

ارزیابی ویژگی‌های کلونیدی و آنتی‌اکسیدانی نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره گزنه

سارا حق‌جو^۱، بابک قنبرزاده^{۲*}، حامد همیشه‌کار^۳، سولماز اثنی‌عشری^۴، جلال دهقان‌نیا^۵

۱. دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۲. استاد، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

۳. دانشیار، مرکز تحقیقات دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز

۴. دانشجوی دکترا، گروه فارماکونوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه تبریز

۵. دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

(تاریخ دریافت: ۹۳/۳/۲۱، تاریخ پذیرش: ۹۳/۵/۲۵)

چکیده

درون‌پوشانی ترکیبات فنولیک، به‌عنوان آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی، یکی از راه‌های جلوگیری از اکسیداسیون و بهبود جذب آن‌ها در بدن است. لیپوزوم‌ها ذرات کلونیدی متشکل از لیپیدهای قطبی هستند که به علت داشتن بخش‌های آب‌دوست و لیپیدی، در به دام انداختن، تحویل و آزادسازی ترکیبات آب‌دوست، چربی‌دوست و آمفی‌فیلیک، می‌توانند به‌کار گرفته شوند. هدف از این پژوهش، بررسی قابلیت لیپوزوم‌ها در درون‌پوشانی عصاره گزنه و ارزیابی ویژگی‌های کلونیدی و آنتی‌اکسیدانی نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره گزنه است. نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره گزنه، با استفاده از نسبت‌های متفاوت لستین-کلیسترویل به میزان ۰-۶۰، ۱۰-۵۰، ۲۰-۴۰ و ۳۰-۳۰ میلی‌گرم، معادل ۰-۸، ۳-۷، ۵-۵ و ۴-۸ میلی‌مولار، به روش هیدراسیون لایه نازک و سونیکاسیون تولید شدند. آزمون‌های تعیین اندازه ذرات، کارایی درون‌پوشانی، پایداری کپسولاسیون، خاصیت آنتی‌اکسیدانی و میزان کدورت مورد ارزیابی قرار گرفتند. اندازه ذرات و توزیع اندازه ذرات به ترتیب در محدوده ۹۴-۸۱ نانومتر و ۰/۸۸-۰/۸۱ بود و اثر غلظت‌های مختلف لستین-کلیسترویل بر اندازه ذرات در سطح آماری ۵٪ معنی‌دار نبود. هم‌چنین غلظت‌های مختلف لستین-کلیسترویل بر میزان کارایی کپسولاسیون نمونه‌های لیپوزومی در سطح احتمال ۵٪ معنی‌دار بوده و بیش‌ترین میزان کارایی کپسولاسیون در فرمولاسیون بدون کلیسترویل با مقدار $65/83 \pm 2/56$ ٪ حاصل شد. بیش‌ترین میزان درصد احیاکنندگی رادیکال‌های آزاد ۲-دی فنیل-۱-پیکریل-هیدرازیل (DPPH) مربوط به غلظت ۱ mg/mL عصاره آزاد و نانولیپوزوم بوده که به ترتیب مقادیر ۵۰/۹۴ و ۴۵/۲۹٪ بودند. از طرف دیگر درصد احیاکنندگی رادیکال‌های DPPH در غلظت‌های برابر عصاره آزاد و کپسوله، تفاوت معنی‌داری نداشت. به‌علاوه، زمان نگهداری، تأثیر معنی‌داری روی پایداری درون‌پوشانی نانولیپوزوم‌ها ایجاد نکرد و نمونه‌ها در طول زمان نسبت به رهایش مقاوم بودند. هر چند که این مسئله در مورد فرمولاسیون ۳۰-۳۰ صادق نبود و بین میزان کارایی درون‌پوشانی روزهای مختلف، تفاوت معنی‌داری وجود داشت. افزایش غلظت کلیسترویل، باعث افزایش میزان کدورت از ۱۱/۷- به ۲۱/۲- گردید.

واژه‌های کلیدی: درون‌پوشانی، نانولیپوزوم، ترکیبات فنولیک، گزنه.

1- مقدمه

رادیکال‌های آزاد عصاره استخراج شده با متانول، کلروفرم، دی اتیل اتر، اتیل استات و بوتانول گیاهان موجود در خانواده اورتیکاسه را بررسی شد. عصاره‌های استخراج شده با بوتانول و اتیل استات و عصاره کلروفرم، به ترتیب دارای بیش‌ترین میزان تأثیر در حذف رادیکال‌های آزاد DPPH و ترکیبات فنولیک کل بودند [6].

درون‌پوشانی¹، تکنولوژی به دام انداختن مواد جامد، مایع یا گازی در کپسول‌هایی که محتویات خود را در سرعت‌های کنترل شده و تحت شرایط ویژه آزاد می‌کنند، می‌باشد که شامل مراحل تشکیل دیواره اطراف ترکیب زیست فعال، اطمینان از عدم نشت این ترکیبات به بیرون و عدم پوشش ترکیبات نامطلوب در کپسول می‌باشد [7]. یکی از انواع حامل‌های لیپیدی که برای درون‌پوشانی مواد زیست فعال و غذا-دارو استفاده می‌شود، لیپوزومها² می‌باشد. لیپوزومها و زیکول‌های کلئیدی متشکل از لیپیدهای قطبی به‌ویژه فسفولیپیدها بوده که در حضور مولکول‌های آب ساختارهای کروی دولایه‌ای را ایجاد می‌کنند. این ترکیبات به‌دلیل خاصیت آمفی‌فیلیک توانایی کپسوله کردن طیف وسیعی از ترکیبات آب‌دوست، چربی‌دوست و آمفی‌فیل را دارند [8]. لیپوزومها و نانولیپوزومها اگرچه خصوصیات ساختاری، شیمیایی و ترمودینامیک یکسان دارند، اما نانولیپوزومها در مقایسه با لیپوزومها، به‌علت اندازه ذرات کوچک‌تر، ناحیه سطحی بیش‌تری را فراهم می‌کنند و باعث افزایش حلالیت، بهبود قابلیت دسترسی زیستی و رهایش کنترل شده و تحویل دقیق‌تر مواد انکپسوله شده به نواحی هدف می‌شوند. هم‌چنین دارای پایداری کلئیدی بالاتر بوده و کدورت کم‌تری ایجاد می‌کنند [9].

کارایی ترکیبات فنولیک³ به فعالیت، پایداری و دسترسی زیستی آن‌ها بستگی دارد. جذب کم ترکیبات فنولیک در روده، ناپایداری طی فرایند و نگهداری مواد غذایی در برابر عوامل محیطی از قبیل اکسیژن، حرارت، عوامل شیمیایی و بیولوژیک، حلالیت کم در آب و طعم تلخ، کاربرد این ترکیبات را در مواد غذایی محدود کرده است که این مشکلات به‌طور بالقوه می‌تواند با درون‌پوشانی توسط لیپوزومها بهبود یابد [10]. بر روی درون‌پوشانی عصاره‌های گیاهی توسط لیپوزومها تاکنون

آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی استخراج‌شده از گیاهان دارویی، جزء مهم‌ترین ترکیبات زیست‌فعال هستند که می‌توانند در تولید مواد غذایی و نوشیدنی‌ها مورد استفاده قرار بگیرند. این ترکیبات، بخش مهمی از رژیم غذایی انسان‌ها را تشکیل داده و باعث کاهش خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی-عروقی، دیابت، پوکی استخوان و سرطان می‌شوند [1]. امروزه به دلیل عوارض آنتی‌اکسیدان‌های شیمیایی، از جمله احتمال سرطان‌زایی و ایجاد آسیب‌های کبدی، تمایل به سمت مصرف آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی افزایش یافته است [2]. ترکیبات پلی‌فنولیک از متابولیت‌های ثانویه گیاهان بوده و یکی از مهم‌ترین ترکیبات آنتی‌اکسیدانی هستند که می‌توانند در تولید مواد غذایی فراسودمند و یا جلوگیری از اکسیداسیون و افزایش ماندگاری مواد غذایی حساس به اکسیژن، مورد استفاده قرار گیرند. این ترکیبات در گیاهان از L-فنیل آلانین مشتق شده و شامل انواع غیرمحلول‌ها، نظیر تانن‌ها، لیگنین، هیدروسینامیک اسید متصل به دیواره سلولی و یا ترکیبات محلول شامل فنولیک اسید، فیل پروپانوئید، فلاونوئید و کینون می‌باشند [3].

گزنه یکی از گیاهان دارویی بومی ایران است که در نواحی آذربایجان غربی به وفور یافت می‌شود. گیاهی چندساله با نام علمی *Urtica dioica L.* و از تیره *Urticaceae* بوده، که با کرک‌های گزنده¹ روی ساقه و برگ مشخص می‌گردد. این گیاه دارای خواص درمانی گسترده‌ای از جمله خلط‌آور، مسهل، ادرار آور، بندآورنده خونریزی و ضدکرم² می‌باشد. به‌علاوه در درمان بیماری‌هایی نظیر اگزما، رماتیسم، بواسیر، پرکاری تیروئید، آماس نایژه، دیابت و سرطان مؤثر است [4]. خاصیت آنتی‌اکسیدانی گیاه گزنه طی پژوهش‌های مختلف به اثبات رسیده است. نتایج بررسی خواص آنتی‌اکسیدانی عصاره آبی گزنه توسط نشان داد که تمامی غلظت‌های مورد بررسی عصاره دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی و خاصیت احیاکنندگی مؤثری بوده و این پارامترها رابطه مستقیمی با غلظت دارد. خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره در تمامی مقادیر (50-250 µg) بالاتر از 100 µg α-توکوفرول گزارش شده است [5]. هم‌چنین طی پژوهش دیگری، میزان ترکیبات فنولی و توانایی حذف

1. Encapsulation

2. Liposome

3. Phenolic compounds

1. Stinging hairs

2. Vermifuge

مطالعات بسیار محدودی انجام شده است. گورتزی و همکاران [11]، لیپوزوم حاوی عصاره گونه‌ای از مرزنگوش با نام علمی *Origanum dictamnus* را به روش هیدراسیون لایه نازک و با استفاده از نسبت مشخصی از لستین-کلاسترول تهیه کردند. نتایج بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی نشان داد که بیش‌ترین میزان فاکتور حفاظتی¹ در بین عصاره‌ها، مربوط به عصاره متانولی در غلظت 240 ppm بوده که فعالیت آن از BHT هم بالاتر بود. به علاوه میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره کپسوله شده بالاتر از عصاره خالص گزارش شد. هم‌چنین، کپسولاسیون عصاره، تأثیر معنی‌داری روی بار سطحی و اندازه ذرات داشت. این محققین [12]، نتایج آزمایشات مذکور را در مورد عصاره گیاه مورد² نیز تصدیق کرده و به این نتیجه رسیدند که خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن تا غلظت‌های 160 ppm از α -توکوفرول بالاتر بوده، به علاوه میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره درون‌پوشانی شده بالاتر از عصاره آزاد بوده است. برای درون‌پوشانی عصاره‌های گیاهی مختلفی از جمله گیاه گزنه از مواد بیوپلیمری نیز استفاده شده است. برای مثال عصاره گزنه در بسترهای آلژینات-کیتوزان کپسوله شدند [13].

با توجه به اهمیت عصاره‌های گیاهان دارویی در تولید مواد غذایی فرا سودمند و گسترش محصولات مفید جدید در صنایع غذایی، و ضمن این‌که تاکنون پژوهشی در زمینه تولید نانولیپوزوم حاوی عصاره گزنه در ایران صورت نگرفته است، هدف از این پژوهش، تولید نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره گزنه به روش هیدراسیون لایه نازک³-سونیکاسیون و بررسی ویژگی‌های کلئیدی⁴ و آنتی‌اکسیدانی آن‌ها می‌باشد.

2- مواد و روش‌ها

2-1- مواد

فسفولیپید (ال-آلفا-لستین گرانولار با درجه خلوص 99٪، شرکت Across آمریکا)، کلاسترول (با درجه خلوص 95٪، شرکت Merck آلمان)، 2-دی فنیل-1-پیکریل-هیدرازیل (DPPH) (شرکت Sigma)، کلروفورم، متانول، n-هگزان، دی‌کلرومتان و اتیل استات، سدیم کربنات و معرف فولین شیوالتو از

2-2- روش‌ها

2-2-1- روش‌های عصاره‌گیری و آماده‌سازی

برگ‌های گیاه گزنه پس از شستشو در سایه خشک شده و سپس آسیاب گردید. استخراج عصاره توسط روش سوکسله¹ و به ترتیب با استفاده از چهار حلال n-هگزان، کلروفورم، اتیل استات و متانول انجام یافت. به این ترتیب که 10 گرم از پودر گیاه داخل کارتوش پیچیده شده و داخل محفظه استخراج قرار گرفت. سپس 200 میلی‌لیتر حلال داخل بالون ته‌گرد ریخته شده و به مدت 2-3 روز تحت دمای 40-45 درجه سانتی‌گراد حرارت دید. پس از هر بار استخراج، عصاره حاصل تخلیه شده و باقی‌مانده گیاه قبل از استخراج با حلال بعدی خشک شد. در نهایت عصاره متانولی به کمک اواپراتور چرخشی تحت خلأ و دمای 35-40 درجه سانتی‌گراد تغلیظ و سپس به ظروف پتری درون دسیکاتور منتقل گردید تا در آن تبخیر نهایی حلال در دمای آزمایشگاه و طی 20 ساعت کامل شود [15].

جهت تهیه لیپوزوم‌ها از نسبت‌های مختلف لستین-کلاسترول (0-60، 10-50، 20-40 و 30-30 میلی‌گرم) استفاده گردید. لایه نازک با حل کردن غلظت‌های مختلف این دو ماده در ترکیبی از دی‌کلرومتان-متانول با نسبت 1:1 و سپس تبخیر حلال در اواپراتور چرخشی (شرکت Heidolph، کشور آلمان) تحت دمای 30 درجه سانتی‌گراد تشکیل یافت و سپس توسط 15 mL آب مقطر هیدراته شد. لیپوزوم‌های تولید شده در این مرحله چندلایه و در مقیاس میکرومتری بودند [16]. عمل هموزنی‌زاسیون نمونه‌ها توسط هموزنایزر (شرکت Heidolph، کشور آلمان) با دور 20000 rpm و در دمای بالاتر از انتقال فاز لیپوزومی (70) صورت گرفت. در نهایت عمل سونیکاسیون نمونه‌های لیپوزومی توسط سونیکاتور پروب (مدل Sonics & Materials vibracell، کشور انگلستان) با 5 سیکل 1 دقیقه‌ای و 1 دقیقه استراحت ما بین هر سیکل، انجام شد. به این صورت لیپوزوم‌های تک‌لایه‌ای در مقیاس نانومتریک تولید شدند [17].

1. Protection factor
2. Myrtus communis
3. Thin layer hydration
4. Colloidal properties

1. Soxhlet extraction

2-2-2- تعیین اندازه و توزیع اندازه ذرات

اندازه ذرات و توزیع اندازه ذرات، اهمیت ویژه‌ای در تعیین خصوصیات سیستم‌های کلوئیدی دارند. توزیع اندازه ذرات و قطر متوسط آن‌ها در دستگاه آنالیزکننده اندازه ذرات (مدل SALD 2101 ساخت ژاپن) بر اساس روش تفرق نور لیزر اندازه‌گیری می‌شوند. متوسط اندازه ذرات بر اساس میانگین قطر حجمی توسط معادله (1) محاسبه و کلیه نمونه‌ها در سه تکرار اندازه‌گیری می‌شوند.

میانگین قطر حجمی (میانگین حجم معادل) یا DeBroukere mean [18]:

$$\bar{D}[\xi, \tau] = \frac{\sum n_i d_i^\xi}{\sum n_i d_i^\tau} \quad (1)$$

n_i : تعداد ذرات d_i : قطر میانگین ذرات
توزیع اندازه ذرات نیز با استفاده از معادله زیر محاسبه می‌شود:

$$\text{Span} = \frac{D(90\%) - D(10\%)}{D(50\%)} \quad (2)$$

D(90%): قطری که حجم ذرات کوچک‌تر از آن، 90٪ حجم کل ذرات موجود در سیستم را تشکیل می‌دهد.
D(50%): قطری که حجم ذرات کوچک‌تر از آن، 50٪ حجم کل ذرات موجود در سیستم را تشکیل می‌دهد (قطر میانه).
D(10%): قطری که حجم ذرات کوچک‌تر از آن، 10٪ حجم کل ذرات موجود در سیستم را تشکیل می‌دهد.

2-2-3- تعیین کارایی درون پوشانی

از آن جایی که هدف از این پژوهش، درون پوشانی ترکیبات فنولیک بود، بنابراین جهت تعیین کارایی درون پوشانی، فنول کل موجود در نمونه‌های لیپوزومی ارزیابی گردید. ابتدا منحنی کالیبراسیون توسط مقادیر مختلف اسیدگالیک بر حسب میلی‌گرم رسم شد. سپس عصاره کپسوله شده توسط فیلتر آمیکون از عصاره آزاد جدا شده و 1 mL از عصاره آزاد با 1 mL محلول 2٪ سدیم کربنات و 200 μL معرف فولین شیوکالتو مخلوط شده و با دور 1200 rpm به مدت 5 دقیقه سانتریفوژ

شد. جذب نمونه‌ها پس از 30 دقیقه نگهداری در دمای محیط، توسط اسپکتروفتومتر Ultraspec 2000، ساخت انگلیس در طول موج 750 نانومتر، خوانده شد. با قرار دادن نتایج حاصل در منحنی کالیبراسیون، میزان فنول کل موجود در عصاره آزاد بر حسب میلی‌گرم، گالیک اسید به دست آمد. با کم کردن مقادیر فنول آزاد از فنول اولیه، فنول کپسوله شده حاصل گردید [19].
کارایی درون پوشانی از رابطه زیر محاسبه شد:

$$\times 100 = \frac{\text{میزان ترکیبات فنولیک کپسوله شده}}{\text{میزان ترکیبات فنولیک کل}} = \text{کارایی درون پوشانی (\%)} \quad (3)$$

2-2-4- تعیین خاصیت آنتی‌اکسیدانی

توانایی از دست دادن اتم هیدروژن توسط ترکیبات فنولیک با میزان بی‌رنگ کردن محلول بنفش 2 و 2-دی فنیل-1-پیکریل-هیدرازیل (DPPH) در متانول، مورد سنجش قرار می‌گیرد. در این تست از DPPH به عنوان ترکیب رادیکالی پایدار استفاده گردید. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی قبل و بعد از کپسولاسیون ارزیابی شد. ابتدا عصاره متانولی در سه رقت متوالی تهیه شده، سپس 50 μL از هر یک از غلظت‌های عصاره به 5 mL محلول متانولی DPPH (8٪ افزوده شده و جذب نوری نمونه‌ها پس از 30 دقیقه گرمخانه‌گذاری در دمای اتاق، در طول موج 517 نانومتر، توسط اسپکتروفتومتر خوانده شد. جهت انجام محاسبات، جذب DPPH (0.004٪) نیز اندازه‌گیری [20] و درصد کاهش ظرفیت رادیکالی¹ در رادیکال‌های آزاد DPPH توسط رابطه زیر محاسبه شد:

$$\times 100 = \frac{\text{جذب نمونه - جذب DPPH (0.004\%)}}{\text{جذب DPPH (0.004\%)}} = \text{کاهش ظرفیت رادیکالی DPPH} \quad (4)$$

جهت ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های لیپوزومی، در ابتدا ساختار لیپوزوم با استفاده از تریتون X-100 لیز شده و مطابق شرایط یاد شده عمل شد.

2-2-5- تعیین پتانسیل زتا

برای تعیین پتانسیل زتای نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره از دستگاه زتا سایزر (Nano-Zs) ساخت شرکت Malvern کشور

1. DPPH radical scavenging effect

انگلستان) استفاده شد. برای این منظور، هر یک از نمونه‌ها

3- نتایج و بحث

3-1- اندازه و توزیع اندازه ذرات

در این پژوهش به منظور تولید نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره گزنه در مقیاس نانومتری، از نسبت‌های مختلف لستین-کلسترول به میزان 0-60، 10-50، 20-40 و 30-30، بر حسب میلی‌گرم استفاده شد. نتایج مربوط به متوسط قطر حجمی و توزیع اندازه ذرات در جدول 1 آورده شده است که به ترتیب، در محدوده 81-94 نانومتر و 0/88-0/81 بوده و اثر غلظت‌های مختلف لستین-کلسترول بر اندازه و توزیع اندازه ذرات در سطح 5٪ معنی‌دار نبود.

به نظر می‌رسد که غلظت کلسترول بر اندازه ذرات لیپوزوم چندان تأثیری نداشته و بیش‌تر بر پایداری لیپوزوم‌ها موثر است. استرول‌ها به‌علت قرارگیری در بین حفرات مولکولی تشکیل یافته توسط مونومرهای سورفاکتانت، تراکم و نظم مولکول‌های فسفولیپید را افزایش می‌دهد و باعث تنظیم سیالیت غشاهای لیپیدی و کاهش نفوذپذیری آن‌ها نسبت به مواد محلول می‌شود [23-24]. هم‌چنین، با افزایش نیروی دافعه الکترواستاتیک، می‌تواند از تجمع ذرات در طی نگهداری جلوگیری کند [25]. مالهیروس و همکاران به این نتیجه رسیدند که افزودن کلسترول در تهیه لیپوزوم حاوی نایسین تأثیری بر پلی‌دیسپرسیتهی نمونه‌ها نداشت؛ اما باعث افزایش قطر وزیکول‌ها از 137 به 218 نانومتر گردید [26]. گزارش‌های متضادی در مورد اثر استرول‌ها بر اندازه ذرات لیپوزومی منتشر شده که به نظر می‌رسد روش تهیه لیپوزوم در آن بسیار موثر بوده است. در تطابق با پژوهش جاری، گوپینات و همکاران گزارش کردند که افزایش غلظت کلسترول از 72-18٪ مولی تأثیری روی اندازه وزیکول‌های حاوی آزدوتیمیدین

نخست با استفاده از آب مقطر، 50 برابر رقیق شدند. سپس نمونه‌ها توسط سرنگی داخل لوله موئین منتقل و لوله موئین در محل مخصوص دستگاه قرار گرفت. اندازه‌گیری پتانسیل زتا دیسپرسیون لیپوزومی در $pH=7/4$ دمای 25 درجه سانتی‌گراد و توان 149 وات انجام شد [21].

2-2-6- اندازه‌گیری کدورت

کدورت نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر نور مرئی و در طول موج 600 نانومتر اندازه‌گیری شد. ابتدا یک میلی‌لیتر از نمونه با 2 میلی‌لیتر آب مقطر رقیق شده و پس از 30 دقیقه نگهداری در دمای اتاق، جذب نمونه‌ها در طول موج 600 نانومتر خوانده شد [17].

2-2-7- بررسی پایداری درون‌پوشانی

بررسی پایداری سیستم‌های کلئیدی طی مدت نگهداری، یکی از آزمون‌های مهم در رابطه با ویژگی این نوع سیستم‌ها می‌باشد. در بررسی پایداری سیستم، پایداری درون‌پوشانی انکپسولاسیون نمونه‌های لیپوزومی پس از نگهداری به مدت 20 روز در دمای یخچال، اندازه‌گیری شد [22].

2-2-8- تجزیه و تحلیل آماری

آزمون‌ها در 3 تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شدند. تحلیل و ارزیابی (ANOVA) با استفاده از مدل خطی (G.L.M) نرم افزار آماری (SPSS version 16 for windows, SPSS Inc) در سطح احتمال 5٪، ($p < 0/05$) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای تأیید وجود اختلاف بین میانگین‌ها انجام گرفت.

جدول (1) تأثیر غلظت‌های مختلف لستین:کلسترول بر اندازه و توزیع اندازه ذرات نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره گزنه (حروف مشابه نشان‌دهنده عدم وجود اختلاف در سطح 5٪ در آزمون دانکن است).

اسپن	میانگین قطر حجمی (نانومتر)	غلظت لستین:کلسترول (میلی‌مولار)
0/83±0/095 ^a	94±7/57 ^a	0.8
0/88±0/06 ^a	81±3/61 ^a	3.7
0/87±0/073 ^a	92±10/44 ^a	5.5
0/81±0/075 ^a	86±11/59 ^a	8.4

میانگین‌های به‌دست آمده حاصل 3 تکرار می‌باشد.

غلظت ترکیبات پایدارکننده، روش تولید لیپوزوم و شرایط محیطی (pH و درجه حرارت) بستگی دارد. عصاره گزنه مورد استفاده، خالص نبوده و دارای انواع مختلفی از ترکیبات فنولیک است که بسته به ساختار شیمیایی خود، می‌توانند در قسمت آبدوست یا آب‌گریز قرار گیرند، به طوری که اگر بیش‌تر هیدروفیل باشند، توسط پیوندهای هیدروژنی به بخش‌های قطبی مولکول‌های فسفولیپید اتصال یافته و در صورتی که بیش‌تر لیپوفیل باشند، بیش‌تر در بین دولایه لیپیدی قرار می‌گیرند. از آنجایی که سیستم لیپوزومی قابلیت کپسولاسیون انواع ترکیبات هیدروفیل، لیپوفیل و آمفی‌پاتیک را دارد، بنابراین حامل مناسبی برای کپسولاسیون عصاره‌های گیاهی با انواع مختلف ترکیبات فنولیک است و کارایی کپسولاسیون در این صورت بالاتر از سیستم‌های دیگر خواهد بود.

در این پژوهش، جهت ارزیابی کارایی کپسولاسیون ترکیبات فنولیک، میزان فنول کل، قبل و بعد از درون‌پوشانی اندازه‌گیری شد.

شکل 2-الف نشانگر منحنی استاندارد اسیدگالیک است. شکل 2-ب نیز کارایی درون‌پوشانی فرمولاسیون‌های مختلف را نشان می‌دهد.

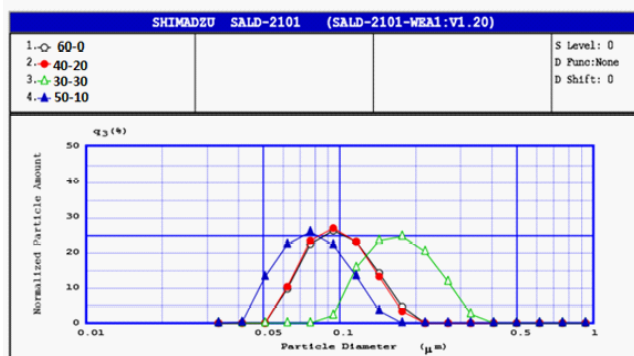
طبق نتایج اثر غلظت‌های مختلف لستین-کسترویل در سطح احتمال 5٪، بر کارایی درون‌پوشانی نمونه‌های لیپوزومی معنی‌دار بود. بیش‌ترین میزان کارایی درون‌پوشانی مربوط به تیمار فاقد کسترویل و حاوی 60 mg لستین بود که مقدار آن $65/83 \pm 2/56$ ٪ به‌دست آمد و افزایش غلظت کسترویل باعث کاهش کارایی کپسولاسیون گردید به طوری که به 51٪ در نمونه حاوی 40 میلی‌گرم لستین-20 میلی‌گرم کسترویل

نداشت [27]. محمدی و همکاران نیز در تولید نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین D₃ به این نتیجه رسیدند که افزایش غلظت کسترویل تأثیر معنی‌داری روی اندازه و توزیع اندازه ذرات نداشت [28]. تحقیقات لیو و همکاران نشان دادند که مقادیر بهینه نسبت فسفولیپید به کسترویل برای حداقل اندازه ذرات (95/8-97/4 نانومتر)، در لیپوزوم‌های پوشش داده شده با کیتوزان حامل ویتامین C، 60 به 40 است و کم‌تر و بیش‌تر از این نسبت، اندازه ذرات افزایش می‌یابد [29]. از طرف دیگر افزودن مخلوط استرویل‌های گیاهی به فرمولاسیون لیپوزوم‌های حامل ویتامین C موجب افزایش اندازه ذرات گردید [23].

شکل 1، منحنی توزیع اندازه ذرات نمونه را در غلظت‌های مختلف لستین-کسترویل نشان می‌دهد که توسط دستگاه آنالیز سایز به‌دست آمده است. هر چقدر اسپن کم‌تر باشد، نشان‌دهنده توزیع اندازه ذرات باریک‌تر و سیستم کلوئیدی همگن‌تر خواهد بود. نمونه‌هایی با توزیع اندازه باریک در برابر پدیده ناپایداری از نوع رسیدگی اسوالد مقاوم‌تر هستند. طبق نتایج، توزیع اندازه ذرات برای تمام نمونه‌ها با غلظت‌های متفاوت لستین-کسترویل باریک بود. با توجه به مطالب بیان شده، می‌توان نتیجه گرفت که روش تولید لیپوزوم‌ها مستقل از غلظت‌های مختلف لستین-کسترویل، برای تولید وزیکول‌ها در مقیاس نانومتری با توزیع اندازه ذرات باریک، مناسب می‌باشد.

3-2- نتایج کارایی درون‌پوشانی

کارایی درون‌پوشانی یکی از پارمترهای مهم در ارزیابی نانو حامل‌ها بوده و به عواملی نظیر ماهیت ماده کپسوله شده (لیپوفیل یا هیدروفیل)، ماهیت و غلظت فسفولیپید، نوع و

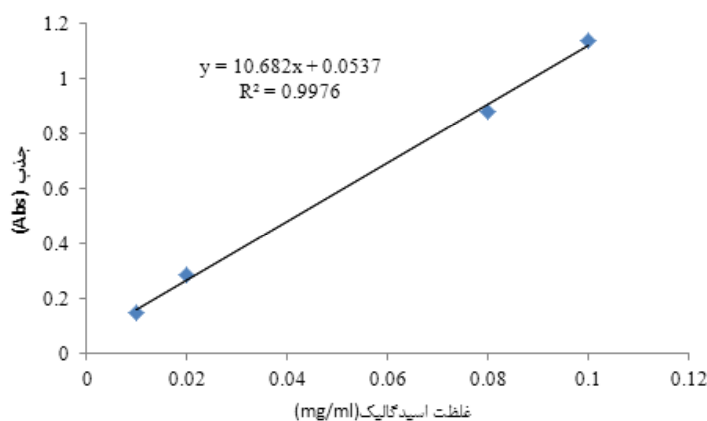


شکل (1) توزیع اندازه ذرات در غلظت‌های مختلف لستین به کسترویل (میلی مولار): 8 به 0 (A)، 7 به 3 (B)، 5 به 5 (C) و 4 به 8 (D)

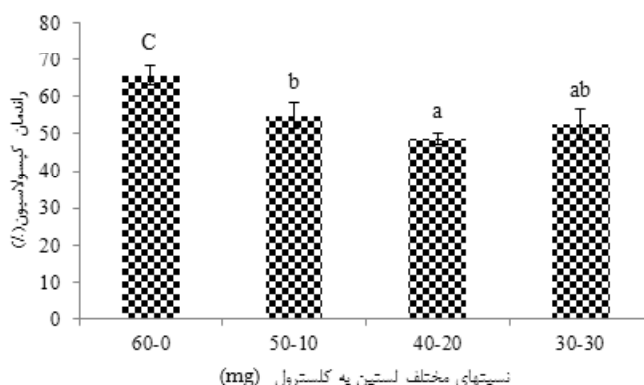
رسید. بنابراین، تیمار حاوی 60 mg لستین به‌عنوان شرایط بهینه کپسولاسیون در نظر گرفته می‌شود. از آنجایی که فسفولیپیدها، ساختمان اصلی لیپوزوم را تشکیل می‌دهند، هرچه میزان غلظت فسفولیپید بالاتر باشد، میزان ترکیب فعال بیش‌تری کپسوله خواهد شد. از طرف دیگر، سفت شدن غشا توسط کلسترول باعث جلوگیری از باز شدن غشای لیپوزومی و در نتیجه، جاگرفتن کم‌تر مواد فعال آب‌گریز در آن می‌گردد. افزایش آب‌گریزی سطحی توسط کلسترول، تمایل اتصال مواد فعال آب‌دوست به سطح لیپوزوم را کاهش می‌دهد. به‌طوری که نتایج این پژوهش با نتایج مالهیروس و همکاران مطابقت داشت و افزودن کلسترول در لیپوزوم‌های حاوی نایسین باعث کاهش کارایی درون‌پوشانی شد [26]. نتایج لاریدی و همکاران نیز نشان داد افزایش غلظت کلسترول (0-20 w/w)، باعث کاهش درصد درون‌پوشانی نایسین Z

3-3- پتانسیل زتا

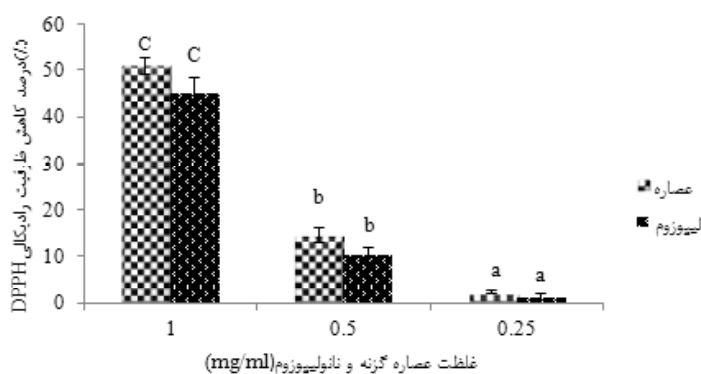
محاسبه پتانسیل زتا یک روش مناسب جهت پیشگویی پایداری



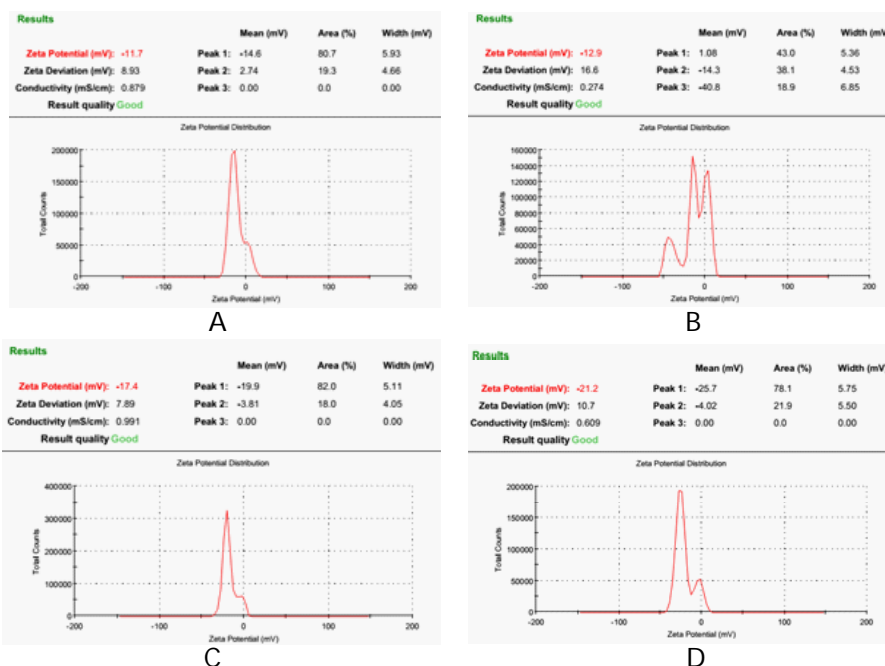
شکل (2) الف-منحنی استاندارد جهت تعیین غلظت میزان فنول کل بر حسب میلی گرم اسید گالیک



شکل (2) ب- تأثیر تغییر غلظت لستین:کلسترول بر کارایی درون‌پوشانی نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره گزنه (حروف غیر مشابه نشان‌دهنده وجود اختلاف معنی‌دار در سطح احتمال 5٪ می‌باشد)



شکل (3) مقایسه خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره گزنه به صورت آزاد و نانولیپوزوم در غلظت‌های مختلف



شکل (4) پتانسیل زتای نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره گزنه در غلظت‌های مختلف لستین-کلسترول (A) 60:0، (B) 50:10، (C) 40:20 و (D) 30:30

لیپوزوم‌ها و سایر سیستم‌های کلوئیدی است. اندازه‌گیری پتانسیل زتا در کنترل توده‌ای شدن و رسوب نانولیپوزوم‌ها که فاکتورهای مهمی در پایداری هستند، مفید است [24]. در این پژوهش، به‌منظور مشخص شدن نحوه عمل نیروهای دافعه الکترواستاتیک نانولیپوزوم و میزان پایداری فرمولاسیون‌ها از نتایج تحرک الکتروفورتیک و پتانسیل زتا استفاده شد، که نتایج آن در جدول 2 آورده شده است. شکل 4 نیز نشانگر پتانسیل زتای نانولیپوزوم‌هاست.

پتانسیل زتا تابعی از بار سطحی وزیکول‌های لیپیدی، لایه‌های جذب شده سطحی و ماهیت محیطی است که لیپوزوم‌ها در آن

پراکنده شده‌اند. ماهیت و دانسیته بار سطحی لیپوزوم‌ها، علاوه‌بر تاثیر بر پایداری کلوئیدی ذرات لیپوزوم، از مهم‌ترین عوامل مؤثر بر مکانیسم و میزان برهم‌کنش‌های سلول و لیپوزوم است. بار سطحی بالاتر لیپوزوم به دلیل نیروهای دافعه بیشتر، از تجمع وزیکول‌ها جلوگیری کرده و در نتیجه پایداری لیپوزوم بیشتر خواهد بود. از طرف دیگر، بار سطحی بالاتر باعث افزایش برهم‌کنش‌های سلول و لیپوزوم و در نتیجه تحویل بهتر ترکیب زیست‌فعال می‌شود [31]. طبق نتایج ارائه شده در جدول 2، افزودن کلسترول باعث افزایش میزان پتانسیل زتا شد. به‌طوری که میزان آن از 12/9- در نمونه بدون کلسترول تا 21/2- در

نمونه بدون کلسترول تا 21/2- در نمونه حاوی 30 mg افزایش یافت. از آنجایی که کلسترول یک مولکول خنثی است، بار منفی ذرات می‌تواند در نتیجه تشکیل پیوند هیدروژنی بین گروه کولین در فسفاتیدیل کولین و گروه هیدروکسیل موجود در سر کلسترول باشد که در نتیجه این پیوند، گروه کولین با بار مثبت به داخل غشا و گروه فسفاتیدیل با بار منفی به سطح غشا کشیده شده و به این ترتیب بار منفی ذرات و دافعه الکترواستاتیک بین آن‌ها افزایش می‌یابد [33]. مالهیروس و همکاران نیز به این نتیجه رسیدند افزودن کلسترول در لیپوزوم حاوی نایسین، باعث افزایش پتانسیل زتا از 55- به 64- گردید [26]. طی تحقیق سیچز (2013) افزایش نسبت مولی کلسترول از 0-0/75 در لیپوزوم‌های متشکل از DPPC و کلسترول، پتانسیل زتا را از 5+ به 7/5- میلی‌ولت تغییر داد (32). در مقابل، افزایش غلظت کلسترول از 16-0 μmol تغییری روی پتانسیل زتای لیپوزوم حاوی ایبوپروفن نداشت [29].

3-4- خاصیت آنتی‌اکسیدانی

در این پژوهش، خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره متانولی گزنه و لیپوزوم در سه غلظت 1، 0/5 و 0/25 mg/mL بررسی شد که نتایج آن در شکل 3 آورده شده است. خاصیت آنتی‌اکسیدانی در مورد لیپوزوم حاوی 60 mg لستین با بیش‌ترین میزان کارایی کپسولاسیون اندازه‌گیری شد. بیش‌ترین میزان درصد احیاکنندگی رادیکال‌های آزاد DPPH مربوط به غلظت 1 mg/mL عصاره آزاد و نانولیپوزوم بوده که به ترتیب مقادیر 50/94 و 45/29٪ بودند. از طرف دیگر در غلظت‌های برابر بین خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره آزاد و کپسوله تفاوت معنی‌داری وجود نداشت.

3-5- اندازه‌گیری کدورت

پخش نور توسط ذرات موجود در محیط سوسپانسیون باعث کدورت سیستم حاصل می‌شود، که میزان آن به تعداد و اندازه ذرات کلئیدی موجود در فاز مایع، تفاوت در ضریب انعکاس ذرات و محیط سوسپانسیون و توزیع اندازه ذرات بستگی دارد. نتایج مربوط به کدورت در شکل 5 نشان داده شده است. همان‌طور که ملاحظه می‌شود با افزایش میزان کلسترول، کدورت به‌طور معنی‌داری افزایش یافته است. با توجه به این که بین غلظت‌های مختلف لستین-کلسترول از لحاظ اندازه ذرات، تفاوت معنی‌داری وجود ندارد، افزایش میزان کدورت در اثر افزایش غلظت کلسترول را می‌توان به موارد مختلفی مربوط دانست. اول این که با افزودن کلسترول، پیوندهای جدیدی بین گروه کولین لستین و گروه هیدروکسیل کلسترول ایجاد می‌شود که با افزایش میزان کلسترول پیوندهای ایجاد شده نیز

جدول (2) پتانسیل زتای نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره گزنه

پتانسیل زتا (mv)	ترکیبات تشکیل‌دهنده لیپوزوم (لستین به کلسترول)
0-60	-11/7
10-50	-12/9
20-40	-17/4
30-30	-21/2

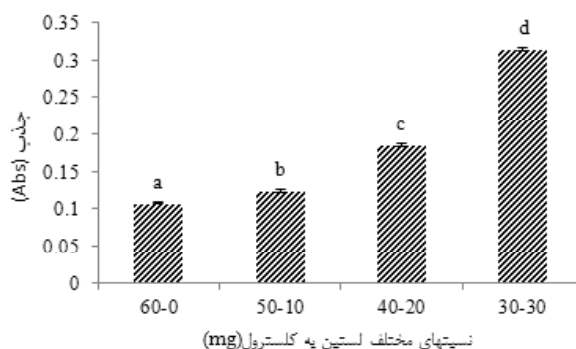
نتایج محمدی و همکاران مطابقت داشت. به طوری که آن‌ها نیز در تولید نانولیپوزوم‌های ویتامین D₃ به این نتیجه رسیدند که افزودن کلسترول باعث افزایش معنی‌دار کدورت نمونه‌ها شد [28].

3-6- بررسی پایداری درون پوشانی

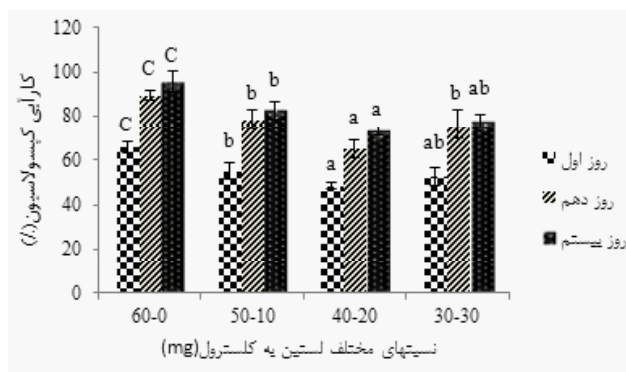
میزان پایداری درون پوشانی ترکیبات فنولیک کپسوله شده در نانولیپوزوم‌ها، طی مدت بیست روز و در بازه زمانی 1، 10 و 20 روز، توسط اسپکتروفتومتر ارزیابی شد. نتایج این آزمون در شکل 6 آورده شده است.

لیپوزوم‌ها از نظر ترمودینامیکی ناپایدار بوده و در طی زمان تمایل به ادغام و رهایش ماده کپسوله دارند. ناپایداری آن‌ها ناشی از سیالیت غشای لیپیدی است. اگر ماده فعال تمایل زیادی به خروج از ساختار غشایی لیپوزومی داشته باشد، اصلاح ساختار دو لایه‌ای و سفت شدن آن منجر به حفظ آن‌ها در لیپوزوم می‌شود. استفاده از این ترکیبات در غشا باعث نظم و انسجام غشای لیپیدی شده و از تشکیل لخته و توده‌ای شدن

بیش‌تر می‌شود، که همین پیوندهای جدید باعث افزایش کدورت می‌شود. دوم این‌که قرار گرفتن کلسترول در ساختار دولایه‌ای منجر به افزایش دانسیته چیدمان مولکول‌های فسفولیپیدی می‌شود. این مولکول در هنگام تبدیل ساختارهای لاملار به وزیکول‌ها، در بین شکاف‌های ایجاد شده توسط زنجیره‌های آسیل قرار می‌گیرد [29]. به احتمال زیاد، افزایش دانسیته، باعث افزایش میزان نور پخش شده توسط ذرات و افزایش کدورت شده است. سوم این‌که افزایش کدورت ممکن است به ماهیت خود کلسترول مربوط باشد. یعنی ممکن است کلسترول بیش‌تر از لستین نور را منحرف می‌کند. گریگوریادیس و همکاران (1979)، گزارش کردند که در کسر مولی بین 0/5-0/2 بسته به ماهیت فسفولیپید، کلسترول می‌تواند در دو لایه لیپیدی حل شود، ولی در غلظت‌های بالاتر تشکیل شکل بلورین را می‌دهند. در این تحقیق نیز با توجه به نسبت‌های استفاده شده، بخشی از مولکول‌های کلسترول به فرم آزاد و بلورین در فرمولاسیون‌های حاوی کلسترول موجود بودند که باعث افزایش میزان کدورت شدند [34]. نتایج پژوهش با نتایج



شکل (5) مقادیر کدورت نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره گزنه (حروف غیر مشابه نشان‌دهنده وجود اختلاف در سطح 5% در آزمون دانکن است)



شکل (6) نتایج پایداری کپسولاسیون نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره گزنه طی نگهداری

سیستم‌های لیپوزومی جلوگیری می‌کند [35]. در این تحقیق از کلسترول جهت کاهش سیالیت غشای لیپوزومی استفاده شد. با توجه به نتایج، زمان نگهداری تأثیر معنی‌داری بر کارایی درون‌پوشانی نمونه‌ها نداشت و نمونه‌های حاصل در طول زمان به رهایش مقاوم‌اند. البته این مسئله در مورد فرمولاسیونی که در آن از میزان یکسان لستین و کلسترول استفاده شده بود، صادق نبود و بین میزان کارایی درون‌پوشانی روز دهم با روز اول و بیستم تفاوت معنی‌داری وجود دارد. راستی و همکاران، پایداری لیپوزوم‌ها و نانولیپوزوم‌های حاوی امگا 3 تولید شده به روش هیدراسیون لایه نازک را بررسی کردند. نتایج آن‌ها نشان داد نگهداری نمونه‌ها به مدت 10 ماه در دمای 4- درجه سانتی‌گراد تأثیر چندانی روی درصد درون‌پوشانی آن‌ها نداشت [36]. زالبا و همکاران نیز اثر کلسترول را بر پایداری درون‌پوشانی لیپوزوم‌های

4- نتیجه‌گیری

نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره گزنه به طرز موفقیت آمیزی با اندازه ذرات زیر 100 نانومتر تولید شدند و میزان خاصیت آنتی‌اکسیدانی آن‌ها پس از درون‌پوشانی تغییر معنی‌داری نداشت. بنابراین، نانولیپوزوم‌ها می‌توانند به عنوان راهکار مناسبی جهت افزایش پایداری ترکیبات فنولیک عصاره‌های گیاهی در صنایع غذایی مورد استفاده قرار گیرند.

منابع

- [5] Gülçin, I., Küfrevioğlu, Ö. Oktay, M., Büyükkokuroglu, M.E. (2004). Antioxidant, antimicrobial, antiulcer and analgesic activities of nettle (*Urtica dioica L.*). *J. Ethnopharmacol.*, 90(2), 205-15.
- [6] Chahardehi, A.M., Ibrahim, D., Sulaiman, SF. (2009). Antioxidant activity and total phenolic content of some medicinal plants in urticaceae family. *J. Appl. Biol. Sci.*, 3(2).
- [7] Fang, Z., Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols—a review. *Trends Food Sci. Tech.*, 21(10), 510-23.
- [8] Keller, B.C. (2001). Liposomes in nutrition. *Trends Food Sci. Tech.*, 12(1), 25-31.
- [9] Mozafari, M.R. (2005). Liposomes: an overview of manufacturing techniques. *Cell. Mol. Biol. Lett.*, 10(4), 711.
- [10] Munin, A., Edwards-Lévy, F. (2011). Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a
- [1] Bozkurt, H. (2006). Utilization of natural antioxidants: Green tea extract and *Thymbra spicata* oil in Turkish dry-fermented sausage. *Meat. Sci.*, 73(3), 442-50.
- [2] Komes, D., Belščak-Cvitanović, A., Horžić, D., Rusak, G., Likić, S., Berendika, M. (2011). Phenolic composition and antioxidant properties of some traditionally used medicinal plants affected by the extraction time and hydrolysis. *Phytochem. Analysis*, 22(2), 172-80.
- [3] Rispail, N., Morris, P., Webb, KJ. (2005). *Phenolic Compounds: Extraction and Analysis*. Lotus Japonicus Handbook: Springer., pp 349-54.
- [4] Kavalalı, G., Tuncel, H., Göksel, S., Hatemi, H. (2003). Hypoglycemic activity of *Urtica pilulifera* in streptozotocin-diabetic rats. *J. Ethnopharmacol.*, 84(2), 241-5.

- orange juice and offer vitamin C protection after heat treatment. *Food Res. Int.*, 44(9), 3039-46.
- [19] González-Paredes, A., Clarés-Naveros, B., Ruiz-Martínez, M.A., Durbán-Fornieles, J.J., Ramos-Correnzana, A., Monteoliva-Sánchez, M. (2011). Delivery systems for natural antioxidant compounds: Archaeosomes and archaeosomal hydrogels characterization and release study. *Int. J. Pharm.*, 421(2), 321-31.
- [20] Delazar, A., Lotfipour, F., Nazemiyeh, H. (2012). Antioxidant and Antimicrobial activity of *Pedicularis sibthorpii* Boiss. And *Pedicularis wilhelmsiana* Fisch ex. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*, 2(1), 89-92.
- [21] Fatouros, D.G., Antimisiaris, S.G. (2002). Effect of amphiphilic drugs on the stability and zeta-potential of their liposome formulations: a study with prednisolone, diazepam, and griseofulvin. *J. Colloid Interface Sci.*, 251(2), 271-7.
- [22] Chanda, H., Das, P., Chakraborty, R., Ghosh, A. (2011). Development and evaluation of liposomes of fluconazole. *J. Pharm. Biomed. Sci.*, 5(05), 1-9.
- [23] Alexander, M., Acero Lopez, A., Fang, Y., Corredig, M. (2012). Incorporation of phytosterols in soy phospholipids nanoliposomes: Encapsulation efficiency and stability. *Food Sci. Technol.*, 47, 427-436.
- [24] Mozafari, M.R., Khosravi-Darani, K., Borazan, G.G., Cui, J., Pardakhty, A., Yurdugul, S. (2008). Encapsulation of food ingredients using nanoliposome technology. *Int. J. Food Prop.*, 11(4), 833-44.
- [25] Maherani, B., Arab-Tehrany, E.R., Mozafari, M., Gaiani, C., Linder, M. (2011). Liposomes: a review of manufacturing techniques and targeting strategies. *Curr. Nanosci.*, 7(3), 436-52.
- [26] Malheiros, P.D.S., Sant Anna, V., Barbosa, M.D.S., Brandelli, A., Franco, B.D.G.D.M. (2012). Effect of liposome-encapsulated nisin and bacteriocin-like substance P34 on *Listeria monocytogenes* growth in Minas Encapsulation of natural polyphenolic compounds; a review. *Pharm.*, 3(4), 793-829.
- [11] Gortzi, O., Lala, S., Chinou, I., Tsaknis, J. (2007). Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of *Origanum dictamnus* extracts before and after encapsulation in liposomes. *Molecules.*, 12(5), 932-45.
- [12] Gortzi, O., Lala, S., Chinou, I., Tsaknis, J. (2008). Reevaluation of bioactivity and antioxidant activity of *Myrtus communis* extract before and after encapsulation in liposomes. *Eur. Food Res. Technol.*, 226(3), 583-90.
- [13] Belščak-Cvitanović, A., Stojanović, R., Manojlović, V., Komes, D., Cindrić, I.J., Nedović V., et al. (2011). Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate-chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion. *Food Res. Int.*, 44, 1094-1101.
- [14] Tsai, W.C., Li, W.C., Yin, H.Y., Yu, M.C., Wen, H.W. (2012). Constructing liposomal nanovesicles of ginseng extract against hydrogen peroxide-induced oxidative damage to L929 cells. *Food Chem.*, 132(2), 744-51.
- [15] Modarresi-Chahardehi, A., Ibrahim, D., Fariza-Sulaiman, S., Mousavi, L. (2012). Screening antimicrobial activity of various extracts of *Urtica dioica*. *Revista de Biología Tropical.*, 60(4), 1567-76.
- [16] Kirby, C., Gregoriadis, G. (1984). Dehydration-rehydration vesicles: a simple method for high yield drug entrapment in liposomes. *Nat. Biotechnol.*, 2(11), 979-84.
- [17] Xia, S., Xu, S. (2005). Ferrous sulfate liposomes: preparation, stability and application in fluid milk. *Food Res. Int.*, 38(3), 289-96.
- [18] Marsanasco, M., Márquez, A.L., Wagner, J.R., del V Alonso, S., Chiramoni, N.S. (2011). Liposomes as vehicles for vitamins E and C: An alternative to fortify

- technological approach. *Biotechnol. Annu. Rev.*, 7, 59-85.
- [36] Rasti, B., Jinap, S., Mozafari, M., Yazid, A. (2012). Comparative study of the oxidative and physical stability of liposomal and nanoliposomal polyunsaturated fatty acids prepared with conventional and Mozafari methods. *Food Chem.*, 135(4), 2761-70.
- [37] Zalba, S., Navarro, I., Trocóniz, IF., Tros de Ilarduya, C., Garrido, M.J. (2012). Application of different methods to formulate PEG-liposomes of oxaliplatin: Evaluation in vitro and in vivo. *Eur. J. Pharm. Biopharm.*, 81(2), 273-80.
- frescal cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, 156(3), 272-277.
- [27] Gopinath, D., Ravi, D., Rao, B., Apte, S., Renuka, D., Rambhau, D. (2004). Ascorbyl palmitate vesicles (Aspasomes): formation, characterization and applications. *Int. J. Pharm.*, 271(1), 95-113.
- [28] Mohammadi, M., Ghanbarzadeh, B., Hamishehkar, H., Rezaei Mokarram, R., Mohammadifar, M.A. (2014). Study of physical properties of vitamin D3-loaded nanoliposomes, prepared by thin layer hydration-sonication method. *Iranian J. Nutr. Sci. Food Tech.*, 8(4), 175-188 [in Persian].
- [29] 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.
- [30] Laridi, R., Kheadr, E., Benech, R.O., Vuilleumard, J., Lacroix, C., Fliss, I. (2003). Liposome encapsulated nisin Z: optimization, stability and release during milk fermentation. *Int. Dairy J.*, 13(4), 325-36.
- [31] Sharma, A., Sharma, U.S. (1997). Liposomes in drug delivery: progress and limitations. *Int. J. Pharm.*, 154(2), 123-40.
- [32] Szcześ, A. (2013). Effects of DPPC/Cholesterol liposomes on the properties of freshly precipitated calcium carbonate. *Colloid Surface B.*, 101, 44-8.
- [33] Makino, k., Yamada, T., Kimura, M., Oka, T., Ohshima, H., and Kondo, T. (1991). Temperature and ionic strength-induced conformational changes in the lipid head group region of liposomes as suggested by zeta potential data. *Biophys. Chem.*, 41, 75-183.
- [34] Gregoriadis, G., Davis, C. (1979). Stability of liposomes in vivo and in vitro is promoted by their cholesterol content and the presence of blood cells. *Biochem. Biophysical Res. Commun.*, 89(4), 1287-93.
- [35] Brandl, M. (2001). Liposomes as drug carriers: a