شدند. به این ترتیب که نمونه‌ها به رقت ۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر رسانده شده و ۲ میلی‌لیتر از نمونه و ۵ میلی‌لیتر متافسفریک اسید را در ارلن ۵۰ میلی‌لیتری ریخته و توسط ایندوفنول تا ظهور رنگ صورتی تیتر گردید (یانگ و همکاران، ۲۰۰۳).

طرح و تحلیل آماری

در این مطالعه از طرح ترکیبی برای مطالعه سه فاکتور فرمولاسیون (فسفولیپید شیر، کلسترول و فیتواسترول) و یک فاکتور فرآوری (زمان فراصوت) شامل ۲۳ نمونه به همراه ۵ نقطه مرکزی استفاده گردید. مطالعه از نوع تحلیلی بود بنابراین پس از گردآوری داده‌ها، آنالیز رگرسیون معنی‌دار بودن فاکتورها و بر هم‌کنش‌های آن‌ها با استفاده از توزیع فیشر در سطح $\alpha \leq ۰/۰۵$ مورد ارزیابی قرار گرفت. آنالیز آماری و رسم نمودارها با نرم افزار Design-Expert نسخه ۷ انجام شد.

نتایج و بحث

در روش مورد استفاده در این تحقیق (روش یک مرحله‌ای همراه با امواج فراصوت با توان پایین و اتانول به عنوان حلال خوراکی) نتایج زیر حاصل شد.

در تمامی شکل‌ها: Phl نشان دهنده فسفولیپید، Chl نشان دهنده کلسترول و Phyt نشان دهنده فیتواسترول می‌باشد.

اندازه و توزیع اندازه ذرات

میانگین قطر ذرات در محدوده ۱۴۷-۳۹۴۲ نانومتر قرار داشت. شایان ذکر است فاکتورهای مورد مطالعه در میانگین اندازه ذرات نانولیپوزوم‌ها تأثیر معنی‌دار نداشت ($p>۰/۰۵$). شکل ۱ (الف) تأثیر نسبت فسفولیپید، کلسترول و فیتواسترول را در میانگین قطر ذرات نانولیپوزوم‌ها نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود فیتواسترول اثر افزایشی و کلسترول اثر افزایشی ولی ناچیز بر میانگین اندازه ذرات داشته است. با افزایش میزان فسفولیپید و کاهش میزان کلسترول و فیتواسترول میانگین قطر کاهش یافته که برخلاف نتایج بدست آمده توسط الکساندر و همکاران (۲۰۱۲) است. در نتیجه می‌توان گفت که با افزایش مقادیر کلسترول و فیتواسترول اندازه ذرات نیز افزایش می‌یابد ولی اثر افزایش فیتواسترول نسبت به کلسترول بیشتر است. بر اساس تحقیق انجام گرفته توسط الکساندر و همکاران (۲۰۱۲) افزودن استرول گیاهی به ویزیکول‌های فسفولیپیدی میانگین قطر را افزایش داده است (الکساندر و همکاران، ۲۰۱۲). همچنین لیپوزوم‌های تهیه شده با اتانول و حرارت و یا فقط حرارت (فاقد اتانول) میانگین قطر بیشتری داشتند و بزرگترین اندازه‌ها مربوط به استرول های گیاهی محلول در چربی بود که در تولید آن‌ها از روش اتانول و حرارت استفاده شده بود (الکساندر و همکاران، ۲۰۱۲).

انحراف معیار اندازه ذرات در محدوده ۰/۱۱۷ – ۰/۳۳۱ بود. آنالیز واریانس نتایج نشان داد اثر متقابل فسفولیپید و فیتواسترول، کلسترول و فیتواسترول، هم-

چنین فیتواسترول و مدت زمان اعمال امواج فراصوت تأثیر معنی‌داری بر انحراف معیار اندازه ذرات نانولیپوزوم‌ها داشت ($p\leq۰/۰۵$). شکل ۱ (ب) نشان دهنده تأثیر تغییر نسبت غلظت فسفولیپید به فیتواسترول و زمان اعمال امواج فراصوت و هم‌چنین شکل ۱ (ج) تأثیر نسبت غلظت فسفولیپید، کلسترول و فیتواسترول بر انحراف معیار اندازه ذرات است. همان‌طور که مشاهده می‌شود با افزایش نسبت فسفولیپید، انحراف معیار ذرات تولید شده افزایش می‌یابد و هم‌چنین با افزایش زمان اعمال امواج فراصوت، انحراف میار نمونه‌ها کاهش یافته است. در نانولیپوزوم‌هایی که نسبت فسفولیپید به فیتواسترول پایین است (مقدار زیاد فیتواسترول) و زمان اعمال امواج فراصوت بالاتر از ۳۰ دقیقه است، کم‌ترین میزان انحراف معیار بدست آمده است.

توزیع اندازه ذرات یکی از عوامل مهم در پایداری فیزیکی نانوحامل‌ها می‌باشد، بطوری‌که محدوده ۰/۱-۰/۲۵ توزیع اندازه ذرات بسیار باریک را نشان می‌دهد ولی محدوده اندازه ذرات بالاتر از ۰/۵ نشان دهنده پهن بودن توزیع اندازه ذرات است (قره نقده و هکاران، ۱۳۹٦). توزیع اندازه ذرات (اسپن)[5]در محدوده ۰/٦٦٦ – ٤١٣٤ بود که نتایج آنالیز واریانس نشان داد اثر متقابل کلسترول و فیتواسترول بر توزیع اندازه ذرات از نظر آماری اثر معنی‌دار داشت. شکل ۱ (د) تأثیر نسبت غلظت سه فاکتور فرمولاسیون یعنی فسفولیپید، کلسترول و فیتواسترول بر توزیع اندازه ذرات نانولیپوزوم‌های تولید شده را نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود با افزایش مقدار فیتواسترول و کلسترول توزیع اندازه ذرات نیز افزایش می‌یابد که مطلوب نیست، ولی در مقادیر متوسط از هر سه فاکتور میزان توزیع اندازه ذرات کاهش یافت. هرچقدر اسپن کم‌تر باشد، نشان دهندهٔ توزیع اندازهٔ ذرات باریک‌تر و سیستم کلوئیدی همگن‌تر خواهد بود. از این‌رو نانولیپوزوم‌های با توزیع اندازه ذرات باریک یعنی کم‌تر از ۰/٤ پایدارتر خواهند بود (محمدی و همکاران، ۱۳۹۲). با توجه به نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت که روش تولید مورد استفاده (روش یک مرحله‌ای- امواج فراصوت با توان پایین)، مستقل از غلظت‌های متفاوت فسفولیپید، کلسترول و فیتواسترول برای تولید لیپوزوم‌های پایدار در اندازه‌های نانومتری و توزیع اندازه ذرات یکنواخت، مناسب نیست که با نتایج محمدی و همکاران (۱۳۹۲) در که از روش هیدراسیون لایه نازک- فراصوت جهت تولید نانولیپوزوم‌ها استفاده کرده بودند، مطابقت ندارد.

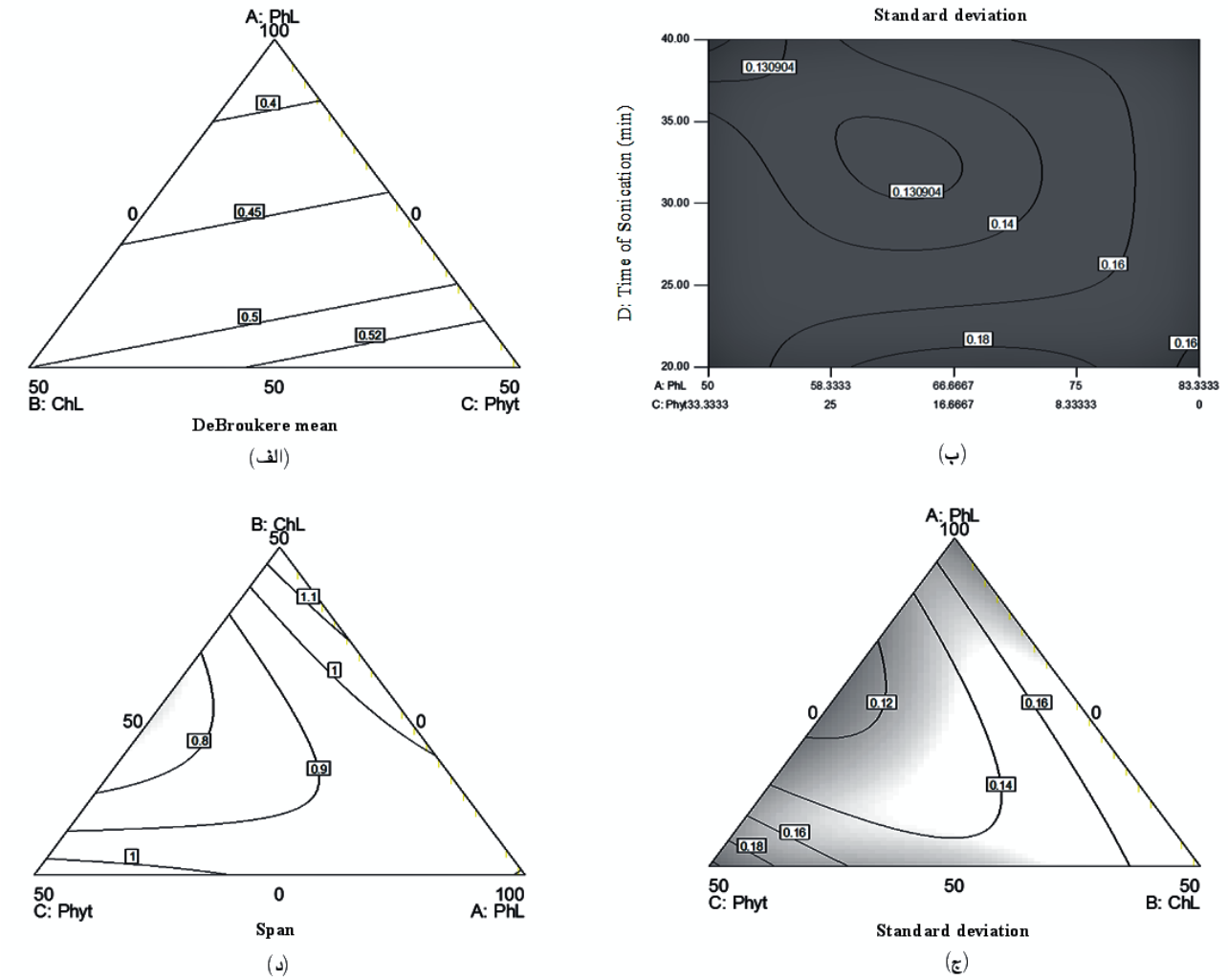
در مورد اثر کلسترول بر اندازهٔ لیپوزوم‌ها نتایج مختلف و متضادی گزارش شده است، برای مثال گزارش شده افزودن کلسترول منجر به سختی دیواره لیپوزومی و در نتیجه افزایش انداز ه ذرات شد ولی طی گزارشی دیگر استفاده از کلسترول در ساختار لسیتین منجر به کاهش اندازه ذرات از ۷۲ نانومتر به ٦۳ نانومتر گردید. به طور کلی می‌توان گفت که تأثیر کلسترول بر روی اندازهٔ ذرات به روش تولید و نوع فسفولیپید مورد استفاده بستگی دارد (محمدی و همکاران، ۱۳۹۲).

گزارش‌های مختلف و متضادی در مورد اثر استرول‌ها بر اندازهٔ ذرات لیپوزوم‌ها منتشر شده است ولی به نظر می‌رسد که تأثیر استرول‌ها بر اندازه ذرات لیپوزوم به روش تهیه لیپوزوم بستگی دارد (حق جو و همکاران، ۱۳۹٤).

گزارش‌های مختلف و متضادی در مورد اثر کلسترول بر اندازهٔ لیپوزوم‌ها ارائه شده است. در پژوهش انجام شده توسط تسنگ و همکاران (۲۰۰۷) افزودن کلسترول باعث سفتی ساختار لیپوزوم‌ها و افزایش اندازه ذرات شد. طی تحقیق دیگر صورت گرفته توسط ویریاروج و همکاران (۲۰۰۹) مشاهده شد که استفاده از کلسترول در ساختار لسیتین منجر به کاهش اندازه ذرات از ۷۲ نانومتر به ۶۳ نانومتر شد. به نظر می‌رسد که تأثیر

[5] Span

کلسترول بر روی اندازهٔ ذرات بستگی به روش تولید و نوع فسفولیپید مورد استفاده دارد.



شکل ۱- اندازه و توزیع اندازه ذرات نانولیپوزوم‌ها، (الف) تأثیر نسبت غلظت فسفولیپید، کلسترول و فیتواسترول در میانگین قطر ذرات، (ب) تأثیر نسبت غلظت فسفولیپید به فیتواسترول و زمان اعمال امواج فراصوت و (ج) تأثیر نسبت غلظت فسفولیپید، کلسترول و فیتواسترول بر انحراف معیار اندازه ذرات، (د) تأثیر نسبت غلظت فسفولیپید، کلسترول و فیتواسترول بر توزیع اندازه ذرات

کارایی درون پوشانی نانولیپوزوم

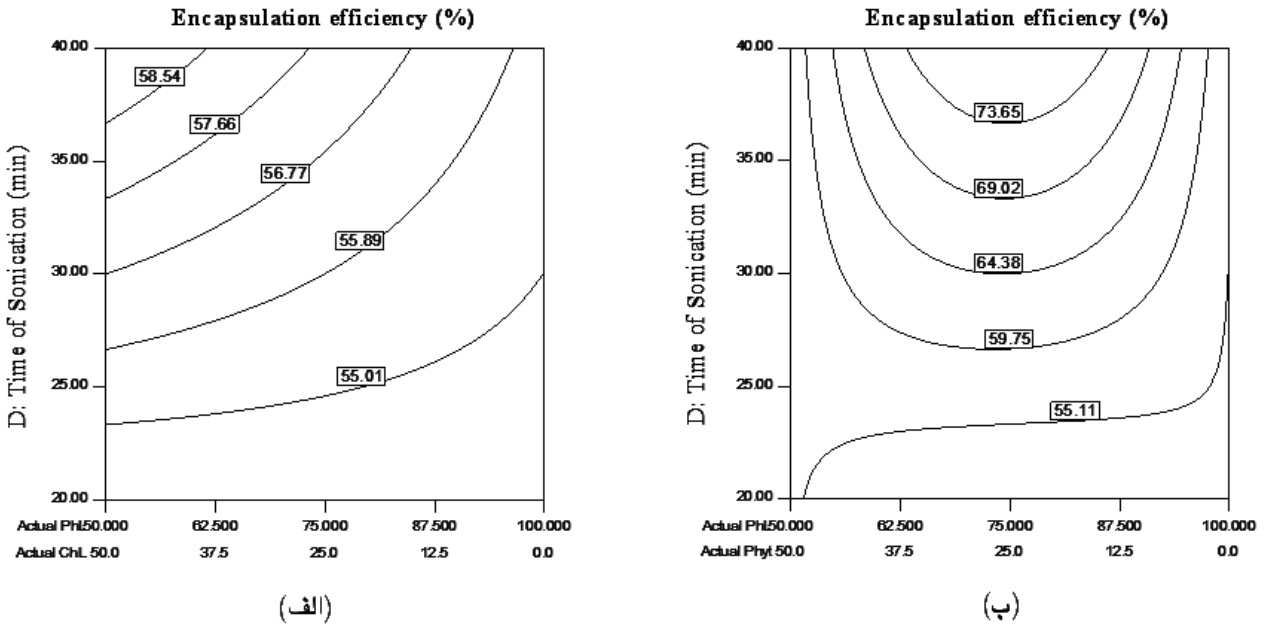
ویتامین C به دلیل آب دوست بودن، توسط پیوندهای هیدروژنی به بخش‌های قطبی مولکول‌های فسفولیپید اتصال می‌یابد (حق جو و همکاران، ۱۳۹٤). کارایی درون‌پوشانی ویتامین C در محدوده ٥٥/٣٤-٦٦/٢٢ درصد بود که اثر متقابل غلظت فسفولیپید و فیتواسترول و هم‌چنین مدت زمان اعمال امواج فراصوت بر غلظت فسفولیپید و فیتواسترول باهم از نظر آماری معنی‌دار ولی اثر متقابل مدت زمان اعمال امواج فراصوت بر غلظت فسفولیپید و غلظت فیتواسترول، از نظر آماری غیر معنی‌دار بود. در شکل ۲ (الف) تأثیر نسبت فسفولیپید به کلسترول در زمان‌های مختلف اعمال امواج فراصوت و هم‌چنین شکل ۲ (ب) تأثیر نسبت غلظت نسبت‌های متفاوت فسفولیپید به فیتواسترول در تغییرات زمان اعمال امواج فراصوت بر درصد کارایی درون‌پوشانی ویتامین C نشان داده شده است. در این شکل با افزایش زمان اعمال امواج فراصوت و کاهش نسبت فسفولیپید به کلسترول

(افزایش کلسترول) درصد کارایی درون‌پوشانی افزایش می‌یابد. در بازهٔ زمانی ۳۵ تا ٤۰ دقیقه و با افزایش کلسترول، بیش‌ترین درصد درون‌پوشانی (٦٦/۲۲ ٪) به دست آمد.

در تحقیق انجام شده توسط الکساندر و همکاران (۲۰۱۲) که اثر افزایش مقدار فسفولیپید سویا را بر درصد کارآمدی به دام انداختن نانولیپوزوم‌های حاوی اسید آسکوربیک تولیدی با فسفاتیدیل کولین سویا – فیتواسترول مورد مطالعه قرار دادند، گزارش شده که افزایش مقدار فسفولیپید سویا از ۱۰۰ به ۱۵۰ و سپس ۲۵۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر موجب افزایش درصد کارایی درون‌پوشانی آسکوربیک اسید به ترتیب ۱۵/۸، ۲۱/۵ و ۳۲/۷ درصد شده است.

در شکل ۲ (ب) تأثیر نسبت فسفولیپید به فیتواسترول در زمان‌های مختلف اعمال امواج فراصوت بر درصد کارایی درون‌پوشانی ویتامین C آمده است. در این شکل با افزایش زمان اعمال امواج فراصوت و با دور شدن از نسبت ۷۵ به ۲۵ فسفولیپید به فیتواسترول از میزان درصد کارایی درون‌پوشانی کاسته شد. در زمان بالاتر از ۳۵ دقیقه و در نسبت ۷۵ به ۲۵ فسفولیپید به فیتواسترول بیشینه درصد کارآمدی به دام انداختن بدست آمده است. آنالیز داده‌ها نشان داد که اثر فسفولیپید به فیتواسترول و هم‌چنین زمان اعمال امواج فراصوت بر درصد کارایی درون‌پوشانی از نظر آماری معنی‌دار است ($p<۰/۰۵$).

کارایی درون‌پوشانی به عوامل مختلف از جمله ماهیت مادهٔ زیست فعال (آب‌گریز یا آب‌دوست بودن و میزان تمایل به برهم‌کنش با غشای دو لایه‌ای)، ترکیب غشای دو لایه (فسفولیپیدی یا فسفولیپید–استرول)، روش تولید لیپوزوم و ویژگی‌های فیزیکی دیواره و شرایط محیطی مانند دما بستگی دارد (حق جو و همکاران، ۱۳۹٤؛ محمدی و همکاران، ۱۳۹۲). به طور کلی ترکیبات آب‌گریز در مقایسه با ترکیبات آب‌دوست کارایی درون-پوشانی بالاتر و سرعت رهایش پایین‌تری دارند (قره نقده و همکاران، ۱۳۹٦). با مقایسه شکل ۲ (الف) و (ب) می‌توان نتیجه‌گیری کرد هنگام جایگزینی کلسترول با فیتواسترول در تولید نانولیپوزوم با استفاده از روش یک مرحله‌ای و دستگاه فراصوت با توان پایین، حتی در مقادیر کم فیتواسترول نیز درصد کارایی درون‌پوشانی افزایش یافته است. از طرفی چون افزایش کلسترول خون آثار مضری بر سلامت بدن انسان دارد. بنابراین، استفاده از فیتواسترول‌ها به جای کلسترول در تولید لیپوزوم‌ها می‌تواند بسیار مفید باشد. در تحقیق انجام گرفته توسط الکساندر و همکاران (۲۰۱۲) استرول‌های گیاهی برای تولید نانولیپوزوم با استفاده از روش تزریق اتانول در هموژنایزر نیروی برشی بالا مورد استفاده قرار گرفت. نتایج بدست آمده نشان داد که ذرات تولید شده اندازهٔ زیر ۲۰۰ نانومتر و توزیع اندازه ذرات محدود بود که در مقایسه با انواع بدون استرول گیاهی و لیپوزوم‌های حاوی کلسترول اندازه ذرات افزایش یافته بود ولی کارایی درون‌پوشانی مانند انواع حاوی کلسترول افزایش یافت. هم‌چنین گزارش کردند که با افزایش میزان فسفولیپید درصد کارایی درون-پوشانی نیز افزایش می‌یابد. ولی بر اساس روش مورد استفاده در این تحقیق همان‌طور که قبلاً نیز بیان شد هنگام کاهش یا افزایش فسفولیپید درصد کارایی درون-پوشانی کاهش می‌یابد (الکساندر و همکاران، ۲۰۱۲).



شکل۲- کارایی درون‌پوشانی، (الف) تأثیر نسبت غلظت فسفولیپید به کلسترول و (ب) تأثیر نسبت غلظت نسبت‌های متفاوت فسفولیپید به فیتواسترول در زمان‌های مختلف اعمال امواج فراصوت بر کارایی درون‌پوشانی

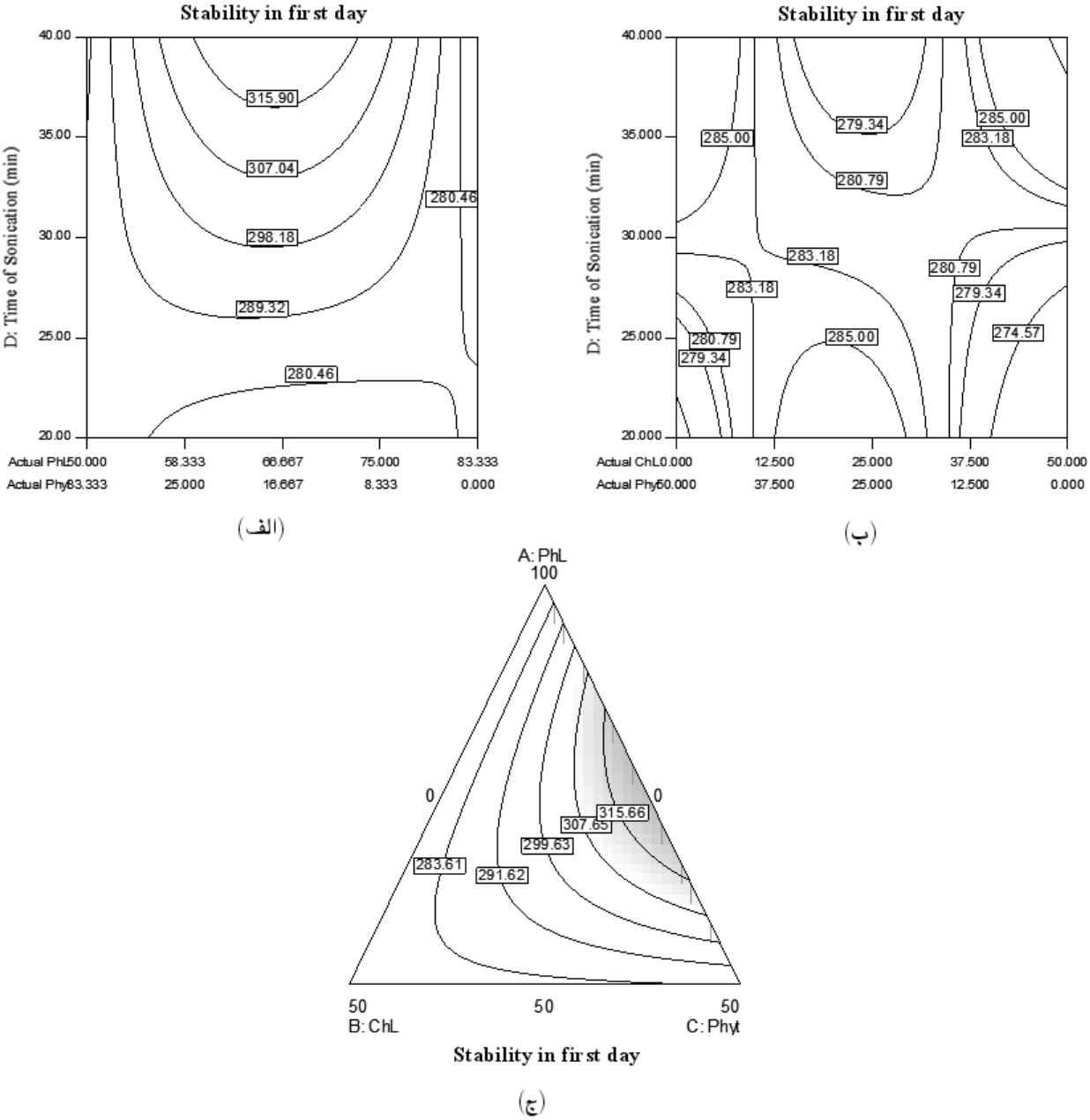
پایداری درون‌پوشانی نانولیپوزوم

ناپایداری لیپوزوم‌ها را می‌توان به برخورد[6] به دلیل حرکات تصادفی و براونی و حتی ادغام غشاهای دو یا چند لیپوزوم نسبت داد (تایلور و همکاران، ۲۰۰۷).

شکل ۳ پایداری درون‌پوشانی ویتامین C در روز اول در دمای ۴۲ °C است، بطوری‌که (الف) تأثیر نسبت‌های مختلف کلسترول به فیتو استرول و (ب) تأثیر و نسبت‌های متفاوت فسفولیپید به فیتواسترول در زمان اعمال امواج فراصوت، هم‌چنین (ج) تأثیر نسبت غلظت فسفولیپید، کلسترول و فیتواسترول بر پایداری درون-پوشانی را نشان می‌دهند. همان‌طور که ملاحظه می‌شود در شکل ۳ (ب) پایداری درون‌پوشانی را می‌توان به دو بازهٔ زمانی تقسیم کرد، در بازه زمانی ۲۰ تا ۳۰ دقیقه با افزایش نسبت کلسترول به فیتواسترول تا نسبت ۲۵ به ۲۵ میزان پایداری افزایش می‌یابد ولی با افزایش این نسبت میزان پایداری در نمونه‌ها دچار کاهش شد. از زمان ۳۵ تا ۴۵ دقیقه با افزایش نسبت کلسترول به فیتواسترول تا نسبت ۲۵ به ۲۵ پایداری کاهش یافت و پس از این نسبت با افزایش میزان کلسترول به فیتواسترول افزایش پایداری در نمونه‌ها رخ داد، می‌توان نتیجه گرفت که تأثیر کلسترول به ۲ بخش تقسیم می‌شود، یکی از زمان‌های ۲۰ تا ۳۰ دقیقه با افزایش نسبت کلسترول به فیتواسترول تا نسبت ۲۵ به ۲۵ کلسترول موجب افزایش پایداری شده و سپس سبب کاهش در پایداری نمونه‌ها می‌شود و دیگری از زمان‌های ۳۵ تا ۴۰ دقیقه که کاملاً عکس زمان‌های ۲۰ تا ۳۰ دقیقه تأثیر خود را اعمال می‌کند. حضور کلسترول در لایه‌های لیپید پایداری را افزایش داده و منجر به تشکیل غشایی سخت همراه با خواص مایع مانند می‌شود. به دلیل ویژگی‌های آمفی پاتیک، کلسترول خود را در لایه‌ها با گروه OH متمایل به هسته آبی و دم هیدروفیلیک سخت را به طرف لایه‌های فسفولیپید جای می‌دهد (نادرخانی، ۲۰۱۱). جالب است که بدانید لیپوزوم‌های فاقد کلسترول حساسیت بیشتری به تخریب در حین مطالعات پایداری در مقایسه با لیپوزوم‌های حاوی کلسترول دارند (چن و همکاران، ۲۰۱۰).

[6] Collision

همان‌طور که در در شکل ۳ (الف) نشان داده شده است که با افزایش زمان اعمال امواج فراصوت، پایداری درون‌پوشانی افزایش می‌یابد، ولی در مورد تأثیر نسبت باید گفت که فقط افزایش نسبت فسفولیپید به فیتواسترول تا میزان ٦٦/٦٦ به ١٦/٦٦موجب افزایش پایداری شده و پس از آن با افزایش نسبت، پایداری نیز کاهش می‌یابد. با توجه به شکل بیش‌ترین پایداری در نسبت ٦٦/٦٦ به ١٦/٦٦ فسفولیپید به فیتواسترول و در زمان اعمال امواج فراصوت بالای ۳۵ دقیقه بدست آمده است.



شکل ۳- پایداری درون‌پوشانی ویتامینC در روز اول، (الف) تأثیر نسبت‌های مختلف کلسترول به فیتو استرول و (ب) تأثیر و نسبت‌های متفاوت فسفولیپید به فیتواسترول در زمان اعمال امواج فراصوت، (ج) تأثیر نسبت غلظت فسفولیپید، کلسترول و فیتواسترول بر پایداری درون‌پوشانی

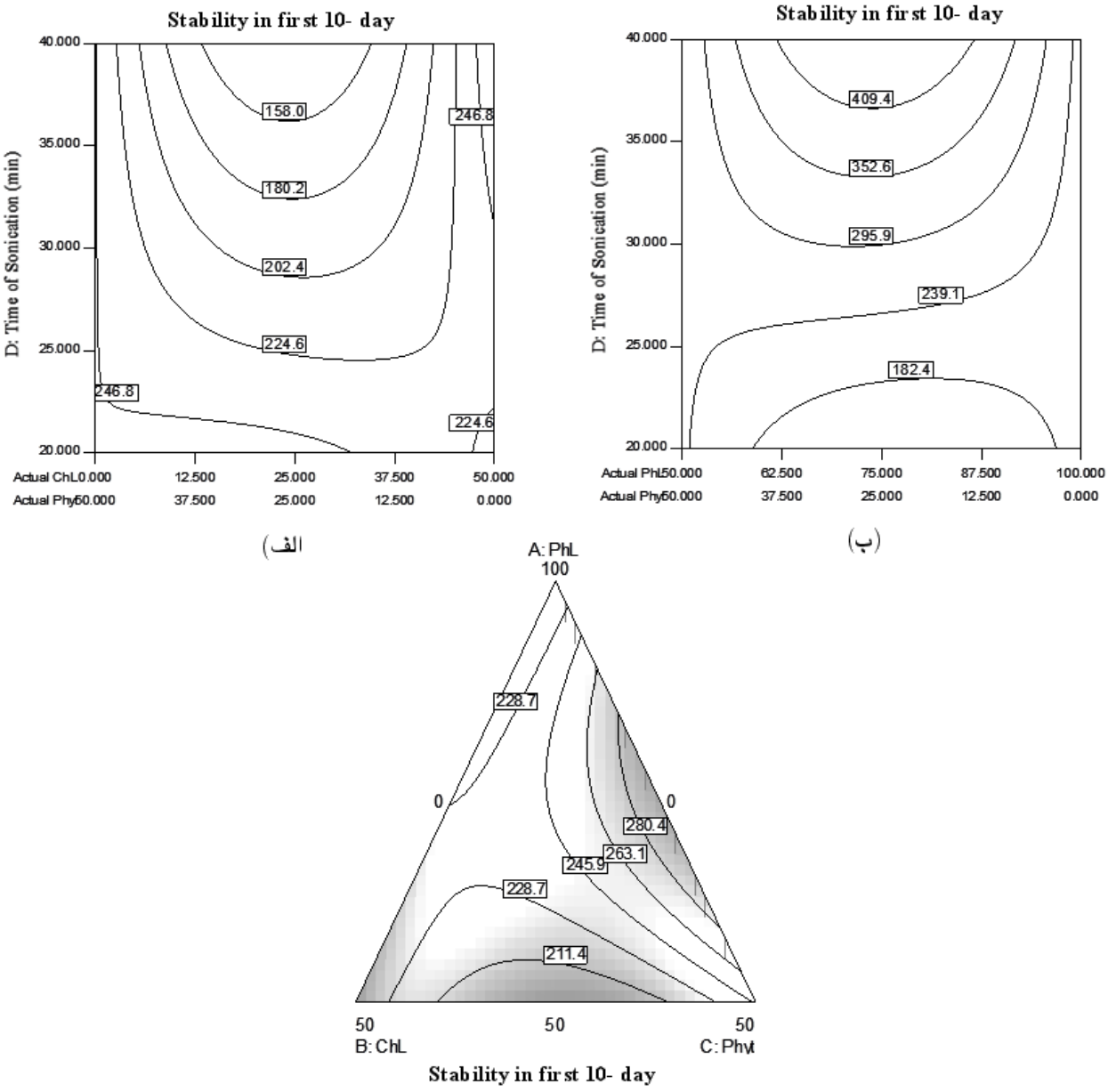
شکل ٤ پایداری درون‌پوشانی ویتامین C پس گذشت ۱۰ روز در شرایط گرمخانه گذاری و در دمای ٤٢ °C نشان می‌دهد.

شکل ٤ (الف) نشان دهنده تأثیر نسبت غلظت‌های کلسترول به فیتواسترول در زمان‌های مختلف اعمال امواج فراصوت بر پایداری درون‌پوشانی است. مشاهده می‌شود با افزایش زمان اعمال امواج فراصوت پس از گذشت ۱۰روز پایداری درون‌پوشانی ویتامین C در نانولیپوزوم‌ها کاهش یافت. از زمان ۲۰ تا ۲۵ دقیقه نسبت کلسترول به فیتواسترول تأثیر چندانی بر پایداری نداشته و پایداری تقریباً ثابت بود، ولی در زمان‌های بالاتر از ۲۵ دقیقه کاهش نسبت کلسترول به فیتواسترول موجب افزایش پایداری تا نسبت ۲۵ به ۲۵ شد و پس از این نسبت با افزایش زمان اعمال امواج فراصوت و نسبت کلسترول به فیتواسترول پایداری نیز افزایش یافت. در زمان‌های ۲۰ تا ۳۰ دقیقه و در نسبت صفر به ۵۰ کلسترول به فیتواسترول بیشترین میزان پایداری مشاهده شد که بیانگر مؤثر بودن جایگزینی کلسترول با فیتواسترول در فرمولاسیون تولید نانولیپوزوم‌ها است. بر طبق نظریه الکساندر و همکاران (۲۰۱۲) استفاده از کلسترول و فیتواسترول ها، بالقوه باعث افزایش نظم چیدمانی فسفولیپیدها و سفتی غشاء می‌شود و از توده‌ای شدن و افزایش سرعت رهایش مواد فعال جلوگیری می‌کند. ولی براساس که در نتایج بدست آمده در این تحقیق، با افزایش میزان فیتواسترول پایداری پس از گذشت ۱۰ روز افزایش یافته و کلسترول تأثیر منفی بر پایداری داشته است.

شکل ٤ (ب) تأثیر نسبت غلظت‌های فسفولیپید به فیتواسترول در زمان‌های مختلف اعمال امواج فراصوت بر پایداری درون‌پوشانی را نشان می‌دهد. همان‌طورکه دیده می‌شود، با افزایش زمان اعمال امواج فراصوت پایداری نیز افزایش می‌یابد. از زمان ۲۰ تا ۳۰ دقیقه، افزایش نسبت فسفولیپید به فیتواسترول تأثیری در پایداری نداشته و پایداری تقریباً ثابت است. پس از زمان ۳۰ دقیقه با افزایش نسبت فسفولیپید به فیتواسترول تا ۷۵ به ۲۵، پایداری افزایش می‌یابد سپس با افزایش نسبت فسفولیپید به فیتواسترول (کاهش فیتواسترول) پایداری کاهش می‌یابد. الکساندر و همکاران (۲۰۱۲) اظهار کردند که پایداری لیپوزوم‌های حاوی استرول‌های گیاهی در مقایسه با انواع دارای کلسترول کاهش یافته و فرمولاسیون تولیدی با گذشت زمان دچار جدایی فاز شد اما لیپوزوم‌های تشکیل شده از کلسترول پایداری خوبی طی مدت نگهداری داشتند، که بر خلاف نتایج بدست آمده در این تحقیق می‌باشد.

شکل ٤ (ج) نشان دهنده تأثیر نسبت غلظت‌های سه فاکتور فرمولاسیون فسفولیپید، کلسترول و فیتواسترول بر پایداری درون‌پوشانی است. با توجه به شکل با کاهش کلسترول پایداری کاهش می‌یابد و کلسترول تأثیر کمی در پایداری داشته است و حضور کلسترول اثر منفی بر پایداری فسفولیپید دارد ولی پایداری فسفولیپید در حضور فیتواسترول‌ها افزایش می‌یابد و نتایج نشان دهنده آن است که با جایگزینی مقادیر کم فیتواسترول به جای مقادیر زیاد کلسترول می‌توان پایداری را افزایش داد، علاوه بر اینکه فیتواسترول دارای فواید زیادی برای بدن نیز است و نیز در نمونه‌هایی که فاقد کلسترول یا فیتواسترول می‌باشند پایداری کم بوده و تأثیر مثبت استرول‌ها را در حفظ پایداری مواد درون‌پوشانی شده نشان می‌دهد.

همچنین آنالیز واریانس داده‌ها نشان دهنده معنی‌دار بودن اثر متقابل غلظت فسفولیپید، فیتواسترول در زمان‌های مختلف اعمال امواج فراصوت بر پایداری ویتامین C پس از ۱۰ روز نگهداری است ($p<0/05$).



شکل ۴- پایداری درون‌پوشانی ویتامین C پس گذشت ۱۰ روز، (الف) تأثیر نسبت غلظت‌های کلسترول به فیتواسترول و (ب) تأثیر نسبت غلظت‌های فسفولیپید به فیتواسترول در زمان‌های مختلف اعمال امواج فراصوت، (ج) تأثیر نسبت غلظت‌های سه فاکتور فرمولاسیون فسفولیپید، کلسترول و فیتواسترول بر پایداری درون‌پوشانی

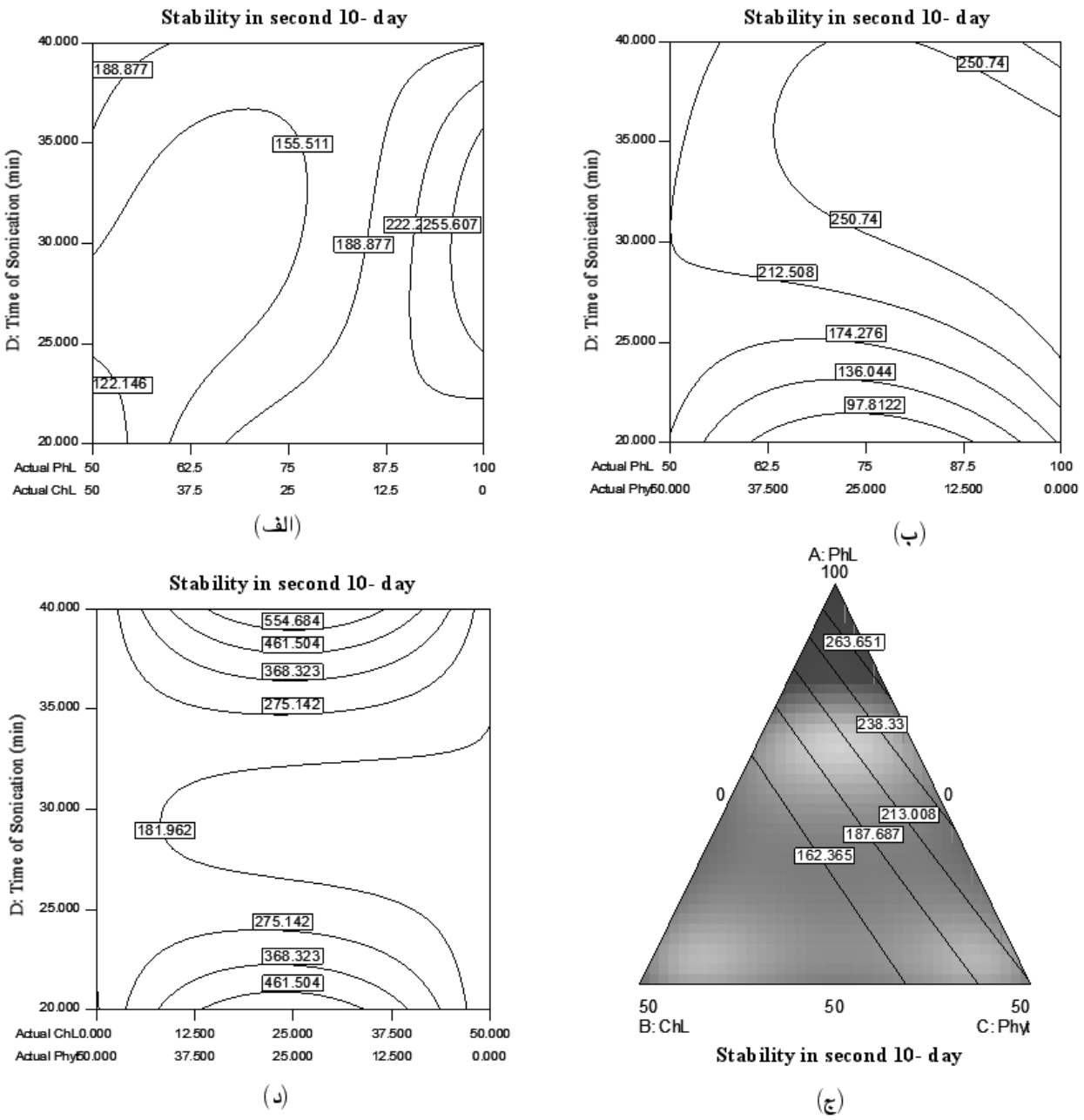
شکل ۵ پایداری درون‌پوشانی ویتامین C پس گذشت ۲۰ روز نگهداری در دمای ۴۲ °C را نشان می‌دهد. شکل ۵ (ب) نشان دهنده اثر نسبت غلظت‌های فسفولیپید به فیتواسترول و زمان‌های مختلف اعمال امواج فراصوت بر میزان ویتامین C حفظ شده پس از گذشت ۲۰ روز از تولید نمونه‌ها است. همان‌طور که مشاهده می‌شود با افزایش زمان اعمال امواج فراصوت میزان ویتامین حفظ شده نیز افزایش یافته است که می‌توان گفت که زمان تأثیر مثبتی بر پایداری داشته است. در زمان بالاتر از ۳۰ دقیقه و در نسبت بالاتر از ۷۵ به ۲۵

فسفولیپید به فیتواسترول بیشینه مقدار ویتامین حفظ شده در درون نانو لیپوزوم‌ها بدست آمد.

شکل (الف) تأثیر نسبت غلظت‌های فسفولیپید به کلسترول در زمان‌های مختلف اعمال امواج فراصوت بر پایداری درون‌پوشانی را نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل ۵ (الف) مشاهده می‌شود با افزایش زمان اعمال امواج فراصوت و افزایش نسبت فسفولیپید به کلسترول میزان ویتامین C حفظ شده نیز افزایش می‌یابد. در مقادیر پایین کلسترول سطح پایداری ویتامین C بالا می‌باشد.

شکل ۵ (ج) تأثیر نسبت غلظت‌های سه فاکتور فرمولاسیون فسفولیپید، کلسترول و فیتواسترول و شکل ۵ (د) تأثیر نسبت غلظت‌های کلسترول به فیتواسترول در زمان‌های مختلف اعمال امواج فراصوت بر پایداری درون‌پوشانی را نشان می‌دهند. همانطور که شکل نشان می‌دهد از زمان ۲۰ تا ۲۵ دقیقه با افزایش نسبت کلسترول به فیتواسترول و زمان اعمال امواج فراصوت میزان ویتامین C حفظ شده کاهش می‌یابد که نشان دهنده تأثیر منفی زمان اعمال امواج فراصوت و میزان کلسترول بر پایداری است. از دقیقه ۲۵ تا ۳۵ میزان پایداری ثابت بوده و زمان اعمال امواج فراصوت و افزایش نسبت تأثیری بر پایداری ندارد. پس از دقیقه ۳۵ به بعد و با افزایش زمان اعمال امواج فراصوت میزان ویتامین C باقی‌مانده افزایش یافت ولی در نسبت ۲۵ به ۲۵ کلسترول به فیتواسترول بیشینه میزان پایداری حاصل شد.

ویژگی‌های آمفی پاتیک کلسترول موجب می‌گردد این ماده در لایه‌ها آب‌دوست و متمایل به هسته آبی قرار گیرد و باعث پایداری شود. این ویژگی در تشکیل غشایی سخت سیال مفید می‌باشد به طوری‌که فقدان حضور کلسترول در ساختار لیپوزوم باعث حساسیت بیشتر لیپوزوم به تخریب و کاهش پایداری آن می‌گردد (نادرخانی، ۲۰۱۱؛ چن و همکاران، ۲۰۱۰). لیپوزوم‌ها به دلیل سیالیت غشای لیپیدی از نظر ترمودینامیکی ناپایدار بوده و در طی زمان تمایل به ادغام و رهایش ماده درون‌پوشانی شده دارند. اصلاح ساختار دو لایه و سفت شدن آن منجر به حفظ ماده درون‌پوشانی شده در لیپوزوم می‌شود. کلسترول باعث افزایش دافعه الکترواستاتیک شده و از انبوهش جلوگیری می‌کند و از طرف دیگر با افزایش سفتی غشا از فرآیند به هم آمیخته شدن جلوگیری می‌کند (قره نقده و همکاران، ۱۳۹۶؛ حق جو و همکاران، ۱۳۹٤).



شکل ۵- پایداری درون‌پوشانی ویتامین C پس گذشت ۲۰ روز، (الف) تأثیر نسبت غلظت‌های فسفولیپید به کلسترول و (ب) تأثیر نسبت غلظت‌های فسفولیپید به فیتواسترول در زمان‌های مختلف اعمال امواج فراصوت، (ج) تأثیر نسبت غلظت‌های سه فاکتور فرمولاسیون فسفولیپید، کلسترول و فیتواسترول بر پایداری درون‌پوشانی، (د) تأثیر نسبت غلظت‌های کلسترول به فیتواسترول در زمان‌های مختلف اعمال امواج فراصوت بر پایداری درون‌پوشانی

نتیجه‌گیری

یکی از عوامل اصلی در ویژگی‌های لیپوزوم‌ها روش تولید آن‌ها است، در روش یک مرحله‌ای ، استفاده از زمان‌های بالای امواج فراصوت، فیتواسترول در مقایسه با کلسترول تأثیر مثبتی بر پایداری اندازه ذرات و پایداری درون‌پوشانی ویتامین C داشت. هم‌چنین نتایج این پژوهش نشان داد، غلظت ۷۵٪ فسفولیپید به ۲۵٪ فیتواسترول و

غلظت ۵۰ ٪ به ۵۰٪ فسفولیپید به کلسترول موجب افزایش توزیع اندازه ذرات و درصد درون‌پوشانی می‌گردد. در نتیجه می‌توان گفت که جایگزین کردن فیتواسترول با کلسترول و جایگزین نمودن اتانول به عنوان یک حلال خوراکی به جای حلال‌های آلی مضر در تولید و کاربرد حامل‌های لیپوزومی در صنعت غذا قابل استفاده است ولی در مورد روش مور استفاده می‌توان نتیجه گرفت که روش یک مرحله‌ای- امواج فراصوت با توان پایین، در تولید حامل‌های لیپوزومی با ویژگی‌های ایده‌آل، کارآمد نیست. بنابراین پیشنهاد می‌شود تحقیقات بیشتری در رابطه با روش یک مرحله‌ای- امواج فراصوت با توان پایین جهت تولید انواع حامل‌های لیپیدی و بویژه لیپوزومی صورت گرفته و هم‌چنین به منظور درک بهتر تفاوت‌های موجود در ویژگی-های فیزیکوشیمیایی سیستم‌های لیپوزومی ناشی از نوع دیواره فسفولیپید تخم مرغ و فسفولیپید سویا نیز باهم مقایسه گردد.

منابع مورد استفاده

بشیری ص، قنبرزاده ب، همیشه هکار ح، دهقان نیا ج، ۱۳۹٤، نانولیپوزومهای حامل بتاکاروتن: بررسی اثر گاماوریزانول بر پایداری اندازه ذرات و درونپوشانی، نشریه پژوهش و نوآوری در علوم و صنایع غذایی، جلد ٤، شماره ٤، صفحات ۳٦۵-۳۸۵.

حق جو س، قنبرزاده ب، همیشه هکار ح، اثنی عشری س، دهقان نیا ج، ۱۳۹٤، ارزیابی ویژگی های کلوئیدی و آنتی اکسیدانی نانولیپوزو مهای حاوی عصاره گزنه، فصلنامه فناوری های نوین غذایی، سال دوم، شماره ۷، صفحه ۱۱-۲۳.

قره نقده س، صمدلوئی ح ر، صوتی خیابانی م، همیشه کار ح، رضایی مکرم ر، ۱۳۹٦، ارزیابی خواص ضدمیکروبی وآنتیاکسیدانتی نانولیپوزوم حاوی اسانس مریم گلی (*Salvia multicaulis*)، فصلنامه علوم و صنایع غذایی شماره ٦۲، دوره ۱٤۰.

محمد حسنی ز، قنبرزاده ب، همیشه کار ح، رضایی مکرم ر، ۱۳۹۳، تعیین ویژگی های نانولیپوزوم های حامل گاما اوریزانول توسط طیف سنجی فرو سرخ، اندازه وزیکول، پتانسیل زتا، پایداری فیزیکی و رئولوژی پایا، نشریه پژوهشهای علوم و صنایع غذایی ایران، جلد ۱۰، شماره ۱، صفحات ٦۲-۷۵.

محمدی م، قنبرزاده ب، همیشه کار ح، رضایی مکرم ر، محمدی فر م الف، ۱۳۹۲، ارزیابی ویژگی های فیزیکی نانولیپوزوم های حامل ویتامین D_3 تولید شده به روش هیدراسیون لایه نازک- سونیکاسیون، مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، سال هشتم، شماره ٤، صفحات ۱۷۵-۱۸۸.

Alexander M, Acero Lopez A, Fang Y and Corredig M, 2012. Incorporation of phytosterols in soy phospholipids nanoliposomes: Encapsulation efficiency and stability. LWT-Food Science and Technology 47(2): 427-436.

AOAC, 1995. Official methods of analysis. In K. Helrich (Ed.) (16th ed.). Arlington, VA, USA: Association of Official Analytical Chemists, Inc

Belitz HD and Grosch W, 1999. Food Chemistry, Springer.

Chen C, Han D, Cai C and Tang X, 2010. An overview of liposome lyophilization and its future potential. Journal of Controlled Release, 142(3): 299-311.

Da Silva Malheiros P, Daroit DJ and Brandelli A, 2010. Food applications of liposome-encapsulated antimicrobial peptides. Trends in Food Science & Technology, 21(6): 284-292.

Dua JS, Rana AC and Bhandari AK, 2012. Liposomes methods of preparation and applications. Int J Pharm Stud, Res 3, 14-20.

Farhang B, Kakuda Y and Corredig M, 2012. Encapsulation of ascorbic acid in liposomes prepared with milk fat globule membrane-derived phospholipids. Dairy Science & Technology 92(4): 353-366.

Fatouros D, Gortzi O, Klepetsanis P, Antimisiaris SG, Stuart MCA, Brisson A and Ioannou PV, 2001. Preparation and properties of arsonolipid containing liposomes. Chemistry and Physics of Lipids 109(1): 75-89.

Goyal P, Goyal K, Kumar SGV, Singh A, Katare OP and Mishra DN, 2005. Liposomal drug delivery systems. Clinical applications Acta Pharm. 55: 1–25.

Kirby C, Clarke J and Gregoriadis G, 1980. Effect of the cholesterol content of small unilamellar liposomes on their stability in vivo and in vitro. Biochem J. 186: 591-598.

Laouini A, Jaafar-Maalej C, Limayem-Blouza I, Sfar S, Charcosset C and Fessi H, 2012. Preparation, Characterization and Applications of Liposomes: State of the Art. Journal of Colloid Science and Biotechnology 1(2): 147-168.

Liang LPTHJ, Chung TW and Liu YYHDZ, 2007. Liposomes incorporated with cholesterol for drug release triggered by magnetic field. Journal of medical and biological Engineering 27(1): 29-34.

Mozafari MR, Flanagan J, Matia-Merino L, Awati A, Omri A, Suntres ZE and Singh H, 2006. Recent trends in the lipid-based nanoencapsulation of antioxidants and their role in foods. Journal of the Science of Food and Agriculture 86(13): 2038-2045.

Mozafari MR, Johnson C, Hatziantoniou S and Demetzos C, 2008. Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. Journal of liposome research 18(4): 309-327.

Naderkhani E, 2011. Investigation and optimization of liposome formulation for use as drug carrier for the anticancer agent Camptothecin.

Patel N and Panda S, Liposome Drug delivery system: a Critic Review.

Quilez J, Garcia- Lorda P and Slas-Salvado J, 2003. Potential uses and benefits of phytosterols in diet: present situation and future directions. Clinical Nutrition 22: 343-351.

Richardson ES, Pitt WG and Woodbury DJ, 2007. The role of cavitation in liposome formation. Biophysical journal 93(12): 4100-4107.

Schroeder A, Kost J and Barenholz Y, 2009. Ultrasound, liposomes, and drug delivery: principles for using ultrasound to control the release of drugs from liposomes. Chemistry and physics of lipids 162(1): 1-16.

Sułkowski WW, Pentak D, Nowak K and Sułkowska A, 2005. The influence of temperature, cholesterol content and pH on liposome stability. Journal of molecular structure 744: 737-747.

Taylor TM, Weiss J, Davidson PM and Bruce BD, 2005. Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 45(7-8): 587-605.

Taylor TM, Gaysinksy S, Davidson PM, Bruce BD and Weiss J, 2007. Characterization of Antimicrobial Bearing Liposomes by Zeta-Potential, Vesicle Size and Encapsulation Efficiency, Food Biophys. 2: 1-9.

Viriyaroj A, Ngawhirunpat T, Sukma M, Akkaramongkolporn P, Ruktanonchai U and Opanasopit P, 2009. Physicochemical properties and antioxidant activity of gamma-oryzanol-loaded liposome formulations for topical use. Pharmaceutical development and technology 14(6): 665-671.

Wechtersbach L, Poklar Ulrih N and Cigić B, 2012. Liposomal stabilization of ascorbic acid in model systems and in food matrices. LWT-Food Science and Technology 45(1): 43-49.

Yang JH, Lee SY, Han YS, Park KC and Choy JH, 2003. Efficient transdermal penetration and improved stability of L-ascorbic acid encapsulated in an inorganic nanocapsule. BULLETIN-KOREAN CHEMICAL SOCIETY 24(4): 499-503.

Yang S, Liu C, Liu W, Yu H, Zheng H, Zhou W and Hu Y, 2013. Preparation and Characterization of Nanoliposomes Entrapping Medium-Chain Fatty Acids and Vitamin C by Lyophilization. International journal of molecular sciences 14(10): 19763-19773.

Evaluating performance of one-step method and ultrasonic waves in production of nano-liposomes containing vitamin C

S Amiri[1], M Rezazad Bari[2*] and M Alizadeh Khaledabad[2]

Received: January 12, 2016 Accepted: January 21, 2017

[1] MSc, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
[2]Associate Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Urmia University, Urmia, Iran
[*]Corresponding Author, E-mail: m.rezazadehbari@urmia.ac.ir

Abstract

Today nano-liposomes are used extensively in all industries such as pharmaceutical and food. Nano-liposomes are formed when aqueous solution of phospholipids subjected to sufficient energy. In this study One-step method combined with ultrasonic waves was used to produce nano-liposomes. Quality characteristics such as particle size, entrapment efficiency and stability were measured.Combined experimental design was used to investigate the effect of different ratio of phospholipids, cholesterol and phytosterols powder (50-100%, 0-50% and 0-50%, respectively) and also the effect of sonication time (20, 25, 30, 35, 40 min) on the functional properties of nano-liposoes new formulation containing vitamin C. High sonication time led to the lowest standard deviation in particle size and increases the entrapment efficiency. In overall stability was increased by sonication time (The highest stability was observed in 35 and 40 minutes of sonication time), although this effect was different at various ratios of phospholipids, cholesterol and phytosterols. The results showed, although one-step method combined with low power ultrasonic waves was not effective to create ideal properties in nano-liposomes, cholesterol with phytosterols replacement, as well as using milk phospholipids and food grade solvent were efficient technique for producing nano-liposomes.

Key words: Nano-liposomes, One-step method, Low power ultrasonic waves, Edible solvent, Vitamin C