

نانولیپوزوم‌های حامل بتاکاروتن: بررسی اثر گاما‌اوریزانول بر پایداری اندازه ذرات و درون‌پوشانی

صحرا بشیری^۱، بابک قنبرزاده^{۲*}، حامد همیشه‌کار^۳، جلال دهقان‌نیا^۴

- ۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
- ۲- استاد گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز
* نویسنده مسئول (ghanbarzadeh@tabrizu.ac.ir)
- ۳- دانشیار مرکز تحقیقات دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز
- ۴- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

چکیده

تاریخ دریافت: ۹۳/۱۰/۱۵
تاریخ پذیرش: ۹۴/۰۷/۱۰

واژه‌های کلیدی

بتاکاروتن
پایداری
گاما‌اوریزانول
نانولیپوزوم

بتاکاروتن، یکی از انواع مهم ترکیبات فراسودمند، آنتی‌اکسیدانی و پیش‌ویتامین A موجود در فرآورده‌های گیاهی است که به علت ماهیت آب‌گریز و پایداری پایین، غنی‌سازی مواد غذایی با آن دشوار است. درون‌پوشانی بتاکاروتن در حامل‌های لیپیدی، مانند لیپوزوم‌ها، راهکاری است که به‌طور بالقوه می‌تواند این مشکلات را کاهش دهد. سیستم‌های لیپوزومی حامل بتاکاروتن با روش اصلاح‌شده حرارتی، تهیه گردیدند و از گاما‌اوریزانول به عنوان یک فیتواسترویل، جهت افزایش پایداری ساختار لیپوزوم‌ها استفاده شد. برای پی‌بردن به انکپسوله‌شدن این ماده در لیپوزوم‌ها، گروه‌های عاملی و برهمکنش‌های احتمالی بین بتاکاروتن و لستین، توسط طیف‌سنجی فروسرخ (FTIR) مطالعه شد و پیک‌های ۹۸۰ و 1580 cm^{-1} مربوط به گروه‌های عاملی بتاکاروتن، در لیپوزوم‌ها مشاهده گردید. در نسبت‌های مختلف لستین به بتاکاروتن، اندازه ذرات در محدوده ۶۴ نانومتر بدست آمد و در طول زمان نگهداری به مدت ۳۰ روز، اندازه ذرات در زیر ۵۰۰ نانومتر باقی ماندند. همچنین درصد درون‌پوشانی بتاکاروتن، در غلظت‌های بالای لستین ۷۷/۲۵ درصد بود و در طول زمان نگهداری به ۶۹/۷۳ درصد کاهش یافت. استفاده از گاما‌اوریزانول در لیپوزوم‌های حاوی بتاکاروتن، موجب افزایش پایداری اندازه ذرات و درصد درون‌پوشانی بتاکاروتن در طول زمان گردید.

مقدمه

آب‌گریز (در مواد غذایی و مجرای گوارشی)، رهایش کنترل‌شده (در مواد غذایی و مجرای گوارشی)، جلوگیری از تغییرات ارگانولپتیکی نامطلوب مانند تغییر رنگ و بو در مواد غذایی توسط ماده غذا- دارو و افزایش جذب زیستی به علت اتصال بهتر برخی از حامل‌ها به غشای سلولی (Keller, 2001; Taylor *et al.*, 2007; Mozafari *et al.*, 2008; Fathi *et al.*, 2011) تکنیک‌های نانودرون‌پوشانی^۲ قابلیت دسترسی زیستی بالاتر، رهایش کنترل‌شده بهتر و دقیق‌تر

درون‌پوشانی^۱ ترکیبات غذا-دارو^۱ در نانوحامل‌های لیپیدی، یکی از زمینه‌های کاربرد علم نانوفناوری در صنایع غذایی است. درون‌پوشانی ترکیبات زیست-فعال، از مزایای متعددی در صنایع غذایی و دارویی برخوردار است که مهم‌ترین آنها عبارتند از: حفاظت و افزایش پایداری در برابر عوامل محیطی (در مواد غذایی و مجرای گوارشی)، افزایش حلالیت مواد فعال

² Nano-encapsulation

¹ Nutricritical

لیپوزومها با درصد درون پوشانی بالا، مورد توجه گسترده قرار گرفته است (Mozafari, 2005; Rasti *et al.*, 2012).

پایداری لیپوزومها جنبه‌های مختلفی دارد که شامل پایداری اندازه ذرات، پایداری درصد درون-پوشانی، پایداری اکسیداسیون و پایداری حجم لیپوزوم تشکیل یافته می‌باشد. برای جلوگیری از افزایش اندازه ذرات و کاهش درصد درون پوشانی، راهکارهای مختلفی پیشنهاد شده است که مهم‌ترین آنها استفاده از مواد پایدارکننده و ترکیبات پلیمری سازگار می‌باشد (Mozafari, 2005; Bouaraba *et al.*, 2014). محمدحسینی و همکاران، (۱۳۹۲). رایج‌ترین ماده پایدارکننده طبیعی کلسترول است ولی در سال‌های اخیر به علت مشکلات تغذیه‌ای ناشی از آن، ترکیبات فیتواسترولی برای بهبود پایداری، مورد استفاده قرار گرفته است. مواد پلیمری مانند کیتوزان^۶ و پلی اتیلن گلیکول^۷ نیز با ایجاد ممانعت فضایی و همچنین افزایش دفع الکترواستاتیک، موجب جلوگیری از انبوهش و توده شدن می‌گردند (Liu & Park, 2010; Bang *et al.*, 2011; Tan & Misran, 2012; Zalba *et al.*, 2012). گاما اوریزانول^۸ ترکیب متشکل از مخلوطی از چند نوع فرولات‌های فیتواسترول^۹ هاست و یک آنتی‌اکسیدان طبیعی موجود در سیبوس و روغن برنج بوده و افزون بر داشتن خواص سلامت‌بخشی، باعث افزایش پایداری روغن‌های حاوی آن، در برابر اکسیداسیون می‌شود (Suh *et al.*, 2007; Viriyaroj *et al.*, 2009).

بتاکاروتن، یکی از مهم‌ترین رنگدانه‌های گیاهی و از دسته کاروتنوئیدهاست و هر واحد آن از ۸ واحد ایزوپرن تشکیل شده است (Yin *et al.*, 2009). بدن انسان، قادر به ساخت بتاکاروتن نیست و به منابع خارجی آن نیاز دارد. در دیواره روده کوچک، هر واحد بتاکاروتن توسط آنزیم β -اکسیژناز به دو واحد ویتامین A تبدیل می‌شود. همچنین، بتاکاروتن عملکردی مستقل از ویتامین A دارد و به‌عنوان یک آنتی-اکسیدان قوی در بدن شناخته می‌شود و خاصیت

نسبت به سیستم‌های میکرودرن پوشانی^۱ داشته و پایداری ترکیبات فعال در زمان طولانی‌تری حفظ می‌شود (Yurduglu & Mozafari, 2004). لیپوزومها از جمله مهم‌ترین حامل‌های لیپیدی با اندازه وسیع ۱۰ نانومتر تا ۱۰ میکرومتر می‌باشد و معمولاً به‌صورت وزیکول^۲‌های دولایه متشکل از فسفولیپیدها می‌باشند (قنبرزاده و همکاران، ۱۳۹۲). لیپوزومها دارای مزایای متعددی نسبت به برخی از حامل‌های دیگر هستند که مهم‌ترین آنها عبارتند از توانایی درون پوشانی توأم ترکیبات آب‌دوست (در محفظه داخلی) و آب‌گریز (در میان غشای دو لایه‌ای)، کارایی درون پوشانی بالا و پایداری کلوئیدی بالا در برابر تفکیک گرانشی و توده-شدن (به دلیل نزدیک بودن چگالی لیپیدهای قطبی به آب) (Keller, 2001; Taylor *et al.*, 2005; Mozafari *et al.*, 2008a; Mozafari *et al.*, 2008b). در سال‌های اخیر، به منظور تولید طیف وسیعی از غذاهای فراسودمند و یا بهبود ماندگاری مواد غذایی، تلاش‌های تحقیقی گسترده‌ای برای درون پوشانی ترکیبات زیست‌فعال غذایی مختلف توسط لیپوزومها انجام شده است (Sagalowics & Leser, 2010). برای مثال درون پوشانی نایسین^۳ (Taylor *et al.*, 2007; Malheiros *et al.*, 2010)، ویتامین E و C (Marsansco *et al.*, 2011)، کاروتنوئیدها (Nacke & Lu *et al.*, 2011)، پلی فنول^۴‌های چای (Schrader, 2011)، آنزیمها (Xia *et al.*, 2006; Hwang *et al.*, 2010)، اسیدهای چرب امگا ۳ (Rasti *et al.*, 2012)، اسید چرب اولئیک (Tan & Misran, 2012)، عصاره هسته انگور (Gibis *et al.*, 2013)، اسید سینامیک (Bouaraba *et al.*, 2014) و ویتامین D (محمدی و همکاران، ۱۳۹۲).

روش‌های مختلفی برای تولید لیپوزومها ابداع شده است و در سال‌های اخیر، روش حرارتی به دلایل متعدد از جمله عدم استفاده از حلال‌های سمی، عدم نیاز به تجهیزات مختلف (تبخیرکننده، فراصوت، همگن‌سازی در فشار بالا و اکستروژن^۵) و تولید سریع

¹ Microencapsulation

² Vesicle

³ Nisine

⁴ Polyphenol

⁵ Ecstrotion

⁶ Cytosane

⁷ Polyetylen glycol

⁸ Gamma oryzanol

⁹ Firulate phytosterols

روش تهیه نانولیپوزوم‌های حاوی بتاکاروتن ابتدا غلظت‌های مختلف لستین (۲۰، ۴۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۵۰، ۲۰۰ میلی‌گرم) در ۲ سی‌سی آب دوبار تقطیر هیدراته‌شده و به محلول، ۴ میلی‌گرم بتاکاروتن حل-شده در ۱۴ سی‌سی پلی‌اتیلن گلیکول ۴۰۰ افزوده شد. مخلوط حاوی محلول بتاکاروتن و لستین به بشر ۳۰۰ سی‌سی مقاوم به حرارت حاوی بافل^۲ منتقل شد و ۱۴ سی‌سی حلال پلی‌اتیلن گلیکول دیگر نیز به آن اضافه شد. محلول گاما‌اوریزانول در پلی‌اتیلن گلیکول ۴۰۰ با نسبت ۴ به ۱ در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد تهیه گردید و به محلول حاوی لستین افزوده شد (در تمام فرمولاسیون‌های حاوی گاما‌اوریزانول، نسبت ۱ به ۱۴ گاما‌اوریزانول به لستین استفاده گردید). مخلوط مورد نظر توسط دستگاه همزن در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد و دور ۱۰۰۰ دور در ثانیه همزده شد و همزمان با ۴۰ سی‌سی آب مقطر به حجم رسانده شد. مجدداً سیستم حاصله به مدت ۱ ساعت با دور ۱۴۰۰ دور در ثانیه در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد همزده شد. به منظور پایداری محلول لیپوزومی بدست آمده، به مدت ۱۵ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت و سپس در یخچال در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد، نگهداری شد. (محمد حسنی و همکاران، ۱۳۹۲).

طیف‌سنجی فروسرخ (FTIR)

برای تعیین برهمکنش‌های بتاکاروتن و لستین در نمونه‌های بدون گاما‌اوریزانول و همچنین در نمونه‌های حاوی گاما‌اوریزانول به‌عنوان پایدارکننده از طیف‌سنجی مادون قرمز (FTIR) استفاده شد، که نمونه‌های تهیه شده، ابتدا به کیسه‌های دیالیز جهت حذف حلال پلی‌اتیلن گلیکول منتقل شده و سپس توسط گاز نیتروژن منجمدشده و با استفاده از دستگاه خشک‌کن انجمادی در دماهای ۵- درجه سانتی‌گراد و فشار ۰/۱ میلی‌بار خشک شدند. از پودرها برای تهیه قرص‌های جامد شفاف استفاده شد. روش تهیه قرص به این صورت بود که ابتدا پودر لیوفیلیزه شده و برمید پتاسیم با نسبت‌های ۱ به ۱۰ مخلوط شده و آسیاب شدند. سپس در دستگاه تهیه قرص با استفاده از

آنتی‌اکسیدانی آن به دلیل جلوگیری از تولید رادیکال‌های آزاد اکسیژن است (Anarjan *et al.*, 2011). به علت آب‌گریزی و ناپایداری بتاکاروتن در برابر اکسیداسیون، افزودن مستقیم آن به مواد غذایی با دشواری‌هایی همراه است و با درون‌پوشانی آن به‌طور بالقوه می‌توان حلالیت بتاکاروتن را در نوشیدنی‌های غذایی، جذب در بدن و پایداری در برابر عوامل محیطی را افزایش داد. لذا در این تحقیق، نانولیپوزوم‌های حامل بتاکاروتن توسط روش حرارتی تولید شد و اثر گاما‌اوریزانول به‌عنوان یک پایدارکننده بر اندازه ذرات و کارایی درون‌پوشانی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش‌ها

مواد شیمیایی

فسفاتیدیل کولین از شرکت Acros Organics بلژیک، بتاکاروتن از شرکت Sigma- Aldrich آمریکا تهیه شدند. پلی‌اتیلن گلیکول از شرکت مواد شیمیایی مرک آلمان تهیه شدند. گاما‌اوریزانول از شرکت Tsuno Rice Chemicals ژاپن تهیه شد.

دستگاه‌ها و تجهیزات

در این پژوهش، دستگاه مخلوط‌کن مدل RER شرکت IKA کشور آلمان، خشک‌کن انجمادی مدل Christ a 1-4 ساخت آلمان، دستگاه تعیین اندازه ذرات مدل SALD 2101 ساخت ژاپن، طیف‌سنجی فروسرخ^۱ توسط دستگاه FTIR مدل Shimadzu 8400، اسپکتروفتومتر فرابنفش - مرئی (UV-Vis) مدل Ultrospec 2000 ساخت انگلستان، دستگاه رئومتر Physica Anton Paar، مدل MCR 301 ساخت کشور اتریش استفاده شد.

تهیه محلول بتاکاروتن

در تحقیق حاضر حلالیت بتاکاروتن در حلال‌های مختلفی بررسی شد و مشاهده شد که حلالیت آن در پلی‌اتیلن گلیکول ۴۰۰ در دمای ۶۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه نسبت به سایر حلال‌ها بالاتر بود و محلول شفاف نارنجی رنگ بدست آمد.

² Baffle

¹ Fourier Transform Infrared Spectroscopy

حل گردید (با نسبت ۱:۱۰ و به مدت ۱۰ دقیقه روی همزن شیکر) و سپس مقادیر بتاکاروتن کپسوله شده توسط اسپکتروفتومتر و به کمک منحنی استاندارد تعیین شد. سپس درصد کارایی درون پوشانی بتا-کاروتن توسط معادله ۲ محاسبه شد (Yin *et al.*, 2009). البته قبل از این اندازه گیری، ۱۰ میلی گرم گاما اوریزانول توزین و با حلال کلرفرم به حجم ۱ سی سی رسانده شد و سپس با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر ماورای بنفش- مرئی شدت جذب آن در طول موج های ۴۰۰-۱۰۰ نانومتر و ۸۰۰-۴۰۰ نانومتر تعیین شد و طول موج با شدت جذب حداکثر تعیین شد. مشاهده شد که بتاکاروتن در طول موج ۴۰۰-۱۰۰ نانومتر جذب ندارد و این باعث می شود که در منحنی جذب نمونه های دارای گاما اوریزانول بین گاما اوریزانول و بتاکاروتن تداخلی ایجاد نشود، زیرا جذب گاما اوریزانول و لستین در ناحیه ۴۰۰-۱۰۰ می باشد. کارایی درصد کپسولی شدن بتاکاروتن در روزهای ۷، ۱۵ و ۳۰ به وسیله معادله ۲ مورد بررسی قرار گرفت، و با بکاربردن معادله ۳ پایداری درون پوشانی در طول زمان بدست آمد.

رابطه (۲)

کارایی درون پوشانی

$$= \frac{\text{میزان بتاکاروتن اندازه گیری شده در لیپوزوم}}{\text{میزان اولیه بتاکاروتن افزوده شده به لیپوزوم}} \times 100$$

رابطه (۳)

پایداری درون پوشانی

$$= \frac{\text{میزان بتاکاروتن حفظ شده در لیپوزوم}}{\text{میزان اولیه بتاکاروتن کپسوله}} \times 100$$

آزمون های رئولوژیکی

اندازه گیری ویژگی های رئولوژیکی نمونه های لیپوزومی یک روز پس از آماده سازی نمونه ها، در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد با استفاده از دستگاه رئومتر Physica Anton Paar مجهز به رئومتری استوانه ای هم مرکز انجام شد. در آزمون رئولوژیکی پایا رفتار

دستگاه پرس به مدت ۲ دقیقه و فشار ۶۰ کیلونیوتن، به شکل قرص درآمدند. پس از آن قرص های حاصل از لستین، بتاکاروتن و پودرهای خشک شده لیپوزوم-های حاوی بتاکاروتن، برای آنالیز در دستگاه FTIR مدل Shimadzu 8400 در محدوده طول موجی cm^{-1} ۴۰۰-۴۰۰ و تفکیک پذیری مورد مطالعه قرار گرفتند (Lu *et al.*, 2011).

اندازه گیری اندازه ذرات و توزیع اندازه ذرات

قطر متوسط ذرات به وسیله دستگاه تعیین اندازه ذرات بر اساس روش پراکندگی نور لیزر اندازه گیری شد. متوسط اندازه ذرات بر اساس میانگین قطر حجمی در مقادیر مختلف لستین (۲۰، ۴۰، ۷۵، ۱۰۰، ۱۵۰ و ۲۰۰ میلی گرم) و بازه های زمانی ۷، ۱۵ و ۳۰ روز، به کمک معادله ۱ معین شد. تمام نمونه ها در سه تکرار اندازه گیری شدند.

رابطه (۱)

$$\bar{D}[\xi, \zeta] = \frac{\sum n_i d_i^\xi}{\sum n_i d_i^\zeta}$$

d_i : قطر ذرات؛ $\bar{D}[\xi, \zeta]$: میانگین قطر حجمی (میانگین حجم معادل)^۱؛ n_i : تعداد ذرات، d_i : قطر میانگین ذرات

اندازه گیری درصد درون پوشانی

برای تعیین غلظت بتاکاروتن کپسوله شده از اسپکتروفتومتری UV استفاده شد و حداکثر جذب در طول موج ۴۵۴ نانومتر اندازه گیری شد (Rauscher *et al.*, 1998). برای این منظور ابتدا غلظت های مختلفی از محلول بتاکاروتن-کلرفرم تهیه شد و با قرائت جذب در این غلظت ها، منحنی استاندارد رسم شد. نمونه ها به صورت بی تحرک روی میز قرار داده شدند به طوری که بتاکاروتن کپسوله نشده (آزاد) به علت اختلاف دانسیته با آب (۰/۹۶۱ گرم بر سانتی متر-مکعب) به سطح بیاید. سپس به کمک سمپلر از قسمت های درونی محلول (حاوی لیپوزوم) به میزان ۱ میلی لیتر برداشته شد سپس نمونه را برای تخریب لیپوزوم ها و آزاد شدن کاروتن کپسوله شده در کلرفرم

¹ De Broukere mean

و یا برهمکنشی رخ دهد در طول موجی جذب تغییر صورت می‌گیرد. در این پژوهش جهت تشخیص درون‌پوشانی بتاکاروتن در لیپوزوم‌ها و تعیین نوع برهمکنش‌ها (فیزیکی یا شیمیایی)، از FTIR استفاده شد. نمودار A در شکل ۱ نشان دهنده طیف فروسرخ مربوط به بتاکاروتن است. پیک‌های cm^{-1} ۹۵۰، ۲۹۱۰، ۳۸۵۰ نشان‌دهنده حضور پیوندهای آلکن (C=H) جایگزین شده در این ماده بوده و پیک‌های cm^{-1} ۱۵۸۷ و cm^{-1} ۱۶۸۰ نشان‌دهنده دو گروه آروماتیک موجود در بتاکاروتن است. پیک موجود در cm^{-1} ۱۴۷۵ نشان‌دهنده گروه عاملی CH_2 بوده و طیف‌های خمشی cm^{-1} ۱۳۲۲ نشان‌دهنده گروه‌های عاملی CH_3 روی حلقه است. نمودار B نشان‌دهنده طیف فروسرخ لستین خالص می‌باشد. در ساختار این ماده گروه‌های عاملی آلکان‌ها به صورت کششی است که در اعداد موجی cm^{-1} ۲۸۱۰ و ۲۹۲۳ مشاهده می‌شود. محدوده cm^{-1} ۲۸۰۰ تا ۳۲۰۰ مربوط به گروه عاملی متیل بوده و نیز cm^{-1} ۳۵۰۰ گروه عاملی آمین لستین است، همچنین عدد موجی cm^{-1} ۱۴۶۵ مربوط به ارتعاش خمشی CH_2 موجود در لستین و عدد موجی cm^{-1} ۱۷۴۰ مربوط به استر آلیفاتیک (ارتعاش کششی گروه عاملی C=O) است. ارتعاشات کششی گروه عاملی PO_2 موجود در ساختار لستین نیز در طیف cm^{-1} ۱۲۰۰ مشاهده می‌شود (Kuligowski *et al.*, 2008).

جریانی محلول لیپوزومی حاوی بتاکاروتن در غلظت‌های متفاوت لستین در دماهای نگهداری ۴ و ۲۵ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ ماه و نمونه‌های تهیه شده در ۴ درجه سانتی‌گراد به مدت ۱ شبانه روز نگهداری شده و مورد ارزیابی قرار گرفتند. برای اندازه‌گیری تنش برشی و گرانیروی به صورت تابعی از سرعت برشی و تعیین نوع رفتار جریانی نمونه‌ها، در یک فاصله زمانی ۱۰ دقیقه، سرعت برشی از ۲ تا ۱۰۰ بر ثانیه رسید (Heurtault *et al.*, 2003).

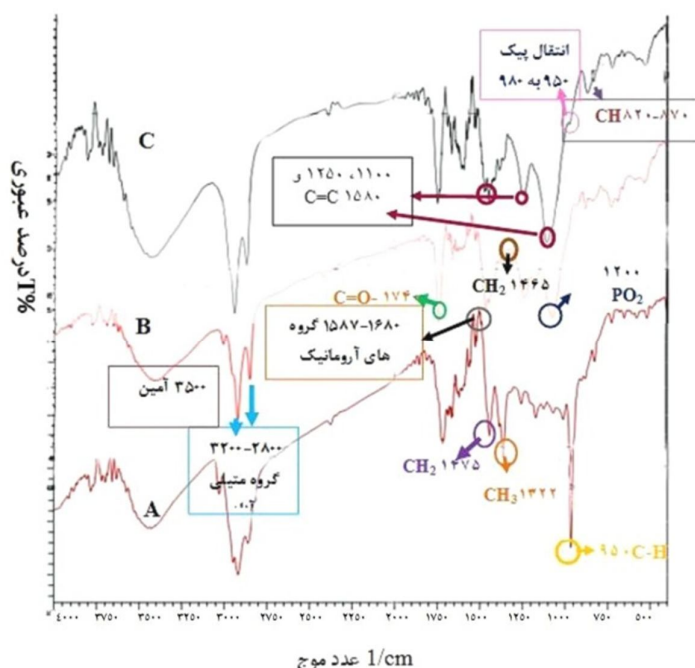
تحلیل آماری

همهٔ آزمون‌ها در سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شدند. تحلیل و ارزیابی (ANOVA) با استفاده از مدل خطی (G.L.M) نرم‌افزار آماری SPSS (Version 16.0 for Windows, SPSS Inc) در سطح احتمال ۹۵ درصد ($P < 0.05$) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای تأیید وجود اختلاف بین میانگین‌ها انجام گرفت.

بحث و نتایج

طیف‌سنجی فروسرخ (FTIR)

با توجه به این که گروه‌های عاملی دارای جذب در فرکانس‌ها و طول‌های موجی مشخصی هستند، در صورتی که در ساختار ترکیبات تغییرات صورت گیرد



شکل ۱- طیف‌های FTIR: بتاکاروتن (A)، لستین (B)، نانولیپوزوم‌های حامل بتاکاروتن (C)

برهمکنش‌های ضعیف فیزیکی بین این ماده و فسفولیپید در لیپوزوم‌ها برقرار شده است. همچنین در تحقیق دیگری به وسیله Rudra و همکاران (۲۰۱۰)، گزارش شد که بین دکسوروبسین (یک نوع دارو) و فسفاتیدیل اتانول آمین در نانولیپوزوم‌های حاوی دکسوروبسین پیوندهای هیدروژنی ضعیف و برهمکنش‌های دی‌پل-دی‌پل و واندراالسی بین اجزا و ماده فعال تشکیل شده و هیچ تغییر قابل ملاحظه‌ای از قبیل ایجاد پیک جدید و تغییر مکان عمده در پیک‌ها صورت نگرفته و به این ترتیب هیچ برهمکنش شیمیایی وجود ندارد.

بررسی پایداری اندازه ذرات

در شکل ۲ تغییر اندازه ذرات لیپوزومی حاوی بتا-کاروتن (بدون گامااوریزانول) طی نگهداری به مدت یک ماه در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد در غلظت‌های مختلف لستین (نسبت متفاوت لستین به بتاکاروتن) ارائه شده است. همانطور که مشاهده می‌شود در غلظت‌های پایین لستین (نمونه B, A) اندازه اولیه ذرات بالای ۶۰۰ نانومتر بوده و تغییرات قابل ملاحظه‌ای بین زمان‌های نگهداری مختلف رخ نداد.

با توجه به شکل ۱ همچنین مقایسه نمودار A و C که طیف فروسرخ مربوط به نانولیپوزوم‌های حاوی بتا-کاروتن می‌باشد، می‌توان سه تغییر در طیف فروسرخ (حضور پیک جدید یا انتقال پیک‌های اصلی) را بدست آورد. پیک شاخص 950 cm^{-1} (گروه آلکن) موجود در بتاکاروتن بسیار ضعیف گشته و در نانولیپوزوم در 980 cm^{-1} مشاهده می‌گردد و پیک 1322 cm^{-1} بتاکاروتن (گروه CH_3) حذف شده است. پیک‌های مربوط به اعداد موجی 1068 cm^{-1} (گروه آلکل)، 1238 cm^{-1} (گروه فسفات) موجود در لستین به ترتیب به 1100 cm^{-1} و 1250 cm^{-1} انتقال یافته و نیز در 1580 cm^{-1} پیک تیز جدیدی ایجاد شده است که می‌تواند مربوط به آلکن مزدوج (C=C) باشد. این تغییرات دلیل بر برهمکنش‌های شیمیایی بین بتاکاروتن و لستین علاوه بر برهمکنش‌های فیزیکی است. در تحقیق صورت گرفته به وسیله Lu و همکاران (۲۰۱۱)، پلی‌فنول‌های چای و لستین و لیپوزوم‌های حاوی فنول‌ها مورد مقایسه قرار گرفت. حضور پلی‌فنول‌ها با چندین پیک اصلی پلی‌فنول‌های چای در اسپکتروم IR نشان دهنده حضور این ماده در لیپوزوم‌ها بود. به علت عدم حضور پیک‌های جدید در نانولیپوزوم‌ها نتیجه گرفته شد که

عوامل مختلفی همانند نسبت فسفولیپید به ماده فعال کپسوله‌شده، نوع و غلظت پایدارکننده (ترکیبات پلیمری یا استرول‌ها) و دما می‌توانند بر اندازه ذرات و پایداری آنها در طول زمان مؤثر باشند. پلی‌اتیلن گلیکول علاوه بر عمل به‌عنوان یک حلال، می‌تواند به‌عنوان یک سورفاکتانت غیریونی پلیمری در سطح غشا عمل کرده و ممانعت فضایی را افزایش داده و موجب پایداری اندازه ذرات گردد. Mohammad Hasani و همکاران (۲۰۱۳)، کاهش اندازه ذرات را در لیپوزوم‌های تولیدشده به روش حرارتی با افزایش غلظت فسفولیپید از ۱۰۰ میلی‌گرم به ۵۰۰ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر گزارش کردند، در حالی که Alexander و همکاران (۲۰۱۲) افزایش اندازه ذرات لیپوزومی حاوی فیتواسترول تهیه شده با روش هموژنیزاسیون فشار بالا را با افزایش غلظت لستین گزارش دادند. در نمونه‌های حاوی فیتواسترول گاما‌اوریزانول نیز افزایش اندازه ذرات در طول زمان نگهداری به غلظت لستین وابسته بود و در غلظت‌های پایین، افزایش اندازه ذرات معنی‌دار نبود در صورتی که در غلظت‌های بالاتر به ویژه در روز ۳۰ام، افزایش اندازه بیشتر مشهود بود (شکل ۳). البته نمونه‌های حاوی گاما‌اوریزانول، دچار افزایش اندازه به مراتب کمتری نسبت به نمونه‌های بدون آن شدند (مقایسه شکل ۲ و ۳). گاما‌اوریزانول همانند کلسترول می‌تواند موجب افزایش سفتی غشا و افزایش دافعه الکترواستاتیک (پتانسیل‌زتا) گردد و در نتیجه موجب کاهش انبوهش و هم‌آمیختگی ذرات شود. Mohammad Hasani و همکاران (۲۰۱۳) با استفاده از روش حرارتی بهینه شده نانولیپوزوم‌های حامل گاما‌اوریزانول را تهیه کردند که در طول زمان نگهداری اندازه ذرات نمونه‌ها پایداری زیادی داشت که این را به خواص استرولی گاما‌اوریزانول نسبت دادند. بر خلاف این تحقیق، Alexander و همکاران (۲۰۱۲) افزایش اندازه ذرات لیپوزوم حاوی ویتامین C را با افزایش غلظت فیتواسترول‌های آب‌دوست و آب-گریز گزارش کردند. Schuler و همکاران (۱۹۹۰) به جای کلسترول از سیتواسترول و کامپسترول در غشا ویزیکول‌ها استفاده کردند و نتیجه گرفتند که حضور این مواد باعث بهبود ویژگی‌های فیزیکی غشا و چیدمان غشای دولایه فسفولیپیدها شدند.

در غلظت‌های بالاتر لستین (C, D, E, F) اندازه ذرات اکثراً زیر ۱۰۰ نانومتر بودند و در طی ۱۵ روز، افزایش اندازه معنی‌داری رخ نداد ولی در طول زمان ۳۰ روز نگهداری دچار افزایش معنی‌داری ($P < 0.05$) شدند. اگرچه اندازه نمونه‌ها زیر ۵۰۰ نانومتر باقی ماند.

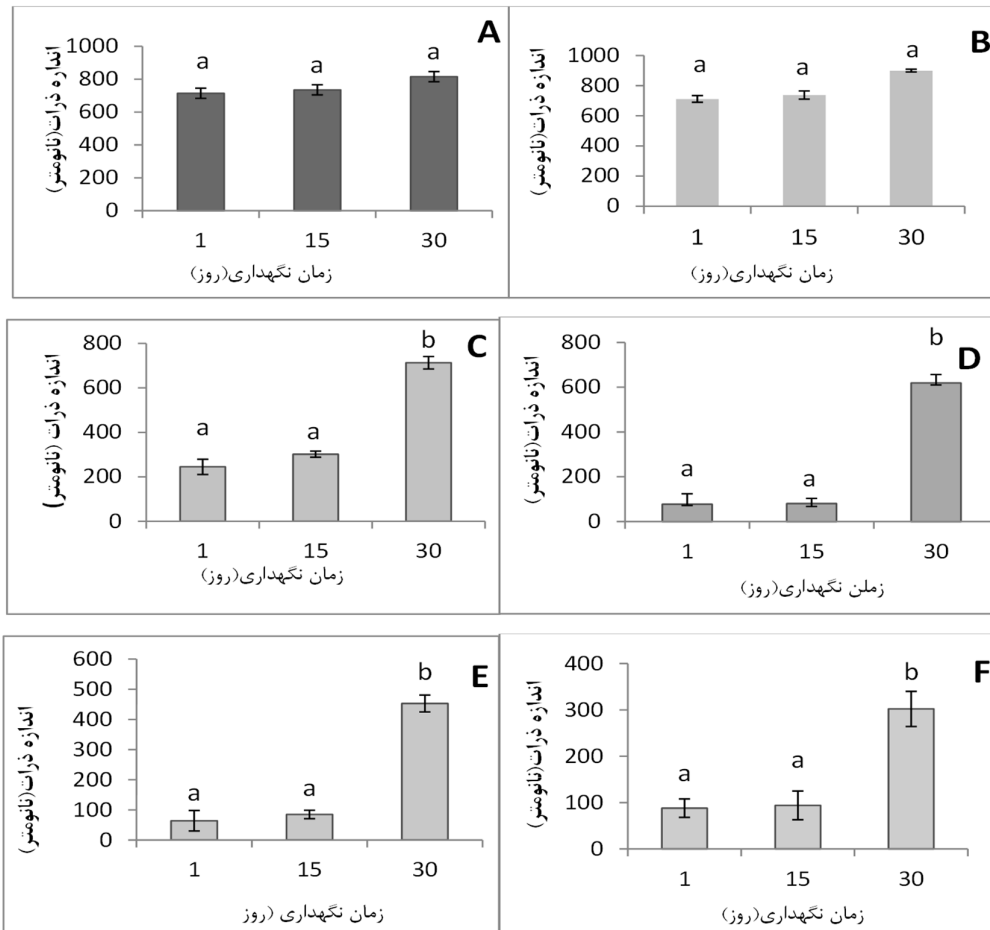
احتمالاً در غلظت‌های بالای لستین، با وجود اندازه ذرات کوچک‌تر اولیه، تعداد ذرات تشکیل شده بیشتر است. به علت اینکه در طول زمان بین ذرات برخورد-هایی صورت می‌گیرد (این برخوردها به علت حرکات تصادفی ذرات (براونی) در محلول و یا به دلیل جابه‌جایی‌های ذرات بر روی یکدیگر می‌باشند) امکان انبوهش^۱ و هم‌آمیختن^۲ ذرات در طول زمان افزایش می‌یابد و اندازه ذرات با گذشت زمان بیشتر شده و ویزیکول‌های بزرگ‌تری تشکیل می‌شوند. همانند امولسیون‌ها، احتمال تصادم لیپوزوم‌ها، بستگی به برهمکنش کلئیدی بین ذرات دارد (McClements, 2005; Taylor et al., 2005; Taylor et al., 2007).

در صورت پیشرفت فرایند انبوهش، لیپوزوم‌ها با هم آمیخته شده و لیپوزوم‌های بزرگ‌تر را ایجاد می‌نمایند (Heurtault et al., 2003). به این ترتیب اندازه ذرات و میزان رهایش مواد کپسوله نیز افزایش می‌یابد. نوع تفکیک گرانشی (رونشینی یا ته‌نشینی) گردد و بنابراین جلوگیری از آن در سیستم‌های کلوییدی از اهمیت بالاتری برخوردار است. همچنین بزرگ‌تر شدن برخی از ذرات و کوچک‌ماندن برخی دیگر موجب ایجاد شیب غلظت شده و ناپایداری از نوع اسوالد رایپینگ^۳ رخ می‌دهد که طی آن، مولکول‌ها از ذرات کوچک به ذرات بزرگ مهاجرت می‌کنند و رفته رفته ذرات کوچک‌تر از بین رفته و ذرات بزرگ، بزرگ‌تر می‌گردند. با توجه به نزدیکی دانسیته لیپیدهای قطبی به آب، تفکیک گرانشی در لیپوزوم‌ها نسبت به امولسیون‌ها با شدت کمتری رخ می‌دهد ولی ناپایداری‌های دیگر از نوع اسوالد رایپینگ و هم‌آمیختگی امکان بیشتری دارند.

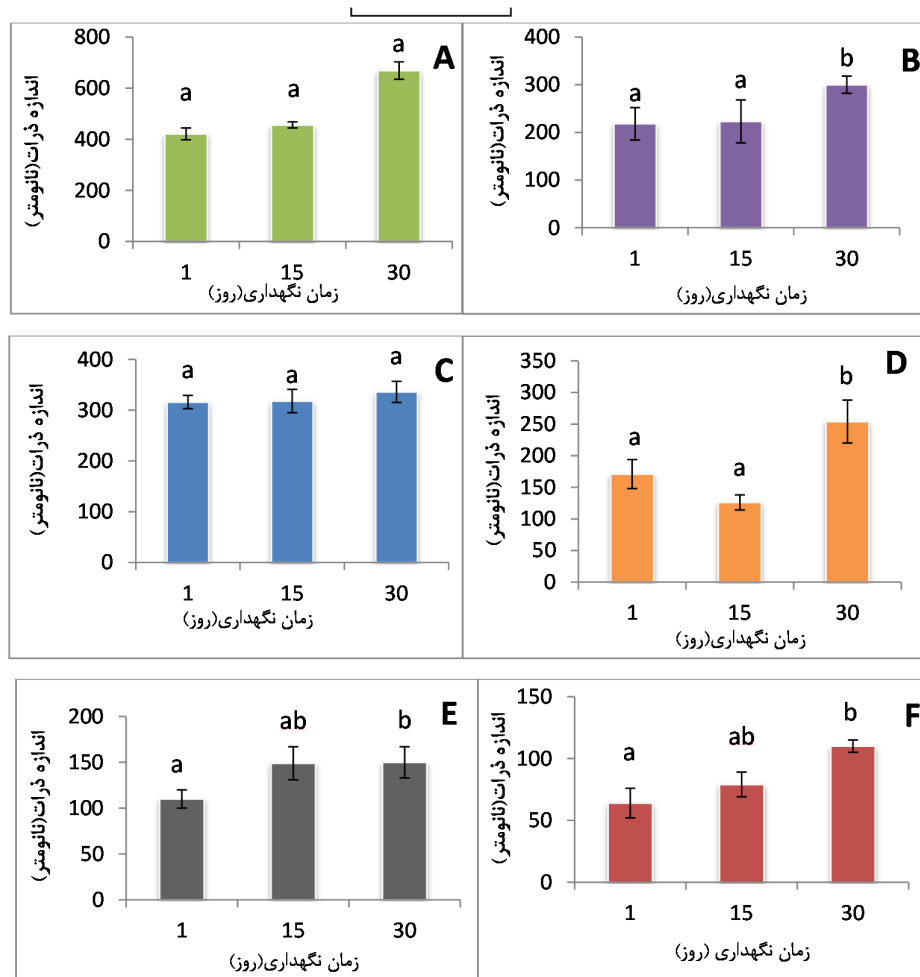
¹ Flocculation

² Coalescence

³ Ostwald ripening



شکل ۲- تأثیر زمان نگهداری (۱، ۱۵ و ۳۰) بر اندازه ذرات لیپوزومی در غلظت‌های مختلف بتاکاروتن به لستین در نمونه‌های بدون گاما‌اوریزانول A: ۱ به ۵، B: ۱۰ به ۱۰، C: ۲۰ به ۲۵، D: ۲۵ به ۴۰، E: ۴۰ به ۵۰، F: ۵۰ به ۱۰۰ (حروف غیرمشابه نشان‌دهنده وجود اختلاف در سطح ۵ درصد در آزمون دانکن است).



شکل ۳- تأثیر زمان نگهداری (۱، ۱۵ و ۳۰) بر اندازه ذرات لیپوزومی در غلظت‌های مختلف بتاکاروتن به لستین در نمونه‌ها با گاما‌اوریزانول A: ۱ به ۵، B: ۱۰ به ۲۰، C: ۲۰ به ۲۵، D: ۲۵ به ۴۰، E: ۴۰ به ۵۰، F: ۵۰ به ۱۰۰. (حروف غیرمشابه نشان‌دهنده وجود اختلاف در سطح ۵ درصد در آزمون دانکن است).

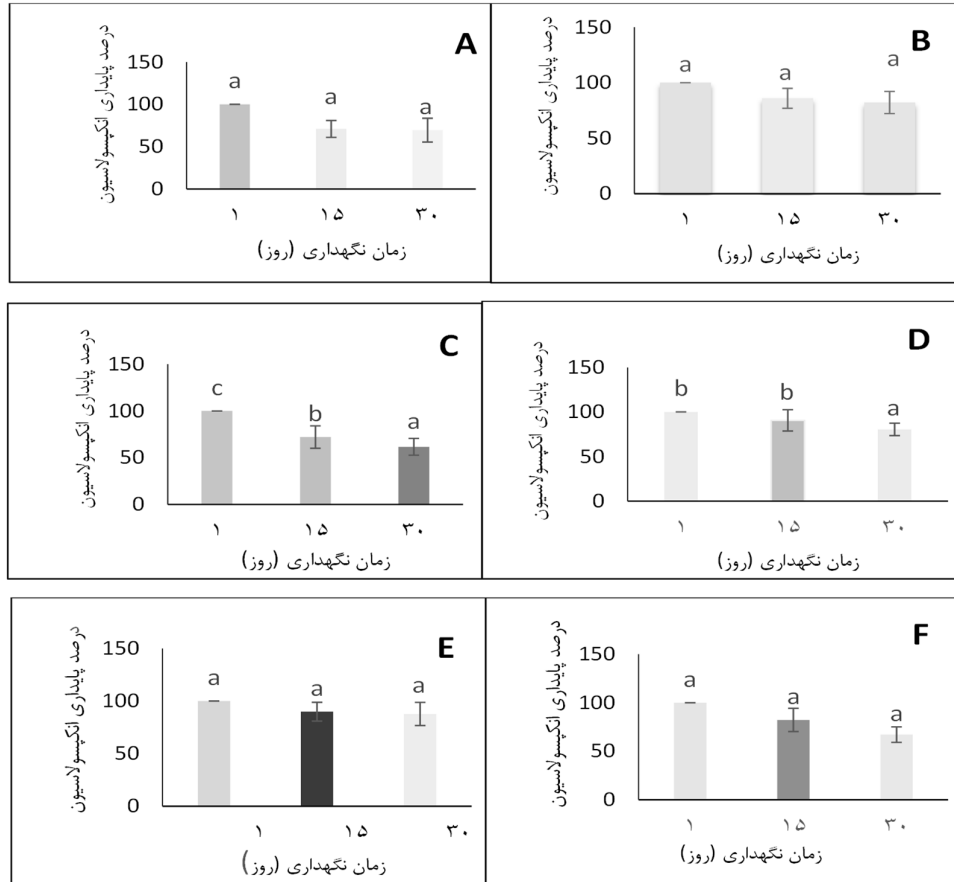
بررسی پایداری انکپسولاسیون

زمان اختلاف معنی‌داری در پایداری درصد درون-پوشانی بدست آمد که می‌توان به این صورت بیان کرد که در این غلظت‌ها درصد درون‌پوشانی نسبت به غلظت‌های پایین لستین، بالا بوده اما به علت عدم وجود لستین کافی برای پوشش بتاکاروتن، به مرور زمان درصد درون‌پوشانی کاهش می‌یابد و یا می‌توان به توزیع ذرات ناهمگن در این غلظت‌ها نسبت داد که مولکول‌های ذرات کوچک به سمت ذرات بزرگ‌تر کشیده شده و ناپایداری از نوع اسوالد رایپینگ رخ می‌دهد و لیپوزوم‌های بزرگ‌تر را ایجاد می‌نمایند.

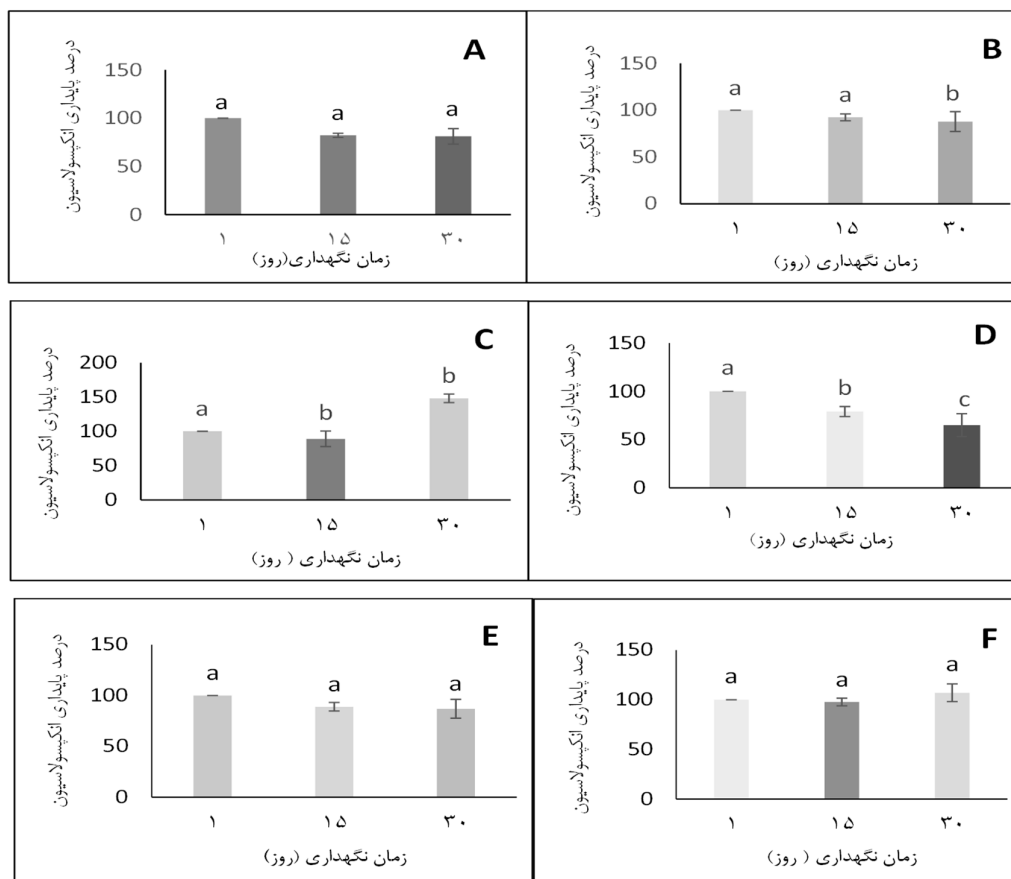
با توجه به شکل ۴، در نمونه‌ها با غلظت‌های ۴۰، ۱۵۰، ۲۰۰ و ۲۰ میلی‌گرم لستین در غلظت ثابت بتا-کاروتن (۴ میلی‌گرم) بین روزهای ۱، ۱۵ و ۳۰ اختلاف معنی‌داری در درصد درون‌پوشانی وجود ندارد به طوری که درصد درون‌پوشانی این نمونه‌ها از ۱۸٪، ۲۶٪، ۸۹/۷۷٪ و ۸۸/۶۶٪ به ترتیب به ۱۳٪، ۲۹/۱۸٪، ۶۹/۴۳٪ و ۷۵/۱۵٪ رسیده است. بنابراین نمونه‌های حاصل در طول زمان نسبت به رهایش مقاوم بودند. اما در غلظت‌های ۷۵ و ۱۰۰ میلی‌گرم لستین، در طول

فروپاشی لیپوزومها و رهاسازی بتاکاروتن می شوند (Heurtault *et al.*, 2003).

همانطور که در شکل ۲ نیز مشاهده می شود در این غلظت ها اندازه ذرات، افزایش می یابد، به این ترتیب میزان رهایش مواد کپسوله نیز افزایش می یابد و باعث



شکل ۴- پایداری درون پوشانی در طول زمان نگهداری در غلظت های مختلف بتاکاروتن به لستین A: ۱ به ۵ ، B: ۱ به ۱۰ ، C: ۱ به ۲۰ ، D: ۱ به ۲۵ ، E: ۱ به ۴۰ و F: ۱ به ۵۰ نمونه های بدون گاما اوریزانول (حروف غیر مشابه نشان دهنده وجود اختلاف در سطح ۵٪ در آزمون دانکن است).



شکل ۵- پایداری درون پوشانی در طول زمان نگهداری در غلظت‌های مختلف بتاکاروتن به لستین A: ۱ به ۵، B: ۱ به ۱۰، C: ۱ به ۲۰، D: ۱ به ۲۵، E: ۴۰ و F: ۱ به ۵۰ نمونه‌های با گاما‌اوریزانول (حروف غیرمشابه نشان دهنده وجود اختلاف در سطح ۵٪ در آزمون دانکن است).

نمی‌شوند و با حرکات برآونی به صورت معلق شناور می‌گردند. در صورت برخورد با یکدیگر می‌توانند ماده فعال را از حالت کپسوله خارج کنند. اگر ماده فعال تمایل زیادی به خروج از ساختار لیپوزومی داشته باشد، با اصلاح ساختار غشا می‌توان مانع آن شد (Brandl, 2001). در این تحقیق جهت افزایش پایداری غشا از فیتواسترول گاما‌اوریزانول استفاده شد. شکل ۵ بیانگر عدم وجود اختلاف معنی‌دار در پایداری درون پوشانی در بیشتر غلظت‌های لستین، در روزهای ۱، ۱۵ و ۳۰ است و به مرور زمان، درصد درون پوشانی برای بتاکاروتن کاهش پیدا نکرده است. احتمالاً حضور گاما‌اوریزانول در غشا، آن را نسبت به تبادلات حلال-های هیدروفیلی مقاوم می‌کند و به این ترتیب باعث افزایش پایداری غشای لیپوزوم‌ها می‌شود (Alexander

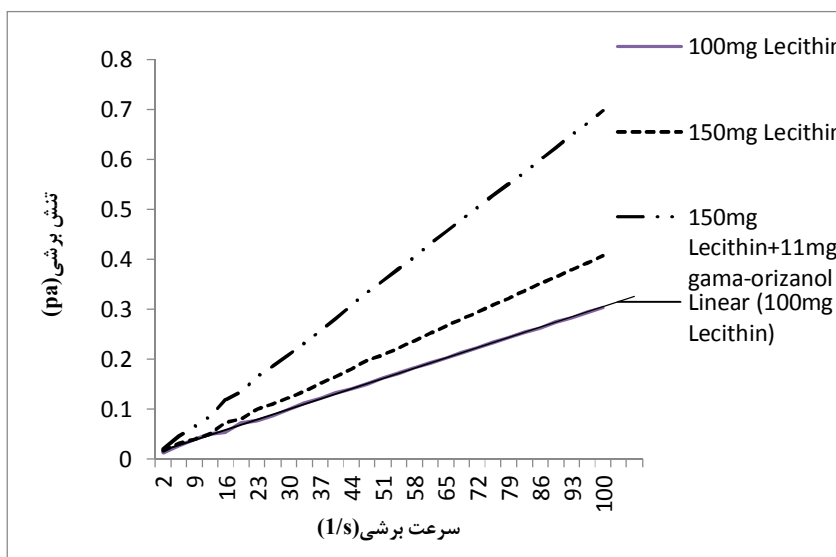
Rasti و همکاران (۲۰۱۲)، پایداری لیپوزوم‌ها و نانولیپوزوم‌های حاوی امگاسه تولیدشده به روش هیدراسیون لایه را بررسی کردند. آنها گزارش کردند که طی ۷ روز در دمای ۴- درجه سانتی‌گراد، تغییر ناچیزی در اندازه ذرات و درصد درون پوشانی امگاسه رخ داد. لیپوزوم‌ها از نظر ترمودینامیکی ناپایدار هستند و در طی زمان تمایل به ادغام و رهایش ماده کپسوله دارند. با قرار گرفتن ترکیبات فعال در غشا احتمالاً چیدمان غشای لیپیدی منظم‌تر می‌شود و ساختار متراکم‌تری تشکیل می‌دهند به این ترتیب از تشکیل لخته و توده‌ای شدن سیستم‌های لیپوزومی جلوگیری شده و در طی نگهداری رهایش ترکیبات فعال به محیط صورت نمی‌گیرد. نانولیپوزوم‌ها به علت تفاوت ناچیز در دانسیته آنها با آب، در فاز پیوسته ته‌نشین

رفتار رئولوژیکی لیپوزوم‌های حاوی بتاکاروتن، مقادیر تنش‌برشی و ویسکوزیته به صورت تابعی از سرعت برشی، در فاصله زمانی ۱۰ دقیقه و سرعت‌برشی ۲-۱۰۰ بر ثانیه اندازه‌گیری شدند (شکل ۶ و ۷). شکل ۶ نشان‌دهنده وجود رابطه نسبتاً خطی و ساده‌ترین رفتار جریانی، یعنی رفتار نزدیک به نیوتونی است اگرچه نمودار ویسکوزیته-سرعت برشی و اندازه‌گیری شاخص جریان (n) رفتار سودوپلاستیک ضعیف را در سرعت‌های برشی پایین نشان می‌دهد. افزایش غلظت لستین و افزودن گاما‌اوریزانول موجب افزایش ویسکوزیته می‌شود. در این سیالات، شیب خط نمودار تنش‌برشی - سرعت برشی، ویسکوزیته را نشان می‌دهد، به طوری که با افزایش ویسکوزیته محلول، شیب منحنی افزایش می‌یابد. آب جزء غالب دیسپرسیونی لیپوزومی را تشکیل می‌دهد و دارای ویسکوزیته پایینی است. در این سیستم‌ها، ویسکوزیته فاز پراکنده نشان‌دهنده ویسکوزیته سیستم است.

(*et al.*, 2012). همچنین احتمالاً در این سیستم‌ها، به علت استفاده از PEG بالا جهت حل‌شدن بتاکاروتن، تمایل حل‌پذیری بتاکاروتن در PEG بیشتر از آب بوده، به مرور زمان بتاکاروتن‌های محیط به سمت PEG منتشر شده و راندمان درون‌پوشانی در برخی غلظت‌های لستین افزایش می‌یابد (Hua & Lin, 2007). احتمالاً دلیل افزایش درصد درون‌پوشانی این است که، با توجه به ساختار گاما‌اوریزانول که بخش OH فرولیک اسید آن با گروه کربونیل فسفو-لیپید پیوند هیدروژنی برقرار کرده، فضای کافی جهت درون‌پوشانی بتاکاروتن باقی مانده است (Mohammad Hasani *et al.*, 2013)

بررسی خواص رئولوژیکی پایا

در آزمون رئولوژیکی پایا، رفتار جریانی لیپوزوم‌های متشکل از غلظت‌های بهینه لستین (۱۰۰ و ۱۵۰ میلی‌گرم) به علت پایداری بالا در طول نگهداری و لستین-گاما‌اوریزانول بررسی شد. جهت پی‌بردن به

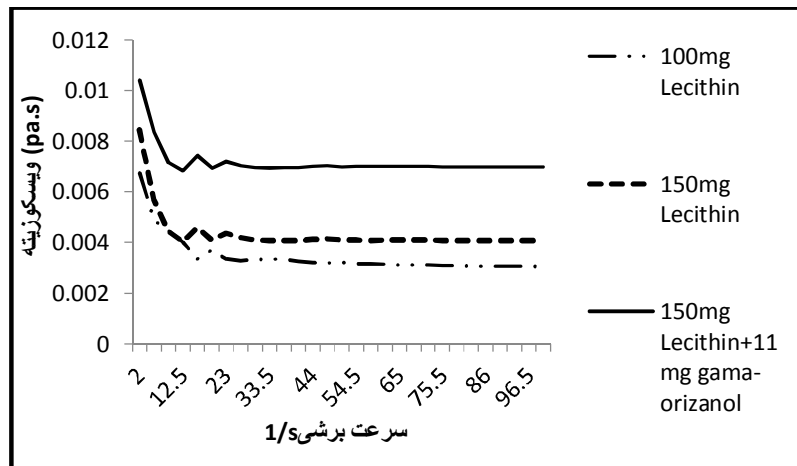


شکل ۶- نمودار تنش‌برشی-سرعت‌برشی برای غلظت‌های مختلف لیپوزوم‌ها با و بدون فیتواسترول

استفاده، خواص رئولوژیکی محلول غذایی را تحت تأثیر قرار نخواهند داد که در بسیاری از موارد از نظر ارگانولپتیکی مطلوب است. یکی از مدل‌هایی که برای تفسیر رفتار رئولوژیکی مورد استفاده قرار می‌گیرد قانون توان می‌باشد. در جدول ۱، مقادیر شاخص جریان (n) و ضریب قوام (K) بدست آمده از مدل قانون توان و همچنین ضریب تبیین (R^2) برای تمام نمونه‌های آزمایشی با درصدهای مختلف، ارائه شده است. ضریب تبیین برای اکثر نمونه‌های ارزیابی شده، بالای ۹۵ درصد بود که نشان‌دهنده مناسب بودن مدل قانون توان برای توصیف خصوصیات جریان محلول‌های نانولیپوزوم‌ها می‌باشد. شاخص جریان، با افزایش غلظت لستین کمتر شده و به عبارت دیگر، رفتار سودوپلاستیک‌تر شده است. از طرف دیگر با افزودن گاما‌اوریزانول، شاخص جریان به یک نزدیک‌تر شده و به رفتار نیوتنی شبیه‌تر شده است.

در تحقیقی که Grassi و همکاران (۲۰۰۶) روی ویژگی‌های رئولوژیکی سیستم‌های آبی آلزینات (پلی-اورونیک) حاوی لیپوزوم‌ها انجام دادند، اعلام نمودند که در غلظت‌های ۲۰ درصد پلی‌اورونیک، سیستم در دمای ۲۱ درجه سانتی‌گراد رفتار نیوتونی از خود نشان می‌دهد. مطابق شکل ۷، در سرعت‌های برشی پایین، افت شدیدی در ویسکوزیته نمونه‌های مختلف وجود دارد که به کاهش اصطکاک و به هم‌مسیر شدن ذرات فاز پراکنده و غلبه نیروی برشی بر نیروی براونی می‌توان نسبت داد. همچنین، نمودارهای ویسکوزیته-سرعت برشی نشان داد که در سرعت‌های بالاتر از ۲۰ بر ثانیه، ویسکوزیته به سرعت برشی وابسته نیست و افزایش سرعت برشی تأثیر چندانی بر ویسکوزیته محلول ندارد.

با توجه به رفتار شبه‌نیوتونی محلول‌های لیپوزومی در غلظت‌های مختلف لستین و حتی در حضور گاما-اوریزانول می‌توان به این نتیجه رسید که محلول‌های تهیه شده رقیق بوده و به غلظت و کسرحجمی بحرانی نرسیده‌اند و همچنین لیپوزوم‌ها در غلظت‌های مورد



شکل ۷- نمودار ویسکوزیته-سرعت برشی نانولیپوزوم‌ها برای غلظت‌های بهینه لستین با و بدون فیتواسترول

جدول ۱- پارامترهای محاسبه شده قانون توان در لیپوزم‌های حاوی بتاکاروتن

ضریب تبیین R ²	ضریب قوام (K) (mPa.s)	شاخص جریان (n)	فرمولاسیون مختلف
۰/۹۸	۶/۳۰	۰/۸۳	لستین ۱۵۰ میلی گرم
۰/۹۵	۶/۷۰	۰/۸۸	لستین ۱۰۰ میلی گرم
۰/۹۷	۹/۰	۰/۹۳	لستین ۱۵۰ میلی گرم + گاما اوریزانول ۱۱ میلی گرم

نتیجه‌گیری کلی

فعال فیتواسترولی است، علاوه بر عمل به‌عنوان یک ترکیب فراسودمند، می‌تواند به‌عنوان یک پایدارکننده بر افزایش کارایی و پایداری درون‌پوشانی نقش مثبتی داشته باشد.

به‌طور کلی به نظر می‌رسد که لیپوزم‌ها به‌طور بالقوه حامل مناسبی برای بتاکاروتن می‌باشند و کارایی درون‌پوشانی نسبتاً بالایی برای بتاکاروتن نشان می‌دهند. همچنین گاما اوریزانول، که یک ترکیب زیست-

منابع

- ۱- قنبرزاده، ب.، الماسی، ه. و نیک‌نیا، ن. ۱۳۹۲، شیمی و فیزیک سیستم‌های کلونیدی و محلول‌های بیوپلیمری غذایی، فصل اول، انتشارات دانشگاه صنعتی شریف.
- ۲- محمد حسنی، ز.، قنبرزاده، ب.، همیشه‌کار، ح. و رضایی مکرّم، رضا. ۱۳۹۲. تعیین ویژگی‌های نانولیپوزوم‌های حامل گاما اوریزانول: توسط طیف‌سنجی فرورسرخ، اندازه وزیکول، پتانسیل زتا، پایداری فیزیکی و رئولوژی پایا نشریه پژوهش‌های علوم و صنایع غذایی ایران، ۱۰ (۱): ۱-۱۷.
- ۳- محمدی، م.، قنبرزاده، ب.، همیشه‌کار، ح. و رضایی مکرّم، ر. ۱۳۹۲. ویژگی‌های فیزیکی نانولیپوزوم‌های حامل ویتامین D تولید شده به روش هیدراسیون ارزیابی لایه نازک-سونیکاسیون. مجله علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران، ۸ (۴): ۱۷۵-۱۸۸.
- 4- Alexander, M., Acero Lopez, A., Fang, Y., & Corredig, M. 2012. Incorporation of phytosterols in soy phospholipids nanoliposomes: Encapsulation efficiency and stability. *Food Science and Technology*, 47: 427-436.
- 5- Aanrjan, N., Miehosseini, H., Bahrani, B.S., & Tan, C.P. 2011. Effect of processing conditions on physicochemical properties of sodium caseinate-stabilized astaxanthin nanodispersions. *Food Science and Technology*, 44: 1658-1665.
- 6- Bang, H.S., Hwang, I.C., Yu, Y.M., Kwon, H.R., Kim, D.H., & Park, H.J. 2011. Influence of chitosan coating on the liposomal surface on physicochemical properties and the release profile of nanocarrier systems. *Journal of Microencapsulation*, 28 (7): 595-604.
- 7- Bouaraba, L., Maherania, B., Kheiolomoom, A., Hasana, M., Aliakbarianc, B., Lindera, M., & Arab-Tehranya, E. 2014. Influence of lecithin-lipid composition on physico-chemical properties of nanoliposomes loaded with a hydrophobic molecule. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 115: 197-204.
- 8- Brandl, M. 2001. Liposomes as drug carriers , A technological approach. *Biotechnology Annual Review*, 7: 59-85.

- 9- Chan, Y.H., Chen, B.H., Chiu, C.P., & Lu, Y.F. 2004. The influence of phytosterols on the encapsulation efficiency of cholesterol liposomes. *International Journal of Food Science and Technology*, 39: 985–995.
- 10- Fathi, B., Mozafari, M., & Mohebbi, M. 2011. Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trend in Food Science and Technology*, 23: 1-15.
- 11- Gibis, M., Rahn, N., & Weiss, J. 2013. Physical and oxidative stability of uncoated and chitosan-coated liposomes containing grape seed extract. *Pharmaceutics*, 5: 421-433.
- 12- Grassi, G., Crevatin, A., Farra, R., Guarnieri, G., Pascotto, A., Rehimers, B., Lapasin, R., & Grassi M. 2006. Rheological properties of aqueous Pluronic–alginate systems containing liposomes. *Journal of Colloid and Interface Science*, 301: 282–290.
- 13- Heurtault, B., Saulnier, P., Pech, B., Proust, J.E., & Benoit, J.P. 2003. Physicochemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials*, 24: 4283-4300.
- 14- Hua, W., & Liu, T. 2007. Preparation and properties of highly stable innocuous niosome in Span 80/PEG 400/H₂O system. *Colloids and Surfaces A: Physicochem*, 302: 377–382.
- 15- Hwang, S.Y., Kim, H.K., Choo, J., Seong, G.H., Hien, T.B.D., & Lee, E.K. 2012. Effects of operating parameters on the efficiency of liposomal encapsulation of enzymes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 94: 296– 303.
- 16- Hwang, I.S., Tasi, Y., & Chiang, K. 2010. The feasibility of antihypertensive oligopeptides encapsulated in liposomes prepared with phytosterols β -sitosterol or stigmasterol. *Food Research International*, 43: 133-19.
- 17- Keller, B.C. 2001. Liposomes in nutrition. *Trends in Food Science and Technology*, 12: 25– 31.
- 18- Kuligowski, J., Quintas, G., Garrigues, S., & Guardia, M. 2008. Determination of lecithin and soybean oil in dietary supplements using partial least squares-Fourier Transform infrared spectroscopy. *Talanta*, 77: 229-234.
- 19- Liu, N., & Park, H.J. 2010. Factors effect on the loading efficiency of vitamin C loaded chitosan-coated nanoliposomes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 76: 16–19.
- 20- Lu, Q., Li, D.C., & Jiang, J.G. 2011. Preparation of a tea polyphenol nanoliposome system and its physicochemical properties. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 59: 13004–13011.
- 21- Malheiros, P.S., Dariot, D.J., & Brandelli, A. 2010. Food applications of liposome-encapsulated antimicrobial peptides. *Trends in Food Science and Technology*, 21: 284-292.
- 22- Marsanasco, M., M´arquez, A.L., Wagner, J.R., Alonso, S.V., & Chiaramoni, N.S. 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: 3039-3046.
- 23- McClements, D. J. 2005. Food emulsions: Principles, practices, and techniques, *Colloidal interactions*, CRC. pp: 53-93.
- 24- Mohammadi, M, Ghanbarzadeh, B., Hamishehkar, H., Rezayi Mokarram, R., & Mohammadifar, M. 2014. Physical properties of vitamin D₃-loaded nanoliposomes prepared by thin layer hydration-sonication. *Iranian Journal of Nutrition Science and Food Technology*, 8 (4): 175-188.
- 25- Mozafari, M.R. 2005. Liposomes: an overview of manufacturing techniques. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 10: 711–719.

- 26- Mozafari, M.R., Khosravi-Darani, K., Borazan, G.G., Cui, J., Pardakhty, A., & Yurdugul, S. 2008. Encapsulation of food ingredients using nanoliposome technology. *International Journal of Food Properties*, 11: 833-844.
- 27- Mozafari, M.R., Johnson, Ch., Hotziantoniou, S., & Demetzos, C. 2008. Nanoliposomes and their applications in food nanotechnology. *Journal of Liposome Research*, 18: 309-327.
- 28- Nacke, C., & Schrader, J. 2011. Liposome based solubilisation of carotenoid substrates for enzymatic conversion in aqueous media. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 71: 133-138.
- 29- Rasti, B., Jinap, E., Mozafari, M.R., & Yazid, A.M. 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: 2761-2770.
- 30- Rauscher, R., Edenharder, R., & Platt, K.L. 1998. In vitro antimutagenic and in vivo anticlastogenic effects of carotenoids and solvent extracts from fruits and vegetables rich in carotenoids. *Mutation Research*, 413: 129-142.
- 31- Rudra, A., Deepa, R.M., Ghosh, M.K., Ghosh, S., & Mukherjee, B. 2010. Doxorubicin-loaded phosphatidylethanolamineconjugated nanoliposomes: in vitro characterization and their accumulation in liver, kidneys, and lungs in rats. *International Journal of Nanomedicine*, 5: 811-823.
- 32- Sagalowics, L., & Leser, M. 2010. Delivery systems for liquid food products. *Current Opinion in Colloid and Interface Science*, 15: 61-72.
- 33- Suh, M., Yoo, S.H., & Lee, H.G. 2007. Antioxidative activity and structural stability of microencapsulated gamma-Oryzanol in heat-treated lards. *Food Chemistry*, 6: 1065-1070.
- 34- Schuler, I., Duportail, G., Glasser, N., Benveniste, P., & Hartmann, M. A. 1990. Soybean phosphatidylcholine vesicles containing plant sterols: a fluorescence anisotropy study. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Biomembranes*, 1028 (1): 82- 88.
- 35- Seetapan, N., Bejrapha, P., Srinuanchai, W., Puttipipatkachorn, S., & Ruktanonchai, U. 2010. Nondestructive rheological measurement of aqueous dispersions of solid lipid nanoparticles: effects of lipid types and concentrations on dispersion consistency. *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 36(9): 1-11.
- 36- Tan, H. W., & Misran, M. 2012. Characterization of fatty acid liposome coated with low-molecular-weight chitosan. *Journal of Liposome Research*, 22 (4): 329-335.
- 37- Taylor, T.M., Davidson, P.M., Bruce, B., & Weiss, J. 2005. Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45: 587-605.
- 38- Taylor, T.M., Gaysinsky, S., Davidson, P.M., Bruce, B.D., & Weiss, J. 2007. Characterization of antimicrobial bearing liposomes by zeta-potential, vesicle size and encapsulation efficiency. *Food Biophysics*, 2: 1-9.
- 39- Viriyaroj, A., Ngawhirunpat, T., Sukma, M., Akkaramongkolporn, P., Ruktanonchai, U., & Opanasopit P. 2009. Physicochemical properties and antioxidant activity of gamma-oryzanol-loaded liposome formulations for topical use. *Pharmaceutical Development and Technology*, 6: 665-671.
- 40- Xia, S., Xu, S., & Zhang, X. 2006. Optimization in the preparation of coenzyme Q10 nanoliposomes. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 17: 6358-6366.
- 41- Yin, L.J., Chu, B.S., Kobayashi I., & Nakajima, M. 2009. Performance of selected emulsifiers and their combinations in the preparation of β -carotene nanodispersions. *Food Hydrocolloids*, 23: 1617-1622.

-
- 42- Yurdugul, S., & Mozafari, M.R. 2004. Recent advances in micro- and nanoencapsulation of food ingredients. *Cellular and Molecular Biology Letters*, 9: 64–65.
- 43- Zalb, S., Navarro, I., Troconiz, I F., Ilarduya, C. T. & Garrido, M. 2012. Application of different methods to formulate PEG-liposomes of oxaliplatin: evaluation in vitro and in vivo. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 81: 273–280.

Beta-Carotene loaded nanoliposome: effects of gama –oryzanol on particle size stability and encapsulation

Sahra Bashiri¹, Babak Ghanbarzadeh^{2*}, Hamed Hamishekar³, Jalal Deghannya⁴

1- MSc. Graduated Student, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

2- Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

*Corresponding author (ghanbarzadeh@tabrizu.ac.ir)

3- Associated Professor, Department of Pharmaceutical Sciences, Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences, Iran

4- Associated Professor, Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

Abstract

Beta-carotene is one of the most important types of functional compounds, antioxidant and precursor of vitamin A which can be found in plant based products. The enrichment of food with beta carotene is difficult due to its hydrophobic nature and low stability. The encapsulation of β -carotene in a lipid carrier such as liposome is a method which potentially can reduce these problems. In this research, the β -carotene bearing liposomal system prepared using modified thermal method and Gama-oryzanol, as a phytosterols, was used to increase the stability of the liposome structure. Intending to ensure the capsulation of beta carotene in liposomes, functional groups and possible interaction between beta-carotene and lecithin was examined by infrared spectroscopy (FTIR) and peaks of 980 and 1580 cm^{-1} corresponding to the functional β -carotene, were observed in liposomes. Not only the particle size was obtained around 64 nm at different ratio of lecithin to β -carotene, but also it was below 500 nm during 30 days of storage time. Encapsulation efficiency of β -carotene at high concentrations of lecithin was % 77.25 and it declined to the %69.73 during storage. Using Gama-oryzanol in β -carotene bearing liposome increased the stability of particle size and encapsulation during the storage period.

Keywords: Beta-Carotene, Gama –oryzanol, Nanoliposome, Stability