



تولید و ارزیابی نانولیپوزوم‌های پوشش داده شده با کیتوزان برای درون‌پوشانی کافئین

شادی رجبی مقدم^۱، رضوان شاددل^{۲*}

۱- دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.

۲- استادیار گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشگاه محقق اردبیلی، اردبیل، ایران.

چکیده

اطلاعات مقاله

در این پژوهش، نانولیپوزوم‌های پوشش داده شده با کیتوزان در نسبت‌های ۱-۹، ۲-۸، ۳-۷ و ۴-۶ لستین-کلوسترول، با استفاده از روش هیدراتاسیون لایه نازک، به عنوان یک سیستم تحویل برای ریزپوشانی کافئین تهیه شدند. سپس، آزمون‌های تعیین اندازه و پتانسیل زتا برای تعیین ویژگی‌های نانوذرات تولید شده صورت گرفت. میانگین اندازه ذرات (میانگین قطر هیدرودینامیکی) و توزیع اندازه ذرات برای نسبت‌های مختلف لستین-کلوسترول، به ترتیب در محدوده ۱۳۳/۵ تا ۵۳۳/۵ نانومتر و ۰/۴۱ - ۰/۳۱ قرار گرفت. مقادیر پتانسیل زتا نیز در محدوده ۴۰/۹۶+ تا ۵۰/۵+ بدست آمد. پس از تعیین ظرفیت بارگذاری، آزمون FTIR برای بررسی واکنش‌های احتمالی بین کافئین و مواد دیواره نانوکیتوزوم‌ها صورت گرفت. مورفولوژی کیتوزوم‌های نسبت ۱-۹ لستین-کلوسترول بارگیری شده با کافئین، با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) نشان داده شد. پایداری نمونه کیتوزومی با نسبت ۱-۹ لستین-کلوسترول، از طریق مشاهده بصری ایجاد رسوب و محاسبه مقدار آزادسازی کافئین محصور شده در طول ۶۰ روز نگهداری در دمای محیط مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده در این پژوهش، نشان داد که نانوکیتوزوم‌ها سیستم کارآمدی در حفظ و رهایش پایدار کافئین هستند.

تاریخ‌های مقاله:

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۱۰/۱۴

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۲/۲۵

کلمات کلیدی:

کافئین،

نانوکیتوزوم،

FTIR،

SEM

DOI: 10.22034/FSCT.20.139.93

DOR:20.1001.1.20088787.1402.20.139.6.0

* مسئول مکاتبات:

r.shaddel@uma.ac.ir

۱- مقدمه

کافئین (3,1-5-تری متیل گزانتین، $C_8H_{10}N_4O_2$) یک آلکالوئید از گروه گزانتین است و در دانه، برگ یا میوه بیش از ۶۰ گونه گیاهی در جهان یافت می‌شود. این ماده در شکل خالص و جامد خود یک پودر کریستالی سفید رنگ، با طعم و مزه تلخ است که در آب و برخی از حلال‌های آلی مانند کلروفرم و دی‌کلرومتان محلول می‌باشد [1]. کافئین یکی از رایج‌ترین مواد فعال زیستی در جهان است که می‌تواند عملکرد ذهنی و جسمی را افزایش داده، خستگی را از بین برده و افسردگی را کاهش دهد [۲]. این ترکیب به طور طبیعی در تعدادی از نوشیدنی‌های رایج مانند چای و قهوه وجود دارد و همچنین معمولاً به طیف گسترده‌ای از نوشیدنی‌های الکلی و غیرالکلی، داروها و لوازم آرایشی اضافه می‌شود [3]. مصرف کافئین، به عنوان ماده اصلی بسیاری از نوشیدنی‌ها، به یک عادت اجتماعی تبدیل شده و با اثرات نشاط‌آوری و انرژی‌بخشی، جایگاه خود را به طور فزاینده‌ای در زندگی ما تقویت کرده است [1].

فعالیت‌های دارویی، اثرات بیولوژیکی و فیزیولوژیکی فراوانی به کافئین نسبت داده شده‌اند، که این ترکیب را به گسترده‌ترین ماده محرک مورد مطالعه در تاریخ تبدیل کرده‌اند [4]. اثرات محرک بودن کافئین عمدتاً با تحریک سیستم عصبی، عضلانی و قلبی-عروقی مرتبط است [5]. متابولیت‌های کافئین منجر به افزایش سطح گلوکز خون، انقباض عروق خونی، افزایش حجم ادرار و شل شدن عضلات در بدن می‌گردند. مصرف مقادیر متوسط کافئین (۲۰۰ تا ۳۰۰ میلی گرم)، با افزایش عملکرد فیزیکی و ذهنی همراه است که در نتیجه‌ی آن افراد فعال‌تر و پرنرژی‌تر می‌شوند. همچنین، کافئین با دوزهای متوسط منجر به کاهش غلظت آدنوزین در مغز می‌شود که توجه و هوشیاری مصرف‌کننده را بیشتر می‌کند [6]. در حالت کلی، افزایش

گردش خون و کاهش خطر ابتلا به بیماری‌های قلبی-عروقی، اثرات ضد التهابی و ضد سرطانی، مهار افزایش میزان چربی بدن و تعدیل متابولیسم گلوکز از اثرات دارویی و بیولوژیکی مصرف کافئین می‌باشند [4]. این ماده با کاهش آستانه تحریک نورون‌ها، تحریک عصبی را افزایش می‌دهد لذا از داروهای حاوی کافئین در درمان احتقان بینی، آسم، سردرد و کاهش وزن استفاده می‌شود [1]. همچنین، کافئین یکی از معدود داروهای مجاز در ورزش است و اثرات مفید آن در رشته‌هایی که نیاز به استقامت دارند، مانند دوچرخه سواری و فوتبال گزارش شده است [3].

با این حال، سطوح بالاتر مصرف کافئین به طور قابل توجهی باعث ایجاد اثرات منفی مانند اضطراب، بی‌قراری و بی‌خوابی می‌شود که عمدتاً در افراد حساس به کافئین مشاهده می‌شود [7]. بنابراین، نظارت بر محتوای کافئین در نوشیدنی‌های مختلف بسیار مهم است. همچنین نگرانی‌هایی در مورد مصرف مقادیر بالای کافئین توسط گروه‌های آسیب‌پذیر مانند کودکان یا زنان باردار نیز ایجاد شده است [3].

لذا با توجه به طعم تلخ و عوارض جانبی مصرف سطوح بالای کافئین، طراحی سیستمی برای پوشش‌دهی طعم و امکان آزادسازی قابل برنامه‌ریزی این ترکیب زیست فعال، در مدت زمان طولانی ضروری است. فناوری ریزپوشانی یکی از بهترین راه‌ها برای غلبه بر این چالش است، این تکنیک به طور گسترده برای بهبود کارایی مواد زیست فعال به کار گرفته می‌شود [8]. تا به امروز، مطالعات مختلفی بر روی ریزپوشانی کافئین مانند؛ درون پوشانی کافئین در میکروهیپدروژل‌های آلزینات به روش الکترواسپری [9]، درون پوشانی کافئین در نانوهیدروژل‌های لاکتوفرین-گلیکوماکروپپتیدی [10] و ریزپوشانی کافئین در سیستم‌های تحویل مبتنی بر پلی‌ساکارید [11] صورت گرفته است.

به منظور دستیابی به یک سیستم ریزپوشانی موفق

لایه‌ای بر روی سطح نانولیپوزوم استفاده شود، گزینه مناسبی است. کیتوزان باعث کاهش سیالیت غشا و کاهش سرعت تجمع نانوساختارهای تشکیل شده می‌شود [2]. هدف از این پژوهش، پوشش دهی طعم و کنترل آزادسازی کافئین با استفاده از نانوکیتوزوم‌ها می‌باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

پودر کافئین خالص از شرکت نیکوشیمی خریداری و در محیط عاری از رطوبت در دمای اتاق نگهداری گردید. اتانول ۹۶٪ و اسید استیک از شرکت مجللی، توین ۸۰ از شرکت مرک آلمان، لستین و کلسترول و نیز کیتوزان از شرکت سیگما آلدריך آلمان تهیه شدند.

۲-۲- روش‌های آزمون

۲-۲-۱- اندازه‌گیری مقدار کافئین بدست آمده

در ابتدا برای ترسیم نمودار کالیبراسیون استاندارد کافئین، محلول استوک کافئین در غلظت ۲۵۰ ppm آماده شد. برای این منظور، مقدار ۲۵ میلی‌گرم از این ماده در آب مقطر حل شده و به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس رقت‌های ۲۵-۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر (۲۵-۵۰-۱۰۰-۱۵۰ و ۲۰۰ میلی‌گرم بر لیتر) از محلول استوک تهیه گردید. در ادامه، مقدار جذب محلول‌های تهیه شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مرئی-UV (BEL PHOTONICS) در طول موج ۲۷۶ نانومتر تعیین و منحنی استاندارد کافئین رسم شد ($y = 0.0035x + 0.0112, R^2 = 0.9988$) [2].

۲-۲-۲- آماده‌سازی لیپوزوم‌های حاوی کافئین

از روش هیدراتاسیون لایه نازک مشابه روش سرابندی

انتخاب حامل مناسب، بسته به ویژگی‌های فیزیکی و شیمیایی ماده فعال، اهمیت دارد. حامل‌های مورد استفاده برای این منظور باید غیرسمی، سازگار با محیط زیست و در دسترس باشند [8]. نانوحامل‌های قابل استفاده در فراوری مواد غذایی می‌توانند بر پایه کربوهیدرات، پروتئین یا لیپید باشند. علی‌رغم اینکه مزایای فراوانی به نانوحامل‌های مبتنی بر کربوهیدرات و پروتئین، نسبت داده شده است، با این حال امکان صنعتی شدن آن‌ها به دلیل نیاز به استفاده از عملیات‌های شیمیایی یا حرارتی پیچیده که به طور کامل قابل کنترل نیستند، وجود ندارد. از سوی دیگر، نانوحامل‌های مبتنی بر لیپید امکان تولید صنعتی را دارند و نیز از راندمان درون‌پوشانی بالا و سمیت کم برخوردار هستند [12]. نانوحامل‌های مبتنی بر لیپید در صنایع غذایی شامل نانوکپسول‌ها، نانولیپوزوم‌ها، نانوامولسیون‌ها، نیوزوم‌ها، فیتوزوم‌ها و نانوذرات لیپیدی با ساختارهای جامد هستند [13]. نانولیپوزوم‌ها به عنوان یکی از رایج‌ترین و مقرون به صرفه‌ترین نانوحامل‌ها در بخش‌های غذایی و دارویی، به دلیل مزیت‌هایی مانند مساحت سطح بالا، روش‌های آماده‌سازی آسان، مواد اولیه ارزان و پتانسیل نفوذ بهتر، در نظر گرفته می‌شوند [14].

با این حال، پایداری فیزیکی پایین، تخریب مواد محصور شده در اثر متغیرهای محیطی (دما، pH، نور، اکسیژن و قدرت یونی محیط) و آزادسازی سریع ترکیبات بارگذاری شده در طول ذخیره‌سازی از جمله محدودیت‌های نانولیپوزوم‌ها در ریزپوشانی ترکیبات فعال زیستی هستند [14] و [15]. به منظور رفع این نواقص محققان بر اصلاح سطح نانولیپوزوم‌ها توسط پلیمرها متمرکز شده‌اند. در بین تمامی پلیمرها، پلیمرهای زیستی به دلیل زیست سازگاری بالا، مهم‌ترین آن‌ها به شمار می‌روند. در بین پلیمرهای زیستی مورد استفاده برای پوشش سطح نانولیپوزوم‌ها، کیتوزان از آنجایی که به طور گسترده در دسترس است و به دلیل داشتن بار مثبت می‌تواند به عنوان

حلال فلاسک به مدت یک شب در دسیکاتور نگهداری شد (در دمای محیط). در ادامه به منظور هیدراته کردن لایه‌ی نازک خشک شده در ته فلاسک، بافر سدیم استات ۲۵۰ میلی‌مولار (Table 1) تهیه گردید. مقدار ۲۵ میلی‌گرم کافئین در ۱۰ میلی‌لیتر از بافر تهیه شده، حل گردیده و به لایه‌ی نازک خشک شده افزوده شد. پس از هیدراتاسیون کامل لایه‌ی لیپیدی تحت عمل همزنی، محلول لیپوزومی تهیه شده برای کاهش اندازه‌ی ذرات تا مقیاس نانو توسط هموژنایزر (Ika مدل T25 digital، آلمان) به مدت زمان ۵ دقیقه در دمای ۶۵ درجه (بالاتر از دمای انتقال فاز لستین) و در دور ۲۰ هزار هموژنیه شد. در مرحله بعد، محلول‌های لیپوزومی آماده شده به مدت ۱۵ دقیقه (۴۵ ثانیه روشن و ۱۵ ثانیه خاموش)، در حمام اولتراسونیک با فرکانس ۵۰ کیلوهرتز قرار داده شدند. سپس، محلول آماده شده کیتوزان (۱٪ w/v در اسید استیک) تحت شرایط همزنی ثابت برای بدست آوردن لیپوزوم‌های پوشش داده شده با کیتوزان، به نانو ساختارهای تولید شده اضافه گردید.

و همکاران (۲۰۱۹)، با اعمال برخی تغییرات برای آماده‌سازی نانوکیتوزوم‌ها استفاده شد [16]. برای این منظور نانوکیتوزوم‌های حاوی کافئین در نسبت‌های وزنی ۱-۹، ۸-۲، ۳-۷ و ۶-۴ لستین-کلیسترویل آماده شدند. در ادامه، مقادیر مختلف لستین در ۱۰ میلی‌لیتر اتانول به مدت ۲ ساعت روی همزن مغناطیسی هیتردار (آلفا مدل D500، ایران) همزده شد و به منظور هیدراته شدن یک شب در یخچال نگهداری گردید. سپس مقادیر ذکر شده کلیسترویل همراه با ۰/۰۲ گرم توپین ۸۰ به نمونه‌های لستین هیدراته افزوده شد. مخلوط‌های حاصله برای اختلاط کامل توسط همزن مغناطیسی هیتردار به مدت ۳۰ دقیقه همزده شدند. سپس محلول‌های نهایی به فلاسک ته‌گرد انتقال یافتند و با استفاده از دستگاه روتاری اوپراتور (Ika مدل RV05basic، آلمان) در دمای ۴۰ درجه‌ی سانتی‌گراد، مدت زمان ۲۰ دقیقه و در دور چرخشی ۶۰ rpm حلال آن‌ها تبخیر گردید. پس از تبخیر حلال، لایه‌ی نازکی در دیواره‌ی فلاسک ته‌گرد ایجاد شد. به منظور اطمینان یافتن از حذف کامل

Table 1 Concentration of sodium acetate and acetic acid to prepare sodium acetate buffer (1L,1M)

pH	Acetic acid concentration (gr/l)	Sodium acetate concentration (gr/l)
3.5	5.7	0.72

۲-۲-۳- ارزیابی نانوکیتوزوم‌های حاوی کافئین

۲-۲-۳-۱- اندازه‌ی ذرات، توزیع اندازه ذرات و پتانسیل زتا میانگین قطر هیدرودینامیکی و شاخص توزیع اندازه ذرات (PI) از مهمترین ویژگی‌های نانو ذرات برای ارزیابی رفتار کلئیدی، پایداری و خواص ریزپوشانی آن‌ها است [17]. روش پراکندگی نور دینامیکی (DLS)^۱، معمولاً روش ترجیحی برای اندازه‌گیری اندازه و توزیع اندازه ذرات است؛

نانوکیتوزوم‌های آماده شده از نظر سایز و اندازه‌ی ذرات، پتانسیل زتا ذرات، ظرفیت بارگذاری و نیز پایداری محلول‌های کیتوزومی، مورد ارزیابی قرار گرفتند.

1- Polydispersity Index
2- Dynamic Light Scattering

= درصد بارگیری ماده فعال

$$(1) \quad 100 \times \frac{\text{مقدار ماده فعال کپسوله شده در لیپوزوم}}{\text{جرم کل لیپید}}$$

۲-۳-۲-۳- پایداری کافئین در نانولیپوزوم‌های

پوشش داده شده با کیتوزان در طی ۶۰ روز

نگهداری

پایداری سیستم ریزپوشانی یکی از مهم‌ترین عواملی است که توانایی نانوحامل‌ها را در حفظ ترکیب فعال تعیین می‌کند [2]. مقدار کافئین آزاد و ریزپوشانی شده (بعد از تخریب دیواره‌ی لیپوزومی) در طی ۲ ماه نگهداری در دمای محیط و در روزهای ۱-۱۵-۳۰-۴۵ و ۶۰ توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۲۷۶ نانومتر اندازه‌گیری گردید.

۲-۳-۲-۴- طیف سنجی مادون قرمز (FTIR)

جهت بررسی واکنش‌های احتمالی کافئین-فسفولیپید از طیف سنج مادون قرمز (FTIR) استفاده گردید. محدوده اسکن در دامنه‌ی طول موج $4000-400 \text{ cm}^{-1}$ برای هر یک از مواد تشکیل دهنده‌ی دیواره شامل فسفاتیدیل کولین (لستین)، کلسترول و کیتوزان و نیز برای نمونه‌های پودر کافئین، محلول کیتوزومی حاوی کافئین و محلول کیتوزومی فاقد کافئین با نسبت ۹-۱ لستین-کلسترول صورت گرفت.

۲-۳-۲-۵- FESEM

بررسی خصوصیات سطحی و مورفولوژی نانوذرات دارای نسبت لستین-کلسترول ۹-۱ توسط میکروسکوپ

زیرا نسبتاً آسان و سریع می‌باشد. با این روش پس از رقت‌سازی‌های مناسب، می‌توان ضریب انتشار و شعاع هیدرودینامیکی برای وزیکول‌ها را به دست آورد [18].

به منظور افزایش فاصله بین ذرات و جلوگیری از اثرات پراکندگی مختلف، نمونه کیتوزومی ۱۰ برابر با آب مقطر رقیق شد و سپس به لوله موین تزریق و در قسمت مخصوص دستگاه DLS قرار گرفت. تعیین اندازه ذرات و پتانسیل زتا کیتوزوم برای تمامی نمونه‌ها در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد و طی سه مرحله تکرار صورت گرفت.

۲-۳-۲-۶- ظرفیت بارگذاری کافئین در نانوکیتوزوم‌ها^۱ (LC)

برای تعیین مقادیر LC، در ابتدا ۱۰ میلی لیتر از محلول نانوکیتوزومی، به منظور جداسازی کافئین آزاد (ریزپوشانی نشده) به مدت ۱۵ دقیقه در دور ۳۰۰۰ rpm سانتریفیوژ گردید (Hettich مدل universal centrifuge، آلمان). سپس جداسازی مایه‌رویی از کیتوزوم‌های ته‌نشین شده و اندازه‌گیری حجم آن‌ها صورت گرفت. در ادامه ۲ میلی لیتر از مایه‌رویی با ۱ میلی لیتر کلروفرم (نسبت ۲ به ۱) ترکیب شده و به مدت ۱۰ دقیقه با دستگاه ورتکس به خوبی تکان داده شد تا غشای کیتوزومی به خوبی تخریب شده و کافئین آزاد گردد. در ادامه میزان کافئین بارگذاری شده و بارگذاری نشده (آزاد) با استفاده از دستگاه اسپکتوفوتومتر در طول موج ۲۷۶ نانومتر اندازه‌گیری گردید [19].

با استفاده از رابطه (۱) درصد بارگیری کافئین نسبت به لیپید محاسبه شد:

2- Fourier-Transform Infrared Spectroscopy
3- Field Emission Scanning Electron Microscope

1 -Loading Capacity

۳- نتایج و یافته‌های پژوهش

۳-۱- ویژگی نانوکیتوزوم‌های حاوی کافئین

۳-۱-۱- اندازه ذرات توزیع اندازه ذرات و پتانسیل زتا

متوسط اندازه و توزیع اندازه ذرات (شاخص پراکندگی ذرات PI) مهمترین مشخصه‌های نانو ذرات هستند که بر پایداری فیزیکی، حلالیت، عملکرد بیولوژیکی، سرعت انتشار و پایداری شیمیایی آن‌ها اثر گذارند [21]. پارامترهای فرآیند نظیر سرعت (سرعت پروب دستگاه هموژنایزر، سرعت اختلاط و همزنی مواد)، مدت زمان هموژنایزر، مدت زمان سونیکاسیون، نوع اولتراسونیک مورد استفاده (حمام یا پروب اولتراسوند) و نیز مقدار ماده‌ی فعال افزوده شده به فرمولاسیون و نوع پلیمر مصرفی، از عوامل اثرگذار در تعیین اندازه ذرات، مقدار بارگیری ماده فعال و ساختار کریستالی منظم در نانوذرات هستند [22]. نتایج حاصل از DLS برای نمونه‌های کیتوزومی تهیه شده با نسبت‌های مختلف لستین-کلسترول در جدول 2 (Table2) بیان شده است.

الکترونی روبشی نشر میدانی (FEG-SEM مدل MIRA3، چک) صورت گرفت. برای این منظور یک قطره از محلول کیتوزومی روی لام آزمایشگاهی قرار داده شده و در دمای محیط خشک گردید. در ادامه لایه‌ی خشک شده توسط ورقه‌ای از طلا به منظور مشاهده زیر میکروسکوپ الکترونی توسط دستگاه اسپاترینگ پوشش داده شد. مشاهده و تصویربرداری از ساختار نانوکیتوزوم‌ها با بزرگنمایی ۵۰ هزار صورت گرفت [20].

۳-۲- تجزیه و تحلیل داده‌ها

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها در قالب طرح کاملاً تصادفی و مقایسه‌ی میانگین آن‌ها با آزمون دانکن ($P < 0.05$) توسط نرم افزار آماری SAS صورت گرفت. به منظور بررسی میزان پایداری کافئین در نانوکیتوزوم‌ها طی مدت زمان نگهداری، داده‌ها به صورت تکرار در زمان و مقایسه‌ی میانگین آن‌ها از طریق آزمون LSD انجام شد. نمودارهای مربوطه با نرم افزار اکسل ۲۰۱۶ ترسیم شدند.

Table 2 Particle size, polydispersity Index and zeta potential of chitosome samples containing caffeine prepared with different lecithin-cholesterol ratios

Sample	Zeta potential (mv)	PI	Z-Average (nm)
Chitosomal nanocapsules with a 9-1 lecithin -cholesterol ratio	40.96 ± 0.46 ^d	0.419 ± 0.04 ^a	133.3 ± 7.27 ^d
Chitosomal nanocapsules with a 8-2 lecithin -cholesterol ratio	45.16 ± 1.02 ^c	0.360 ± 0.03 ^{ab}	298.3 ± 10.33 ^c
Chitosomal nanocapsules with a 7-3 lecithin -cholesterol ratio	48.36 ± 0.55 ^b	0.318 ± 0.02 ^b	443.6 ± 6.76 ^b
Chitosomal nanocapsules with a 6-4 lecithin -cholesterol ratio	50.5 ± 0.3 ^a	0.313 ± 0.05 ^b	523.6 ± 3.96 ^a

Different letters in same column represent significant differences ($P < 0.05$).

اندازه ذرات به صورت Z-Average (میانگین قطر هیدرودینامیکی ذرات) می‌باشد که برای نسبت‌های مختلف لستین-کسترویل در محدوده $5/533 - 5/133$ نانومتر قرار گرفت. همانگونه که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، افزایش مقادیر کسترویل در ساختار کیتوزومی، منجر به افزایش اندازه ذرات گردید و با افزایش غلظت آن، افزایش اندازه ذرات تشدید شد. در توضیح این پدیده می‌توان اظهار داشت که احتمالاً در طول فرایند تبدیل ساختارهای لایه‌ای فسفولیپیدی به وزیکول‌های توده‌ای، کسترویل در میان حفره‌ها و فضاهای مولکولی ایجاد شده، ساکن شده و لذا تا حدودی باعث افزایش معناداری در اندازه‌ی وزیکول‌ها می‌گردد [13]. از طرفی در این پژوهش، متوسط اندازه بالای ذرات، می‌تواند به دلیل پوشش‌دهی سطحی لیپوزوم‌ها با محلول کیتوزان باشد. در این راستا، در تحقیقی گزارش شد که با افزایش نسبت کسترویل به لستین، در تولید نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین C، اندازه وزیکول‌ها افزایش می‌یابد [23]. در تحقیقی دیگر عنوان شد که میانگین قطر لیپوزوم‌های حاوی سفوکسیتین، با افزودن کسترویل به ساختار لیپوزومی افزایش می‌یابد [24]. همچنین، در تحقیق صورت گرفته توسط مالهیروس و همکاران (۲۰۱۲)، گزارش شد که افزودن کسترویل به ساختارهای لیپوزومی حاوی ناپسین، با افزایش اندازه ذرات همراه است [25]. با این حال، نتایج پژوهش‌های گذشته نشان‌دهنده‌ی عدم وجود روند یکسان در مورد تاثیر کسترویل بر اندازه نهایی نانولیپوزوم‌ها می‌باشند. در تحقیقی از نسبت‌های مختلف لستین-کسترویل برای تولید نانولیپوزوم‌های حاوی بتاکاروتن، استفاده شد؛ نتایج بدست آمده نشان داد که افزایش نسبت کسترویل به لستین تاثیر معنی‌داری در اندازه وزیکول‌ها ندارد [13]. همچنین، در تحقیقی دیگر که از نسبت‌های مختلف لستین-کسترویل، برای ساخت نانولیپوزوم‌های ویتامین D₃ استفاده شده بود، مشاهده شد که افزایش غلظت کسترویل تاثیری بر اندازه ذرات

نداشت [26]. از سوی دیگر در تحقیقی، افزودن کسترویل به ساختار لیپوزوم‌ها باعث کاهش اندازه ذرات گردید [27]. بنابراین به نظر می‌رسد که افزایش اندازه لیپوزوم‌ها به نوع فسفولیپید مورد استفاده، ماهیت ماده ریزپوشانی شده و روش تولید آن‌ها بستگی دارد [13].

با توجه با نتایج جدول ۲، مقادیر PI برای نسبت‌های مختلف لستین- کسترویل در محدوده $0/41 - 0/31$ قرار دارد. با وجود این که افزودن کسترویل به ساختار کیتوزومی با افزایش اندازه نانوذرات همراه بود، با این حال تاثیر مثبتی روی PI ایجاد نموده و سبب کاهش اختلاف اندازه و یکنواخت‌تر شدن اندازه ذرات گردید. مقدار PI معمولاً از ۰ تا ۱ متغیر است. مقادیر $PI \leq 0.1$ نشانگر بالاترین کیفیت توزیع پراکندگی ذرات، مقادیر $PI \leq 0/3$ نشانگر مقادیر بهینه پراکندگی و مقادیر $PI \leq 0/5$ نیز مقدار قابل قبول است [28]. از دیگر پارامترهای مهم در خصوصیات لیپوزوم‌ها، پتانسیل زتا می‌باشد. پتانسیل زتا بار کلی است که یک وزیکول لیپیدی در یک محیط خاص به دست می‌آورد. ارزیابی پتانسیل زتا نانولیپوزوم می‌تواند به پیش‌بینی پایداری آن‌ها کمک کند. آگاهی از پتانسیل زتا همچنین در کنترل تجمع، همجوشی و رسوب نانولیپوزوم‌ها که از عوامل مهم مؤثر بر پایداری فرمولاسیون نانولیپوزومی هستند، مفید است [29]. مقادیر مطلق بالای پتانسیل زتا، نشان‌دهنده پایداری بیشتر و بالاتر سیستم‌های لیپوزومی است [8]. به طور کلی، نانوذرات با پتانسیل زتا بالاتر از ± 30 میلی‌ولت، از دافعه الکترواستاتیک کافی بین ذرات برخوردار بوده و پایداری فیزیکی خوبی را از خود نشان می‌دهند [16]. همانطور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، تمامی نمونه‌ها پتانسیل زتای بالایی دارند و با افزایش نسبت کسترویل به لستین، پتانسیل زتا افزایش قابل توجهی داشته است که بیانگر افزایش دافعه الکترواستاتیکی و پایداری بیشتر است. در تحقیقات مختلفی ذکر شده است که افزایش مقادیر کسترویل باعث افزایش تدریجی پتانسیل زتا و بهبود

ذرات آن نیز در حد مطلوب است؛ به عنوان نسبت بهینه برای آزمون‌های بعدی انتخاب شد.

۳-۱-۲- ظرفیت بارگذاری کافئین در نانوکیتوزوم‌ها (LC)

اگرچه فسفولیپیدها به عنوان ترکیبات غیرسمی شناخته می‌شوند، اما باید توجه داشت که مقادیر بالای لیپید استفاده شده در ساختار لیپوزوم‌ها، عملکرد بدن را برای هضم آن‌ها کاهش می‌دهد. لذا توصیه می‌شود که درصد بارگیری ماده فعال به لیپید تا حد مقدور بالا باشد و یا اینکه میزان لیپید مورد استفاده تا حد مقدور پایین باشد [33]. درصد بارگیری کافئین نسبت به لیپید برای نسبت‌های ۱-۹، ۲-۸، ۳-۷ و ۴-۶ لستین - کلسترول، اندازه‌گیری شد که نتایج آن در شکل ۱ (Fig 1) گزارش شده است.

پایداری نانولیپوزوم‌ها می‌شود [13]، [30] و [26]. در حقیقت افزایش پایداری نانولیپوزوم، با افزایش مقادیر کلسترول را می‌توان به این واقعیت نسبت داد که گروه هیدروکسیل موجود در کلسترول، با گروه کولین موجود در سرفطبی لستین، پیوند هیدروژنی تشکیل می‌دهد و گروه کولین به داخل غشای لیپیدی کشیده می‌شود؛ در نتیجه بار منفی افزایش یافته و به دنبال آن دفع الکترواستاتیک بین ذرات نیز افزایش می‌یابد [31]. با این حال، پوشش‌دهی نمونه‌های لیپوزومی با مقدار ثابت محلول کیتوزان، بارسطحی نانولیپوزوم‌ها را به دلیل وجود گروه‌های آمین آزاد (دارای بار مثبت)، به مقادیر مثبت تغییر داد [32].

با توجه به این که پتانسیل زتا در تمامی نسبت‌های لستین - کلسترول بالاتر از محدوده‌ی مطلوب است، لذا انتخاب نسبت بهینه لستین - کلسترول بر اساس اندازه و توزیع اندازه انجام می‌شود. بدین منظور نمونه ۱-۹ لستین - کلسترول که کوچکترین اندازه ذرات را دارد و توزیع اندازه

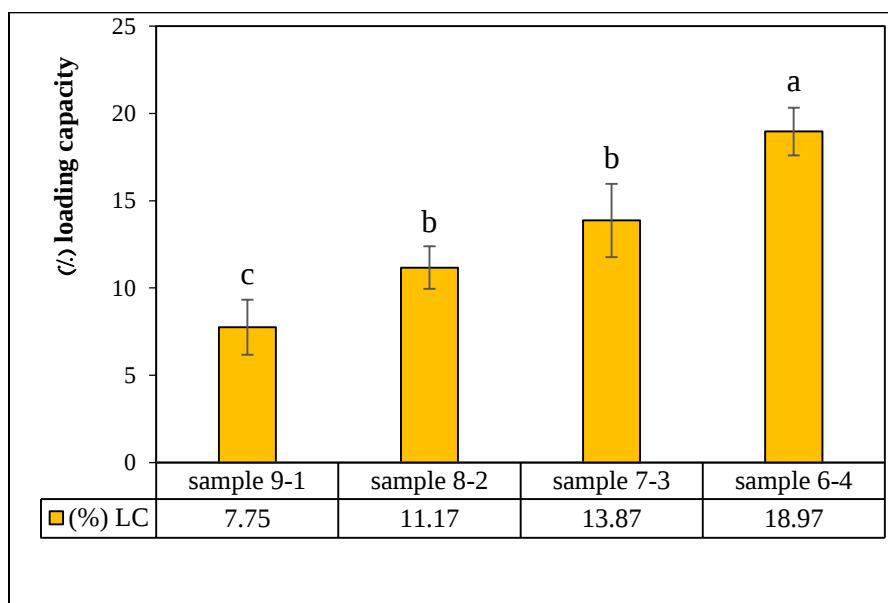


Figure 1 Loading capacity of caffeine to lipids at different amounts of lecithin -cholesterol ratios. Different letters in same column represent significant differences ($P < 0.05$)

نسبت کافئین به لیپید (لستین)، بازده بارگیری کافئین نسبت به لیپید بیشتر شده است به عبارت دیگر با کاهش غلظت

با توجه به نتایج شکل ۱، مشاهده شد که با افزایش

فرمولاسیون، pH، قدرت یونی و شرایط ذخیره‌سازی (مانند دما، نور) قرار دارد [15]. پایداری کافئین در نانوکیتوزوم‌ها، با توجه به میزان کاهش کافئین محصور شده در نانوکیتوزوم نسبت ۹-۱ لستین-کلسترو و کافئین آزاد در نمونه‌ی شاهد طی نگهداری در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد (دمای محیط) و مدت زمان ۱۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روز مورد بررسی قرار گرفت.

کاهش مقدار کافئین ریزپوشانی شده در طی مدت زمان نگهداری نشان‌دهنده‌ی کاهش میزان پایداری خواهد بود. نتایج مربوطه در شکل ۲ (Fig 2) آورده شده است.

لستین در نمونه‌های کیتوزومی تهیه شده، بازده بارگیری کافئین افزایش یافته است. در همین راستا، در تحقیقی گزارش شد که افزایش نسبت ماده فعال به لیپید (تا سطح ۵ به ۱)، با افزایش بازده بارگذاری همراه است [34]. در مطالعات مختلف، میزان بارگذاری بتائین [19]، آنتوسیانین [35] و ویتامین‌های C و E [36] نسبت به لیپید به ترتیب ۲۷، ۲۴، ۱/۴ و ۵/۹٪ گزارش شدند.

۳-۱-۳- پایداری کافئین در نانولیپوزوم‌های پوشش داده

شده با کیتوزان در طی ۶۰ روز نگهداری

پایداری لیپوزوم‌ها و میزان آزادسازی ترکیبات بارگذاری شده به طور قابل ملاحظه‌ای تحت تأثیر ترکیب

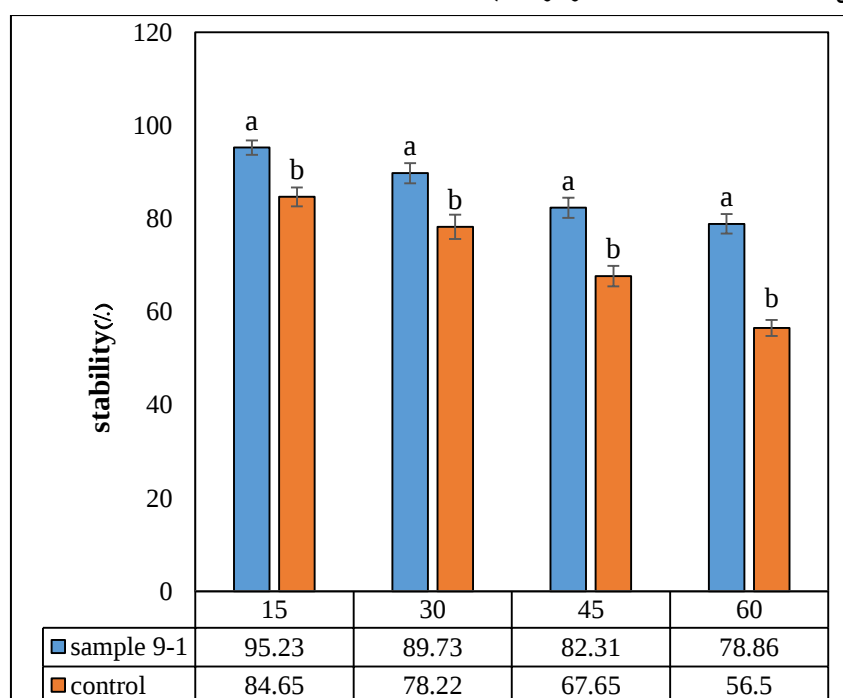


Figure 2 Stability of caffeine in chitosomal solution 1-9 and control sample during 60 day storage at room temperature

نمونه شاهد (کافئین ریزپوشانی نشده) بیشتر بوده است ($P < 0.05$). از طرفی طی این مدت زمان، پایداری کافئین در نانوکیتوزوم‌ها بالا بوده و میزان آزادسازی این ترکیب از حامل‌های لیپیدی نسبتاً پایین (حدود ۲۱) بوده است. علت این پدیده را به دو عامل می‌توان نسبت داد: ۱) حضور

مطابق شکل ۲، نتایج بدست آمده نشان داد که پایداری کافئین در نانوکیتوزوم‌ها (نسبت ۹-۱ لستین-کلسترو)، طی ۶۰ روز نگهداری در دمای اتاق، همواره به طور معناداری از

کلسترویل در ساختار نانوذرات: کلسترویل با افزایش قابل توجه دمای انتقال فاز فسفولیپید، نقش مهمی در افزایش پایداری دولایه لیپوزومی ایفا می‌کند [27]. همچنین، غلظت‌های مشخص و ثابت کلسترویل، سبب متراکم شدن دولایه لیپیدی و سفت شدن آن می‌شوند که نفوذپذیری و سیالیت غشای لیپیدی را کاهش داده و پایداری لیپوزوم را افزایش می‌دهد [13]. ۲) پوشش دهی لیپوزوم با کیتوزان: در این مطالعه به منظور بهبود پایداری نانولیپوزوم‌ها از کیتوزان به عنوان یک بیوپلیمر اضافی در سطح خارجی لیپوزوم‌ها استفاده شد. در تحقیقات مختلف نشان داده شده است که لیپوزوم‌های پوشش داده شده با کیتوزان، توانایی بیشتری در نگهداری از ماده هسته، به علت شکل‌گیری پوشش محافظ الکترواستاتیکی کیتوزان، از خود نشان می‌دهند [2] و [37].

البته همان گونه که در شکل (۲) نیز مشاهده می‌شود، میزان پایداری کافئین در نانوکیتوزوم‌ها طی مدت زمان نگهداری روند کاهشی دارد. آزاد شدن ماده فعال در طی زمان نگهداری به علت تخریب دیواره‌ی نانوکیتوزوم‌ها، می‌تواند یکی از دلایل این امر باشد. چرا که تراوا بودن غشای لیپوزومی و تخریب آن در اثر اکسیداسیون فسفولیپیدها، سبب رهایش ماده فعال (ریزپوشانی شده) در طول زمان نگهداری می‌شود [36]. همچنین شرایط محیطی مانند دمای نگهداری نیز از عوامل موثر در کاهش پایداری لیپوزوم‌ها می‌باشد. احتمالاً نگهداری محلول‌های کیتوزومی در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد سبب نشت بیشتر کافئین به بیرون از وزیکول‌ها شده است. نگهداری لیپوزوم‌ها در دمای بالا منجر به تغییر ساختار کریستالی لیپید، نرم شدن غشا، افزایش سیالیت آن و تسریع اکسیداسیون اسیدهای چرب می‌شود که افزایش سرعت آزادسازی مواد محصور شده را به دنبال دارد [37]. در این راستا، در تحقیقی، میزان پایداری لیپوزوم‌های حاوی فلوکونازول در طی یک ماه نگهداری در دمای یخچال (۲-۹ درجه سانتی‌گراد)، دمای اتاق (25 ± 2) درجه سانتی‌گراد و دماهای بالا (۴۵ درجه سانتی‌گراد)

ارزیابی شد. نتایج حاصله نشان داد نگهداری لیپوزوم‌ها در دمای یخچال، بیشترین میزان پایداری و کمترین میزان آزادسازی مواد (کمتر از ۵٪) را دارد؛ همچنین عنوان شد که دماهای بالا منجر به افزایش سیالیت دولایه لیپیدی و رهایش بیشتر ترکیبات ریزپوشانی شده می‌گردد [38]. همچنین در مطالعه صورت گرفته روی نانولیپوزوم‌های حامل ویتامین D₃، ذخیره‌سازی لیپوزوم‌ها در دمای پایین (۴ درجه سانتی‌گراد) به عنوان بهترین شرایط برای پایدار نگه داشتن ویتامین D₃ در نانولیپوزوم‌ها، گزارش گردید [26]. در پژوهشی دیگر میزان آزادسازی ویتامین E از نانولیپوزوم‌های حامل این ماده، ۶۲٪ طی یکماه نگهداری در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) عنوان شد در حالیکه این مقدار در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد حدود ۳۹٪ گزارش گردید [36].

۳-۱-۴- طیف سنجی مادون قرمز FTIR

آزمون FTIR، یک روش مطلوب برای شناسایی و تفکیک ترکیبات آلی و گروه‌های عاملی موجود در ساختار آن‌ها می‌باشد. در این آزمون اندازه‌گیری شدت جذب در پیک‌های منحنی، امکان شناسایی ترکیبات مختلف و برهمکنش‌های بین اجزا را بوجود می‌آورد. از آنجایی که هر یک از گروه‌های عاملی شدت جذب مشخصی در یک فرکانس معین دارند، لذا ایجاد تغییرات در ساختار ترکیبات، سبب تغییر شدت جذب در آن‌ها خواهد شد. در این پژوهش، طیف FTIR در محدوده $4000-400\text{ cm}^{-1}$ ، مربوط به مواد دیواره نانوکیتوزوم‌ها (لستین-کلسترویل و کیتوزان)، کافئین، نانوکیتوزوم خالی و نانوکیتوزوم بارگذاری شده با نسبت ۹-۱ لستین-کلسترویل در شکل 3 نشان داده شده است.

در ساختار کلسترویل طیف وسیع در محدوده cm^{-1} ۳۴۰۰ به پیوند کششی OH نسبت داده می‌شود. پیک‌های ۲۸۹۹، ۱۶۷۴، ۱۴۶۴ و 1378 cm^{-1} به ترتیب به ارتعاشات

ارتعاشات کششی پیوندهای C-H و C-H گروه متیل مربوط هستند. همچنین، پیک‌های 1703 و 1656 cm^{-1} مربوط به گروه‌های C=O در ناحیه آمید I می‌باشند. پیک‌های 1547 ، 1356 ، 1071 و 1023 cm^{-1} نیز به ترتیب با مناطق CH_3 ، C-C و C-OH در آمید II مرتبط هستند [2].

در مقایسه کیتوزوم‌های خالی با کیتوزوم‌های بارگیری شده توسط کافئین، مطابق شکل 3، مشاهده می‌شود که با ورود کافئین به نانوکیتوزوم‌های دارای نسبت ۹-۱ لستین-کلتترول، اکثر پیک‌های جذبی افزایش جذب را دارند. همچنین، پیک‌های جدید 1284 ، 1238 ، 1095 ، 1071 ، 1053 و 974 cm^{-1} پیک‌های جدید 1284 ، 1238 ، 1095 ، 1071 ، 1053 و 974 cm^{-1} مشاهده گردید که احتمالاً می‌تواند در نتیجه‌ی برهمکنش بین مواد دیواره‌ی نانوکیتوزوم و کافئین باشد، که تاییدی بر بارگذاری موفقیت‌آمیز کافئین در کیتوزوم‌ها است.

کششی متقارن CH_2 ، پیوند C=C در حلقه‌ی دوم کلتترول، ارتعاشات کششی نامتقارن گروه‌های CH_2 و CH_3 و ارتعاشات خمشی CH_2 و CH_3 مربوط می‌شوند. علاوه بر این، پیک‌های 1055 و 840 cm^{-1} نیز به ترتیب مربوط به تغییر شکل حلقه کلتترول و پیوند کششی C-C در مولکول کلتترول می‌باشند [39]. در رابطه با لستین (فسفاتیدیل کولین)، پیک‌های جذبی 2924 ، 2923 ، 1735 ، 1464 ، 1055 و 1053 cm^{-1} به ترتیب مربوط به ارتعاشات OH، ارتعاشات کششی نامتقارن CH_2 ، گروه C=O، گروه‌های PO_2^- نامتقارن و C-O در C-O- PO_2^- هستند [40]. همچنین در کیتوزان، پیک‌های 1650 ، 1225 ، 1095 و 1071 cm^{-1} به ترتیب مربوط به پیوند کششی OH، پیوند کششی CH، پیوند کششی C=O در ناحیه آمید I و پیوند کششی C-O هستند. همچنین، پیک 894 cm^{-1} نیز مربوط به پیوند گلیکوزیدی $\beta 1 \rightarrow 4$ می‌باشد [41] و [42]. در رابطه با کافئین خالص، پیک 1656 cm^{-1} مربوط به پیوند کششی OH و پیک‌های 1730 و 1284 cm^{-1} به ترتیب به

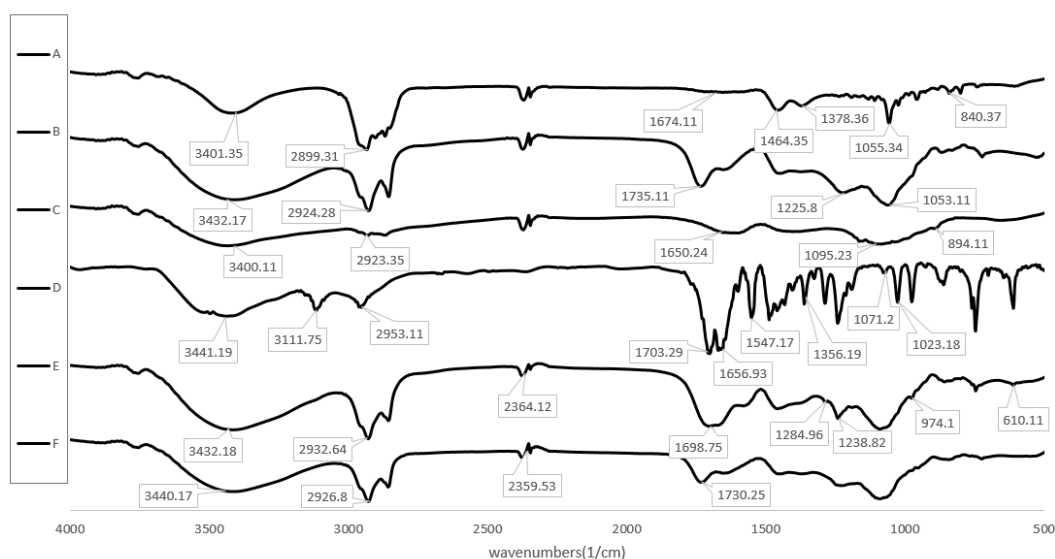


Figure 3 FTIR analysis results. (A=cholesterol, B= lecithin, C=chitosan, D=caffeine, E=lecithin-cholesterol 9-1 ratio nanochitosome containing caffeine, F=lecithin-cholesterol 9-1 ratio nanochitosome without caffeine)

۳-۱-۵- بررسی تصاویر FESEM

مورفولوژی کیتوزوم‌های بارگیری شده با کافئین، با

اشکال تقریباً کروی را نشان می‌دهند. همچنین، در این پژوهش پوشش دهی سطحی نانولیپوزوم‌ها با کیتوزان، مورفولوژی کروی شکل نانولیپوزوم‌ها را تغییر نداد که با نتایج سایر مطالعات همخوانی دارد [2] و [43].

استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) در شکل 4 با بزرگنمایی ۵۰ هزار، نشان داده شده است. این تصویر نتایج حاصل از DLS در رابطه با اندازه نانوکیتوزوم‌ها را تایید می‌کند؛ چرا که اندازه اکثر ذرات کمتر از ۱۵۰ nm است. با توجه به شکل (4)، نانوساختارهای تولید شده

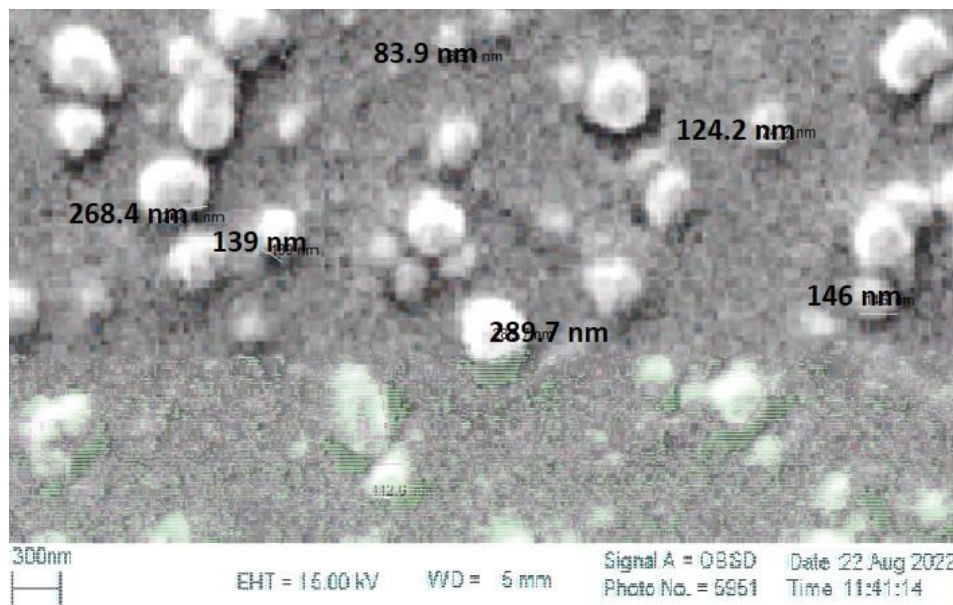


Figure 4 FESEM analysis for nanochitosome with 1-9 lecithin /cholesterol ratio containing caffeine

تاییدکننده‌ی بارگذاری موفقیت‌آمیز کافئین در نانوکیتوزوم‌ها بود. همچنین، آنالیز تصاویر مورفولوژی ذرات (FESEM)، نتایج حاصل از DLS در رابطه با اندازه ذرات را تایید کرد. به طور کلی، نتایج مطالعه حاضر پتانسیل نانوکیتوزوم‌ها را به عنوان سیستم کارآمد برای نگهداری و رهایش پایدار کافئین نشان داد که می‌تواند در صنعت غذا مورد استفاده قرار گیرد.

۵- منابع

[1] Sivrikaya, S. (2020). A deep eutectic solvent based liquid phase microextraction for the determination of caffeine in Turkish coffee samples by HPLC-UV. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 37(3), 488-495. <https://doi.org/10.1080/19440049.2020.1711972>

[2] Seyedabadi, M. M., Rostami, H., Jafari, S. M., & Fathi, M. (2021). Development and characterization of chitosan-coated nanoliposomes

۴- نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر، اثر نسبت‌های مختلف لستین-کلیسترول (۱-۹، ۲-۸، ۳-۷ و ۴-۶) بر تغییرات اندازه، پتانسیل زتا و توزیع اندازه ذرات معنی‌دار بود. نتایج نشان داد که با افزایش مقادیر کلیسترول، اندازه و پتانسیل زتا ذرات افزایش می‌یابد. با توجه به این که پتانسیل زتا تمامی نسبت‌ها در محدوده مطلوب قرار داشت، لذا انتخاب نسبت بهینه لستین-کلیسترول بر اساس اندازه و توزیع اندازه ذرات صورت گرفت. نتایج حاصل از اندازه‌گیری ظرفیت بارگیری کافئین نشان داد که، با افزایش نسبت کافئین به لیپید (لستین)، بازده بارگیری کافئین نسبت به لیپید بیشتر می‌گردد. نتایج مربوط به آزمون پایداری، نشان‌دهنده‌ی پایداری بالای کافئین ریزپوشانی شده طی دوماه نگهداری در دمای محیط بود. نتایج مربوط به آزمون FTIR،

for encapsulation of caffeine. *Food bioscience*, 40, 100857. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100857>

[3] Peng, X., Brown, M., Bowdler, P., & Honeychurch, K. C. (2020). Extraction-free, direct determination of caffeine in microliter volumes of beverages by thermal desorption-gas chromatography mass spectrometry. *International Journal of Analytical Chemistry*, 2020. <https://doi.org/10.1155/2020/5405184>.

[4] Russo, M., Dugo, P., Fanali, C., Dugo, L., Zoccali, M., Mondello, L., & De Gara, L. (2018). Use of an online extraction technique coupled to liquid chromatography for determination of caffeine in coffee, tea, and cocoa. *Food analytical methods*, 11, 2637-2644. <https://doi.org/10.1007/s12161-018-1247-5>

[5] Cai, C., Li, F., Liu, L., & Tan, Z. (2019). Deep eutectic solvents used as the green media for the efficient extraction of caffeine from Chinese dark tea. *Separation and Purification Technology*, 227, 115723. <https://doi.org/10.1016/j.seppur.2019.115723>

[6] Chow, C. H., Kan, Y. C., & Ho, K. S. (2019). A Simple and Rapid Gas Chromatographic Method for Routine Caffeine Determination in Beverages using Nitrogen Phosphorus Detector. *Journal of Analytical Chemistry*, 74, 764-770. <https://doi.org/10.1134/S1061934819080045>

[7] Ilgaz, S., Sat, I. G., & Polat, A. (2018). Effects of processing parameters on the caffeine extraction yield during decaffeination of black tea using pilot-scale supercritical carbon dioxide extraction technique. *Journal of food science and technology*, 55(4), 1407-1415. <https://doi.org/10.1007/s13197-018-3055-8>

[8] Solghi, S., Emam-Djomeh, Z., Fathi, M., & Farahani, F. (2020). The encapsulation of curcumin by whey protein: Assessment of the stability and bioactivity. *Journal of Food Process Engineering*, 43(6), e13403. <https://doi.org/10.1111/jfpe.13403>

[9] Nikoo, A. M., Kakhodaee, R., Ghorani, B., Razzaq, H., & Tucker, N. (2018). Electrospray-assisted encapsulation of caffeine in alginate microhydrogels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 116, 208-216. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.04.167>

[10] Bourbon, A. I., Cerqueira, M. A., & Vicente, A. A. (2016). Encapsulation and controlled release of bioactive compounds in lactoferrin-glycomacropeptide nanohydrogels: Curcumin and caffeine as model compounds. *Journal of Food Engineering*, 180, 110-119. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.02.016>

[11] Noor, N., Shah, A., Gani, A., Gani, A., & Masoodi, F. A. (2018). Microencapsulation of caffeine loaded in polysaccharide based delivery systems. *Food Hydrocolloids*, 82, 312-321. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.04.001>

[12] Fathi, M., Mozafari, M. R., & Mohebbi, M. (2012). Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends in food science & technology*, 23(1), 13-27. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2011.08.003>

[13] Pezeshky, A., Ghanbarzadeh, B., Hamishehkar, H., Moghadam, M., & Babazadeh, A. (2016). Vitamin A palmitate-bearing nanoliposomes: Preparation and characterization. *Food bioscience*, 13, 49-55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2015.12.002>

[14] Muhamad, I. I., Zaidel, D. N. A., Hashim, Z., Mohammad, N. A., & Bakar, N. F. A. (2020). Improving the delivery system and bioavailability of beverages through nanoencapsulation. In *Nanoengineering in the beverage industry* (pp. 301-332). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816677-2.00010-7>

[15] Sarabandi, K., Jafari, S. M., Mohammadi, M., Akbarbaglu, Z., Pezeshki, A., & Heshmati, M. K. (2019). Production of reconstitutable nanoliposomes loaded with flaxseed protein hydrolysates: Stability and characterization. *Food Hydrocolloids*, 96, 442-450. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.05.047>

[16] Sarabandi, K., Mahoonak, A. S., Hamishehkar, H., Ghorbani, M., & Jafari, S. M. (2019). Protection of casein hydrolysates within nanoliposomes: Antioxidant and stability characterization. *Journal of Food Engineering*, 251, 19-28. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.02.004>

[17] Singh, H., Thompson, A., Liu, W., & Corredig, M. (2012). Liposomes as food ingredients and nutraceutical delivery systems. In *Encapsulation technologies and delivery systems for food ingredients and nutraceuticals* (pp. 287-318). Woodhead Publishing.

<https://doi.org/10.1533/9780857095909.3.287>

[18] Homayoonfal, M., Mousavi, S. M., Kiani, H., Askari, G., Desobry, S., & Arab-Tehrany, E. (2021). Encapsulation of berberis vulgaris anthocyanins into nanoliposome composed of rapeseed lecithin: A comprehensive study on physicochemical characteristics and biocompatibility. *Foods*, 10(3), 492. <https://doi.org/10.3390/foods10030492>

[19] Amjadi, S., Ghorbani, M., Hamishehkar, H., & Roufegarinejad, L. (2018). Improvement in the stability of betanin by liposomal nanocarriers: Its application in gummy candy as a food model. *Food Chemistry*, 256, 156-162. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.02.114>

[20] Yu, D. G., Yang, J. H., Wang, X., & Tian, F. (2012). Liposomes self-assembled from electrosprayed composite microparticles. *Nanotechnology*, 23(10), 105606. <https://doi.org/10.1088/0957-4484/23/10/1056>

[21] Tamjidi, F., Shahedi, M., Varshosaz, J., & Nasirpour, A. (2013). Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 19, 29-43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2013.03.002>

[22] Soleimani Fard, M., A. Sadeghi Mahonek, M. Ghorbani, Kh. Azizi and A. Sephond, 2017. Optimizing the extraction of Khoramabadi variety olive leaf extract and investigating the physical characteristics of lipid nanocarriers containing it. *Nutritional Sciences and Food Industries of Iran*, 13 (3): 92-81(in persian).

[23] 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(1), 16-19. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2009.09.041>

[24] Wu, P. C., Tsai, Y. H., Liao, C. C., Chang, J. S., & Huang, Y. B. (2004). The characterization and biodistribution of cefoxitin-loaded liposomes. *International journal of pharmaceutics*, 271(1-2), 31-39. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2003.10.034>

[25] da Silva Malheiros, P., Sant'Anna, V., de Souza Barbosa, M., Brandelli, A., & de Melo Franco, B. D. G. (2012). Effect of liposome-encapsulated nisin and bacteriocin-like substance P34 on *Listeria*

monocytogenes growth in Minas frescal cheese. *International Journal of Food Microbiology*, 156(3), 272-277. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.004>

[26] 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. <https://doi.org/10.5681/apb.2014.084>

[27] Chorilli, M., Calixto, G., Rimério, T. C., & Scarpa, M. V. (2013). Caffeine encapsulated in small unilamellar liposomes: characterization and in vitro release profile. *Journal of dispersion science and technology*, 34(10), 1465-1470. <https://doi.org/10.1080/01932691.2012.739535>

[28] Shah, R., Eldridge, D., Palombo, E., & Harding, I. (2014). Optimisation and stability assessment of solid lipid nanoparticles using particle size and zeta potential. *Journal of physical science*, 25(1).

[29] Mozafari, M. R. (2010). Nanoliposomes: preparation and analysis. *Liposomes: Methods and Protocols, Volume 1: Pharmaceutical Nanocarriers*, 29-50. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-360-2_2

[30] Foteini, P., Pippa, N., Naziris, N., & Demetzos, C. (2019). Physicochemical study of the protein-liposome interactions: Influence of liposome composition and concentration on protein binding. *Journal of liposome research*, 29(4), 313-321. <https://doi.org/10.1080/08982104.2018.1468774>

[31] Miller, W. L. (2007). Steroidogenic acute regulatory protein (StAR), a novel mitochondrial cholesterol transporter. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1771(6), 663-676. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2007.02.012>

[32] Shin, G. H., Chung, S. K., Kim, J. T., Joung, H. J., & Park, H. J. (2013). Preparation of chitosan-coated nanoliposomes for improving the mucoadhesive property of curcumin using the ethanol injection method. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(46), 11119-11126. <https://doi.org/10.1021/jf4035404>

[33] Brandl, M. (2001). Liposomes as drug carriers: a technological approach. [https://doi.org/10.1016/S1387-2656\(01\)07033-8](https://doi.org/10.1016/S1387-2656(01)07033-8)

[34] Ramana, L. N., Sethuraman, S., Ranga, U., & Krishnan, U. M. (2010). Development of a liposomal nanodelivery system for nevirapine. *Journal of biomedical science*, 17, 1-9. <https://doi.org/10.1186/1423-0127-17-57>

[35] Zhao, L., Temelli, F., & Chen, L. (2017). Encapsulation of anthocyanin in liposomes using supercritical carbon dioxide: Effects of anthocyanin and sterol concentrations. *Journal of Functional Foods*, 34, 159-167. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.04.021>

[36] Saqashirpour, S., 2013. Nanoliposome production for simultaneous encapsulation of vitamin E and vitamin C by thermal method (Mozaffari), Master's thesis of food industry science and engineering, Ghanbarzadeh, B. and Tolit, T. Faculty of Ares International Campus of Tabriz University (in persian).

[37] Li, Z., Paulson, A. T., & Gill, T. A. (2015). Encapsulation of bioactive salmon protein hydrolysates with chitosan-coated liposomes. *Journal of Functional Foods*, 19, 733-743. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.09.058>

[38] Chanda, H., Das, P., Chakraborty, R., & Ghosh, A. (2011). Development and evaluation of liposomes of fluconazole. *J Pharm Biomed Sci*, 5(27), 1-9.

[39] Gupta, U., Singh, V. K., Kumar, V., & Khajuria, Y. (2014). Spectroscopic studies of cholesterol: fourier transform infra-red and vibrational frequency analysis. *Materials focus*, 3(3), 211-217. <https://doi.org/10.1166/mat.2014.1161>

[40] Mohan, V., Naske, C. D., Britten, C. N., Karimi, L., & Walters, K. B. (2020). Hydroxide-catalyzed cleavage of selective ester bonds in phosphatidylcholine: An FTIR study. *Vibrational Spectroscopy*, 109, 103055. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2020.103055>

[41] Wanule, D., Balkhande, J. V., Ratnakar, P. U., Kulkarni, A. N., & Bhowate, C. S. (2014). Extraction and FTIR analysis of chitosan from American cockroach, *Periplaneta americana*. *Extraction*, 3(3), 299-304.

[42] Kumirska, J., Czerwicka, M., Kaczyński, Z., Bychowska, A., Brzozowski, K., Thöming, J., & Stepnowski, P. (2010). Application of spectroscopic methods for structural analysis of chitin and chitosan. *Marine drugs*, 8(5), 1567-1636.

<https://doi.org/10.3390/md8051567>

[43] Hamedinasab, H., Rezayan, A. H., Mellat, M., Mashreghi, M., & Jaafari, M. R. (2020). Development of chitosan-coated liposome for pulmonary delivery of N-acetylcysteine. *International journal of biological macromolecules*, 156, 1455-1463.



Scientific Research

Production and Evaluation of Chitosan-Coated Nanoliposomes for Caffeine Encapsulation

Shadi Rajabi-Moghaddam¹, Rezvan Shaddel^{2*}

1. MSc Graduated in Food Science & Technology, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

2. Assistant Professor, Department of Food Science & Technology, University of Mohaghegh Ardabili, Ardabil, Iran.

ABSTRACT

In this study, chitosan-coated nanoliposomes in ratios of 9-1, 8-2, 7-3 and 6-4 lecithin-cholesterol, were prepared using thin-film hydration method, as a practical delivery system for encapsulation of caffeine. Then, the particle size and zeta potential were measured to determine the characteristics of the produced particles. Average particle size (average hydrodynamic diameter) and particle size distribution for different lecithin-cholesterol ratios were in the range of 135.5-533.5 nm and 0.31-0.41, respectively. Zeta potential values were also obtained in the range of +40.96 to +50.5. After determining the encapsulation efficiency, FTIR method was used to investigate possible reactions between caffeine and nanoliposome wall materials. The morphology of chitosome with 9-1 ratio of lecithin-cholesterol loaded with caffeine, was shown by scanning electron microscopy (SEM). The stability of the chitosomal sample with a ratio of 1-9 lecithin-cholesterol was evaluated through visual observation of precipitation formation and calculation of the amount of release of encapsulated caffeine during 60 days of storage at ambient temperature. The results obtained in this research showed that nanochitosomes are an efficient system in maintaining and releasing caffeine.

ARTICLE INFO

Article History:

Received: 2023/1/4

Accepted: 2023/5/15

Keywords:

Caffeine,

Nanochitosome,

FTIR,

SEM

DOI: 10.22034/FSCT.20.139.93

DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.139.6.0

*Corresponding Author E-Mail:
r.shaddel@uma.ac.ir