

بهبود پایداری و قابلیت زیست‌دسترسی ویتامین D₃ در ساختار نانونیوزوم‌های طراحی شده با سورفاکتانت‌های مختلف

حمیده مقامی‌کیا¹، وحید حکیم‌زاده^{2*}، اکرم آریان‌فر²، قدیر رجب‌زاده³، مصطفی شهیدی نوقابی⁴

- 1- دانشجوی دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران
- 2- استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران
* نویسنده مسئول (v.hakimzadeh@iauq.ac.ir)
- 3- استاد، گروه نانوفناوری مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران
- 4- دانشیار، گروه شیمی مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران

تاریخ دریافت: 1399/08/06
تاریخ بازنگری: 1399/08/19
تاریخ پذیرش: 1399/08/21
تاریخ انتشار برخط: 1399/08/25

چکیده

باتوجه به ارزش بالای تغذیه‌ای ویتامین D₃ و ازطرفی ناپایداری آن در شرایط مختلف محیطی و فراوری، لزوم حفظ آن ازطریق تکنیک‌هایی مانند ریزپوشانی طی مغذی‌کردن مواد خوراکی با آن حس می‌شود. در این مطالعه ویتامین D₃ در ساختار نیوزوم‌های بر پایه سورفاکتانت‌های مختلف (اسپن 60، توئین 20 و 80) و کلسترول با نسبت‌های (80:20 و 60:40 وزنی/وزنی) با استفاده از روش هیدراسیون لایه نازک-سونیکاسیون انکپسوله شد. مشخص گردید که نیوزوم‌های تهیه‌شده با توئین 20 و 80 با نسبت سورفاکتانت به کلسترول (80:20 وزنی/وزنی) از کمترین میانگین اندازه ذرات، کمترین شاخص پراکندگی و بیشترین مقدار پتانسیل زتا برخوردار بودند. همچنین این نمونه‌ها از کارایی انکپسولاسیون بالا و اندازه‌ای در حدود مقیاس نانو بودند. تعیین پایداری ویتامین D₃ طی 1 ماه نگهداری در دمای یخچال برای نمونه‌های نانونیوزوم بر پایه توئین 20 و 80 با نسبت سورفاکتانت به کلسترول (80:20 وزنی/وزنی) صورت گرفت. نتایج نشان داد که نانونیوزوم‌های بر پایه توئین 20 پایداری بیشتری نسبت به نمونه‌های بر پایه توئین 80 طی 1 ماه نگهداری داشتند. همچنین قابلیت زیست‌دسترسی ویتامین D₃ پس از هضم کامل تحت شرایط شبیه‌سازی‌شده دستگاه گوارش مورد ارزیابی قرار گرفت. براین اساس مشخص شد که قابلیت زیست‌دسترسی ویتامین D₃ در حالت آزاد 58 درصد می‌باشد که طراحی نانونیوزوم‌های بر پایه توئین قابلیت زیست‌دسترسی آن را به‌طور معنی‌داری ($P < 0/05$) بهبود بخشید. به‌طوری‌که بیشترین قابلیت زیست‌دسترسی ویتامین D₃ برای نانونیوزوم‌های توئین 20 با نسبت سورفاکتانت به کلسترول (80:20 وزنی/وزنی) حاصل گردید.

واژه‌های کلیدی

انکپسولاسیون
دستگاه گوارش
قابلیت زیست‌دسترسی
نانونیوزوم
ویتامین D₃

دریافت کافی مواد مغذی، غذا-دارو، ویتامین‌ها و ترکیبات زیست‌فعال ازطریق رژیم‌های غذایی و یا مکمل‌های

مقدمه

امروزه بسیاری از افراد جامعه دچار مشکلات ناشی از عدم

(2014). این سیستم‌های رسانش هدفمند یکی از روش‌های نوین انکپسولاسیون می‌باشند که برای طیف گسترده‌ای از ترکیبات غذا-دارو نظیر ویتامین E (Basiri, Rajabzadeh, & Bostan, 2017)، کورکومین (Akbari et al., 2020)، اسید فولیک (Akbarzadeh, Yarak, Ahmadi, Chiani, & Nourouziyan, 2020)، اسانس‌ها (Eid, Essa, & El Khatoun et al., 2019) و غیره به کار می‌روند (Maghraby, 2017). عامل اصلی برای جذابیت استفاده از نیوزوم‌ها در مقایسه با سیستم‌های تحویلی دیگر نظیر لیپوزوم‌ها (سیستم‌های تحویلی دولایه بر پایه فسفولیپیدها) پایداری فیزیکی و شیمیایی بالاتر نیوزوم‌ها می‌باشد. به طوری که حساسیت لیپوزوم‌ها در مقایسه با نیوزوم‌ها در مقابل هیدرولیز آنزیمی، تخریب در pH پایین و اکسیداسیون و همچنین نور بیشتر می‌باشد. علاوه بر اینها نیوزوم‌ها زیست‌دسترسی به ترکیبات غذا-دارو را افزایش می‌دهد، پایداری آنها سبب رسانش و رهایش هدفمند ترکیبات بارگذاری شده می‌شود، هزینه پایین‌تری دارند و می‌توان طیف گسترده‌ای از ترکیبات را با ماهیت آمفیپلیک⁷، هیدروفیلیک⁸ و لیپوفیلیک⁹ در آنها به‌دام‌انداخت (Khoee & Yaghoobian, 2017; Mura, Pirot, Manconi, Falson, & Fadda, 2007).

با بررسی مطالعه‌های انجام‌شده، مشخص گردید چند مطالعه درمورد انکپسولاسیون ویتامین D₃ در ساختار نیوزوم‌ها صورت گرفته است (Estupiñán Sánchez, García, Manrique, Blanco López, Matos González, & Gutiérrez Cervelló, 2020; Talebi, Ghanbarzadeh, Hamishehkar, Pezeshki, & Ostadrahimi, 2021; Wagner, Spoth, Kourkoutis, & Rizvi, 2016). از آنجایی که تأثیر انواع مختلف سورفاکتانت‌های غیریونی با توازن آب‌دوستی و آب‌گریزی (HLB¹⁰) متفاوت و همچنین تأثیر استفاده از مقادیر مختلف کلسترول (به‌عنوان عامل پایدارکننده غشاهای دولایه نیوزوم‌ها) روی انکپسولاسیون ویتامین D₃ و همچنین قابلیت زیست‌دسترسی ویتامین D₃ تحت شرایط شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش از این ساختارها مورد مطالعه قرار نگرفته است. از این‌رو، در مطالعه حاضر تأثیر استفاده از سورفاکتانت‌های غیریونی مختلف (اسپن 60، توئین 20 و 80) و نسبت‌های مختلف سورفاکتانت به کلسترول (80:20 و 40:60) روی وضعیت

خوراکی می‌باشند. یکی از مشکلات جدی که طیف گسترده‌ای از زنان، بزرگسالان و افراد با رژیم غذایی فقیر را تهدید می‌نماید، بیماری‌های متابولیک استخوانی نظیر نرمی استخوان¹ و پوکی استخوان² می‌باشد (Brandão-Lima et al., 2007; Holick, 2019). علت اصلی این بیماری‌ها بیشتر ناشی از کمبود ویتامین D و کلسیم در رژیم غذایی و بدن می‌باشند. ویتامین D₃ یکی از انواع ویتامین D می‌باشد که به اصطلاح کلکلسیفرول³ نامیده می‌شود و هنگامی که پوست بدن در معرض تابش مستقیم نور خورشید قرار می‌گیرد این ویتامین تولید می‌گردد. نوع دیگری از ویتامین D وجود دارد که تحت عنوان ارگوکلسیفرول⁴ یا D₂ شناخته می‌شود که بیشتر منبع گیاهی و قارچی دارد (Goyal, Perisetti, Rahman, Levin, & Lippi, 2019; Valer-Martinez et al., 2019).

ویتامین D₃ نقش حیاتی را در سنتز استخوان، استحکام و سلامتی آن دارد، زیرا این ویتامین جذب کلسیم، منیزیم و فسفر را افزایش می‌دهد. بنابراین برای افراد مسن، زنان و افرادی که کمتر در معرض تابش مستقیم نور آفتاب می‌باشند جذب ویتامین D₃ از طریق رژیم غذایی بسیار حائز اهمیت می‌باشد (Holick, 2004). از این‌رو، غنی‌سازی داروها، محصولات غذایی و مکمل‌های غذایی و دارویی با ویتامین D می‌تواند پتانسیل قابل توجهی را برای افزایش سلامتی افراد جامعه ارائه دهد. با این وجود چالش جدی که روبروی غنی‌سازی این محصولات با ویتامین D₃ قرار دارد، عدم ناپایداری ویتامین D₃ در مقابل شرایط محیطی و نامساعد فراوری و همچنین حساسیت نسبت به نور و حرارت می‌باشد. بنابراین استفاده از تکنولوژی‌های نوین رسانش نظیر انکپسولاسیون می‌تواند راهی امیدوارکننده برای انتقال و تحویل هدفمند ترکیبات زیست‌فعال و غذا-دارو به بدن محسوب شود (Khan, Butt, Pasha, & Jamil, 2018; Winuprasith et al., 2020). وزیکول⁵‌های سورفاکتانتی غیریونی یا نیوزوم⁶‌ها سیستم‌های رسانش دولایه بر پایه سورفاکتانت‌های غیریونی مختلف می‌باشند که قادر به به‌دام‌اندازی ترکیبات محلول در چربی و محلول در آب هر دو می‌باشند (Moghassemi & Hadjizadeh, 2019).

¹ Osteomalacia

² Osteoporosis

³ Cholecalciferol

⁴ Ergocalciferol

⁵ Vesicle

⁶ Niosomes

⁷ Amphiphilic

⁸ Hydrophilic

⁹ Lipophilic

¹⁰ Hydrophile-Lipophile Balance

شاخص پراکندگی (PDI⁵) استفاده شد. نمونه‌های نیوزوم پس از صوت‌دهی و تهیه تا 10 برابر در دمای محیط رقیق شدند و در دستگاه فوق مورد آنالیز قرار گرفتند (Gharbavi *et al.*, 2020). به‌منظور تعیین پتانسیل زتای هرکدام از نمونه‌های نیوزوم بارگذاری‌شده با ویتامین D₃، از دستگاه زتاسایزر⁶ (HAS 3000, Malvern، ساخت انگلستان) استفاده شد (Hasan, 2014).

کارایی انکپسولاسیون

به‌منظور تعیین کارایی انکپسولاسیون ویتامین D₃ از روش Imam, Aqil, Ahad, Moghddam و Sultana (2016)، با کمی تغییرات استفاده شد. هرکدام از نیوزوم‌های بارگذاری‌شده با ویتامین D₃ (5 میلی‌لیتر) با 5 میلی‌لیتر ایزوپروپیل 50 درصد به آرامی و به‌طور کامل مخلوط شد. مخلوط حاصل به مدت 30 دقیقه در 15000 دور بر دقیقه در دمای محیط سانتی‌فیوژ (Sigma، 3-30K، ساخت آلمان) شد و سوپرناتانت (فاز رویی) و فاز پایینی از یکدیگر جدا شدند. سپس جذب فاز رویی در 264 نانومتر با اسپکتروفتومتر UV-Vis Shimadzu UV-VIS 1601، ساخت ژاپن) سنجیده شد. درنهایت با استفاده از رابطه (1) کارایی انکپسولاسیون ویتامین D₃ محاسبه شد.

رابطه (1)

$$\text{کارایی انکپسولاسیون (درصد)} = \frac{(C_t - C_s)}{C_t} \times 100$$

در رابطه (1)، C_t و C_s به ترتیب غلظت کل ویتامین D₃ و غلظت ویتامین D₃ موجود در سوپرناتانت می‌باشند.

پایداری ویتامین D₃ تحت شرایط آزمایشگاهی

به‌منظور پایداری ویتامین D₃ در ساختار نیوزوم‌های طراحی‌شده از روش Chanda, Das, Chakraborty و Ghosh (2011) با اندکی تغییر استفاده شد. از این رو، نمونه‌های نیوزوم تولیدشده به مدت 1 ماه در فواصل زمانی مختلف (روز 1، 7، 15 و 30) مورد آزمون قرار گرفتند. برای این منظور طی این فواصل زمانی، 2 میلی‌لیتر از نمونه‌های نیوزوم تولیدشده با 2 میلی‌لیتر ایزوپروپیل الکل 50 درصد به‌صورت کامل مخلوط شد و درنهایت با استفاده از نمودار استاندارد ویتامین D₃ و طبق رابطه (2) محتوی ویتامین باقی‌مانده در ساختار نیوزوم‌های تولیدشده محاسبه گردید.

انکپسولاسیون ویتامین D₃ در ساختار نیوزوم‌ها بررسی شده است. علاوه بر این پایداری ویتامین در دمای یخچال به مدت 30 روز و قابلیت زیست‌دسترسی آن در ساختار نیوزوم‌های طراحی‌شده در محیط‌های شبیه‌سازی‌شده دستگاه گوارش مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روش‌ها

ویتامین D₃ (کلکسیفرول، 98 درصد)، کلروفرم، اتانول، ایزوپروپیل الکل، سدیم هیدروکسید¹ (NaOH) و کلریدریک کلریدریک اسید² (HCl) از شرکت مرک (ساخت آلمان) خریداری شدند. پودر پپسین (50-58 mkat per میلی‌گرم)، پودر پانکراتین (porcine pancreas-4×USP specifications)، نمک‌های صغراوی، اسپن 60، توئین 20 و 80 از شرکت سیگما آلدریج (ساخت آمریکا) تهیه شدند.

تهیه نیوزوم‌ها

تهیه نیوزوم‌های بارگذاری‌شده با ویتامین D₃ با استفاده از روش لایه فیلم نازک و سونیکاسیون انجام شد. برای این منظور ابتدا سورفاکتانت‌ها (اسپن 60، توئین 20 و 80) با نسبت‌های مختلف همراه با کلسترول (80:20 و 60:40 وزنی/وزنی) با 15 میلی‌لیتر حلال (12 میلی‌لیتر کلروفرم و 1/5 میلی‌لیتر اتانول) با یکدیگر مخلوط شدند. سپس 1/5 میلی‌لیتر از ویتامین D₃ با غلظت 3 درصد (وزنی/حجمی) در اتانول خالص به مخلوط فوق اضافه شد. مخلوط حاصل در روتاری تحت خلأ (100 میلی‌متر جیوه، 100 دور در دقیقه، Heidolph، ساخت آلمان) با دمای 60 درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا حلال آن تبخیر و لایه فیلم نازک تشکیل شود. لایه نازک تشکیل‌شده در 10 میلی‌لیتر بافر نمکی فسفات (pH=7/4) و بافر نمکی فسفات (PBS³)، 10 میلی‌مولار) در دمای 40 درجه سانتی‌گراد به مدت 30 دقیقه هیدراته شد و درنهایت سونیکاسیون (120 Hz، Hielscher، ساخت آلمان) به مدت 15 دقیقه با 3 فاصله زمانی (هر 5 دقیقه، 1 دقیقه استراحت) صورت گرفت (Talebi *et al.*, 2021).

تعیین اندازه ذرات و پتانسیل زتا

از دستگاه تفرق نور پویا⁴ (SZ-100Z، ساخت ژاپن) به‌منظور تعیین میانگین توزیع اندازه ذرات نیوزوم‌ها و نیز تعیین

¹ Sodium hydroxide

² Hydrochloric acid

³ Phosphate buffered saline

⁴ Dynamic Light Scattering

⁵ Particle size Distribution Index

⁶ Zetasizer

(نسخه 22) در سطح اطمینان 95 درصد صورت گرفت و در آزمون چنددامنه‌ای دانکن به منظور مقایسه میانگین داده‌ها استفاده شد.

نتایج و بحث

اندازه ذرات و پتانسیل زتا

نتایج تأثیر نوع امولسیفایر و نسبت امولسیفایر به کلسترول روی توزیع اندازه ذرات، شاخص پراکندگی (PDI) و پتانسیل زتای نمونه‌های مختلف نیوزوم بارگذاری شده با ویتامین D در جدول (1) نشان داده شده است. براساس نتایج به دست آمده مشخص شد که با افزایش شاخص HLB برای امولسیفایرها توزیع اندازه ذرات نیوزوم به طور معنی داری ($P < 0/05$) کاهش می‌یابد. به طوری که نمونه‌های نیوزوم تهیه شده با توئین 20 و 80 نسبت به نمونه‌های نیوزوم فرموله شده با اسپن 60 به طور معنی داری ($P < 0/05$) از توزیع اندازه ذرات کمتری برخوردار بودند. همچنین نتایج جدول (1) نشان داد با افزایش نسبت مولی کلسترول به امولسیفایر توزیع اندازه ذرات و نیز شاخص پراکندگی به غیر از اسپن به طور معنی داری ($P < 0/05$) افزایش می‌یابد. توزیع اندازه ذرات نیوزوم‌های تهیه شده در این پژوهش در دامنه 101 نانومتر تا 500 نانومتر بودند.

توئین 20 و 80 به ترتیب دارای HLB برابر با 16/7 و 15 می‌باشند که به دلیل سر آب دوست بزرگ به تنهایی قادر به تشکیل وزیکول پایدار نمی‌باشند. به همین خاطر این ترکیبات در حضور کلسترول قادر به تشکیل نیوزوم می‌باشند. از طرف دیگر اسپن 60 به دلیل HLB پایین و دارا بودن بخش آب‌گریز بزرگ برای تشکیل وزیکول نیاز زیادی به حضور کلسترول ندارد (Bayindir & Yuksel, 2007; Pardakhty, Varshosaz, & Rouholamini, 2010). بنابراین می‌توان گفت که استفاده از مخلوط توئین‌ها (20 یا 80) و کلسترول در این پژوهش به طور مؤثری قادر به تشکیل نیوزوم‌های با اندازه کوچک‌تر می‌شود. زیرا کلسترول به دلیل نقش پایدارکنندگی که روی ساختار لایه‌ای در نیوزوم‌ها دارد، سبب افزایش پایداری وزیکول‌ها در مقابل امواج فراصوت می‌شود. بنابراین فراصوت قادر است به طور مؤثری اندازه ذرات نیوزوم‌ها را کاهش دهد بدون آنکه آسیبی به نیوزوم وارد شود. اما در غلظت‌های بالای کلسترول به دلیل سختی مولکول آن می‌تواند اثر پایدارکنندگی کلسترول از بین رود و ذرات درشتی تشکیل شوند (Essa, 2014; Nasser, 2005).

رابطه (2)

$$100 \times \frac{\text{مقدار اولیه ویتامین D}_3 \text{ موجود در ساختار نیوزومها}}{\text{مقدار ویتامین D}_3 \text{ موجود در ساختار نیوزومها}} = \text{پایداری درصد}$$

تعیین زیست‌دسترسی ویتامین D₃ تحت شرایط آزمایشگاهی

از روش هضم شبیه‌سازی شده دستگاه گوارش تحت شرایط آزمایشگاهی جهت تعیین قابلیت زیست‌دسترسی ویتامین D₃ آزاد و ویتامین D₃ بارگذاری شده در ساختار نیوزوم‌ها استفاده شد. برای این منظور 10 میلی‌لیتر از نمونه‌های نیوزوم تازه تهیه شده با 40 میلی‌لیتر محلول HCl از پیش گرم شده (37 درجه سانتی‌گراد) با غلظت 0/1 مول بر لیتر (pH=1/5) به مدت 10 دقیقه به صورت کامل مخلوط شدند. سپس 10 میلی‌گرم پودر پیپسین به مخلوط فوق افزوده شد تا شرایط هضم معده‌ای طی مدت 60 دقیقه شبیه‌سازی گردد. بعد از گذشت این زمان، pH محیط فوق با NaOH با غلظت 4 مول بر لیتر به 7 رسانده شد. به دنبال آن، 250 میلی‌گرم از نمک‌های صفاوی به مخلوط فوق اضافه گردید و پس از حل شدن کامل آن 2 میلی‌گرم پودر پانکراتین به آن اضافه شد تا شرایط هضم روده‌ای به مدت 120 دقیقه شبیه‌سازی شود. بعد از گذشت زمان 120 دقیقه 1 میلی‌لیتر از محلول فوق با 1 میلی‌لیتر ایزوپروپیل الکل 50 درصد مخلوط شد و در 5000 دور در دقیقه، به مدت 15 دقیقه در دمای یخچال سانتریفیوژ (Micro Hitachi, Ultracentrifuge CS15ONX, ساخت ژاپن) شد. سپس جذب فاز رویی که به عنوان فاز مایسل در نظر گرفته می‌شود جهت تعیین میزان ویتامین D₃ موجود در مایسل‌ها در 264 نانومتر با اسپکتروفتومتر UV-Vis سنجیده شد. هر چقدر که میزان ویتامین آزاد شده در بخش مایسل بیشتر باشد به منزله زیست‌دسترسی بالاتر ویتامین D₃ می‌باشد. غلظت ویتامین D₃ در ساختار نیوزوم‌ها نیز براساس مقادیری که در بخش کارایی کپسولاسیون به دست می‌آید، تعیین می‌گردد. در نهایت درصد زیست‌دسترسی ویتامین D₃ با استفاده از رابطه (3) محاسبه گردید (Lin, Wang, Yang, Guo, & Wang, 2016).

رابطه (3)

$$100 \times \frac{\text{غلظت ویتامین در مایسل}}{\text{غلظت ویتامین در نیوزوم}} = \text{درصد زیست‌دسترسی}$$

تجزیه و تحلیل آماری

تمام آزمون‌ها در غالب طرح کاملاً تصادفی و در سه تکرار انجام شدند. آنالیز داده‌ها با استفاده از نرم‌افزار SPSS

جدول 1- توزیع اندازه ذرات و PDI نمونه‌های نیوزوم بارگذاری شده با ویتامین D₃ تهیه شده با سورفاکتانت‌های مختلف و نسبت‌های مختلف سورفاکتانت به کلسترول

سورفاکتانت	سورفاکتانت:کلسترول (درصد وزنی/وزنی)	اندازه ذرات (نانومتر)	شاخص پراکندگی
اسپن 60	80:20	827/1±4/57 ^a	0/724±0/02 ^a
توئین 20	60:40	453/7±3/16 ^b	0/532±0/04 ^b
توئین 80	80:20	101/4±2/24 ^f	0/189±0/01 ^f
	60:40	258/6±3/41 ^d	0/261±0/03 ^d
	80:20	111/3±3/52 ^e	0/203±0/04 ^e
	60:40	371/5±2/11 ^c	0/486±0/05 ^c

* میانگین±انحراف معیار

حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در هر ستون می‌باشند ($P<0/05$).

نمودند افزایش نسبت کلسترول به امولسیفایر به دلیل ماهیت سخت کلسترول منجر به سختی غشای دولایه می‌شود که همراه با افزایش شاخص پراکندگی (PDI) در نمونه‌های نیوزوم می‌باشد.

پتانسیل زتا

پتانسیل زتا یکی از فاکتورهای مهم در پایداری نیوزوم‌ها طی دوره نگهداری می‌باشد. مطالعه‌ها نشان داده است که هرچقدر بزرگی پتانسیل زتا بیشتر باشد، پایداری سیستم نیز بالاتر است، زیرا در این حالت نیروی دافعه بیشتری بین ذرات ایجاد می‌شود که منجر به پایداری بالاتر سیستم خواهد شد. به دلیل اینکه در پتانسیل زتای بالاتر از +30 میلی‌ولت یا پایین‌تر از -30 میلی‌ولت تمایل به تجمع ذرات خیلی کم می‌باشد، لذا پایداری الکترواستاتیکی اینگونه سیستم‌ها بیشتر ناشی از دافعه الکتریکی رخ می‌دهد (Cano-Sarmiento *et al.*, 2018; Gutiérrez *et al.*, 2016). نتایج به دست آمده در این پژوهش نشان داد که پتانسیل زتای تمام نمونه‌ها منفی می‌باشند و در محدوده $-6/28±1/17$ تا $-42/75±1/12$ میلی‌ولت است (جدول 2). همان‌طور که در جدول (2) نشان داده شده است در تمام نمونه‌های نیوزوم تهیه شده با توئین 20 و 80 بزرگی پتانسیل زتا به طور معنی‌داری ($P<0/05$) بیشتر از نمونه‌های نیوزوم فرموله شده با اسپن 60 می‌باشد. همچنین بزرگی پتانسیل زتای نیوزوم‌های تهیه شده با توئین 20 به طور معنی‌داری ($P<0/05$) بزرگ‌تر از سایر نمونه‌ها بود. علاوه بر این افزایش نسبت کلسترول به امولسیفایر در تمام نمونه‌ها به طور معنی‌داری ($P<0/05$) منجر به کاهش بزرگی پتانسیل زتا شد (جدول 2).

شاخص پراکندگی (PDI) نشان‌دهنده توزیع اندازه ذرات می‌باشد که در دامنه صفر تا 1 می‌تواند قرار گیرد. به طور کلی شاخص پایین PDI، بیانگر یکنواختی توزیع ذرات می‌باشد و PDI در حدود 0/2 مقدار قابل قبول برای توزیع مناسب خواهد بود. سیستم‌هایی که دارای شاخص PDI کمتر از 0/2 می‌باشند تحت عنوان سیستم‌های یکپارچه یا مونودیسپرس شناخته می‌شوند که از پایداری قابل توجهی طی دوره نگهداری برخوردار خواهند بود (Jafari, Assadpoor, He, & Bhandari, 2008). شاخص PDI برای نیوزوم‌های تهیه شده در این پژوهش در محدوده 0/189 تا 0/725 به دست آمد. بنابراین همان‌طور که در جدول (1) نشان داده شده است افزایش HLB در نمونه‌های نیوزوم (یعنی استفاده از توئین 20 و 80) به طور معنی‌داری ($P<0/05$) منجر به کاهش PDI خواهد شد. علاوه بر این افزایش غلظت کلسترول نیز به طور معنی‌داری ($P<0/05$) PDI را افزایش داد (جدول 1). همان‌طور که بیان شد این رفتارها ممکن است ناشی از نقش پایدارکنندگی کلسترول در مقادیر پایین‌تر نسبت به نسبت‌های بالای آن در فرمولاسیون نیوزوم‌ها می‌باشد. محققین دیگر نیز نتایج مشابهی را به دست آوردند (Abdelkader, Farghaly, & Moharram, 2010; Junyaprasert, Singhsa, Suksiriworapong, & Chantasart, 2012). Junyaprasert و همکاران (2012)، با مطالعه توزیع اندازه ذرات نیوزوم‌های بارگذاری شده با اسید الایژیک¹ مشاهده نمودند که نمونه‌های نیوزوم تهیه شده با توئین 60 در مقایسه با نمونه‌های فرموله شده با اسپن 60 از توزیع اندازه ذرات (به ترتیب $161±3$ و $723±32$ نانومتر) و PDI (به ترتیب $0/228±0/01$ و $0/605±0/08$) پایین‌تر برخوردار می‌باشند. Abdelkader و همکاران (2014)، بیان

¹ Ellagic Acid

جدول 2- پتانسیل زتا و کارایی انکپسولاسیون ویتامین D₃ در ساختار نمونه‌های نیوزوم تهیه‌شده با سورفاکتانت‌های مختلف و نسبت‌های مختلف سورفاکتانت به کلسترول

سورفاکتانت	سورفاکتانت:کلسترول (درصد وزنی/وزنی)	پتانسیل زتا (میلی‌ولت)	کارایی انکپسولاسیون (درصد)
اسپن 60	80:20	-10/47±1/63 ^b	81/41±1/38 ^e
	60:40	-6/28±1/17 ^a	77/59±1/23 ^f
توئین 20	80:20	-42/75±1/12 ^f	92/84±1/10 ^a
	60:40	-38/53±1/52 ^e	86/67±1/05 ^c
توئین 80	80:20	-34/64±1/31 ^d	90/12±1/21 ^b
	60:40	-29/37±1/42 ^c	84/13±1/23 ^d

* میانگین±انحراف معیار

حروف کوچک متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در هر ستون می‌باشند ($P<0/05$).

60 می‌باشد. همان‌طور که در **جدول (2)** نشان داده شده است دو نیوزوم تهیه‌شده با توئین 20 و 80 و با نسبت توئین به کلسترول 80:20 به‌طور معنی‌داری ($P<0/05$) دارای بیشترین کارایی انکپسولاسیون نسبت به سایر تیمارها بودند. همچنین مشخص شد که افزایش سطح به‌کارگیری کلسترول در فرمولاسیون نیوزوم‌ها به‌طور معنی‌داری ($P<0/05$) کارایی انکپسولاسیون را کاهش می‌دهد. ممکن است سطح 20 درصد کلسترول به‌دلیل کمک به تشکیل غشاهای دولایه پایدار نیوزوم و نیز کاهش قابلیت نفوذپذیری غشای دولایه منجر به انکپسولاسیون ویتامین D به‌طور موفقیت‌آمیزی خواهد شد. اما افزایش سطح به‌کارگیری کلسترول (بیش از 20 درصد) تأثیر منفی روی انکپسولاسیون ویتامین دارد که محققین دلیل این امر را ناشی از رقابت کلسترول با ویتامین D برای قرارگیری در فضای غشاهای دولایه و نیز اختلال در تشکیل غشای دولایه منظم نیوزوم‌ها می‌دانند (El-Samaligy, Afifi, & Mahmoud, 2006; Wagh & Moghddam, 2012). همکاران (2016)، نتایج مشابهی را برای انکپسولاسیون دی‌آسیرین³ درون نیوزوم تحت تأثیر غلظت‌های مختلف کلسترول (5 تا 15 میلی‌گرم) به‌دست آوردند. این محققین دریافتند که در سطح 5 میلی‌گرم از کلسترول بالاترین کارایی انکپسولاسیون و در سطح 15 میلی‌گرم کلسترول کمترین کارایی انکپسولاسیون دی‌آسیرین مشاهده می‌شود. آنها عدم یکنواختی غشاهای دولایه و افزایش قابلیت

این خصوصیات ممکن است ناشی از بخش آب‌دوست بیشتر نمونه‌های تهیه‌شده با توئین (20 و 80) باشد. زیرا بخش آب‌دوست این امولسیفایرها قادر به برقراری پیوند هیدروژنی بیشتری با گروه‌های هیدروکسیل ویتامین D می‌باشند و منجر به کاهش پتانسیل زتا نمونه‌های نیوزوم خواهد شد (Waddad et al., 2013). نتایج مشابهی توسط Waddad و همکاران (2013)، برای انکپسولاسیون مورین هیدرات¹ (یک فلاونوئید طبیعی² در برخی از میوه‌ها، سبزی‌ها و گیاهان دارویی می‌باشد) در نیوزوم بر پایه سورفاکتانت‌های مختلف نظیر توئین 60، اسپن 60 و 80 گزارش شده است. نتایج این محققین نشان داد که استفاده از توئین 60 به‌منظور تشکیل نیوزوم‌ها منجر به افزایش بزرگی پتانسیل زتا می‌شود. آنها دلیل این رفتار را به قابلیت آب‌دوستی بیشتر توئین 60 نسبت به اسپن‌ها نسبت دادند. خاصیت آب‌دوستی بالاتر توئین 60 سبب برقراری بیشتر پیوندهای هیدروژنی با مورین هیدرات از طریق گروه‌های هیدروکسیل خواهد شد که همراه با افزایش بزرگی پتانسیل زتا می‌باشد.

کارایی انکپسولاسیون

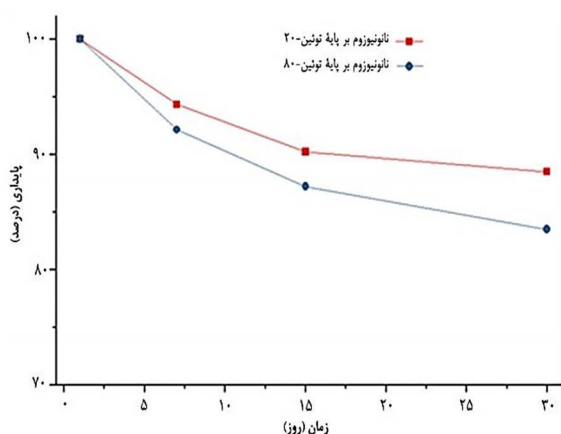
نتایج کارایی انکپسولاسیون ویتامین D در ساختار نیوزوم‌های تهیه‌شده در این پژوهش در **جدول (2)** نشان داده شده است. براساس نتایج به‌دست‌آمده مشخص شد که بیشترین کارایی انکپسولاسیون مربوط به نیوزوم‌های تهیه‌شده با توئین در مقایسه با نیوزوم‌های بر پایه اسپن

¹ Morin hydrate

² Bioflavonoid

³ Diacerein

پایهٔ توئین 20 بارگذاری شده با ویتامین D₃ بالاتر است (Lu, Li, & Jiang, 2011)، لذا ممکن است به‌همین دلیل پایداری این نانونیوزوم‌ها طی 1 ماه نگهداری در دمای یخچال بالاتر از نیوزوم‌های بر پایهٔ توئین 80 باشد. Mohammadi و همکاران (2014)، پایداری ویتامین D₃ بارگذاری شده در ساختار نانولیپوزوم‌های نگهداری شده در دمای 4-8 درجهٔ سانتی‌گراد به مدت 1 ماه مورد بررسی قرار دادند. آنها بیان نمودند افزایش مدت زمان نگهداری منجر به کاهش پایداری نمونه‌های نانولیپوزوم خواهد شد. همچنین بیان کردند نمونه‌هایی که طی دورهٔ نگهداری دارای پتانسیل زتای بالاتر و اندازهٔ کوچک‌تر هستند، نسبت به سایر نمونه‌ها به‌خوبی قادرند از ویتامین D₃ محافظت نمایند.



شکل 1-1- تغییرات پایداری ویتامین D₃ بارگذاری شده در ساختار نانونیوزوم‌های بر پایهٔ توئین 20 و 80 طی 1 ماه نگهداری در دمای یخچال

تعیین زیست‌دسترسی ویتامین D₃ تحت شرایط آزمایشگاهی

قابلیت زیست‌دسترسی ویتامین D₃ بعد از هضم نمونه‌های ویتامین D₃ آزاد و انکپسوله شده در ساختار نانونیوزوم‌های بر پایهٔ توئین 20 و 80 با نسبت سورفاکتانت به کلسترول 80:20 تحت شرایط شبیه‌سازی شدهٔ دستگاه گوارش (معدة و روده) صورت گرفت و نتایج آن در شکل (2) نشان داده شده است. براساس نتایج به‌دست‌آمده مشخص شد قابلیت زیست‌دسترسی ویتامین D₃ بعد از مرحلهٔ هضم روده‌ای در نمونه‌های نانونیوزوم به‌طور معنی‌داری (P<0/05) بالاتر از نمونه‌های آزاد و انکپسوله نشده می‌باشد (شکل 2). همچنین مقایسهٔ میانگین داده‌های مربوط به نمونه‌های نانونیوزوم نشان داد قابلیت زیست‌دسترسی ویتامین D₃ در

نفوذپذیری غشاها در حضور مقادیر بالاتر کلسترول را عامل کاهش کارایی انکپسولاسیون دانستند.

براساس نتایج به‌دست‌آمده از آزمون‌های PDI، DLS، پتانسیل زتا و کارایی انکپسولاسیون مشخص شد که دو نمونهٔ نیوزوم تهیه شده با توئین 20 و 80 با نسبت توئین به کلسترول 80:20 از کمترین میانگین اندازهٔ ذرات، کمترین PDI و بیشترین بزرگی پتانسیل زتا برخوردار هستند. از آنجایی که اندازهٔ ذرات این نیوزوم‌های بارگذاری شده با ویتامین D در مقیاس نانو می‌باشد و همچنین بالابودن کارایی انکپسولاسیون آنها، لذا برای آزمون‌های تکمیلی انتخاب شدند.

پایداری ویتامین D₃ در دمای یخچال

نتایج حاصل از اندازه‌گیری پایداری ویتامین D₃ در ساختار نانونیوزوم‌ها طی 30 روز نگهداری در دمای یخچال در شکل (1) نشان داده شده است. براساس نتایج به‌دست‌آمده از تحلیل واریانس داده‌ها مشخص شد که پایداری ویتامین D₃ تحت دمای یخچال به‌طور معنی‌داری (P<0/05) وابسته به مدت زمان نگهداری و نیز نوع ماتریس نانونیوزوم می‌باشد. براین‌اساس همان‌طور که در شکل (1) نشان داده شده است با افزایش مدت زمان نگهداری تا پایان روز 30 در دمای یخچال پایداری ویتامین D₃ در هر دو نمونه نانونیوزوم تهیه شده با توئین 20 و 80 با نسبت سورفاکتانت به کلسترول 80:20 به‌طور معنی‌داری (P<0/05) کاهش می‌یابد. با این‌وجود مقایسهٔ دو نوع نانونیوزوم نشان داد که پایداری ویتامین D₃ در ساختار نانونیوزوم‌های تهیه شده با توئین 20 به‌طور معنی‌داری (P<0/05) بالاتر از پایداری این ویتامین در ماتریس نانونیوزوم‌های بر پایهٔ توئین 80 می‌باشد (شکل 1).

کاهش پایداری با افزایش زمان نگهداری ممکن است ناشی از نفوذ ویتامین D₃ به محیط اطراف طی دورهٔ نگهداری در نتیجهٔ کاهش پتانسیل زتا و نیز ترکیب ذرات با یکدیگر باشد (Mohammadi, Ghanbarzadeh, & Hamishehkar, 2014). همچنین ممکن است کلسترول نقش پایدارکنندگی بیشتری روی ساختارهای دولایه در نانونیوزوم‌های بر پایهٔ توئین 20 در مقایسه با نانونیوزوم‌های تهیه شده با توئین 80 داشته باشد. از طرف دیگر بزرگی پتانسیل زتا در نمونه‌های نانونیوزوم بر

نتایج حاصل از این پژوهش با یافته‌های دیگر محققین از لحاظ بهبود قابلیت زیست‌دسترسی به ترکیبات زیست‌فعال سازگاری دارد. Lin و همکاران (2016)، از هیدرولیزات‌های پروتئین ذرت به‌عنوان نانوساختارهای نوین جهت بهبود زیست‌دسترسی به ویتامین D₃ تحت شرایط آزمایشگاهی در مقایسه به حالت آزاد ویتامین استفاده نمودند. آنها مشاهده کردند که با طراحی نانوذرات بر پایه هیدرولیزات‌های پروتئین ذرت جهت انکپسولاسیون ویتامین D₃ در مقایسه با حالت آزاد ویتامین، قابلیت زیست‌دسترسی آن پس از هضم کامل از 62 به 95 درصد افزایش می‌یابد. آنها کاهش بلورینگی¹ در نتیجه فرایند انکپسولاسیون ویتامین D₃ را دلیل این امر دانستند. Charpashlo، Ghorani و Mohebbi (2021)، از سیستم چندلایه بر پایه ژلاتین و زئین جهت افزایش قابلیت زیست‌دسترسی لیکوپن در محیط شبیه‌سازی‌شده دستگاه گوارش استفاده نمودند. براساس نتایج به‌دست‌آمده توسط این محققین مشخص شد نمونه‌های آزاد لیکوپن به‌طور معنی‌داری دارای قابلیت زیست‌دسترسی پایین‌تری نسبت به نمونه‌های انکپسوله‌شده در ساختارهای چندلایه بودند. آنها دلیل این رفتار را ناشی از افزایش پایداری لیکوپن در محیط‌های دهانی و روده‌ای در نتیجه اعمال ساختار چندلایه دانستند. همچنین ممکن است کلسترول نقش پایدارکنندگی بیشتری روی ساختارهای دولایه در نانونیوزوم‌های بر پایه توئین 20 در مقایسه با نانونیوزوم‌های تهیه‌شده با توئین 80 داشته باشد. از طرف دیگر بزرگی پتانسیل زتا در نمونه‌های نانونیوزوم بر پایه توئین 20 بارگذاری‌شده با ویتامین D₃ بالاتر است (Lu et al., 2011)، لذا ممکن است به‌همین دلیل پایداری این نانونیوزوم‌ها طی 1 ماه نگهداری در دمای یخچال بالاتر از نیوزوم‌های بر پایه توئین 80 باشد. Mohammadi و همکاران (2014)، پایداری ویتامین D₃ بارگذاری‌شده در ساختار نانولیپوزوم‌های نگهداری‌شده در دمای 4-8 درجه سانتی‌گراد به مدت 1 ماه مورد بررسی قرار دادند. آنها بیان نمودند افزایش مدت زمان نگهداری منجر به کاهش پایداری نمونه‌های نانولیپوزوم خواهد شد. همچنین بیان کردند نمونه‌هایی که طی دوره نگهداری دارای پتانسیل زتای بالاتر و اندازه کوچک‌تر هستند،

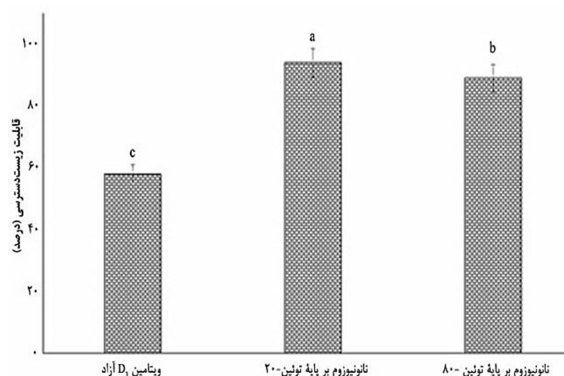
ساختار نانونیوزوم‌های بر پایه توئین 20 به‌طور معنی‌داری ($P < 0/05$) بالاتر از نمونه‌های تهیه‌شده با توئین 80 می‌باشد. براین‌اساس همان‌طور که در شکل (2) نشان داده شده است بعد از هضم کامل برای نمونه‌های آزاد ویتامین D₃ تنها 58 درصد ویتامین D₃ باقی‌ماند. اما در مقابل، برای نمونه‌های ویتامین D₃ قرارگرفته در نانونیوزوم با توئین 20 و 80 بعد از هضم کامل تحت شرایط شبیه‌سازی‌شده دستگاه گوارش به ترتیب 94 و 89 درصد ویتامین D₃ پایدار باقی‌ماند. به عبارتی دیگر رهایش ویتامین D₃ در روده، بالاتر و زیست‌دسترسی و جذب آن بیشتر می‌باشد (شکل 2).

جذب روده‌ای ترکیبات نامحلول در آب مانند ویتامین D₃ وابسته به حلالیت آنها در محیط آبدوست روده از طریق فعالیت امولسیفایری نمک‌های صفاوی می‌باشد. نمک‌های صفاوی می‌توانند ترکیبات آب‌گریز را در مخلوط مایسل‌ها و وزیکول‌ها احاطه نمایند، آنها را از طریق سدهای سلولی روده حمل کنند و این ترکیبات را به جریان خون منتقل نمایند (Porter, Trevaskis, & Charman, 2007). از این‌رو، به نظر می‌رسد ترکیبات محلول شاید پتانسیل بالایی برای جذب در روده کوچک را دارند (Etcheverry, Grusak, & Fleige, 2012). افزودن مستقیم ویتامین D₃ به‌صورت آزاد به محیط آبی ممکن است بلافاصله تشکیل کریستال دهد و رسوب نماید که منجر به کاهش زیست‌دسترسی آن خواهد شد. با این‌وجود هنگامی که ویتامین D₃ در ساختار نانونیوزوم‌ها به‌دام می‌افتد حالت کریستالی آن ناپدید می‌شود و به‌صورت ترکیبات آمورف در می‌آید که این امر شرایط را برای حلالیت آن در محیط آبی روده و ورود به جریان خون محیا می‌سازد (Lindfors, Skantze, Skantze, Westergren, & Olsson, 2007; Xiong, Ren, Li, & Li, 2018). از طرف دیگر اتصال‌های آب‌گریز بین ویتامین D₃ با بخش آب‌گریز توئین‌های 20 و 80 و نمک‌های صفاوی و نیز پیوندهای هیدروژنی بین ویتامین و ماتریس نانونیوزوم‌ها محتوی ویتامین را در بخش مایسلی افزایش می‌دهد که این امر همراه با افزایش پایداری ویتامین D₃ در شرایط نامساعد محیطی خواهد بود که افزایش زیست‌دسترسی به آن را بیشتر می‌نماید (Xiong et al., 2018).

¹ Crystallinity

شد که نیوزوم‌های بر پایهٔ توئین 20 و 80 با نسبت سورفاکتانت به کلسترول (80:20 وزنی/وزنی) دارای ابعادی در حدود مقیاس نانو می‌باشند. این نانونیوزوم‌ها از لحاظ کارایی انکپسولاسیون و بزرگی پتانسیل زتا و PDI در مقایسه با سایر نیوزوم‌های بارگذاری شده با ویتامین D₃ از مطلوبیت بالاتری برخوردار بودند. همچنین پایداری ویتامین D₃ در ساختار نیوزوم‌های طراحی شده طی 1 ماه نگهداری در دمای یخچال مورد ارزیابی قرار گرفت که نتایج نشان داد نمونه‌های نانونیوزوم تهیه شده بر پایهٔ توئین 20 با نسبت سورفاکتانت به کلسترول (80:20 وزنی/وزنی) دارای بیشترین پایداری طی دورهٔ نگهداری بودند. علاوه بر این قابلیت زیست‌دسترسی ویتامین D₃ آزاد با ویتامین انکپسوله شده در ساختار نانونیوزوم‌های طراحی شده در این پژوهش نشان داد که قابلیت زیست‌دسترسی ویتامین D₃ با فرایند انکپسولاسیون در نانونیوزوم‌ها به‌طور معنی‌داری ($P < 0/05$) افزایش می‌یابد. به‌طوری‌که بیشترین قابلیت زیست‌دسترسی مربوط به نانونیوزوم‌های تهیه شده بر پایهٔ توئین 20 می‌باشند.

نسبت به سایر نمونه‌ها به‌خوبی قادرند از ویتامین D₃ محافظت نمایند.



شکل 2- قابلیت زیست‌دسترسی ویتامین D₃ آزاد و انکپسوله شده در ساختار نانونیوزوم‌های بر پایهٔ توئین 20 و 80

نتیجه‌گیری

نیوزوم‌ها در سال‌های اخیر به‌عنوان راهی امیدوارکننده جهت انتقال موفق و کارآمد ترکیبات غذا-دارو و زیست‌فعال به بدن توسعه یافته‌اند. در این مطالعه مشخص

منابع

- Abdelkader, H., Farghaly, U., & Moharram, H. (2014). Effects of surfactant type and cholesterol level on niosomes physical properties and in vivo ocular performance using timolol maleate as a model drug. *Journal of pharmaceutical investigation*, 44(5), 329-337. doi:<https://doi.org/10.1007/s40005-014-0121-8>
- Akbari, J., Saeedi, M., Enayatifard, R., Morteza-Semnani, K., Hashemi, S. M. H., Babaei, A., . . . Nokhodchi, A. (2020). Curcumin Niosomes (curcusomes) as an alternative to conventional vehicles: A potential for efficient dermal delivery. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 60, 102035. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2020.102035>
- Akbarzadeh, I., Yarak, M. T., Ahmadi, S., Chiani, M., & Nourouzian, D. (2020). Folic acid-functionalized niosomal nanoparticles for selective dual-drug delivery into breast cancer cells: An in-vitro investigation. *Advanced Powder Technology*, 31(9), 4064-4071. doi:<https://doi.org/10.1016/j.apt.2020.08.011>
- Basiri, L., Rajabzadeh, G., & Bostan, A. (2017). α -Tocopherol-loaded niosome prepared by heating method and its release behavior. *Food chemistry*, 221, 620-628. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.11.129>
- Bayindir, Z. S., & Yuksel, N. (2010). Characterization of niosomes prepared with various nonionic surfactants for paclitaxel oral delivery. *Journal of pharmaceutical sciences*, 99(4), 2049-2060. doi:<https://doi.org/10.1002/jps.21944>
- Brandão-Lima, P. N., Santos, B. d. C., Aguilera, C. M., Freire, A. R. S., Martins-Filho, P. R. S., & Pires, L. V. (2019). Vitamin D food fortification and nutritional status in children: A systematic review of randomized controlled trials. *Nutrients*, 11(11), 2766. doi:<https://doi.org/10.3390/nu11112766>
- Cano-Sarmiento, C., Téllez-Medina, D., Viveros-Contreras, R., Cornejo-Mazón, M., Figueroa-Hernández, C., García-Armenta, E., . . . Gutiérrez-López, G. (2018). Zeta potential of food matrices. *Food Engineering Reviews*, 10(3), 113-138. doi:<https://doi.org/10.1007/s12393-018-9176-z>
- Chanda, H., Das, P., Chakraborty, R., & Ghosh, A. (2011). Development and evaluation of liposomes of fluconazole. *J Pharm Biomed Sci*, 5(27), 1-9 .

- Charpashlo, E., Ghorani, B., & Mohebbi, M. (2021). Multilayered electrospinning strategy for increasing the bioaccessibility of lycopene in gelatin-based sub-micron fiber structures. *Food hydrocolloids*, 113, 106411. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106411>
- Eid, R. K., Essa, E. A., & El Maghraby, G. M. (2019). Essential oils in niosomes for enhanced transdermal delivery of felodipine. *Pharmaceutical development and technology*, 24(2), 157-165. doi:<https://doi.org/10.1080/10837450.2018.1441302>
- El-Samaligy, M., Afifi, N., & Mahmoud, E. (2006). Increasing bioavailability of silymarin using a buccal liposomal delivery system: preparation and experimental design investigation. *International journal of pharmaceuticals*, 308(1-2), 140-148. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.11.006>
- Essa, E. A. (2014). Effect of formulation and processing variables on the particle size of sorbitan monopalmitate niosomes. *Asian Journal of Pharmaceutics (AJP): Free full text articles from Asian J Pharm*, 4(4). doi:<http://dx.doi.org/10.22377/ajp.v4i4.289>
- Estupiñán Sánchez, Ó. R., García Manrique, P., Blanco López, M. d. C., Matos González, M., & Gutiérrez Cervelló, G. (2020). Vitamin D3 loaded niosomes and transfersomes produced by ethanol injection method: identification of the critical preparation step for size control. *Foods*, 9(10), 1367. doi:<https://doi.org/10.3390/foods9101367>
- Etcheverry, P., Grusak, M. A., & Fleige, L. E. (2012). Application of in vitro bioaccessibility and bioavailability methods for calcium, carotenoids, folate, iron, magnesium, polyphenols, zinc, and vitamins B6, B12, D, and E. *Frontiers in physiology*, 3, 317. doi:<https://doi.org/10.3389/fphys.2012.00317>
- Gharbavi, M., Johari, B., Mousazadeh, N., Rahimi, B., Leilan, M. P., Eslami, S. S., & Sharafi, A. (2020). Hybrid of niosomes and bio-synthesized selenium nanoparticles as a novel approach in drug delivery for cancer treatment. *Molecular Biology Reports*, 47(9), 6517-6529. doi:<https://doi.org/10.1007/s11033-020-05704-z>
- Goyal, H., Perisetti, A., Rahman, M. R., Levin, A., & Lippi, G. (2019). Vitamin D and gastrointestinal cancers: a narrative review. *Digestive diseases and sciences*, 64(5), 1098-1109. doi:<https://doi.org/10.1007/s10620-018-5400-1>
- Gutiérrez, G., Matos, M., Barrero, P., Pando, D., Iglesias, O., & Pazos, C. (2016). Iron-entrapped niosomes and their potential application for yogurt fortification. *LWT*, 74, 550-556. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.08.025>
- Hasan, A. A. (2014). Design and in vitro characterization of small unilamellar niosomes as ophthalmic carrier of dorzolamide hydrochloride. *Pharmaceutical development and technology*, 19(6), 748-754. doi:<https://doi.org/10.3109/10837450.2013.829095>
- Holick, M. F. (2004). Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease. *The American journal of clinical nutrition*, 80(6), 1678S-1688S. doi:<https://doi.org/10.1093/ajcn/80.6.1678S>
- Holick, M. F. (2007). Vitamin D deficiency. *New England journal of medicine*, 357(3), 266-281. doi:<https://doi.org/10.1056/NEJMra070553>
- Jafari, S. M., Assadpoor, E., He, Y., & Bhandari, B. (2008). Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification. *Food hydrocolloids*, 22(7), 1191-1202. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2007.09.006>
- Junyaprasert, V. B., Singhsa, P., Suksiriworapong, J., & Chantasart, D. (2012). Physicochemical properties and skin permeation of Span 60/Tween 60 niosomes of ellagic acid. *International journal of pharmaceuticals*, 423(2), 303-311. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.11.032>
- Khan, W. A., Butt, M. S., Pasha, I., & Jamil, A. (2020). Microencapsulation of vitamin D in protein matrices: In vitro release and storage stability. *Journal of Food Measurement and Characterization*, 14(3), 1172-1182. doi:<https://doi.org/10.1007/s11694-019-00366-3>
- Khatoun, M., Shah, K. U., Din, F. U., Shah, S. U., Rehman, A. U., Dilawar, N., & Khan, A. N. (2017). Proniosomes derived niosomes: recent advancements in drug delivery and targeting. *Drug delivery*, 24(2), 56-69. doi:<https://doi.org/10.1080/10717544.2017.1384520>
- Khoei, S., & Yaghoobian, M. (2017). Chapter 6 - Niosomes: a novel approach in modern drug delivery systems. In E. Andronescu & A. M. Grumezescu (Eds.), *Nanostructures for Drug Delivery* (pp. 207-237): Elsevier.
- Lin, Y., Wang, Y.-H., Yang, X.-Q., Guo, J., & Wang, J.-M. (2016). Corn protein hydrolysate as a novel nano-vehicle: Enhanced physicochemical stability and in vitro bioaccessibility of vitamin D3. *LWT-Food Science and Technology*, 72, 510-517. doi:<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.05.020>

- Lindfors, L., Skantze, P., Skantze, U., Westergren, J., & Olsson, U. (2007). Amorphous drug nanosuspensions. 3. Particle dissolution and crystal growth. *Langmuir*, 23(19), 9866-9874. doi:<https://doi.org/10.1021/la700811b>
- Lu, Q., Li, D.-C., & Jiang, J.-G. (2011). Preparation of a tea polyphenol nanoliposome system and its physicochemical properties. *Journal of agricultural and food chemistry*, 59(24), 13004-13011. doi:<https://doi.org/10.1021/jf203194w>
- Moghassemi, S., & Hadjizadeh, A. (2014). Nano-niosomes as nanoscale drug delivery systems: an illustrated review. *Journal of controlled release*, 185, 22-36. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2014.04.015>
- Moghddam, S. R. M., Ahad, A., Aqil, M., Imam, S. S., & Sultana, Y. (2016). Formulation and optimization of niosomes for topical diacerein delivery using 3-factor, 3-level Box-Behnken design for the management of psoriasis. *Materials Science and Engineering: C*, 69, 789-797. doi:<https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.07.043>
- Mohammadi, A., Jafari, S. M., Mahoonak, A. S., & Ghorbani, M. (2021). Liposomal/nanoliposomal encapsulation of food-relevant enzymes and their application in the food industry. *Food and Bioprocess Technology*, 14(1), 23-38. doi:<https://doi.org/10.1007/s11947-020-02513-x>
- Mohammadi, M., Ghanbarzadeh, B., & Hamishehkar, H. (2014). Formulation of nanoliposomal vitamin D3 for potential application in beverage fortification. *Advanced pharmaceutical bulletin*, 4(Suppl 2), 569-575. doi:<https://doi.org/10.5681/apb.2014.084>
- Mura, S., Pirot, F., Manconi, M., Falson, F., & Fadda, A. M. (2007). Liposomes and niosomes as potential carriers for dermal delivery of minoxidil. *Journal of Drug Targeting*, 15(2), 101-108. doi:<https://doi.org/10.1080/10611860600991993>
- Nasseri, B. (2005). Effect of cholesterol and temperature on the elastic properties of niosomal membranes. *International journal of pharmaceutics*, 300(1-2), 95-101. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2005.05.009>
- Pardakhty, A., Varshosaz, J., & Rouholamini, A. (2007). In vitro study of polyoxyethylene alkyl ether niosomes for delivery of insulin. *International journal of pharmaceutics*, 328(2), 130-141. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2006.08.002>
- Porter, C. J., Trevaskis, N. L., & Charman, W. N. (2007). Lipids and lipid-based formulations: optimizing the oral delivery of lipophilic drugs. *Nature reviews Drug discovery*, 6(3), 231-248. doi:<https://doi.org/10.1038/nrd2197>
- Talebi, V., Ghanbarzadeh, B., Hamishehkar, H., Pezeshki, A., & Ostadrahimi, A. (2021). Effects of different stabilizers on colloidal properties and encapsulation efficiency of vitamin D3 loaded nano-niosomes. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, 61, 101284. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jddst.2019.101284>
- Valer-Martinez, A., Martinez, J. A., Sayon-Orea, C., Galvano, F., Grosso, G., & Bes-Rastrollo, M. (2019). Vitamin D and Cardio-Metabolic Risk Factors in Overweight Adults: An Overview of the Evidence. *Current pharmaceutical design*, 25(22), 2407-2420. doi:<https://doi.org/10.2174/1381612825666190722103919>
- Waddad, A. Y., Abbad, S., Yu, F., Munyendo, W. L., Wang, J., Lv, H., & Zhou, J. (2013). Formulation, characterization and pharmacokinetics of Morin hydrate niosomes prepared from various non-ionic surfactants. *International journal of pharmaceutics*, 456(2), 446-458. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2013.08.040>
- Wagh, V. D., & Deshmukh, O. J. (2012). Itraconazole niosomes drug delivery system and its antimycotic activity against *Candida albicans*. *International Scholarly Research Notices*, 2012. doi:<https://doi.org/10.5402/2012/653465>
- Wagner, M. E., Spoth, K. A., Kourkoutis, L. F., & Rizvi, S. S. (2016). Stability of niosomes with encapsulated vitamin D3 and ferrous sulfate generated using a novel supercritical carbon dioxide method. *Journal of liposome research*, 26(4), 261-268. doi:<https://doi.org/10.3109/08982104.2015.1088868>
- Winuprasith, T., Khomein, P., Mitbumrung, W., Suphantharika, M., Nitithamyong, A., & McClements, D. J. (2018). Encapsulation of vitamin D3 in pickering emulsions stabilized by nanofibrillated mangosteen cellulose: Impact on in vitro digestion and bioaccessibility. *Food hydrocolloids*, 83, 153-164. doi:<https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.04.047>
- Xiong, W., Ren, C., Li, J., & Li, B. (2018). Enhancing the photostability and bioaccessibility of resveratrol using ovalbumin-carboxymethylcellulose nanocomplexes and nanoparticles. *Food & function*, 9(7), 3788-3797. doi:<https://doi.org/10.1039/C8FO00300A>

Improving the Stability and Bioaccessibility of Vitamin D₃ in the Structure of Nanoniosomes Designed by Different Surfactants

Hamideh Maqamikia¹, Vahid Hakimzadeh^{2*}, Akram Arianfar², Ghadir Rajabzadeh³,
Mostafa Shahidi-Noghabi⁴

- 1- PhD. Student, Department of Food Science and Technology, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran
- 2- Assistant Professor, Department of Food Science and Technology, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran
- * Corresponding author (v.hakimzadeh@iauu.ac.ir)
- 3- Professor, Department of Food Nanotechnology, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran
- 4- Associate Professor, Department of Food Chemistry, Research Institute of Food Science and Technology, Mashhad, Iran

Abstract

Due to the high nutritional value of vitamin D₃ and its instability in various environmental and processing conditions, the need to preserve it through techniques such as capsulation during nitrification is felt. In this study, vitamin D₃ was encapsulated in the structure of niosomes based on various surfactants (Span 60, Tween 20, and 80) and cholesterol with ratios (80:20 and 60:40 w/w) using by thin layer hydration-sonication method. It was found that the niosomes prepared with tween 20 and 80 with a surfactant to cholesterol ratio (80:20 w/w) had the lowest mean particle size distribution, lowest polydispersity index, and the highest zeta potential magnitude. Also, these samples had high encapsulation efficiency and their sizes were in the nanoscale. The stability of vitamin D₃ was determined during 1 month at refrigerator condition for nanoniosomes samples based on tween 20 and 80 with a surfactant to cholesterol ratio (80:20 w/w). The results showed that tween 20 based nanoniosomes were more stable than tween 80 based samples during 1 month storage. Also, the bioaccessibility of vitamin D₃ after complete digestion was evaluated under simulated gastrointestinal conditions. Based on this, it was found that the bioaccessibility of vitamin D₃ in the free form is 58%, which the design of nanoniosomes based on tween significantly improved its bioaccessibility ($P < 0.05$). The highest bioaccessibility of vitamin D₃ was obtained for tween 20 nanoniosomes at ratio 80:20 of surfactant to cholesterol.

Keywords: Bioaccessibility, Digestive system, Encapsulation, Nanoniosome, Vitamin D₃