



Semnan University

Journal of Applied Chemistry

Journal homepage: <https://chemistry.semnan.ac.ir/>

Research Article

Evaluation of Drug Delivery of Allicin Liposome Based on Phosphatidylethanolamine and Salep-Based Hydrogel

Romisa Mohammad Gholinezhad^a, Nooshin Gholipour-Zanjani^{b,*}, Arash Kamran-Pirzaman^a, Behzad Zahed^c

^aDepartment of Chemical Engineering, University of Science and Technology of Mazandaran, Behshahr, Iran

^bChemistry and Petrochemistry Research Center, Standard Research Institute, Iran

^cDepartment of Chemical Engineering, Islamic Azad University, Ayatollah Amoli Branch, Amol, Iran

PAPER INFO

Article history:

Received: 31/Jan/2016

Revised: 5/Apr/2016

Accepted: 20/Sep/2016

Keywords:

Allicin, Liposome,
Hydrogel, Salep,
Encapsulation, Released
Control

ABSTRACT

Click here and insert your abstract text. Click here and insert your abstract text. Click here In this study, liposome coatings based on phosphatidylethanolamine (by Bingham method) and hydrogel based on salep were produced and loaded with the aim of allicin shelf life study. The structure and morphology of Liposome and hydrogel were studied by FT-IR and SEM. Considering design variables of phosphatidylethanolamine to cholesterol ratio, organic phase solvent to aqueous solvent ratio and liposome formation time, a model was proposed to predict the allicin encapsulation efficiency in liposomes. The optimum condition was achieved by Response Surface Method and software of Design-Expert v.12 where the amount of phosphatidylethanolamine-to-cholesterol 8:1, organic phase to water phase ratio of 4.8:1 and formation time of 158 minutes lead to a yield of 98.99%. For salep-based hydrogel coatings, the maximum encapsulation value was 74.98% at 140 min formation time, while the amount of acrylic acid was 3 ml and the amount of N, N '-methylenebisacrylamide was 0.01 gr. The release behavior of allicin from the liposome coating and the hydrogel coating showed both of them are suitable for drug delivery in the media with pH of 7.4. Investigation of allicin release kinetics from liposomes and hydrogels based on first-order reaction models, Higuchi model and Hixson-crowell equation and Weibull model indicated that Weibull could make better fit the experimental data.

DOI: <https://doi.org/10.22075/CHEM.2022.26440.2056>

© 2023 Semnan University.

This is an open access article under the CC-BY-SA 4.0 license.(<https://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/>)

*.Corresponding author: Assistant Professor of chemical Engineering. E-mail address: n.gholipour@standard.ac.ir

How to cite this article: Mohammad Gholinezhad, R., Gholipour Zanjani, N., Kamran Pirzaman, A., & Zahed, B. (2023). Evaluation of drug delivery of allicin liposome based on phosphatidylethanolamine and salep-based hydrogel. Applied Chemistry, 18(67), 107-124. (in persian)

بررسی رفتار دارورسانی لیپوزوم آلیسین بر پایه فسفاتیدیل اتانول آمین و هیدروژل

بر پایه ثعلب

رومیسا محمدقلی نژاد^۱، نوشین قلی پور زنجانی^{۲*}، آرش کامران پیرزمان^۱، بهزاد زاهد^۳

^۱گروه مهندسی شیمی، دانشگاه علم و فناوری مازندران، بهشهر، ایران

^۲گروه پتروشیمی و پلیمر، پژوهشگاه استاندارد، البرز، ایران

^۳گروه مهندسی شیمی، دانشگاه آزاد اسلامی واحد آیت الله املی، امل، ایران

تاریخ دریافت: ۰۱/۰۱/۲۱ تاریخ تصحیح: ۰۱/۰۷/۳۰ تاریخ پذیرش: ۰۱/۰۸/۱۲

چکیده

در این تحقیق پوشش لیپوزوم بر پایه فسفاتیدیل اتانول آمین (با روش بنگهام) و هیدروژل بر پایه ثعلب، با هدف بررسی ماندگاری داروی آلیسین تولید و بارگذاری شدند. ساختار لیپوزوم و هیدروژل با FT-IR و SEM بررسی شدند. با در نظر گرفتن متغیرهای نسبت فسفاتیدیل اتانول آمین به کلسترول، نسبت حلال فاز آبی به حلال فاز آبی و زمان تشکیل لیپوزوم، یک مدل جهت پیش بینی بازده کپسوله سازی آلیسین در لیپوزوم ارائه شد. شرایط بهینه میزان فسفاتیدیل اتانول آمین به کلسترول ۸:۱، نسبت فاز آبی - فاز آبی ۱:۴ و زمان تشکیل ۱۵min با استفاده از روش سطح پاسخ و نرم افزار دیزاین اکسپرت ۱۲ پیش بینی شد که منجر به بازده ۹۸٫۹۹٪ می شود. برای پوشش هیدروژل با پایه ثعلب مقدار بیشینه کپسوله سازی ۷۴٫۹۸٪ در زمان تشکیل ۱۴min، میزان آکرلیک اسید ۳ml و میزان N'N - متیلن بیس آکریل آمید ۰٫۱g بدست آمد. روند رهایش آلیسین از پوشش لیپوزوم و هیدروژل نشان داد که هردو پوشش می توانند کاربری مناسبی برای انتقال دارو در شرایط محیطی با pH حدود ۷/۴ داشته باشند. بررسی سینتیک انتشار آلیسین از لیپوزوم و هیدروژل براساس مدل های واکنش درجه اول، مدل هیگوجی و معادله هیگسون-کراول و مدل ویبول نشان داد که رفتار رهایش آلیسین از این دو پوشش به مدل ویبول نزدیکتر است.

کلمات کلیدی: آلیسین، لیپوزوم، هیدروژل، ثعلب، کپسوله سازی، کنترل رهایش.

۱- مقدمه

آلیسین اصلی ترین عامل فعال بیولوژیکی سیر و از جمله ترکیبات ارگانوسولفور است که با خرد کردن سیر و واکنش آنزیمی بین اسید آمینه، آلیسین و آنزیم آلیناز موجود در آن تشکیل می شود [۱، ۲]. این ماده دارای اثرات بیولوژیکی است که به واکنش های تبادل تیول دی سولفید با آنزیم های دارای عامل سولفیدریل نسبت داده شده است [۳-۵]. در مورد پایداری آلیسین، به دلیل پایداری کم و زود تجزیه شدن آن، پیشنهاد می شود که این ماده با استفاده از یک پوشش، جهت کاربری درازمدت حفظ شود [۶]. به ویژه در مواردی که نیاز به آزادسازی این ماده در بخش خاصی از بدن مانند روده می باشد، افزایش زمان رهایش این ماده با روش هایی مانند کپسوله سازی می تواند از هدر رفت آن جلوگیری کند یا نرخ رهایش را کند نماید. از جمله روش های کپسوله سازی استفاده از پوشش لیپوزوم یا هیدروژل است [۷-۹].

لیپوزوم یک وزیکول دو لایه کروی تشکیل یافته از فسفولیپید است که از غشاهای دو لایه آمفیپاتیک فسفولیپید با بخش‌های آب‌دوست و آبگریز تشکیل شده است. بررسی لیپوزوم به عنوان یک نوع حامل کلونیدی، نشان داده که دارای مزایایی از جمله زیست‌سازگاری، حل کردن ترکیبات محلول ضعیف و قابلیت رهاسازی پایدار است و حتی برای کپسوله‌سازی مواد ضد عفونی‌کننده و ضد میکروب‌های غذایی نیز عملکرد مناسبی داشته است [۷، ۱۰، ۱۱]. در ارتباط با فرمولاسیون لیپوزوم با پایه لیپید برای کپسوله‌سازی آنتی‌میکروبیال‌های طبیعی، آنزیم‌ها و اسانس‌ها مطالعات زیادی انجام شده که بازده مناسب آن را نشان می‌دهد [۸]. متغیرهای اصلی موثر بر بازده بارگذاری دارو در لیپوزوم شامل، شرایط نگهداری دارو، نیمه عمر رهایش دارو و نرخ دارو به لیپید است [۷].

از سوی دیگر هیدروژل‌ها نیز در انتقال دارو برای مواردی مانند درمان سرطان، عفونت و التیام زخم یا برای علف‌کش‌ها استفاده شده‌اند [۹، ۱۲، ۱۳]. آن‌ها به دلیل خاصیت ترشوندگی خوب و رفتار الاستیکی بالا و زیست‌سازگاری نسبت به سایر پلیمرها شباهت بیشتری با بافت‌های طبیعی بدن دارند [۱۴]. این مواد معمولاً دارای پایه ژلاتین، آلژینات، زانتان، کیتوزان و... هستند. لیکن اخیراً در ارتباط با استفاده از ثعلب در تولید هیدروژل نیز تحقیقاتی انجام شده که نتایج خوبی در انتقال دارو نشان داده است [۱۵، ۱۶]. ثعلب یک کامپوزیت پلی ساکاریدی است و منبع خوبی برای گلوکومانان می باشد.

در این پژوهش، ساخت پوشش لیپوزوم بر پایه فسفاتیدیل اتانول آمین و هیدروژل بر پایه ثعلب به عنوان حامل داروی آلیسین، به منظور بررسی روند کنترل رهایش و ناپایداری آن انجام شد. به منظور پیدا کردن شرایط بهینه تولید این پوشش‌ها طراحی آزمایش با روش سطح پاسخ (RSM) [□] با استفاده از نرم‌افزار دیزاین اکسپرت ۱۲ انجام شد و ضمن تعیین میزان رهایش آلیسین از این پوشش‌ها، سینتیک فرایند نیز بررسی گردید.

۲- بخش تجربی

۲-۱- مواد و دستگاه‌ها

مواد مورد استفاده برای تولید پوشش‌های لیپیدی و هیدروژلی شامل فسفاتیدیل اتانول آمین، کلسترول، آمونیوم پرسولفات ۹۸٪، متیلن بیس آکریل آمید، آکرلیک اسید ۹۹/۸٪ و حلال‌های کلروفرم ۹۹٪ و اتانول ۹۸٪ بوده و همچنین کیسه دیالیز (تولید شرکت سیگما) و بافر فسفات (تولید شرکت مرک) استفاده شدند. سیر و ثعلب نیز از استان گلستان تهیه شدند.

برای تهیه آلیسین، سیر در دمای ۷۰C در آون خشک شده و آسیاب شد، سپس ۱۰ mg از آن در ۷۵ ml محلول اتانول و آب مقطر (با نسبت ۷ حجم به ۳ حجم) به مدت ۲۴ ساعت در دمای محیط همزده شد. آلیسین علیرغم ناپایداری که دارد در آب به میزان جزئی حل می‌شود ولی در اتانل به راحتی حل می‌شود و تحقیقات نشان می‌دهد که استخراج آن با محلول حاوی حدود

^a Response Surface Method

۶۰٪ تا ۸۰٪ اتانول بازده خوبی دارد [۱۷]. مخلوط تهیه شده به مدت یک هفته نگهداری شد و بعد از ته نشینی مواد، فاز مایع شفاف حاوی آلئوسین جداسازی شده و برای پوشش گذاری استفاده شد.

شناسایی ساختار و مورفولوژی لیپوزوم و هیدروژل با استفاده از طیف‌سنجی مادون قرمز تبدیل فوریه FT-IR و میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) انجام شد. طیف FT-IR روی صفحات KCL در محدوده ۴۰۰ تا ۴۰۰۰ بررسی شد. دیگر تجهیزات آزمایشگاهی مورد استفاده شامل همزن مغناطیسی مدل FALC-F60، پمپ خلاء روغنی مدل PCV-6، طیف‌سنج ماوراءبنفش مدل 1800-DP200A، pH متر مدل ISTEK، شیکر مدل LS-100، حمام التراسونیک مدل Elma S10 و انکوباتور شیکردار مدل LSI-3016R می‌باشد. با انجام آزمون‌های نفوذپذیری و کنترل نرخ رهایش (طبق زیربند ۲-۶)، میزان پایداری لیپوزوم‌های حامل ارزیابی شد.

۲-۲- آماده سازی پوشش لیپوزوم بر پایه فسفاتیدیل اتانول آمین

طبق طراحی آزمایش انجام شده در جدول ۱ بند ۲-۷، ابتدا فسفاتیدیل اتانول آمین (PEA) و کلسترول توزین شده و با مخلوط حلال‌های کلروفرم-اتانول با همزن مغناطیسی در دمای محیط با نرخ ۸۰ rpm طبق زمان طراحی شده همزده شد. به عنوان مثال در سطح یک جدول مذکور به ازای ۰/۰۲۵ گرم PEA، ۰/۰۰۵ گرم کلسترول ریخته شد. سپس جهت تبخیر حلال‌های آلی، نمونه در شرایط خلاء در دمای ۵۰ °C قرار گرفت. در ادامه فیلم نازکی از مواد روی دیواره بالن مشاهده شد که فاز لیپید است و بر این اساس پوشش مورد نیاز قابل تهیه است [۱۸].

۲-۳- آماده سازی پوشش هیدروژل بر پایه ثعلب

برای تهیه هیدروژل پلی‌آکریلیک‌اسید گرفت شده بر روی ثعلب، ابتدا 1g ثعلب با ۴۰ cc آب مخلوط شده و آکریلیک اسید (AA) به آن اضافه شد. سپس مخلوط آمونیوم پرسولفات (به عنوان آغازگر) و N،N' - متیلن‌بیس‌آکریل‌آمید (MBA) (به عنوان شبکه‌ای کننده) با آب به آن اضافه شد. پس از ۱ ساعت همزدن و انجام پلیمریزاسیون یا تشکیل ژل، به آن استن اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در ظرف باقی ماند و رسوب ایجاد شده درون آن خشک و آسیاب شد [۱۹].

۲-۴- بارگذاری آلئوسین در پوشش لیپوزوم و هیدروژل

برای بارگذاری دارو درون پوشش لیپوزوم، ابتدا ۱۰ mg آلئوسین در ۱۰۰ cc بافر فسفات با pH=۷٫۴ حل شده و به مدت ۱ ساعت با همزن مغناطیسی در دمای محیط همزده شد تا فاز آبی آماده شود. غلظت‌های مختلف این محلول طبق توضیحات بند ۲-۵ تهیه شد. سپس طبق جدول ۱ بند ۲-۷ فاز آبی به بالن حاوی نمونه‌ی لیپید (فاز آلی) اضافه شده و با استفاده از همزن مغناطیسی در دمای محیط همگن شد تا سوسپانسیون یکنواختی ساخته شود. در ادامه نمونه در دمای ۴ °C نگهداری شد و در بازه‌های زمانی مختلف آزمون‌های مربوطه روی آن انجام گرفت [۲۰].

همچنین برای بارگذاری دارو در پوشش هیدروژل، ابتدا غلظت‌های مختلفی از آلیسین ساخته شد و به هر کدام مقدار یکسانی جاذب اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق با دور معین همزده شد. سپس نمونه‌ها کنار گذاشته شد تا ته‌نشین شوند و با استفاده از طیف‌سنج ماوراءبنفش میزان جذب محلول رویی اندازه‌گیری شد تا میزان بهترین جذب دارو مشخص شود [۱۹].

۲-۵- محاسبه میزان کپسوله سازی آلیسین با پوشش لیپوزوم و هیدروژل

ابتدا ۱۰ mg از آلیسین درون بافر فسفات با $\text{pH} = 7.4$ حل شده و به حجم ۱۰۰ رسانده شد. سپس حجم‌های ۱، ۲، ۴، ۵، ۷، ۸، ۱۰ و ۱۱ ml از این محلول در بالن‌های حجمی جداگانه‌ای به حجم ۵۰ cc رسانده شد. به این ترتیب غلظت‌های ۲، ۴، ۵، ۸، ۱۱، ۱۴، ۱۷ و ۲۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر از این محلول به دست آمد. با توجه به اینکه طول موج جذب بیشینه برای آلیسین ۲۸۵ نانومتر است، جذب نمونه‌ها در این طول موج با طیف سنج ماوراءبنفش تعیین شد. به این ترتیب با دانستن غلظت تمامی نمونه‌ها و جذب خوانده شده معادله (۱) برای منحنی جذب بر حسب غلظت بدست آمد:

$$A = 0.0016C - 0.0018 \quad (R^2 = 0.9872) \quad (1)$$

که در آن، A میزان جذب و C میزان غلظت بر حسب $\mu\text{g/ml}$ می باشند. به این ترتیب بعد از تعیین میزان جذب با طیف‌سنج ماوراءبنفش، برای هر نمونه‌ای که ساخته می‌شود می‌توان میزان غلظت آلیسین را با معادله (۱) تعیین کرد.

ضمناً میزان درصد کپسوله‌سازی (EE) برای نمونه‌های ساخته شده با معادله زیر تعیین شد [۱۸]:

$$EE\% = \frac{C_1 - C_2}{C_1} \times 100 \quad (2)$$

که در آن C_1 غلظت کل (اولیه) آلیسین و C_2 غلظت آلیسین رها شده از سوسپانسیون لیپوزومی است.

۲-۶- تعیین نفوذپذیری آلیسین و نرخ رهائش از پوشش لیپوزوم و هیدروژل

نفوذپذیری یک شاخص موثر برای ارزیابی پایداری و ثبات پوشش‌های دارو بعد از آماده سازی و نگهداری در دمای 4°C است و آزمون نفوذپذیری باید در بازه‌های زمانی منظم انجام گیرد. در طول دوره‌ی ذخیره‌سازی، مقدار رهائش آلیسین از لیپوزوم و هیدروژل اگر کم باشد، آن پوشش پایدار است [۱۸]. محاسبه میزان نفوذپذیری طبق معادله زیر انجام شد [۱۸، ۲۱]:

$$P\% = \frac{EE_1 - EE_2}{EE_1} \times 100 \quad (3)$$

که در آن P شاخص نفوذپذیری، EE_1 و EE_2 به ترتیب، میزان کپسوله‌سازی قبل و بعد از زمان ذخیره سازی است.

برای بررسی نرخ رهائش از کیسه دیالیز استفاده شد و در ابتدا پوشش‌های حامل دارو برای همگن سازی بیشتر به مدت ۵ min در حمام التراسونیک 30°C همزده شد. یک طرف کیسه دیالیز با نخ محکم بسته شد تا مایع به بیرون نشت نکند، سپس ۵ ml از سوسپانسیون لیپوزوم یا هیدروژل درون کیسه دیالیزهای جداگانه ریخته و ورودی کیسه محکم بسته شد. محلول بافر فسفات در چند ارلن ریخته شد و کیسه‌های دیالیز به حالت غوطه‌ور درون آن‌ها روی انکوباتور شیکردار در دمای 37°C و

دور متوسط ۸۰ min قرار داده شدند. جهت تعیین غلظت آلیسین رهاشده از سوسپانسیون، در بازه‌های زمانی مشخص مقدار ml ۵ از نمونه بافر درون ارلن برداشته شد و بلافاصله جهت ایجاد تعادل به همان مقدار بافر تازه درون ارلن ریخته شد. بعد از تعیین میزان جذب نمونه‌ها با دستگاه طیف‌سنج و با جایگذاری در معادله (۱)، غلظت آلیسین رهاشده از سوسپانسیون تعیین شد.

میزان رهاسازی تجمعی نیز با استفاده از رابطه ی زیر معین شد [۱۸]:

$$Q = \frac{M_t}{M} \quad (۴)$$

که در آن Q نرخ رهایش تجمعی، M_t مقدار آلیسین رهاشده در یک زمان معین و M مقدار اولیه ی آلیسین در داخل پوشش لیپوزوم یا هیدروژل می‌باشند.

۲-۷- طراحی آزمایش و معرفی متغیرها

با هدف بهینه‌سازی نتایج، طراحی آزمایش با استفاده از روش سطح پاسخ (RSM) با مدل طراحی آزمایش مرکب مرکزی (CCD) در نرم‌افزار دیزاین اکسپرت ۱۲ انجام شد. در این طراحی، میزان دارو ثابت در نظر گرفته شد و اثر مواد غشاء لیپوزوم شامل نسبت فسفاتیدیل اتانول آمین به کلسترول (A)، نسبت فاز آلی به فاز آبی (B) و زمان تشکیل لیپوزوم (C) بر کپسوله‌سازی EE یا به عبارتی میزان بازده نشت آلیسین از لیپوزوم طبق روش مرکب مرکزی در پنج سطح برای ۳ متغیر تعریف شد (جدول ۱).

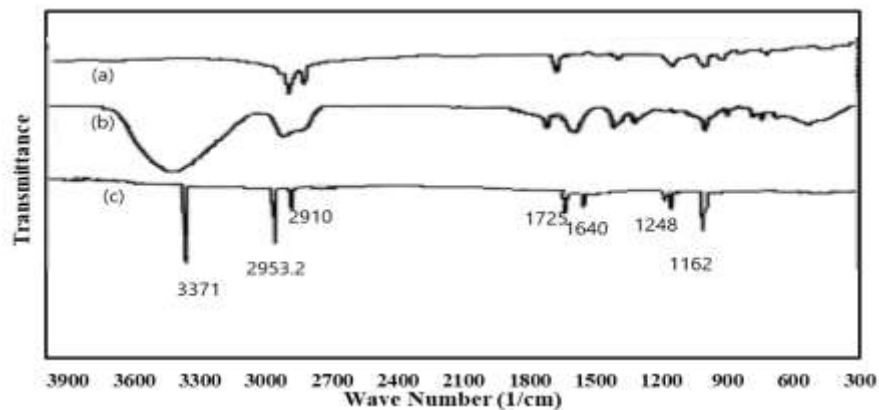
جدول ۱- پارامترها و سطوح در نظر گرفته شده برای بررسی میزان EE لیپوزوم‌ها

سطح	A	B	C
۱	۵:۱	۲:۱	۹۰
۲	۶:۱	۳:۱	۱۱۵
۳	۷:۱	۴:۱	۱۴۰
۴	۸:۱	۵:۱	۱۶۵
۵	۹:۱	۶:۱	۱۹۰

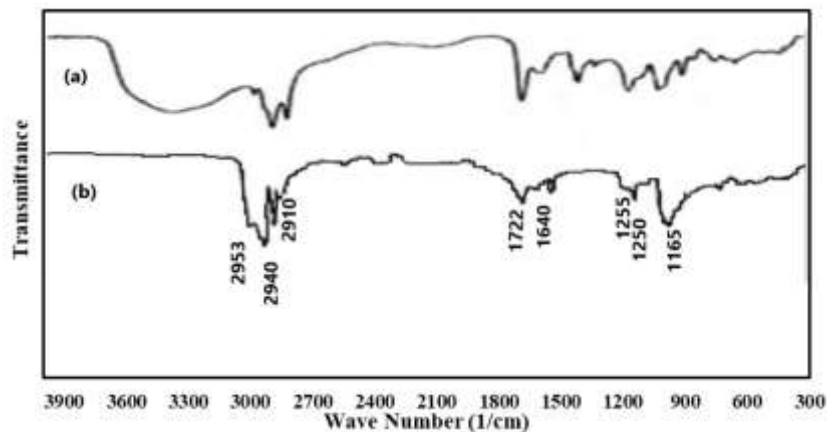
به طور مشابه طراحی آزمایش برای تهیه هیدروژل با در نظر گرفتن متغیرهای میزان آکرلیک اسید (AA) برحسب ml، میزان N، N' - متیلن بیس آکریل آمید (MBA) برحسب g در سه سطح برای بررسی عملکرد هیدروژل در کپسوله‌سازی آلیسین طبق جدول ۲ انجام شد.

جدول ۲- سطوح متغیرهای مورد استفاده در بررسی اثر پارامترهای تشکیل هیدروژل بر میزان کپسوله سازی

سطح	AA	MBA
-۱	۱	۰٫۰۱
۰	۲	۰٫۰۲
+۱	۳	۰٫۰۳



شکل ۲: طیف FT-IR مربوط به (a) فسفاتیدیل اتانول آمین، (b) کلسترول و (c) لیپوزوم بر پایه PEA حامل دارو



شکل ۳: طیف FT-IR هیدروژل بر پایه ثعلب قبل (a) و بعد از بارگذاری دارو (b)

در طیف‌های مربوط به هیدروژل (شکل ۳) پیک 3386 cm^{-1} نمایشگر ارتعاش کششی گروه OH در ساختار گروه کربوکسیلیک-اسید می‌باشد و پیک 1644 cm^{-1} می‌تواند مربوط به گروه کربونیل C=O در گلوکومانان باشد. لذا با توجه به این که گروه کربونیل C=O طبق شکل ۳-b، در طول موج حدود 1640 cm^{-1} مشاهده می‌شود، علاوه بر جابجایی پیک در هیدروژل نسبت به گلوکومانان که ناشی از واکنش گرافت شدن گلوکومانان موجود در ثعلب با آکرلیک اسید است، در زمان بارگذاری دارو نیز کمی جابجایی پیک‌ها محتمل است [۲۳].

۳-۲- اثر پارامترهای مختلف بر بازدهی لیپوزوم‌های آلیسین

در این پژوهش از روش RSM و مدل طراحی آزمایش مرکب مرکزی (CCD)، استفاده شده است. همانطور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود از ۲۰ آزمایش انجام شده تعداد ۶ آزمون روی یک نقطه مرکزی ($A=7, B=4, C=140$) بوده که منجر به کاهش خطای استاندارد و ایجاد تعادل در میزان واریانس در ناحیه اطراف مرکز فضای طراحی می‌شود [۲۴]. در این پژوهش یک مدل جهت پیش‌بینی میزان کپسوله‌سازی آلیسین (EE) با توجه به پارامترهای نسبت آلیسین به کلسترول، نسبت فاز آلی به فاز آبی

و زمان تشکیل لیپوزوم ارائه شد (معادله (۵)). تجزیه و تحلیل واریانس (ANOVA) برای آزمون اهمیت و کفایت مدل انجام شد. طبق جدول ۴، میزان F-value مدل (۶/۲۳) نشان می‌دهد که مدل اثربخش^b است. با توجه به میزان p تنها ۰/۳٪ احتمال دارد که میزان F مربوط به نویز باشد و مدل ارائه شده برای تعیین میزان کپسوله‌سازی (EE) براساس تغییر میزان پارامترهای PEA به کلسترول (A)، نسبت فاز آلی به فاز آبی (B) و زمان تشکیل لیپوزوم (C) مناسب می‌باشد. میزان p برای lack of fit مدل بیش از ۰/۱ است و نشان می‌دهد که فیت‌شدن پارامترها در مدل انجام شده است. مقادیر P برای پارامترهای A، BC، AC، A² و C² کمتر از ۰/۰۵ است که به این معنی است که تغییر میزان آن‌ها تاثیر قابل‌ملاحظه‌ای بر راندمان دارد. از طرفی میزان Adeq. Precision مدل (به عبارتی نسبت سیگنال به نویز) ۹/۰۲۵ است که بیش از ۴ بوده و نشان‌دهنده طراحی مناسب است.

جدول ۳- ماتریس طراحی آزمایش مرکب مرکزی برای متغیرهای مستقل و مقادیر پاسخ (بازدهی لیپوزوم) با انجام آزمون

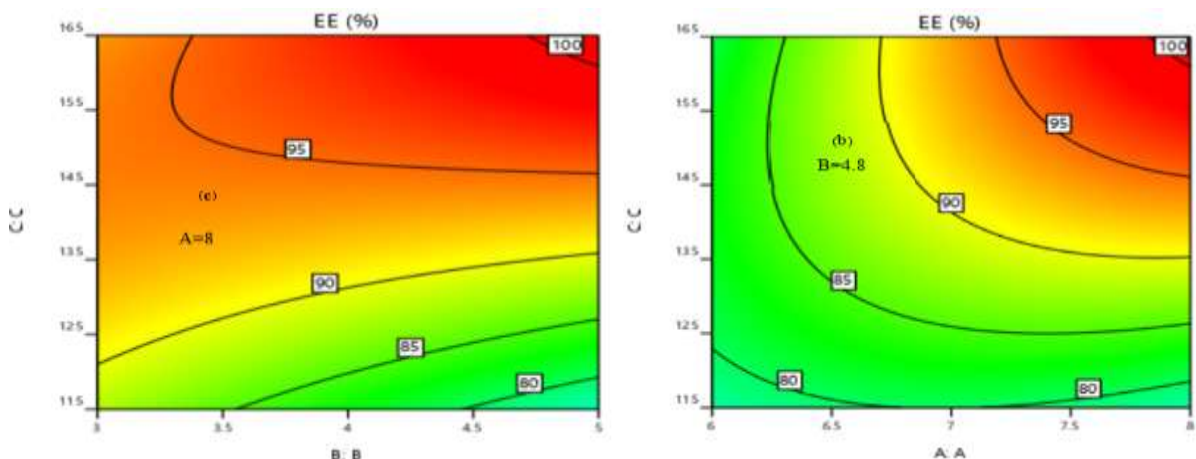
میزان تجربی EE (%)	C (زمان تشکیل لیپوزوم) min	B (نسبت فاز آلی به فاز آبی)	A نسبت آلیسین به کلسترول	Run No.
۹۸,۱۵	۱۴۰	۲	۷	۱
۸۳,۳۳	۱۱۵	۳	۸	۲
۸۹,۷۴	۱۴۰	۴	۷	۳
۸۷,۴۱	۱۹۰	۴	۷	۴
۶۸,۸۰	۱۶۵	۳	۶	۵
۹۵,۰۰	۱۶۵	۵	۸	۶
۶۷,۳۴	۱۴۰	۴	۵	۷
۹۲,۷۰	۱۴۰	۴	۷	۸
۹۳,۵۰	۱۴۰	۴	۷	۹
۷۸,۳۵	۱۱۵	۵	۶	۱۰
۹۴,۰۲	۱۶۵	۳	۸	۱۱
۸۰,۹۰	۱۱۵	۵	۸	۱۲
۹۴,۵۴	۱۴۰	۴	۹	۱۳
۸۶,۰۶	۱۴۰	۴	۷	۱۴
۸۶,۷۴	۱۴۰	۴	۷	۱۵
۶۸,۷۲	۹۰	۴	۷	۱۶
۹۳,۹۲	۱۱۵	۳	۶	۱۷
۸۶,۸۹	۱۶۵	۵	۶	۱۸
۹۰,۴۴	۱۴۰	۶	۷	۱۹
۸۶,۱۳	۱۴۰	۴	۷	۲۰

^b - Significant

جدول ۴- استفاده از ANOVA در پیش‌بینی مدل میزان کپسوله سازی (EE)

	p-value	F-value	Mean Square	df	Sum of Squares	Source
significant	۰٫۰۰۳	۶٫۲۳	۱۷۹٫۴۷	۷	۱۲۵۶٫۳۰	Model
significant	۰٫۰۰۳	۱۳٫۷۸	۳۹۶٫۹۱	۱	۳۹۶٫۹۱	A
	۰٫۵۱۶	۰٫۴۴۷	۱۲٫۸۷	۱	۱۲٫۸۷	B
	۰٫۰۵۵	۴٫۵۱	۱۲۹٫۹۰	۱	۱۲۹٫۹۰	C
significant	۰٫۰۱۸	۷٫۴۳	۲۱۳٫۹۳	۱	۲۱۳٫۹۳	AC
significant	۰٫۰۳۱	۵٫۹۷	۱۷۱٫۷۷	۱	۱۷۱٫۷۷	BC
significant	۰٫۰۴۶	۴٫۹۴	۱۴۲٫۳۷	۱	۱۴۲٫۳۷	A ²
significant	۰٫۰۱۳	۸٫۴۸	۲۴۴٫۰۳	۱	۲۴۴٫۰۳	C ²
			۲۸٫۷۹	۱۲	۳۴۵٫۵۲	Residual
not significant	۰٫۱۱۰	۳٫۱۸	۴۰٫۳۱	۷	۲۸۲٫۱۷	Lack of Fit
			۱۲٫۶۷	۵	۶۳٫۳۵	Pure Error
				۱۹	۱۶۰٫۱۸۲	Cor Total

$$EE = +140.334 + 8.562 * A - 26.846 * B - 0.712 * C + 0.207 * A * C + 0.185 * B * C - 2.324 * A^2 - 0.005 * C^2 \quad (e)$$

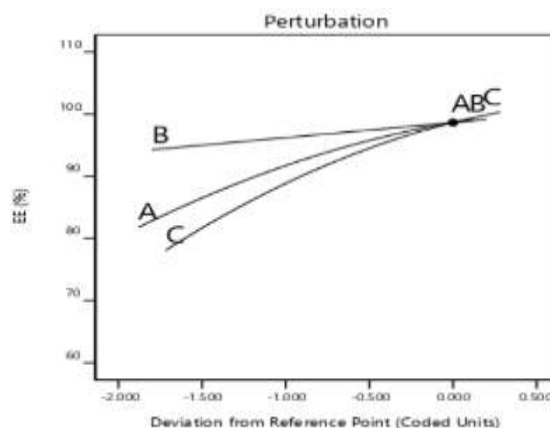


شکل ۴: طرح کانتور اثرات همبستگی PEA-کلسترول و زمان تشکیل (b) و نسبت فاز آلی به فاز آبی و زمان تشکیل (c) در بازه کپسوله سازی لیپوزوم شکل ۴، طرح کانتور اثرات متقابل متغیرها بر روی بازه کپسوله سازی لیپوزوم را در (شکل a) نشان می‌دهد. اثرات همبستگی نسبت PEA به کلسترول و زمان تشکیل (min) بر کارایی جذب لیپوزوم‌های آلیسین در شکل b-۴ نشان می‌دهد که در مقادیر PEA به کلسترول بیش از ۷/۲ و زمان بیش از ۱۴۵min و نسبت فاز آلی-فاز آبی مساوی ۴/۸ میزان EE بیش از ۹۵٪ می‌باشد. افزایش EE به این معنی است که آلیسین بیشتر داخل کیسه دیالیز می‌ماند و بنابراین از نظر کاربری لیپوزوم تولید شده در انتقال داروی آلیسین بهتر عمل می‌کند. در نمودار کانتراست ۴-c، اثرات همبستگی فاز آلی-فاز آبی و زمان تشکیل لیپوزوم بر

کپسوله‌سازی نشان می‌دهد که برای رسیدن به میزان EE بیش از ۹۵٪ در مقادیر فاز آلی به فاز آبی بیش از ۳/۲ و مقادیر PEA به کلاسترول مساوی ۸، نیاز به زمان بیش از ۱۴۵min می‌باشد.

شرایط بهینه تولید لیپوزوم و بارگذاری داروی آلیسین با استفاده از RSM در شرایط میزان PEA به کلاسترول ۱:۸، نسبت فاز آلی به فاز آبی ۱:۴/۸ و ۱۵۸ min تعیین شد که منجر به پاسخ پیش‌بینی شده (EE) ۹۸/۹۹٪ می‌شود. همانطور که مشاهده می‌شود بیشینه میزان کپسوله‌سازی زمانی بدست آمده است که نرخ PEA به کلاسترول ۸:۱ بوده است. در مورد نقش کلاسترول می‌توان گفت که این ماده می‌تواند در یک ساختار دولایه‌ای گنجانده شود به نحوی که گروه هیدروکسیل آن به سمت بیرون باشد. این گروه هیدروکسیل در کلاسترول و گروه کربونیل در مولکول‌های PEA می‌تواند منجر به باندهای هیدروژنی شده و با کاهش حرکت آزادانه زنجیره‌ها منجر به کاهش سیالیت و نفوذپذیری غشای لیپید شده و به عبارتی ساختار غشای لیپوزوم را پایدار کند [۱۸]. نکته مهم این است که کپسوله کردن لیپوزومال دارو می‌تواند میزان سمیت آن را در زمان نگهداری کاهش دهد و بازده آن را افزایش دهد.

همانطور که نتایج نشان می‌دهد زمانی که نسبت فاز آلی به فاز آبی کم است میزان کپسوله‌سازی بازده کمتری دارد که این در تطابق با نتایج تحقیقات دیگر در مورد نانو لیپوزوم‌های آلیسین است و می‌تواند این دلیل باشد که در مقادیر کم لیپیدها نمی‌توانند به طور موثری در فاز آلی حل شوند و بنابراین امولسیون اولیه آب در روغن را تشکیل نمی‌دهند [۱۸].



شکل ۵: نمودار اثر پارامترها بر کپسوله‌سازی آلیسین

طبق شکل ۵ و نتایج بدست آمده بازدهی کپسوله سازی در نرخ حلال فاز آلی به فاز آبی ۱:۴/۸ به اوج خود رسیده و سپس کمی کاهش پیدا می‌کند. اینگونه می‌توان دریافت که در نرخ‌های پایین‌تر مواد لیپیدی کاملاً در حلال‌های آلی حل نمی‌شوند و در نتیجه نمی‌توانند با آلیسین کاملاً مخلوط شده و امولسیون اولیه آب در روغن را تشکیل دهند و در نرخ‌های بالاتر نیز مخلوط نمی‌تواند به حالت معکوس درآید و امولسیون دوم را که امولسیون روغن در آب است، تشکیل دهد. در فرآیند آماده سازی، سیستم دوفازی آلی-آبی به سیستم تک فاز و یکنواختی تبدیل می‌شود، بنابراین زمان ادغام این دو فاز، نقش مهمی را در تشکیل لیپوزوم ایفا می‌کند. انجام فرایند به ازاء نرخ PEA به کلاسترول ۷:۱، نرخ حلال فاز آلی به فاز آبی ۴:۱ و زمان تشکیل ۱۴۰min، نشان

می‌دهد که متوسط کپسوله‌سازی ۸۸/۹۷٪ با این شرایط قابل دستیابی است. این نتیجه می‌تواند تاثیر کارآمدی فسفاتیدیل- اتانول‌آمین در پوشش‌دهی آلایسین را مشابه تحقیقات دیگر تایید کند [۲۵، ۱۱].

۳-۳- اثر پارامترهای مختلف بر بازدهی هیدروژل

از آنجا که هیدروژل‌ها آبدوست هستند و قابلیت جذب حجم زیادی آب دارند، انتظار می‌رود که سازوکار رهایش دارو از درون این حامل‌ها کاملاً با رهایش دارو از پلیمرهای آگریز متفاوت باشد. طراحی آزمایش با در نظر گرفتن پارامترهای میزان آکرلیک اسید (AA) برحسب ml، میزان N,N - متیلن‌بیس‌آکریل‌آمید (MBA) برحسب g در سه سطح برای بررسی عملکرد هیدروژل در میزان کپسوله‌سازی دارو با در نظر گرفتن زمان ۱۴۰ min طبق جدول ۲ و ۵ انجام شد و همانطور که نتایج نشان می‌دهد بیشترین میزان کپسوله‌سازی با هیدروژل (۷۴/۹۸٪) در زمان ۱۴۰ min، میزان g=MBA ۰/۱ و AA=۳ml بدست آمد. نصرالهی و همکارانش در سال ۲۰۱۰ به طور مشابه این پژوهش اقدام به تولید هیدروژل کردند و نشان دادند که دو عامل میزان AA و MBA روی میزان تورم و جذب آب موثر هستند و افزایش MBA که نقش شبکه‌ای کننده دارد و افزایش میزان AA می‌تواند به دلیل افزایش در ویسکوزیته محیط منجر به محدودیت در حرکت رادیکال‌های آزاد و مولکول‌های مونومر شده و میزان تورم هیدروژل و جذب آب را کاهش دهند [۲۶].

جدول ۵- طراحی آزمایش و تعیین بازده میزان کپسوله سازی آلایسین با هیدروژل بر پایه ثعلب

Run No.	MBA(g)	AA(ml)	EE(%)
۱	۰/۰۲	۲	۲۷/۲۷
۲	۰/۰۳	۲	۶۵/۲۳
۳	۰/۰۱	۳	۷۴/۹۸
۴	۰/۰۲	۱	۴۹/۸۸
۵	۰/۰۱	۱	۵۵/۶۵
۶	۰/۰۲	۳	۲۹/۷۴
۷	۰/۰۳	۳	۴۹/۳۶
۸	۰/۰۱	۲	۶۰/۱۷
۹	۰/۰۳	۱	۵۳/۴۲

۳-۴- تعیین نفوذپذیری

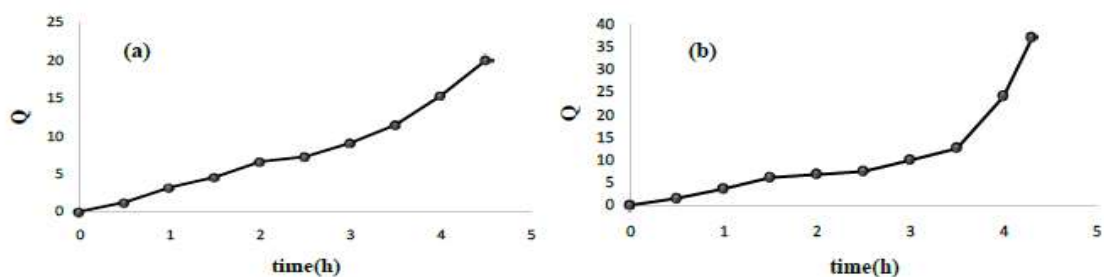
لیپوزوم آلایسین بر پایه‌ی PEA و هیدروژل بر پایه ثعلب در فواصل زمانی ۱ تا ۳ ساعت و در دمای ۴ °C نگهداری شدند. طی این ۳ ساعت تغییر مشهودی در یکنواختی لیپوزوم PEA دیده نشد ولی در پوشش هیدروژل هاله‌هایی متراکم مشاهده شد. به ازاء لیپوزوم بر پایه PEA، میزان نفوذپذیری و به عبارتی ناپایداری لیپوزوم‌ها بعد از ۱ ساعت ۲/۲۶٪، بعد از ۲ ساعت ۱۷/۴۱٪ و بعد از ۳ ساعت ۱۹/۷۵٪ بدست آمد. همچنین به ازاء هیدروژل بر پایه ثعلب، بعد از ۱ ساعت ناپایداری ۳/۱۸٪، بعد از ۲ ساعت

۶/۶۹٪ و بعد از ۳ ساعت ۱۶/۳۸٪ بدست آمد. این روند تخریب تدریجی نشانگر پایداری مناسب آلیسین در پوشش‌ها است. ضمناً وجود باندهای هیدروژنه در ساختار غشای لیپوزومی یا غشای هیدروژل می‌تواند دلیل اصلی این پایداری باشد [۱۴، ۱۸].

۳-۵- رهایش آلیسین

میزان آزادسازی تجمعی آلیسین از لیپوزوم بر پایه PEA و هیدروژل بر پایه ثعلب همانطور که در بند ۲-۶ توضیح داده شد در دمای ۳۷ °C بررسی شد (شکل ۵). با توجه به شکل ۵-a، در ۲ ساعت اول سرعت آزاد شدن آلیسین از هیدروژل بر پایه ثعلب زیاد است، زیرا آلیسین آزاد خارج از هیدروژل از کیسه دیالیز نفوذ می‌کند. از ۲h تا ۴h و ۳۰min، آلیسین موجود در هیدروژل به تدریج آزاد می‌شود و سرعت آزادسازی کمتر است. همانطور که در شکل ۵-b مشخص است، آزادسازی لیپوزوم‌های آلیسین بر پایه PEA از غشای لیپوزوم به تدریج صورت گرفته است و از ۳h تا ۴h و ۲۵min، میزان سرعت انتشار بیشتر شده است. ضمناً مطابق شکل ۵، رهایش آلیسین بعد از ۴،۳۰ ساعت از پوشش لیپوزوم حدود ۳۶/۶۶٪ و از پوشش هیدروژل بر پایه ثعلب ۲۰/۰۱٪ بوده است و در شرایط آزمون تعریف شده، هیدروژل نسبت به لیپوزوم کمی پایدارتر به نظر می‌رسد. به طور کلی اگر زمان نیمه عمر آلیسین در محیط با $pH=7/4$ حدود ۱/۵h تا ۳h باشد، پس از این زمان، آزادسازی دارو از این پوشش‌ها سریعتر اتفاق می‌افتد که بسته به وضعیت کاربری دارو می‌تواند هرکدام از پوشش‌های لیپوزوم و هیدروژل استفاده شود. به طور کلی در ارتباط با رهایش دارو از هیدروژل، مکانیسم نفوذ پیشنهاد می‌شود، به این ترتیب که نفوذ آب به داخل هیدروژل باعث تورم آن شده و داروی موجود در این بخش متورم در آب حل می‌شود و وارد محیط آبی موجود می‌شود [۱۳، ۱۵].

سلیمان و همکارانش در سال ۲۰۱۵ اقدام به تولید هیدروژل با استفاده از ثعلب، ژلاتین و آکریل آمید در حضور MBA کردند و نتایج بررسی آن‌ها در محیط با pH بیشتر از ۷ نشان داد که پایداری یونی نسبت به محیط‌های اسیدی افزایش می‌یابد و میزان تورم هیدروژل کمتر است [۱۶]. از سوی دیگر نتایج بدست آمده در پژوهش جاری نشان داد که مقدار رهایش آلیسین از هیدروژل ثعلب در $pH=7/4$ بعد از ۴،۳۰ ساعت حدود ۲۰/۰۱٪ بوده که می‌توان آن را به پایداری یونی بالای آن نسبت داد [۱۶].



شکل ۵: پروفایل رهایش آزمایشگاهی آلیسین از هیدروژل بر پایه ثعلب (a) و فسفاتیدیل اتانول آمین (b)

۳-۶- بررسی سینتیک رهایش آلیسین

رفتار انتشار آلیسین از نانولیپوزوم بر پایه PEA و هیدروژل بر پایه ثعلب با معادلات سینتیکی از جمله معادله مرتبه اول، معادله

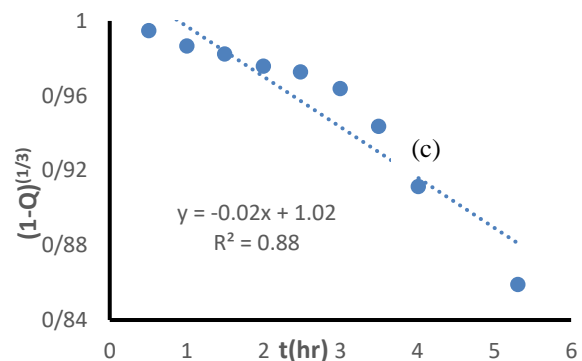
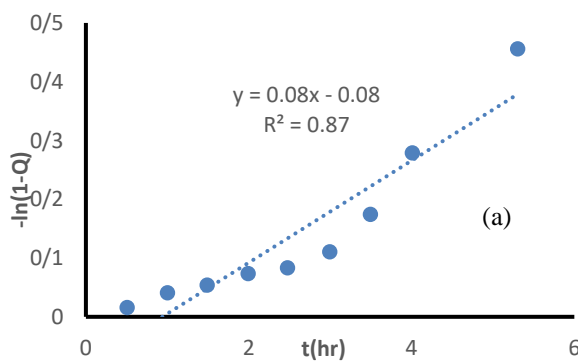
هیگوجی، معادله ریشه مکعب هیکسون کراول و معادله ویبول مطابق شکل‌های ۶ و ۷ بررسی شد. معادلات استفاده شده برای ارزیابی سینتیک در جدول ۶ ارائه شده‌اند. معادله هیگوجی معمولاً برای ذرات دارویی که نفوذ متوسط دارند و شرایط رهایش دارو از محلول کاملاً اشباع ارائه می‌شود و رهایش دارو را براساس فرآیند نفوذ در قانون فیک برحسب جذری از زمان رهایش بیان می‌کند [۲۷، ۲۸].

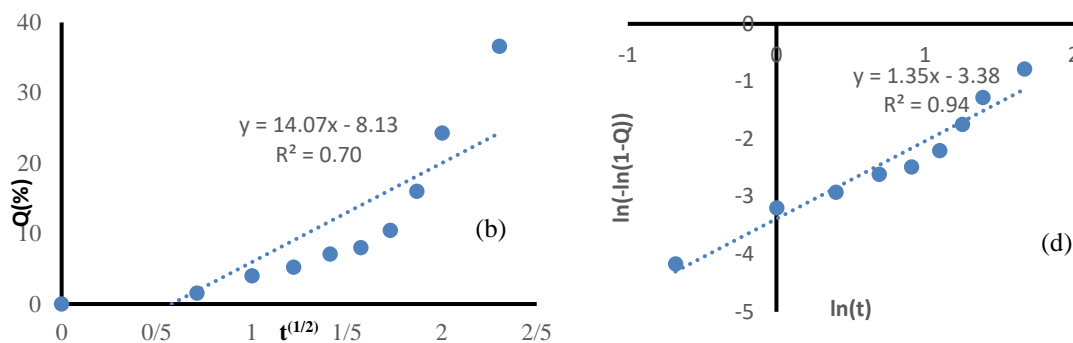
معادله ریشه مکعب هیکسون کراول برای توصیف سیستم‌های رهایشی که با تغییر مساحت سطح و قطر ذرات همراه هستند و تعیین نرخ رهایش برای داروهای پودری با اندازه ذره‌ای مشخص، استفاده می‌شود [۲۸]. میزان K_4 در معادله ویبول نشان‌دهنده‌ی نوع رهایش است [۲۷]. همانطور که در شکل‌های ۶ و ۷ مشاهده می‌شود میزان k_4 برای لیپوزوم برپایه ثعلب و برپایه PEA معادل ۱،۲۲۹ و ۱،۳۹۴۶ می‌باشد که طبق مقالات و تحقیقات $k_4 > 1$ ، مکانیسم پیچیده‌ای از رهایش را نشان می‌دهد، نرخ رهایش تا رسیدن به نقطه عطف منحنی افزایش پیدا می‌کند و سپس کاهش می‌یابد [۲۷، ۲۹]. مقایسه میزان R^2 در مدل‌های بررسی شده نشان می‌دهد میزان آن در معادله ویبول بیش از سایر مدل‌ها است، لذا برای انتشار آلیسین از لیپوزوم بر پایه PEA و هیدروژل ثعلب، مدل سینتیکی ویبول مناسب‌تر از واکنش درجه اول، مدل هیگوجی و معادله هیکسون کراول می‌باشد. مدل ویبول برای رهایش دارو در مقالات دیگر هم پیشنهاد شده است [۳۰].

به طور مشابه، در رهایش داروی ایندومتاسین از لیپوزوم‌های برپایه دی پالمیتوفسفاتی‌دیل کولین یا رهایش بایکالین از لیپوزوم‌های بر پایه فسفولیپون، استفاده از مدل ویبول در بررسی سینتیک مناسب بوده است [۳۱].

جدول ۶: مطالعه معادلات سینتیکی در بررسی رفتار انتشار آلیسین از لیپوزوم بر پایه PEA و هیدروژل بر پایه ثعلب

نام مدل	معادله	R^2 (آلیسین بر پایه PEA)	R^2 (هیدروژل بر پایه ثعلب)
واکنش درجه اول	$\ln(1-Q) = -k_1 t$	۰،۸۷	۰،۸۹
معادله هیگوجی	$Q = k_2 t^{1/2}$	۰،۷۰	۰،۷۷
معادله ریشه مکعب هیکسون-کراول	$(1-Q)^{1/3} = K_3 t$	۰،۸۸	۰،۸۹
معادله ویبول	$\ln[-\ln(1-Q)] = k_4 \ln t + a_0$	۰،۹۴	۰،۹۷



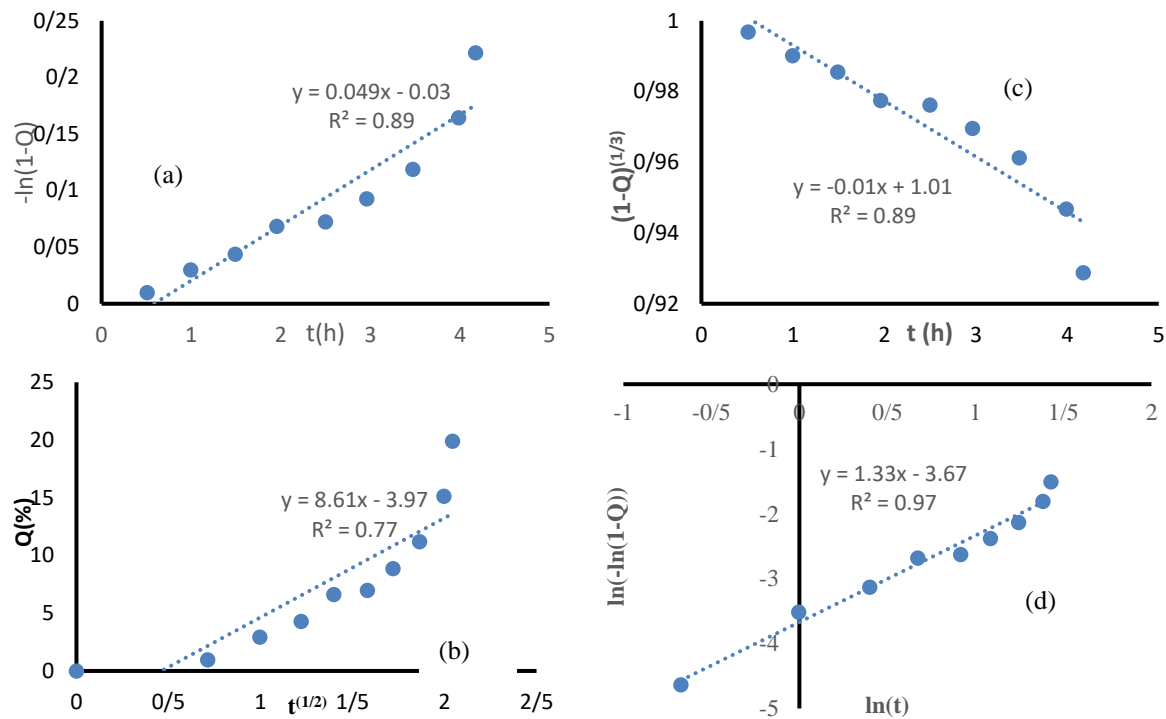


شکل ۶: سینتیک رهائش آلیسین از نانولیپوزوم براساس معادله مرتبه اول (a)، هیگوجی (b)، هیکسون کراول (c) و ویبول (d)

براساس نتایج حاصل از منحنی سینتیکی رفتار انتشار آلیسین از نانولیپوزوم بر پایه PEA و هیدروژل بر پایه ثعلب، معادله ویبول با داده‌های تجربی مطابقت بیشتری دارد. بنابراین این معادله را می‌توان برای پیش‌بینی میزان انتشار آلیسین (Q) در زمان‌های مختلف یا محاسبه زمان انتشار یک مقدار مشخص از آلیسین در دمای 37°C و $\text{pH}=7/4$ استفاده کرد و به عبارتی وضعیت نانولیپوزوم‌ها را در کاربردهای عملی پیش‌بینی کرد.

۴- نتیجه گیری

در این تحقیق، تولید لیپوزوم آلیسین بر پایه PEA و هیدروژل بر پایه ثعلب انجام شده است. شرایط بهینه بازده نانولیپوزوم آلیسین با استفاده از روش سطح پاسخ و نرم‌افزار دیزاین اکسپرت ۱۲، معادل میزان فسفاتیدیل اتانول آمین-به کسترول ۱: ۸، نسبت فاز آلی- فاز آبی ۱: ۴/۸ و زمان تشکیل ۱۵۸min تعیین شده که منجر به پاسخ پیش‌بینی شده (EE) $99/98\%$ می‌شود. همچنین یک مدل جهت پیش‌بینی میزان کپسوله‌سازی آلیسین بر پایه‌ی PEA ارائه شده که با داده‌های واقعی تناسب خوبی دارد. بررسی عملکرد هیدروژل در میزان کپسوله‌سازی دارو با در نظر گرفتن زمان 140min ، نشان داد که بیشترین بازده $74/98\%$ با میزان آکرلیک اسید (AA) 3ml و میزان N,N' -متیلن بیس‌آکریل آمید (MBA) 0.1g بدست می‌آید. در طول دوره ذخیره‌سازی آلیسین در فواصل زمانی ۱ h تا ۳ h و در دمای 4°C ، مقدار رهائش آن از لیپوزوم و هیدروژل بررسی شد، که روند کند رهائش نشان داد پوشش‌های لیپوزومی و هیدروژل تولید شده پایداری مناسبی دارند که پیش‌بینی می‌شود از آن‌ها بتوان جهت انتقال آلیسین به اعضای داخلی بدن استفاده کرد. از سوی دیگر بررسی سینتیک رهائش دارو با استفاده از واکنش درجه اول، مدل هیگوجی و معادله هیکسون کراول و مدل ویبول نشان داد که مدل سینتیکی ویبول جهت پیش‌بینی انتشار آلیسین از لیپوزوم بر پایه PEA و هیدروژل بر پایه ثعلب مناسب‌تر می‌باشد.



شکل ۷: سینتیک رهاش آلیسین از هیدروژل براساس معادله مرتبه اول (a)، هیگوجی (b)، هیکسون کراول (c) و ویبول (d)

۵- تقدیر و تشکر

از همکاری و حمایت مسئولین محترم دانشگاه علم و فناوری مازندران برای انجام این پژوهش تشکر و قدردانی می‌شود.

۶- منابع و ماخذ

- [1] Z. Hassanzadeh, E. Mikaeili Agah, A. Asadi and B.v. Kobra, (2019) *Effect of aquatic garlic (Allium sativum L.) extract on the survival of breast cancer cells (MCF-7) and non-cancerous cells of mouse fibroblasts (L929)*. *J. Dev. Biol.* 11(1) 45-52.
- [2] S. Ejaz, L.C. Woong and A. Ejaz, (2003) *Extract of garlic (Allium Sativum) in cancer chemoprevention*. *Exp. Oncol.* 25 93-97.
- [3] A. Rabinkov, T. Miron, L. Konstantinovski, M. Wilchek, D. Mirelman and L. Weiner, (1998) *The mode of action of allicin: trapping of radicals and interaction with thiol containing proteins*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1379, 233-244.
- [4] H. Shirzad, F. Taji and M. Rafieian, (2011) *The Effect of Heating on Useful Components of Garlic*. *Armaghan Danesh*, 16, 9-20.
- [5] Q. An, S. Zhao, C. Zhao, R. Wei, L. Zhang, J. Li, Y. Bao, L. Zhang and J. Zheng, (2022). *Identification of the key emulsifying components from the byproducts of garlic oil distillation*. *Food Hydrocolloids*, 122, 107043.
- [6] Y. Shan, D. Chen, B. Hu, G. Xu, W. Li, Y. Jin, X. Jin, X. Jin and L. Jin, (2021), *Allicin ameliorates renal ischemia/reperfusion injury via inhibition of oxidative stress and inflammation in rats*. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 142, 112077.

- [7] D. Savaghebi, M. Barzegar and M.R. Mozafari, (2019), *Manufacturing of nanoliposomal extract from Sargassum boveanum algae and investigating its release behavior and antioxidant activity*. Food science & nutrition, 8 , 299-310.
- [8] C.M.B. Pinilla, N.A. Lopes and A. Brandelli, (2021) *Lipid-Based Nanostructures for the Delivery of Natural Antimicrobials*. Molecules (Basel, Switzerland), 26, 3587.
- [9] F. Nobakht Asl and M. Kurdtabar, (2017) *Synthesis and Characterization of Iron Magnetic Nanocomposite Super-Absorbent Hydrogels Based on Modified Xanthan Gum using Acrylic Acid*. Iranian Journal of Chemistry & Chemical Engineering, 35, 33-38, (in persian).
- [10] R. Yusaf, R. Nawaz, S. Hayat, A. Khurshed, N. Zafar, A. Ahmad, I. Bashir, N. Alvi, M. Sajid and I. Majeed, (2014) *Structural Components of Liposomes and Characterization Tools*. American Journal of Pharm Research, 4, 3559.
- [11] T.M. Taylor, J. Weiss, P.M. Davidson and B.D. Bruce, (2005) *Liposomal Nanocapsules in Food Science and Agriculture*. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 45, 587-605.
- [12] M. Babae, S. Hajivand, and S. Rahman, (2020), *Hydrogels as Drug Delivery Systems: A Review of Current Characterization and Evaluation Techniques*. Pharmaceutics, 17-62, 21.
- [13] S. Zarei, G. Rezanejade Bardajee and M. Sadeghi, (2019), *Montmorillonite Nanocomposite Hydrogel Based on Poly(acrylic acid-co-acrylamide): Polymer Carrier for Controlled Release Systems*. Iranian Journal of Chemistry and Chemical Engineering (IJCCE), (IJCCE). 38, 31 (in persian).
- [14] G. Rezanejade Bardajee, A. Monfared and M.R. Rezaei, (2022) *Synthesis and Characterization of a magnetic multi walled carbon nanotubes nanocomposite hydrogel based on poly(2-dimethylamino ethyl methacrylate) grafted onto sodium alginate*. Journal of Applied Chemistry, 16, 9-24 (in persian).
- [15] G. Rezanejade Bardajee and S.S. Hosseini, (2020) *Synthesis of Iron Nanocomposite Hydrogel and Study the Release of Doxorubicin Anticancer Drug*. Iranian Journal of Chemistry & Chemical Engineering, 38, 67-78 (in persian).
- [16] R. Soleyman, G. Bardajee, A. Pourjavadi, A. Varamesh and A. Davoodi, (2015) *Hydrolyzed Salep/GELATIN-G-POLYACRYLAMIDE AS A NOVEL MICRO/NANO-POROUS SUPERABSORBENT HYDROGEL: SYNTHESIS, OPTIMIZATION AND INVESTIGATION ON SWELLING BEHAVIOR*. Scientia Iranica., 22, 883-893 (in persian).
- [17] H. Jiang, Z. Xing, Y. Wang, Z. Zhang, B. Kumah Mintah, M. Dabbour, Y. Li, R. He, L. Huang and H. Ma, (2020) *Preparation of allicin-whey protein isolate conjugates: Allicin extraction by water, conjugates' ultrasound-assisted binding and its stability, solubility and emulsibility analysis*. Ultrasonics Sonochemistry, 63 , 104981.
- [18] Q. Lu, P.-M. Lu, J.H. Piao, X.-L. Xu, J. Chen, L. Zhu and J.-G. Jiang, (2014) *Preparation and physicochemical characteristics of an allicin nanoliposome and its release behavior*. LWT - Food Science and Technology, 57, 686.-695

- [19] A. Pourjavadi, R. Soleyman and G. Bardajee, (2008) *Novel Nanoporous Superabsorbent Hydrogel Based on Poly(acrylic acid) Grafted onto Salep: Synthesis and Swelling Behavior*. Starch 60 , 467-475.
- [20] Q. Lu, P.-M. Lu, J.-H .Piao, X.-L. Xu, J. Chen, L. Zhu and J.G. Jiang, (2014) *Preparation and physicochemical characteristics of an allicin nanoliposome and its release behavior*. LWT - Food Science and Technology, 57, 686-695.
- [21] Q. Lu, D.-C. Li and J.-G. Jiang, (2011) *Preparation of a Tea Polyphenol Nanoliposome System and Its Physicochemical Properties*. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59, 13004-13011.
- [22] Andrade, J., C. González-Martínez and A. Chiralt, (2021) *Liposomal Encapsulation of Carvacrol to Obtain Active Poly (Vinyl Alcohol) Films*. Molecules, 26, 1589.
- [23] A. Olad, H. Zebhi, D. Salari, A. Mirmohseni and A. Reyhanitabar, (2018) *Water retention and slow release studies of salep-based hydrogel nanocomposite reinforced with montmorillonite clay*. New Journal of Chemistry, 42, 2758.
- [24] D.C. Montgomery, (2019) *Experimental Designs for Fitting Response Surfaces*, in *Design and analysis of experiments*. John wiley & sons: Arizona state university. 8st Ed.p. 430-476.
- [25] A.D. Sezer, (2014) *Liposomes as Potential Drug Carrier Systems for Drug Delivery..Application of Nanotechnology in Drug Delivery*, 1st Ed. pp.20.
- [26] M. Nasrolahi and z. talebi, (2010) *Salt sensitivity, pH responsivity and kinetic study of chitosan-g-PAA hydrogel*. Applied Chemistry, 5(16), 31-42.
- [27] A. Roy, K. Roy, S. Roy, J. Deb, A. Ghosh, and K.A. Ali , (2012) *Response surface optimization of sustained release metformin-hydrochloride matrix tablets: influence of some hydrophilic polymers on the release*. ISRN pharmaceutics, 2012 ,364261.
- [28] G. Singhvi and M. Singh, (2011) *Review: In vitro Drug Release Characterization Models*. International Journal of Pharmaceutical Studies and Research, 2, 77-84.
- [29] P. Costa and J.M. Sousa Lobo, (2001) *Modeling and comparison of dissolution profiles*. European Journal of Pharmaceutical Sciences, 13,123-133.
- [30] C. Corsaro, G. Neri, A.M. Mezzasalma and E. Fazio, *Weibull Modeling of Controlled Drug Release from Ag-PMA Nanosystems*. Polymers. Polymers, 13 (2021) 2897.
- [31] C. Mircioiu, V. Voicu, V. Anuta, A. Tudose, C. Celia, D. Paolino, M. Fresta, R. Sandulovici, and I. Mircioiu, (2019) *Mathematical Modeling of Release Kinetics from Supramolecular Drug Delivery Systems*. Pharmaceutics, 11(3) 140.