

بررسی رهایش و خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانوفیتوزوم حاوی اسانس زیره در شرایط آزمایشگاهی

مریم خوش منظر^۱، میر خلیل پیروزی فرد^{۲*}، حامد همیشه کار^۳

۱- دانشجوی دکتری، دانشگاه ارومیه، دانشکده کشاورزی، گروه علوم و صنایع غذایی

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

۳- استاد، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، مرکز تحقیقات کاربردی دارویی

(تاریخ دریافت: ۹۸/۰۲/۰۳ تاریخ پذیرش: ۹۸/۰۴/۱۷)

چکیده

هدف اصلی این مطالعه پوشش دهی اسانس زیره با فسفاتیدیل کولین به منظور غلبه بر حلالیت کم اسانس در آب و زیست دسترسی بهتر آن و حفاظت از اسانس در برابر شرایط محیطی می باشد. نانوفیتوزوم حاوی اسانس زیره (۶۰ میلی گرم فسفاتیدیل کولین - ۳۰ میلی گرم اسانس زیره) به روش هیدراسیون لایه نازک تهیه شده و خصوصیات فیزیکوشیمیایی آن شامل اندازه ذرات و توزیع اندازه ذرات، کارایی درون پوشانی، کدورت و پتانسیل زتای سیستم مورد مطالعه قرار گرفت. نتایج نشان داد که نانوفیتوزوم حاوی اسانس دارای اندازه ذرات بسیار ریز (کمتر از ۱۰۰ نانومتر) بوده و کارایی درون پوشانی ۹۴/۴۶ درصد می باشد و توزیع اندازه ذرات کمتر از ۰/۳ می باشد. کدورت نانوفیتوزوم حاوی اسانس بدون تغییر باقی ماند و پتانسیل زتای نانوفیتوزوم شاهد و نانوفیتوزوم حاوی اسانس از +۹ به -۱۹ (میلی ولت) تغییر یافت. سرعت رهایش اسانس پوشش دهی شده طی زمان افزایش یافت. طی بررسی رهایش اسانس در بافر فسفات مشخص شد در طول ۶ ساعت، حدود ۶۰ درصد از اسانس آزاد و در طول ۲۴ ساعت، ۵۰ درصد از اسانس ریزپوشانی شده در محیط رهایش پیدا کرد. همچنین بررسی مدل های رهایش در بافر فسفات نشان داد که رهایش اسانس آزاد و اسانس پوشش دهی شده، از معادله درجه اول تبعیت می کند. این مطالعه نشان داد که سرعت رهایش ترکیبات زیست فعال مانند اسانس ها را می توان با پوشش دهی آنها توسط فسفاتیدیل کولین کاهش داد و می توان نانوفیتوزوم حاوی اسانس زیره با رهایش کنترل شده را در مواد غذایی مخصوصاً نوشیدنی ها به کار برد.

کلید واژگان: اسانس زیره، ریزپوشانی، فیتوزوم، مدل های رهایش.

*مسئول مکاتبات: k.pirouzifard@yahoo.com

۱- مقدمه

در سال‌های اخیر علاقمندی مردم به استفاده از غذاها و ترکیبات غذایی طبیعی بیشتر شده است. زیرا عقیده بر این است که این ترکیبات سالم‌تر بوده و نسبت به ترکیبات غذایی مصنوعی و افزودنی‌های سنتزی خطرات کمتری دارند. این علاقمندی باعث شده است استفاده از ترکیبات طبیعی جایگزین افزودنی‌های مصنوعی در فرمولاسیون‌های غذایی و دارویی شود [۱،۲]. اسانس‌های گیاهی، مایعاتی فرار و ترکیباتی معطر با منشا ترپنی و الکی میباشند و به روش‌های مختلف فیزیکی و شیمیایی از گیاهان استخراج می‌شوند و باعث ایجاد بوی خوش و طعم مطبوع در مواد غذایی می‌شوند [۳]. تحقیقات اخیر حاکی از تمایل به استفاده از اسانس‌های گیاهی به عنوان ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی طبیعی در مواد غذایی می‌باشد [۴]. زیره سبز (*Cuminum Cyminum L.*) از خانواده چتریان است و به طور معمول در کشورهایمانند ایران، هند، ترکیه و چین رشد می‌کند. دانه‌های این گیاه به طور متداول به عنوان معطر کننده به غذا افزوده می‌شود. مطالعات درباره ترکیبات موجود در اسانس زیره سبز نشان می‌دهد مهم‌ترین ترکیبات موجود در اسانس این گیاه شامل کومین‌الدئید، کومیک اسید و کومینال می‌باشد که همه این ترکیبات دارای ارزش غذایی و دارویی می‌باشند [۵،۶]. زیره به دلیل داشتن ترکیبات فیتوشیمیایی، دارای خاصیت ضد-اکسایشی، ضد میکروبی و درمانی می‌باشد [۷،۶،۵]. با وجود تمام ویژگی‌های بی‌ظنیری که اسانس زیره دارد، مهم‌ترین مشکل در خصوص این ترکیبات حساس بودن و تخریب سریع آنها می‌باشد، مخصوصاً زمانی که این ترکیبات در معرض نور، اکسیژن، دما و هوا قرار می‌گیرند [۸]. بنابراین مهم‌ترین هدف از پایداری‌سازی اسانس‌های روغنی درون فرمولاسیون‌ها محافظت آنها در برابر تاثیر مخرب عوامل محیطی و رهایش کنترل شده این ترکیبات می‌باشد. برای این منظور درون پوشانی^۱ این ترکیبات یک روش ساده برای محافظت و رهایش آنها می‌باشد. از طرفی ریزپوشانی^۲ باعث افزایش پایداری و بهبود حلالیت در آب و زیست دسترسی^۳ این ترکیبات می‌شود [۸، ۴].

سیستم‌های نانوحامل را به دو دسته حامل‌های بیوپلیمری (پروتئینی و پلی‌ساکاریدی) و حامل‌های بر پایه لیپید طبقه‌بندی می‌نمایند. آنها عموماً متشکل از یک دیواره یا غشاء فیزیکی-شیمیایی محافظ و یک هسته فعال هستند و از روی عملکرد غشای سلولی در طبیعت الگوبرداری می‌شوند [۹]. از این سیستم‌ها برای پوشاندن و درون‌پوشانی ترکیبات مختلفی در صنایع غذایی از جمله ترکیبات ویتامینی، مواد غذا-دارو، ترکیبات آنتی‌اکسیدانی، مواد ضد میکروبی، طعم دهنده‌ها و هم-چنین میکروبی‌های مفید استفاده می‌شود [۱۰]. لیپوزوم‌ها^۴ از جمله حامل‌های بر پایه لیپید می‌باشند که حاوی یک یا چند لایه فسفولیپید بوده و معمولاً از لیسیترین سویا و یا تخم‌مرغ جهت تولید لیپوزوم‌ها استفاده می‌شود. مطالعات زیادی در خصوص استفاده از لیپوزوم‌ها به عنوان حامل ترکیبات ضد-میکروبی، مواد معطر و ترکیبات زیست فعال صورت گرفته است [۱۱،۱۲]. فیتوزوم‌ها^۵ شکل پیشرفته و کمپلکسی از ترکیبات فعال گیاهی و فسفولیپیدها می‌باشند که در ابتدا به منظور افزایش جذب و بهبود دسترسی زیستی عصاره‌های گیاهی و هم‌چنین محافظت از ترکیبات فعال در برابر ترشحات گوارشی تولید شدند [۱۳]. رهایش کنترل‌شده این ترکیبات توسط فیتوزوم‌ها امری ممکن و مطلوب می‌باشد. به طور کلی دارو یا ترکیبات زیست فعال پوشش‌دهی شده درون فیتوزوم می‌تواند بدون تخریب از سیستم گوارشی عبور کرده و از این طریق باعث افزایش زیست دسترسی و فعالیت زیستی این ترکیبات می‌شود [۱۴]. فیتوزوم را می‌توان در محصولات مختلف و با اهداف متفاوت استفاده کرد، به عنوان نمونه می‌توان از فیتوزوم‌ها در صنایع غذایی برای افزایش پایداری مواد فراسودمند (مانند ویتامین‌ها، پلی‌فنول‌ها، اسیدهای چرب ضروری، کاراتنوئیدها و...) در محیط‌های غذایی و کنترل رهایش مواد ضد اکسایشی و ضد میکروبی استفاده کرد. همچنین در صنایع دارویی نیز می‌توان برای حمل هموگلوبین، محافظت از پپتیدهای زیست فعال در مقابل اسید معده و رهایش آنها در روده استفاده کرد [۱۵، ۱۶]. در این مقاله رفتار رهایشی این ترکیبات جهت کاربرد در مواد غذایی تعیین‌کننده و مهم می‌باشد. رهایش ترکیبات زیست فعال می‌تواند به یکی از دو روش انتشار کنترل‌شده بواسطه مانع کنترلی سرعت و یا

4. Nutraceutical
5. Liposome
6. Phytosome

1. Encapsulation
2. Nanoencapsulation
3. Bioavailability

۲-۳- ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و مرفولوژی

نانوفیتوزوم

ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی شامل بررسی کارایی درون پوشانی، اندازه و توزیع اندازه ذرات و پتانسیل زتا به شرح زیر تعیین شد.

۲-۳-۱- کارایی درون پوشانی

برای تعیین کارایی درون پوشانی اسانس زیره داخل نانوحامل، از روش غیر مستقیم استفاده شد. برای این منظور ابتدا غلظت‌های مناسبی از اسانس با اتانول (۰/۰۰۱ - ۰/۰۲۵ mg/ml) تهیه شد و میزان جذب نمونه در ۲۶۰ نانومتر (حداکثر جذب بر اساس داده‌های حاصل از اسکن توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Ultrospec 2000، ساخت Scintec انگلستان) خوانده شد و سپس منحنی کالیبراسیون رسم گردید و معادله آن تعیین شد ($y=0.163x+0.0411$ $R^2 = 0.99$). جهت تعیین کارایی، ۰/۵ میلی لیتر از نانوفیتوزوم با ۳/۵ میلی لیتر اتانول (۵۰٪) مخلوط شده و سپس نمونه به داخل فیلتر آمیکون انتقال داده شد و به مدت ۵ دقیقه در ۴۰۰۰ دور در دقیقه، سانتریفوژ انجام گرفت. میزان جذب نمونه فیلتر شده در ۲۶۰ نانومتر خوانده شد که نشان‌دهنده اسانس پوشش‌دهی نشده می باشد. در نهایت کارایی درون پوشانی با فرمول زیر محاسبه می شود، با اندکی تغییر [۱۸].

$$\%EE = \frac{C_2 - C_1}{C_2} \times 100$$

EE: کارایی درون پوشانی.

C_1 : مقدار اسانس زیره پوشش‌دهی نشده بر حسب میلی گرم
 C_2 : مقدار اسانس زیره آزاد و درون پوشانی شده بر حسب میلی گرم

۲-۳-۲- تعیین اندازه ذرات و پتانسیل زتا:

اندازه و توزیع اندازه ذرات و پتانسیل زتای نمونه در دستگاه اندازه گیری کننده اندازه ذرات Nano - ZS ساخت (شرکت Malvern انگلستان) در دمای ۲۵ درجه اندازه گیری شد. متوسط اندازه ذرات بر اساس میانگین قطر حجمی تعیین شد و تمام نتایج مربوط به مجموع سه بار تکرار نمونه‌ها می باشد [۱۹].

۲-۳-۳- تعیین کدورت

مقدار کدورت نمونه‌ها توسط دستگاه اسپکتروفتومتر (مدل Ultrospec 2000، ساخت Scintec انگلستان) اندازه

کنترل تخریبی بواسطه شکستن مواد مانع انجام می گیرد که این روش‌ها منجر به رهایش آرام یا سریع این ترکیبات می شود [۱۷]. مدل‌های ریاضی متنوعی جهت افزایش اطلاعات در خصوص پدیده‌های موثر بر سینتیک رهایش داروها استفاده می شود و این اطلاعات می تواند بر بهینه‌سازی فرمولاسیون کمک کند. مهم ترین هدف این مطالعه بررسی رهایش درون آزمایشگاهی^۷ اسانس زیره پوشش دهی شده با فیتوزوم توسط مدل‌های رهایشی مختلف و بررسی رفتار رهایشی آن می باشد.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد مورد استفاده

لیسیتین مورد استفاده در این پروژه دارای ۹۹ درصد خلوص، از شرکت لیپوئید (آلمان) خریداری شد. اسانس زیره بصورت مایعی زرد رنگ از شرکت نگین خوراک پارس تهیه گردید. قرص نمک‌های دی پتاسیم هیدروژن فسفات (PBS) از شرکت مواد شیمیایی مرک (Merck, Germany) تهیه شدند. اتانول ۹۶٪ از شرکت داروسازی زهراوی خریداری شده بود. همچنین آب مصرفی در این پروژه از نوع آب دوبار تقطیر بود

۲-۲- روش‌ها

۲-۲-۱- تهیه نانوفیتوزوم

برای تولید نانوفیتوزوم از روش هیدراسیون فیلم لایه نازک استفاده شد. برای این منظور حدود ۳۰ میلی گرم از اسانس زیره و ۶۰ میلی گرم فسفاتیدیل کولین در ۱۰ میلی لیتر اتانول حل شد. سپس برای تشکیل کمپلکس، این مخلوط به مدت ۲۴ ساعت در ۴ درجه سانتیگراد نگهداری شد. کمپلکس حاصله به فلاسک ته گرد انتقال داده شده و توسط اوپراتور تحت خلا (Heydolph، آلمان) تبخیر شد تا تمام حلال جدا شود و تشکیل یک لایه نازک اطراف فلاسک بدهد. پس از آن ۱۰ میلی لیتر آب مقطر اضافه شد، نهایتاً فیلم تشکیل شده با آب مقطر، توسط روتاری در دمای ۴۵ درجه سانتیگراد هیدراته شد. به منظور کاهش اندازه ذرات و تولید سیستم پایدار، از اولتراسوند پروب (hielscher, up200H، کشور آلمان) (۱۰ سیکل با فاصله یک دقیقه و دامنه ۷۰ درصد و ۰/۵ دور در دقیقه) استفاده شد [۱۸].

رهایش در لحظه t : Mt رهایش در لحظه اول Mi :
 Mi/Mt رهایش جمعی در لحظه t , b , a اعداد متغیر در هر
 معادله، $(1/2) t^{\wedge}$ ریشه دوم زمان می باشد [۱۷]، با اندکی
 تغییر].

۲-۴- محاسبات آماری

تمام نمونه‌ها در سه تکرار تهیه شده و میانگین و انحراف از
 استاندارد نمونه‌ها با استفاده از نرم‌افزار اکسل محاسبه شد.
 جهت برازش کردن داده‌های حاصل از رهایش توسط مدل‌های
 سینتیکی، از نرم افزار متلب مدل ۱۸ استفاده شد.

۳- بحث و نتایج

۳-۱- خصوصیات فیزیکوشیمیایی

خصوصیات فیزیکوشیمیایی شامل کارایی درون‌پوشانی، اندازه
 ذرات، توزیع اندازه ذرات، پتانسیل زتای نمونه به طور کامل
 مورد بررسی واقع شد.

۳-۱-۱- تعیین کارایی درون پوشانی

کارایی درون‌پوشانی یکی از فاکتورهای مهم برای ارزیابی
 ظرفیت نانوحامل‌ها جهت رهایش ترکیبات فعال می‌باشد [۲۱].
 این ویژگی حامل‌های لیپیدی تحت تاثیر فرآیند تهیه، حجم
 نمونه، سطح حجمی، روش تهیه و خصوصیات سطحی نمونه
 قرار دارد [۱۹]. در این تحقیق نانوفیتوزوم حاوی اسانس زیره
 دارای کارایی حدود $0/6 \pm 94/46\%$ می‌باشد که علت آن کافی
 بودن فضای فیتوزوم برای اسانس می باشد و نشان می دهد این
 حامل برای پوشش دهی زیره مناسب است. همچنین استفاده از
 اولتراسوند پروب و کاهش اندازه ذرات به کمتر از ۱۰۰ نانومتر
 نیز باعث می شود حجم فیتوزوم افزایش یافته و تمرکز ماده
 فعال بر روی سطح فسفولیپید بیشتر شود و در نتیجه درصد
 بارگیری ترکیب فعال در ساختار فیتوزوم افزایش می‌یابد. این
 نتیجه با یافته‌های محققین دیگر مطابقت دارد که کارایی درون
 پوشانی آنها نیز بالای ۹۰ درصد می باشد [۲۲، ۲۳]. بابازاده و
 همکاران نیز نانوفیتوزوم حاوی روتین با کارایی ۹۸ درصد
 تولید کردند که علت این کارایی بالا را کافی بودن لیپیتین
 جهت پوشش دهی روتین اعلام کردند [۱۸]. فاطمیا و همکاران
 در تحقیقی که از فسفاتیدیل‌کولین به عنوان حامل تیمین
 استفاده کردند، کارایی درون‌پوشانی را ۹۷ درصد اعلام کردند.
 آنها نتیجه گیری کردند که فسفاتیدیل‌کولین حامل مناسبی برای

گیری شد. برای این منظور جذب نمونه‌ها بدون رقیق‌سازی، در
 طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه گیری شد و آب دو بار تقطیر به
 عنوان نمونه شاهد در نظر گرفته شد.

۲-۳-۴- میکروسکوب الکترونی روبشی

مورفولوژی سطح نمونه‌های تولید شده به وسیله میکروسکوب
 الکترونی (KYKY-EM3200) مورد بررسی واقع شد و
 آماده‌سازی نمونه با آب مقطر صورت گرفته و روی لامل تا
 خشک شدن کامل قرار داده شد. سپس نمونه مورد نظر با طلا
 پوشش دهی شده و سپس تصویربرداری از نمونه با
 میکروسکوب الکترونی روبشی صورت گرفت [۲۰].

۲-۳-۵- بررسی رهایش در شرایط شبیه سازی شده

آزمایشگاهی

رهایش اسانس از نانوفیتوزوم در شرایط آزمایشگاهی مورد
 مطالعه قرار گرفت. برای این منظور محلول اسانس زیره با
 افزودن نیم درصد توین ۸۰ به محیط حاوی اسانس و آب تهیه
 شد و به عنوان شاهد در تعیین میزان پایداری مورد استفاده قرار
 گرفت. برای تعیین نحوه رهایش ۲ میلی لیتر از محلول اسانس
 و نانوفیتوزوم حاوی اسانس، به داخل کیسه دیالیز اضافه شد
 سپس کیسه دیالیز درون ۲۰۰ میلی لیتر بافر فسفات (۷/۴)
 (pH=) غوطه ور شد. دمای بافر فسفات، ۳۷ درجه و دور
 همزن ۱۰۰ rpm بود. در فاصله‌های زمانی (۰/۵ - ۱ - ۲ - ۴ - ۶ -
 ۸ - ۱۲ - ۲۴ ساعت) نمونه برداری انجام گرفت. هر بار دو
 میلی‌لیتر از بافر جهت تعیین مقدار اسانس رهایش‌یافته، نمونه
 برداری شد و مجدداً به همان اندازه، بافر تازه به محیط اضافه
 شد. مقدار اسانس با روش اسپکتروفتومتری تعیین شد. نتایج
 حاصل از رهایش اسانس آزاد و پوشش‌دهی شده، درون بافر
 فسفات از طریق معادلات Zero Order درجه صفر (معادله
 ۱)، Peppas (معادله ۲)، Hixon-Crowell (معادله ۳) و
 Higuchi (معادله ۴) درجه اول First Order (معادله ۵)
 بررسی شد.

$$\text{Zero Order} \quad Q = a \quad (1)$$

$$\text{Peppas} \quad Q = a \cdot (t)^{\wedge n} \quad (2)$$

$$\text{Hixon-Crowell} \quad Q = 1 \cdot (1 - (1 - a \cdot t)^{\wedge 1/3}) \quad (3)$$

$$\text{Higuchi} \quad Q = a \cdot (t)^{\wedge 0.5} \quad (4)$$

$$\text{First Order} \quad Q = a \cdot (1 - \exp(-b \cdot t)) \quad (5)$$

تولید شده هموزن می باشد [۱۹]. در تحقیقی که رفیعی و همکاران جهت تولید نانولیپوزوم حاوی ترکیبات پلی فنلی پسته انجام دادند مشاهده کردند که توزیع اندازه ذرات کمتر از ۰/۳ بوده و آنها نیز اعلام کردند ذرات یکنواخت و همگن می باشند [۱۹].

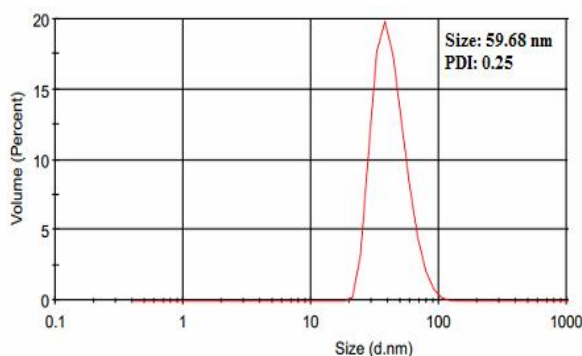


Fig 1 Particle size (nm) and poly dispersity index (PDI) pattern of cumin essential oil loaded nanophytosome

۳-۱-۳- پتانسیل زتا (Zeta Potential)

پتانسیل زتا شاخصی برای بررسی پایداری نمونه‌ها می باشد. بار منفی روی ذرات باعث ایجاد دافعه الکترواستاتیک و در نتیجه ممانعت از تجمع آنها می شود [۲۱]. نتایج نشان داد پتانسیل زتای نمونه مربوط به فیتوزوم فاقد اسانس $\pm 0/95$ + ۷/۶۸ میلی ولت و نانوفیتوزوم حاوی اسانس $\pm 0/79$ + ۱۹/۸۹ میلی ولت می باشد که دلیل این پدیده به دلیل حضور گروه‌های با بار منفی اسانس بر روی سطح نانوفیتوزوم می باشد. ساختار ترکیب فعال با تغییر دادن ساختار سطحی فیتوزوم، موجب منفی شدن پتانسیل زتای سطحی آن می‌شود. این تغییرات منجر به تغییر در آرایش و جهت‌گیری گروه‌های سر فسفاتیدیل‌کولین در سطح فیتوزوم می‌شود. احتمالاً بار روی فیتوزوم به دلیل قرار گرفتن گروه کولین در سطح غشا مثبت بوده و بعد از درون پوشانی اسانس توسط فسفاتیدیل‌کولین، با بار منفی آن که به دلیل حضور ترکیبات فنلی است، خنثی شده و این امر منجر به افزایش بار منفی روی سطح نانوفیتوزوم می‌شود. در تحقیقی که امجدی و همکاران بر روی نانولیپوزوم حاوی بتانین انجام دادند مشخص شد پتانسیل زتای نمونه ی فاقد بتانین ۱۱/۸- بوده و در حضور بتانین به مقدار ۱۹/۰۵- می‌رسد. آنها نتیجه‌گیری کردند که بارهای مثبت روی قسمت آمین بتانین با بارهای منفی روی لیسیتین جفت می‌شوند و در این حالت گروه‌های کربوکسیلی روی بتانین در سطح نانو-لیپوزوم قرار می‌گیرد و باعث منفی‌تر شدن مقدار پتانسیل زتا

تیامین می باشد [۲۴]. نتایج لیو و پارک در تحقیق بر روی نانو-لیپوزوم‌های حاوی ویتامین C پوشش‌دار شده توسط کیتوزان نشان داد لیپوزوم‌هایی با اندازه کوچک قادر به بارگیری بیشتر ویتامین C درون خود هستند که این می‌تواند به علت حضور مقدار بیشتر حامل در سیستم آنها باشد [۲۵].

۳-۱-۲- اندازه ذرات و توزیع اندازه ذرات

اندازه ذرات کوچکتر از جنبه‌های مختلفی حائز اهمیت می باشد که از مهم‌ترین آنها می‌توان به زیست‌دسترسی بالاتر، پایداری کلوئیدی بیشتر، حلالیت در محیط آبی، محلول‌های شفاف تر (کدورت کمتر) اشاره کرد [۱۸]. اندازه نانوحامل حاوی اسانس در حدود $1/07 \pm 59/68$ نانومتر و توزیع اندازه ذرات آن $0/01 \pm 0/25$ می‌باشد (شکل ۱). در حالی که نانو-فیتوزوم بلانک حدود $3/68 \pm 172/46$ نانومتر و توزیع اندازه آن $0/0152 \pm 0/31$ می‌باشد. با افزودن اسانس اندازه ذرات کاهش می‌یابد که احتمالاً به دلیل خصوصیات فیزیکوشیمیایی ترکیبات فعال، حلالیت، قطبیت و اندازه مولکول‌های اسانس می‌باشد. ترکیبات فعال موجود در اسانس حاوی گروه‌های باردار هستند که می‌توانند پیوند هیدروژنی و یا پیوند یونی با سر قطبی فسفاتیدیل‌کولین برقرار کنند. همچنین قسمت آب-گریز ترکیب فعال می‌تواند در داخل تک لایه فسفولیپید قرار گرفته و با زنجیره هیدروکربنی آن پیوند برقرار کند. به عبارتی برهمکنش بین فسفاتیدیل‌کولین و ترکیبات اسانس بر اندازه ذرات فیتوزوم موثر است [۱۹]. نتایج این تحقیق با نتایج امجدی و همکاران که نانولیپوزوم حاوی بتانین به روش لایه نازک تولید کردند، مطابقت دارد که در تحقیق آنها اندازه ذرات کمتر از ۵۰ نانومتر گزارش شده بود [۲۰]. در تحقیق دیگری که زو و همکاران بر روی نانولیپوزوم حاوی ترکیبات پلی فنلی انجام دادند اندازه ذرات نانولیپوزوم حاوی ترکیبات پلی فنلی چای را $66/8$ نانومتر و توزیع اندازه ذرات $0/21$ گزارش کردند [۲۶]. نتایج بدست آمده از تحقیق حور اسفند و همکاران بر روی نانوفیتوزوم حاوی روتین نشان داد اندازه ذرات نانوفیتوزوم حاوی غلظت‌های مختلف روتین در محدوده ۹۹ تا ۱۲۳ نانومتر قرار دارد [۲۷]. توزیع اندازه ذرات یکی از شاخص‌های مهم جهت تعیین پایداری نانوحامل‌ها می باشد. مقادیر بالای ۰/۳ نشان‌دهنده سیستم ناهمگن و مقادیر کمتر از ۰/۳ نشان‌دهنده سیستم همگن و هموزن می باشد. توزیع اندازه ذرات نمونه‌ها کمتر از ۰/۳ می باشد که نشان می‌دهد سیستم

۳-۱-۵- مطالعه میکروسکوپ الکترونی روبشی

میکروسکوپ الکترونی روبشی یکی از روش‌های مناسب جهت دستیابی به اطلاعاتی در خصوص اندازه ذرات و شکل آنها و تأیید کننده نتایج حاصل از اندازه ذرات نیز می باشد. تصویر بدست آمده از میکروسکوپ الکترونی روبشی نشان داد اندازه ذرات نانوفیتوزوم حاوی اسانس زیره کمتر از ۱۰۰ نانومتر می باشند (شکل ۳). شکل کروی ذرات کاملاً در تصویر مشاهده می شود. همچنین این تصویر تأیید کننده نتایج اندازه ذرات می باشند [۱۹].

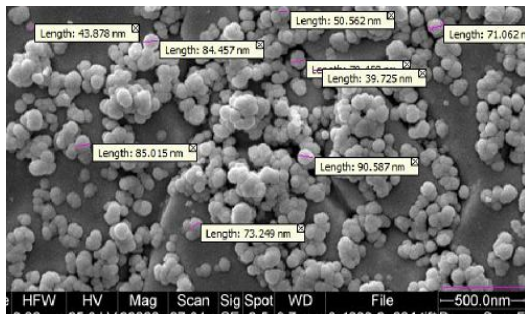


Fig 3 Scanning electron microscopy (SEM) of cumin essential oil loaded nanophytosome

۳-۲- بررسی رهایش در شرایط آزمایشگاهی:

رهایش اسانس پوشش دهی شده و اسانس آزاد در شرایط آزمایشگاهی مورد ارزیابی قرار گرفت و نتایج آن در شکل ۴ آورده شده است. در این آزمایش رهایش اسانس آزاد به عنوان شاهد در نظر گرفته شد. همانطور که مشخص است طی ۶ ساعت اول حدود $0.22 \pm 62/88$ درصد از اسانس پوشش-دهی نشده از کیسه دیالیز در محیط بافری آزاد می شود در حالی که اسانس ریزپوشانی شده توسط فیتوزوم، در طی ۶ ساعت $1/02 \pm 28/70$ درصد و در طی ۲۴ ساعت $1/03 \pm 44/93$ درصد از اسانس، در محیط رهایش می یابد. این نتیجه احتمالاً به دلیل حضور گروه‌های آب گریز و آب دوست اسانس زیره و ریزپوشانی آن توسط لیستین می باشد. در تحقیقی که زو و همکاران [۳۰] بر روی نانولپوزوم حامل اپی گالوکاتکین گالات (EG) انجام دادند مشخص شد که حدود ۹۲/۴ درصد از (EG) پوشش‌دهی نشده در طی ۶ ساعت از کیسه دیالیز در محیط بافری آزاد می شود و این درحالیست که حدود ۶ و ۱۲ درصد از (EG) از نانولپوزوم طی ۶ و ۲۴ ساعت به محیط بافری وارد می شود. گیس و همکاران [۱۷] به بررسی نحوه رهایش روغن دانه انگور،

می شود [۲۰]. زو و همکاران [۲۶] در بررسی نانولپوزوم حاوی عصاره چای، پتانسیل زتای نمونه را $6/16$ میلی ولت گزارش کردند. آنها علت اختلاف در مقادیر پتانسیل زتا را تفاوت در ترکیبات و خصوصیات فسفولیپیدهای سازنده نانو-لیپوزوم اعلام کردند. این محققین اعلام کردند پایداری سیستم لیپوزومی تنها به پتانسیل زتا وابسته نیست. کارایی کپسولاسیون و اندازه ذره دو عامل مهم در انتخاب این سیستم برای ریز-پوشانی می باشد. کیوانی و همکاران [۲۸] پتانسیل زتای نانو-لیپوزوم حاوی اسانس دارچین را بین $10/9$ تا $17/4$ میلی-ولت گزارش کردند. آنها اعلام کردند بار منفی روی فسفاتیدیل کولین با افزایش غلظت اسانس افزایش یافته است.

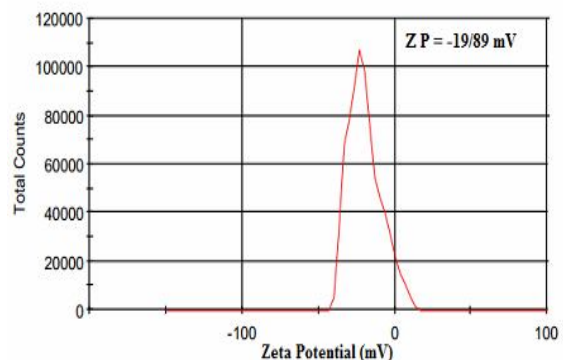


Fig 2 Zeta potential (mv) of cumin essential oil loaded nanophytosome

۳-۱-۴- کدورت

باتوجه به اینکه کدورت محلول‌های کلوئیدی بستگی به اندازه ذرات و غلظت و اندیس انکسار (شکست) ذرات دارد. به همین منظور کدورت نمونه‌ها مورد بررسی قرار گرفت [۲۳]. مقدار کدورت نانوفیتوزوم حاوی اسانس 0.39 ± 0.16 و نمونه نانوفیتوزوم شاهد 0.49 ± 0.54 می باشد. با اینکه هر دو نمونه شفاف است ولی فیتوزوم فاقد اسانس دارای بالاترین کدورت است که علت آن، بالا بودن اندازه ذرات می باشد. بابازاده و همکاران [۱۸] در بررسی تأثیر نانوحامل بر کدورت نمونه‌ی غذایی نشان دادند که این حامل‌ها تأثیری بر کدورت محصول نهایی ندارد که علت آن را به کوچک بودن اندازه ذرات (کمتر از ۱۰۰ نانومتر بودن ذرات) تعمیم دادند. امیری و همکاران [۲۹] به این نتیجه رسیدند که حامل‌های با اندازه ذرات بزرگتر از ۲۰۰ نانومتر بر کدورت سیستم کلوئیدی تأثیر می گذارند.

رهايش برپايه ديافوزيون مي باشد. Baker Lonsdale معمولاً برای رهايش ماده از ماتريكس كروي بكار مي رود و نوع توسعه يافته آن Higuchi مي باشد. Rigter-Peppas اطلاعات بيشتري در مورد رفتار رهايشي به ما مي دهد. به اين صورت اگر توان معادله کمتر از $0/5$ باشد ديافوزيون فيك مي باشد و اگر توان معادله بين $0/45$ و $0/98$ باشد ديافوزيون از نوع غير عادي يا غير فيك مي باشد. اگر بالای $0/89$ باشد نشان دهنده رفتار انتقالی درجه دو يا بحرانی می باشد [۳۲، ۳۳]. ديافوزيون غير عادي يا غير فيك در اغلب حالاتها به تركيب هر دو ديافوزيون ارتباط داشته و نشان دهنده ديافوزيون تدريجي مي باشد و انتقال درجه دو و يا بحرانی نشان دهنده تحليل تدريجي زنجيره پلی مری می باشد [۱۷].

داده‌های مربوط به سرعت رهايش تجمعي هر دو نمونه اسانس و نانوفیتوزوم حاوی اسانس در ۵ مدل فیت شدند. در بررسی دو نمونه اسانس و نانوفیتوزوم حاوی اسانس، در بافر فسفات مشخص شد رهايش نمونه ی اسانس از مدل *first order* تبعیت می کند. چرا که بيشتري رگرسيون مربوط به اين مدل می باشد. در جدول ۱ داده‌های مربوط به نتايج که در معادلات فیت شده اند آورده شده است. بهترين مدل، مدلی است که دارای بيشتري همبستگي باشد.

در مقايسه دو نمونه اسانس و فیتوزوم حاوی اسانس در محيط PBS به نتايج زیر دست يافتيم. رهايش اسانس از معادله درجه يك و معادله Peppas و Higuchi تبعیت می کند اما بيشتري نزديكي را با معادله درجه يك دارد. رهايش نانو-فیتوزوم حاوی اسانس نیز دارای بالاترين ضريب همبستگي با معادله درجه يك و معادله Peppas, Higuchi دارد (حدود $0/99$ ، $0/96$). به عبارتی اسانس و نانوفیتوزوم حاوی اسانس دارای بالاترين همبستگي با معادلات درجه يك و معادله Peppas و Higuchi هستند. با توجه به اينکه $0/49$ $n=0/48$ است رهايش از قانون فيك تبعیت می کند.

نتايج مربوط به بررسی سيئينتيك رهايش هسته انگور و نانولپوزوم حاوی هسته انگور در بافر فسفات، بر پايه زمان نشان می دهد که با گذشت زمان سرعت رهايش تجمعي نمونه‌ها افزايش می يابد. رهايش هسته انگور بعد از ۵ ساعت به 68 درصد می رسد. رهايش هسته انگور به صورت آزاد از معادله *first order* تبعیت می کند در حالی که نمونه نانولپوزوم حاوی هسته انگور از معادله Peppas تبعیت می کند و دارای بيشتري رگرسيون در اين معادله می باشد. با توجه به اينکه $n=0/55$ است رهايش از قانون فيك تبعیت می کند [۱۷]. نتايج اين تحقيق با نتايج ما مطابقت داشت.

لپوزوم حاوی روغن انگور و لپوزوم پوشش دهی شده پرداختند. نتايج اين تحقيق نشان داد که رهايش روغن هسته انگور در طی مدت ۲۴ ساعت به 100 درصد می رسد و نانو-لپوزوم حاوی هسته انگور در طی ۳۰ دقيقه به 7 درصد و طی ۲۴ ساعت به 55 درصد می رسد و اين درحالی است که در مورد نانولپوزوم پوشش دهی شده با کیتوزان، در طی ۶ ساعت 28 درصد رهايش اتفاق افتاد و در طی ۲۴ ساعت در همين دامنه باقی می ماند. اين نتايج با نتايج تحقيق ما هماهنگی داشت. کريمی و همکاران [۲۳] در تحقيقی بر روی ريزپوشانی عصاره زردچوبه با استفاده از نانوحامل لپیدی به اين نتيجه رسيدند که تنها $43/2$ درصد از عصاره زرد چوبه طی ۲۰ ساعت در 37 درجه با دور همزن 50 دور در دقيقه و $pH=7$ از نانوحامل لپیدی آزاد شد که اين مقدار کمتر از مقدار عصاره زردچوبه پوشش دهی نشده بود. آنها نتيجه گيري کردند احتمالاً دليل آن تمايل قسمت‌های هيدروفوبيك عصاره زردچوبه برای ماندن درون قسمت لپیدی ساختار حامل لپیدی می باشد و اين علت باعث می شود رهايش به کندی و آرامی صورت گیرد. همچنين اعلام کردند رها سازی در شرايط $pH=7$ باعث می شود رها سازی در خون صورت گیرد و اسيد معده بر آن تاثير نگذارد.

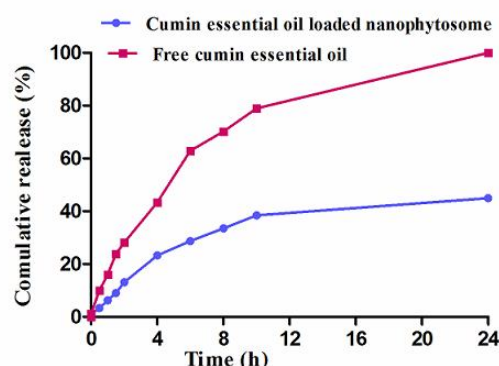


Fig 4 In vitro release profile of cumin essential oil from cumin essential oil loaded nanophytosome and free cumin essential oil for 24 (h)

جهت بررسی مدل سيئينتيكي، داده‌های حاصل از رهايش اسانس آزاد و نانوفیتوزوم حاوی اسانس در مدل‌های مختلف جایگذاری شده و مکانيسم رهايش بر پايه اين مدل‌ها آناليز شدند. داده‌ها در مدل‌های درجه صفر، درجه اول و مدل‌های انتشار مانند Higuchi و Rigter-Peppas و Weibull جایگذاری شده و بررسی شدند [۳۱]. معادله Hixon-Crowell توصيف کننده رهايش بر پايه حل شدن بوده و بستگي به سطح نمونه داشته و نشان دهنده تغيير در اندازه ذرات می باشد. با توجه به اينکه مدل Higuchi نشان دهنده

Table 1 Fitted equations of different release models; Q=release rate, a=release constant, t = time (h)

Sample	X	Model	Equation	R-square
Free cumin essential oil	A	Zero Order $Q = a \times t$	$Q = 5.52 \times t$	0.55
	B	Peppas $Q = a \times (t)^n$	$Q = 22.78 \times (t)^{0.49}$	0.96
	C	Hixon-Crowell $Q = 1 \times (1 - (1 - a \cdot t)^{1/3})$	$Q = 1 \times (1 - (1 - 16.42 \cdot t)^{1/3})$	0.57
	D	Higuchi $Q = a \times (t)^{0.5}$	$Q = 22.3 \times (t)^{0.5}$	0.96
	E	First Order $Q = a \times (1 - \exp(-b \cdot t))$	$Q = 101 \times (1 - \exp(-0.15 \cdot t))$	0.99
Cumin essential oil loaded nanophytosome	A	Zero Order $Q = a \times t$	$Q = 2.55 \times t$	0.51
	B	Peppas $Q = a \times (t)^n$	$Q = 10.7 \times (t)^{0.48}$	0.93
	C	Hixon-Crowell $Q = 1 \times (1 - (1 - a \cdot t)^{1/3})$	$Q = 1 \times (1 - (1 - 7.52 \cdot t)^{1/3})$	0.55
	D	Higuchi $Q = a \times (t)^{0.5}$	$Q = 10.38 \times (t)^{0.5}$	0.93
	E	First Order $Q = a \times (1 - \exp(-b \cdot t))$	$Q = 46.19 \times (1 - \exp(0.16 \cdot t))$	0.99

system. Journal of Food Science and Technology. 51(11), 3269–3276

- [3] Isman, M. B. Plant essential oils for pest and disease management. (2000). Crop Protect. 19 (8), 603-608.
- [4] Zhavah, S., Mohsenifar, A., Beiki, M., Khalili, S. T., Abdollahi, A., Rahmani-Cherati, T., Tabatabaei, M. (2015). Encapsulation of cuminum cyminum essential oils in chitosan-caffeic acid nanogel with enhanced antimicrobial activity against *Aspergillus flavus*. Industrial Crops and Products. 6, 251–256.
- [5] Kaur, D., Sharma, R. (2012). An Update on pharmacological properties of Cumin. International Journal of Research in Pharmacy and Science. 2(4), 14-27.
- [6] Singh, R. P., Gangadharappa, H.V., Mruthunjaya, K. (2017). Cuminum cyminum. A Popular Spice: An Updated Review. A Multifaceted Journal in the field of Natural Products and Pharmacognos. 9(3), 292-301.
- [7] Al Snafi, E. A. (2016). The pharmacological activities of cuminum cyminum. Journal of Pharmacy. 6(6), 46-65.
- [8] Karimia, N., Ghanbarzadeh, B., Hamishehkar, H., Mehramuz, B., Samadi Kafild, H. (2018). Antioxidant, antimicrobial and physicochemical properties of turmeric extract-loaded nanostructured lipid carrier

۴- نتیجه گیری

در این مطالعه کمپلکس فسفولیپید لیسیتین- اسانس زیره به روش ترکیبی هیدراسیون لایه نازک و استفاده از اولتراسوند تولید شد. سپس به بررسی پارامترهای فیزیکی شیمیایی این کمپلکس و نحوه رهائش آن پرداختیم. نتایج نشان داد که اندازه ذرات کمتر از ۱۰۰ نانومتر بوده و رهائش نانوفیتوزوم از معادله درجه یک و از قانون فیک تبعیت کرده و سرعت رهائش با پوشش دهی کاهش می یابد. بنابراین استفاده از این کمپلکس در نوشیدنی‌ها و غذاها باعث می شود رهائش اسانس به صورت کنترل شده و تدریجی بوده و ترکیبات زیست فعال و مواد غذایی با ارزش دارویی آن محافظت شوند.

۵- منابع

- [1] Chen, Q., Gan, Zh., Zhao, J., Wang, Y., Zhang, Sh., Li, J., Ni, Y. (2014). In vitro comparison of antioxidant capacity of cumin (*Cuminum cyminum* L.) oils and their main components. LWT - Food Science and Technology. 55, 632-637.
- [2] Chan, K. W., Khong, N. M. H., Iqbal, S., Ch'ng, S. E., Younas, U., Babji, A. S. (2012). Cinnamon bark deodorised aqueous extracts: a potential natural antioxidant in meat emulsion

- [20] 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.
- [21] Nazari, M., Ghanbarzadeh, B., Samadi Kafil, H., Zeinali, M., Hamishehkar, H. (2019). Garlic essential oil nanophytosomes as a natural food preservative: Its application in yogurt as food model. *Colloid and Interface Science Communications*. 30, 1-7.
- [22] Rasaie, S., Ghanbarzadeh, S., Mohammadi, M., Hamishehkar, H. (2014). Nano Phytosomes of Quercetin: A Promising Formulation for Fortification of Food Products with Antioxidants. *Pharmaceutical Sciences*. 20, 96-101.
- [23] Karimi, N., Ghanbarzadeh, B., Hamishehkar, H., Pezeshki, A., Mostafayil, H., Gholian, M. (2015). Phytosome as novel delivery system for nutraceutical materials. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*. 4(6), 152-159.
- [24] Fathima, S. J., Fathima, I., Abhishek, V., Khanum, F. (2016). Phosphatidylcholine, an edible carrier for nanoencapsulation of unstable thiamine. *Food Chemistry*. 197, 562–570.
- [25] Liu, N. and Park, H.J. (2010). Factors effect on the loading efficiency of vitamin c loaded chitosan-coated nanoliposomes. *Colloids Surface B*. 76(1), 9-16.
- [26] Zou, L., Liu, W., Liu, W. L., Liang, R. H., Li, T., Liu, CH. M., Cao, Y, N., Niu, J., LiU, Z. (2014). Characterization and bioavailability of tea polyphenol nanoliposome prepared by combining an ethanol injection method with dynamic high-pressure microfluidization. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*. 62, 934–941.
- [27] Hooresfand, Z., Ghanbarzadeh, S., Hamishehkar, H. (2015). Preparation and characterization of rutin-loaded nanophytosomes. *Pharmaceutical Sciences*. 1, 145-151.
- [28] Keivaninahr, F., Ghanbarzadeh, B., Hamishehkar, H., Samadi kafil, H., Hoseini, M., Esmailnejad, B. (2019). Investigation of physicochemical properties of essential oil loaded nanoliposome for enrichment purposes. *LWT - Food Science and Technology*. 105, 282-289.
- [29] Amiri, S., Ghanbarzadeh, B., Hamishehkar, H., Hosein, M., Babazadehe, A., Adun, P. (2018). Vitamin E loaded nanoliposomes: (NLC). *Colloid and Interface Science Communications*. 22, 18–24.
- [9] Vos, D. P., Faas, M. M., Spasojevic, M., Sikkema, M. (2012). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*. 20, 292–302.
- [10] Ezhilarasi, N. P., Karthik, P., Chhanwal, N., Anandharamkrishnan, C. (2013). Nanoencapsulation Techniques for Food Bioactive Components. A Review, *Food Bioprocess Technol*. 6, 628–647.
- [11] Bochicchio, S., Barba, A., A. Grassi, G., Lamberti, G. (2016). Vitamin delivery: Carriers based on nanoliposomes produced via ultrasonic irradiation. *Food Science and Technology*. 69, 9-13.
- [12] Saraf, S. A. (2010). Applications of novel drug delivery system for herbal formulations *Fitoterapia*. 680–689.
- [13] Pawar, H. A., Bhangale, D. B. (2015). Phytosome as a novel biomedicine: a microencapsulated drug delivery system. *Journal of Bioanal Biomed*. 7(1), 6-12.
- [14] Bilia, A., Guccione, C., Isacchi, B., Righeschi, Ch., Firenzuoli, F., Bergonzi, M. (2014). Essential oils loaded in nanosystems: A developing strategy for successful therapeutic approach. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*. 1-12.
- [15] Amin, T., Bhat, S. V. (2012). A review on phytosome technology as a novel approach to improve the bioavailability of nutraceuticals. *International Journal of Advancements in Research and Technology*. 1(3), 43-57.
- [16] Gandhi, A., Dutta, A., Pal, A., Bakshi, P. (2012). Recent trends of phytosomes for delivering herbal extract with improved. *Bioavailability Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 1(4), 6-14.
- [17] Gibis, M., Ruedt, CH., Weiss, J. (2016). In Vitro release of grape-seed polyphenols encapsulated from uncoated and chitosan-coated liposomes. *Food Research International*. 88, 105-113.
- [18] Babazadeh, A., Ghanbarzadeh, B., Hamishehkar, H. (2017). Phosphatidylcholine-rutin complex as a potential nanocarrier for food applications. *Journal of Functional Foods*. 33, 134–141.
- [19] Rafiee, Z., Barzegar, M., Sahari, M, A., Maherani, B. (2017). Nanoliposomal carriers for improvement the bioavailability of high – valued phenolic compounds of pistachio green hull extract. *Food Chemistry*. 215, 157–164.

- release characterization. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 4 (04), 324-338.
- [32] Ramteke, K. H., Dighe, P. A., Kharat, A. R., Patil S.V. (2014). Mathematical models of drug dissolution: A Review. *Scholars Academic Journal of Pharmacy*. 3(5), 388-396.
- [33] Dash, S., Murity, P. N., Nath, L. Chowdhury., P. (2010). Kinetic modeling on druge release from controlled druge delivery systems. *Acta Poloniae Pharmaceutica ñ Drug Research*. 67(3), 217-223.
- effects of gammaoryzanol, polyethylene glycol and lauric acid on physicochemical properties. *Colloid and Interface Science Communications*. 26, 1-6.
- [30] Zou, L, Q., Peng, S, F., Liu, W. Gan, L., Liu, W., Liang, R, H., Lia, CH, M., Niu, J., Cao, Y, L., Liu, Zh., Chen, X. (2014). Improved in vitro digestion stability of (-)-epigallocatechin gallate through nanoliposome encapsulation. *Food Research International*. 64, 492-499.
- [31] Shaikh, H. K., Kshirsagar, V. R., PatiL S. G. (2015). Mathematical models for drug

Investigation of *in vitro* release and physicochemical properties of nanophytosome containing cumin essential oil

Khosh Manzar, M.¹, Pirouzifard, M. Kh.^{2*}, Hamishehkar,³

1. Ph.D. Student of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Urmia, Iran.
2. Associated Professor of the Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Urmia, Urmia, Iran.
3. Assistant Professor, Department of Pharmaceutical Sciences, Pharmaceutical Technology Laboratory, Drug Applied Research Center, Tabriz University of Medical Sciences

(Received: 2019/04/23 Accepted:2019/07/08)

The aim of the present research was to encapsulate cumin essential oil with phosphatidylcholine to overcome the fortification difficulties such as low water solubility and bioavailability and was protected umin essential oil from degradation in the presence of oxygen, light and temperatures. Cumin essential oil loaded nanophytosome (60 mg phosphatidylcholine- 30 mg cumin essential oil) was prepared by thin layer hydration method. Physicochemical properties of nanophytosome such as particle size, polydispersity index, encapsulation efficiency turbidity and zeta potential were investigated. Cumin essential oil nanophytosome showed excellent characteristics i.e. sub 100 nm particle sizes, low size distribution (PDI<0.3). and encapsulation efficiency 94/46 %. The turbidity of cumin essential oil loaded nanophytosome were remained unchanged and zeta potential changed from +9 mV in blank nanophytosome to -19 mV in cumin essential oil loaded nanophytosome. The release rate increased gradually by increasing time. About 60% of free cumin essential oil were released in phosphate buffer during 6 hours while 50 % of encapsulated cumin essential oil were released during 24 hours. *In vitro* release of essential oil was followed an exponential equation (first order $Q(t) = a \times (1 - \exp(-k \times t))$). This study indicates that the release of bioactive compounds from liposomes can be reduced by capsulated with phosphatidylcholine, allowing an application of with a nanophytosome controlled release of Cumin essential oil in water-based foods.

Keywords: Cumin essential oil, Nanoencapsulation, Phytosome, Release model.

* Corresponding Author E-Mail Address: k.pirouzifard@yahoo.com