

انکپسوله کردن اسکوربیک اسید درون نانومیسل

فاطمه باذلی محبوب^{۱*}، حسین عطار^۲، قاسم عموعابدینی^۳، مریم ایمان^۴

۱. کارشناسی ارشد، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه مهندسی شیمی، تهران، ایران
۲. استادیار، دانشگاه آزاد اسلامی، واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه مهندسی شیمی، تهران، ایران
۳. دانشیار، دانشگاه تهران، پردیس دانشکده های فنی، گروه مهندسی شیمی، گروه بیوتکنولوژی، تهران، ایران
۴. استادیار، دانشگاه علوم پزشکی بقیه ا... (عج)، پژوهشکده طب رزمی، مرکز تحقیقات آسیب های شیمیایی، تهران، ایران

چکیده

سابقه و هدف: اسکوربیک اسید یا ویتامین ث پودری سفید رنگ و غیر سمی است و از مهم ترین آنتی اکسیدان ها می باشد. این ویتامین به اندازه کافی در محلول آبی پایدار نیست. هدف از این کار انکپسوله کردن اسکوربیک اسید درون نانومیسل می باشد که باعث افزایش پایداری ویتامین، محلول در چربی شدن و دارورسانی در غلظت بالاتر می شود.

مواد و روش ها: نانومیسل های حاوی اسکوربیک اسید با استفاده از سورفاکتانت توئین ۸۰ و پایدار کننده آلفا توکوفرول در شرایط دمایی آزمایشگاه تهیه شد. کارایی انکپسولاسیون به روش اسپکتروفوتومتری محاسبه گردید. سایز ذرات تشکیل شده با میکروسکوپ الکترونی به روش TEM گرفته شده و نتایج با پارتیکل سایز آنالایزر مقایسه شد.

یافته ها: میانگین قطر اسکوربیک اسید و درصد محصور سازی اسکوربیک اسید در نانومیسل به ترتیب ۱۰۰ نانومتر و ۷۰٪ درصد به دست آمد.

نتیجه گیری: این مطالعه نشان داد که اسکوربیک اسید می تواند درون نانومیسل محصور سازی شده و در برابر عوامل محیطی مانند دما، رطوبت، pH و نور محافظت شود، هم چنین با این روش این ویتامین محلول در چربی شد.

واژگان کلیدی: اسکوربیک اسید، انکپسوله کردن، نانومیسل، ویتامین ث، توئین ۸۰

مقدمه:

و در اثر وکلروفورم نامحلول است. ویتامین ث برای تولید کلاژن، التیام زخم ها، ایمنی سلامت بدن و سیستم عصبی بسیاری ضروری می باشد. هم چنین یک آنتی اکسیدان مناسب برای جلوگیری از بیماری ها می باشد (۲۲).

حد مجاز مصرف روزانه L- اسکوربیک اسید بر طبق RAD^۱ ایالات متحده آمریکا، برای بزرگسالان ۶۰ میلی گرم/روز که متوسط مصرف ۴۶ میلی گرم/روز برای جلوگیری از بیماری اسکوربوت می باشد. بررسی ها نشان داده که مصرف ۹۰ تا ۱۰۰ میلی گرم ویتامین ث/ روز خطر ابتلا به بیماری های مزمن در مردان و زنان را سبب می شود (۳). سنتز اسید اسکوربیک در

L- اسکوربیک اسید یک ماده مغذی ضروری برای تعداد زیادی از گونه پستانداران، چند گونه از پرندگان و برخی از گونه های ماهی و هم چنین برای انسان می باشد که کمبود آن در انسان موجب بیماری اسکوربوت می شود (۱۵). اسکوربیک اسید پودر کریستال سفید تا زرد کم رنگی است که از مهم ترین ویتامین های محلول در آب می باشد اما به اندازه کافی در محلول آبی پایدار نمی باشد. در الکل کمی محلول، در گلیسرول خیلی کم

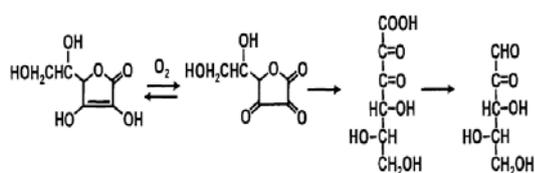
نویسنده مسئول:

دانشگاه آزاد اسلامی واحد علوم و تحقیقات تهران، گروه مهندسی شیمی، تهران، ایران،

ایمیل: fb.mahbob@yahoo.com

تاریخ دریافت: ۱۳۹۲/۱۲/۲۴

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۴/۲۳



شکل ۳: طرح شماتیکی از تخریب اسکوربیک اسید در محلول آبی (۱۰)

به منظور غلبه بر این مشکلات تعدادی از روش ها پیشنهاد شده است از جمله خشک کن پاششی^۲، سرد کردن پاششی و خشک کردن پاششی^۳، اکستروژن^۴، بستر سیال^۵، پوشاندن توسط لیپوزوم^۶، توسط متراکم کردن^۷، میکروامولسیون^۸ و... (۱۱، ۲۳).

هدف از این مطالعه محصورسازی اسکوربیک اسید درون نانومیسول می باشد که توسط امولسیون های روغن در آب (O/W) انجام می گیرد، که به موجب این روش به پایداری اسکوربیک اسید در حلال های چربی افزوده شده . از آنجایی که برای تشکیل امولسیون یک فاز آبی و یک فاز روغنی لازم می باشد به همین جهت برای فاز روغنی در اینجا از روغن کنجد استفاده شده است. عمده اسیدهای چرب اشباع در روغن کنجد شامل اسیدهای پالمیتیک^۹ (۵۸/۰٪)، استئاریک^{۱۰} (۴۴/۵٪) با مقدار کمی اسید آراشیدیک^{۱۱} (۹/۰٪) می باشد. هم چنین اسیدهای چرب غیر اشباع اصلی آن اسیدهای لینولئیک^{۱۲} (۲۶/۴٪) و اولئیک^{۱۳} (۳۸/۸٪) می باشد (۱۷).

مواد و روش ها:

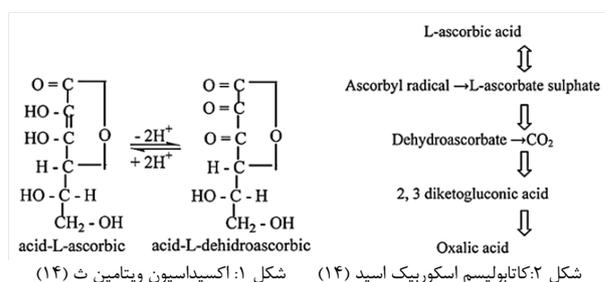
مواد:

L-اسکوربیک اسید (خلوص ۹۹/۹٪)، توئین ۸۰ از شرکت مرک آلمان خریداری گردید. آلفا توکوفرول (ویتامین E) از شرکت سیگما آلد ریچ تهیه شد. روغن مورد استفاده روغن کنجد (تشکیل امولسیون) است که از شرکت عقاب فراهم شده بود. برای تهیه کلیه محلول ها از آب دیونیزه استفاده شده است.

ساخت نانومیسول حاوی اسکوربیک اسید:

- ۲ Spray drier
- ۳ Spray cooling and spray chilling
- ۴ Extrusion
- ۵ Fluidized bed coating
- ۶ Liposome entrapment
- ۷ Coacervation
- ۸ Microemulsion
- ۹ Palmitic acid
- ۱۰ Stearic acid
- ۱۱ Arachidic acid
- ۱۲ Linoleic acid
- ۱۳ Oleic acid

طیف گسترده ای از مکمل ها، قرص، کپسول، قرص جویدنی، پودر کریستالی، قرص های جوشان و به شکل مایع در دسترس است. L-اسکوربیک اسید با نام ساده ویتامین ث می باشد که نام شیمیایی آن 2-oxo-L-threo-hexono-1, 4-lac-2, 3-endiol است (شکل ۱). همان طور که گفته شد اسکوربیک اسید یک ترکیب محلول در آب است که به راحتی جذب می شود اما آن را در بدن نمی تواند ذخیره کند. متابولیت مهم اسکوربیک اسید در بدن انسان دهیدرواسکوربیک اسید^{۲،۳}-دی کتوگلوکونیک اسید و اگزالیک اسید (شکل ۲) می باشد. اسکوربیک اسید به طور کلی غیر سمی است اما در دوزهای بالا (۲-۶ گرم/روز) می تواند باعث اختلالات گوارشی یا اسهال شود (۱۴).



شکل ۱: اکسیداسیون ویتامین ث (۱۴) شکل ۲: کاتابولیسم اسکوربیک اسید (۱۴)

متاسفانه ویتامین ث بسیار حساس به نور ، عوامل اکسید کننده، یون های فلزی مانند مس، pH ، دما و حضور اکسیژن می باشد. این ویتامین در اثر حرارت به ویژه در حضور فلزات مانند مس زود از بین می رود اما انجماد اثری روی آن ندارد. پودر اسکوربیک اسید در هوا به شرطی که رطوبت هوا کاملاً حذف شده باشد، نسبتاً پایدار است (۹). احمد و همکاران در سال ۲۰۱۱ نشان دادند که سرعت تخریب اکسیداتیو فرمولاسیون کرم اسکوربیک اسید در تاریکی حدود ۷۰٪ کمتر از آن است که در حضور نور باشد (۲).

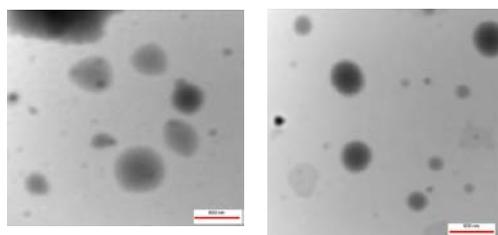
پروسه تخریب اسکوربیک اسید بسیار پیچیده است و شامل تعدادی از اکسیداسیون / کاهش با برخی از مولکول ها است. شکل ۳ مسیر تخریب اسکوربیک اسید در محلول آبی را نشان می دهد. تخریب اسکوربیک اسید نتیجه اش رنگ قهوه ای است که به سبب واکنش با آمینواسیدها است (۲۴ ، ۱۰). همان طور که مشاهده می شود اسکوربیک اسید به دهیدرواسکوربیک اسید (DHA) تخریب می شود که از نظر سینتیکی ناپایدار است و هیدولیز می شود به ۲،۳ دی کتوگلوکونیک اسید (DKG) که ویتامین ث فعالی ندارد (۱۳).

۱۰	۱/۳۷۳	۰/۹۰۷
۵	۰/۶۹۵	۰/۴۲۸
۲,۵	۰/۳۶۰	۰/۲۶۵
۱,۲۵	۰/۱۷۹	۰/۱۱۶

جدول ۱: نتایج میزان داروی محصور شده با گذشت ۳ ماه

بررسی تصویر میکروسکوپ الکترونی (TEM):

شکل ۴ تصاویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی عبوری مربوط به نانو میسل های بدون اسکوربیک اسید و با اسکوربیک اسید را نشان می دهد. همان طور که مشاهده می شود نانو میسل ها کاملا کروی و یک دست بوده و سایز یکنواختی برای کلیه آن ها دیده می شود.



شکل ۴: سمت راست بدون اسکوربیک اسید، سمت چپ با اسکوربیک اسید

بحث:

در صنعت غذا تقریباً روش محصورسازی جدید می باشد و مورد مصرف زیادی هم پیدا کرده است. محافظت و نگه داری مواد مغذی و عناصر مفید غذاها و تحویل این مواد در ارگان های مورد نظر در بدن عاملی است که این روش را در صنایع غذایی پر طرفدار نموده است. همان طور که گفته شد اسکوربیک اسید از جمله ویتامین هایی است که در حالت پودری پایدار می باشد ولی هنگامی که در آب حل می شود این پایداری کاهش می یابد. فاکتورهای محیطی مانند دما، pH، هوا، رطوبت، نور، حرارت، اکسیژن، یون های فلزی، اشعه X و پرتو UV اثر سوء بر ثبات این ویتامین دارند (۲۲، ۱۶). که به راحتی تبدیل به ترکیبات غیر فعال بیولوژیکی می شود، بنابراین کاربردش در زمینه های آرایشی و بهداشتی، پوست و دارویی محدود می شود. وظیفه اصلی این ویتامین، سنتز بافت های کلاژن بدن ما اطراف استخوان، دندان، غضروف، پوست و بافت های صدمه دیده (۶)، تولید هورمون ها، ساخت استروئید ها به ویژه در مرحله هیدروکسیله شدن، محافظت از سلول ها در برابر رادیکال های آزاد، التیام زخم ها،

ابتدا اسکوربیک اسید را که به صورت پودر سفید رنگ می باشد با آب مقطر (به نسبت ۱:۱) حل می نموده تا محلول آبی اسکوربیک اسید حاصل شود (دمای، pH= ۳,۷). سپس محلول آبی را به دمای ۴۰°C رسانده و به آن پلی سوربات ۸۰، روغن کنجد و ویتامین E به همراه همزدن (هموژنایزر) اضافه می گردد (۲۰ دقیقه، دمای ۶۰,۵۰۰°C دور بر دقیقه) تا محلول روشن و تک فازی به دست بیاید. برای این فرمولاسیون کنترل بدون اسکوربیک اسید نیز تهیه شد.

تعیین اندازه و پتانسیل زتا نانو ذره:

با استفاده از دستگاه زتاسایزر (مدل Nano-ZS; Malvern, UK) میانگین قطر نانومیسل ها و هم چنین پتانسیل زتا اندازه گیری شد.

تعیین میزان داروی محصور شده:

برای تعیین میزان داروی محصور شده ابتدا دارو را رقیق کرده و سپس توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۲۶۵ nm میزان جذب دارو را خوانده می شود.

بررسی مورفولوژی نانو ذره:

تعیین خصوصیات مورفولوژی نانو ذرات توسط روش های میکروسکوپی با رزولوشن بالا مثل میکروسکوپ الکترونی گذاره^{۱۴} و میکروسکوپ الکترونی نگاره^{۱۵} است انجام می شود. که در اینجا از میکروسکوپ الکترونی گذاره استفاده شد.

یافته ها

تعیین اندازه و پتانسیل نانو ذره:

میانگین قطر نانومیسل ها برای نمونه اسکوربیک اسید نانومیسله شده ۱۰۰ نانومتر و پتانسیل زتا ۰/۱۴۱- به دست آمد.

تعیین میزان داروی محصور شده:

برای تعیین میزان داروی محصور شده ابتدا نمونه را رقیق کرده و سپس توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۲۶۵ نانومتر میزان جذب نمونه را خوانده شد. که نتایج به دست آمده در جدول ۱ مشاهده می شود.

رقت دارویی (mg/mL)	جذب نور	داروی محصور شده بعد از ۳ ماه
--------------------	---------	------------------------------

۱۴ (transmission electron microscope (TEM)
۱۵ (scanning electron microscope (SEM)

سلامت سیستم ایمنی و عصبی و هم چنین یک آنتی اکسیدان برای کمک به جلوگیری از بیماری ها است (۲۳)، هم چنین برای فعال سازی آنزیم های مختلف مربوط به سیستم عصبی، هورمون ها، و سم زدایی از داروها و سموم در کبد ضروری است (۱۲).

اسکوربیک اسید نقش آنتی اکسیدانی دارد، هم چنین حلالیت آن در آب موجب می شود که به عنوان آنتی اکسیدان در داخل مایعات بدن ما کار کنند. ویتامین ث باعث افزایش میزان جذب آهن، کلسیم و اسید فولیک و هم چنین باعث کاهش واکنش های آلرژیک، تقویت سیستم ایمنی بدن، باعث تشکیل صفرا در کیسه صفرا، و تسهیل دفع از استروئیدهای مختلف می شود (۱). اسکوربیک اسید قدرت اکسیداتیوی بالایی دارد که می تواند سبب مشکلات زیادی در سیستم غذایی و دارویی شود. به طور مثال در صنعت غذا در مرحله فرآیند این ویتامین تغییر رنگ از سفید به زرد می دهد که بر روی رنگ غذا اثر می گذارد، هم چنین می تواند با سایر اجزاء مواد غذایی واکنش داده و سبب به وجود آمدن تغییرات نامطلوب در رنگ و طعم غذا شود. میزان pH غذا بر روی اسکوربیک اسید تاثیر دارد چنانچه سرعت اکسیداسیون اسکوربیک اسید در pH ۵ و ۱۱/۵ به بیش ترین مقدار خود می رسد به هر حال این خاصیت اکسیداتیو باعث شده که اسکوربیک اسید یک آنتی اکسیدان مناسب شود (۲۳). همان طور که اشاره شد روش های مختلفی برای محصور سازی اسکوربیک اسید وجود دارد از قبیل: خشک کن پاششی، سرد کردن پاششی و خنک کردن پاششی، اکستروژن، بستر سیال، پوشاندن توسط لیپوزوم، توسط متراکم کردن، میکرومولسیون ها (آب در روغن یا روغن در آب)، کریستال های مایع می باشند.

مطالعات متعددی در متون های گذشته صورت گرفته اما آنها با روش های مختلف و عوامل کپسوله سازی دیگری این روش را انجام داده اند. برای مثال ترینداد و همکاران در سال ۲۰۰۰ اسکوربیک اسید را به روش خشک کن پاششی با بکارگیری صمغ عربی و نشاسته برنج به عنوان مواد دیواره انکپسوله کرده اند (۲۱). هم چنین پییرسی و همکاران در سال ۲۰۰۶ اسکوربیک اسید را بوسیله خشک کن پاششی با بکارگیری پروتئین نخود به عنوان مواد دیواره میکروانکپسوله کرده اند (۱۸). اودین و همکاران در سال ۲۰۰۱ خصوصیات اسکوربیک اسید میکروکپسوله شده که با تکنیک های مختلفی تولید شده اند را مقایسه کرده است که شامل پراکندگی ذوب، پراکندگی حلال و خشک کن پاششی می باشد (۲۲). در حالی که لی و همکاران در سال ۲۰۰۴ اسکوربیک اسید را با خشک کن پاششی به وسیله پلی آکیل گلیسرول مونواستئارات برای بکارگیری در

تقویت شیر میکروانکپسوله کرده اند (۱۲). جانگ و لی در سال ۲۰۰۸ بوسیله نانو ذرات chitosan اسکوربیک اسید را کپسوله کردند و پایداری آن را در محلول آبی بررسی کردند که تاثیر مثبت این پوشش در پایداری آن و هم چنین رهایش آهسته ای را در محلول مشاهده کردند (۸). فرهنگ و همکاران در سال ۲۰۱۲ پایداری اسکوربیک اسید انکپسوله شده را در لیپوزوم ها دخیله شده در ۴ درجه سانتی گراد در دو مقدار pH (۳) و pH=۷ بررسی کرده بودند (۵) و هم چنین رزمان و همکاران در سال ۲۰۰۷ اسکوربیک اسید را با میکرومولسیون های آب/روغن انکپسوله کرده اند (۱۹). در سال ۲۰۱۳، تالیتا و همکاران میکروکپسول اسکوربیک اسید را با روش کواشرویشن مرکب^{۱۶} و با استفاده از صمغ عربی و ژلاتین به عنوان مواد دیواره و هم چنین پلی گلیسرول پلی ریکی اولئات (PGPR90)^{۱۷}، به عنوان امولسیفایر تهیه کرده بودند. که هدف از این روش حفاظت و رهایش کنترل شده بود. که با استفاده از امولسیون آب در روغن و استفاده از روغن ذرت انجام گرفته بود. در این مطالعه تاثیر پارامترهای مختلفی، شامل فعالیت آب، هیگروسکوپیک، قابلیت انحلال، اندازه ذرات، بازده محصور سازی، طیف سنجی تبدیل فوریه مادون قرمز و پایداری مواد محصور شده را بررسی کرده اند. همه میکروکپسول های تشکیل شده کروی، چند هسته ای و کمی محلول و هیگروسکوپ بودند و بازده محصور سازی تقریباً ۹۸٪ بوده است (۲۰).

در سال ۲۰۱۲ لوکا و همکاران ثبات لیپوزومی اسکوربیک اسید در ماتریس غذایی را بررسی کردند، که اسکوربیک اسید را درون لیپوزوم های DPPC و DPPC/chol انکپسوله کردند. نتیجه اش نشان داد که اسکوربیک اسید درون لیپوزوم در سیستم هایی که حاوی غلظت کاتالیزوری یون های مس هستند ثبات قابل توجهی دارد. سرعت اکسیداسیون اسکوربیک اسید تا ۳۰۰ برابر نسبت به اسکوربیک اسید آزاد کاهش یافته بود. اسکوربیک اسید انکپسوله شده هم چنین در ماتریس غذایی دارای پایداری بود. سرعت اکسیداسیون اسکوربیک اسید در آب سیب، نسبت به اسکوربیک اسید آزاد که بوسیله انکپسوله کردن به هر دو روش آماده سازی که در بالا اشاره شد کاهش یافته بود. پایداری لیپوزومی اسکوربیک اسید در محصول تخمیر شیر کمتر بود (۱۳).

هونگو و همکاران در سال ۲۰۱۱ نانوسوسپانسیون جامد در روغن اسکوربیک اسید را به منظور تولید فرمول پایدار برای مدت طولانی را بررسی کردند. نتایج نشان داد که تقریباً تمام

۱۶ complex coacervation (

۱۷ polyglycerol polyricinoleate (

اسكوربيك اسيد محصور شده (۹۵/۳%) بود. مطالعه پايداري ذخيره سازي آن در ۲۵ ساعتي گراد بيش از ۹۰ روز تحت حفاظت از نور مورد بررسي قرار گرفت و اسكوربيك اسيد در^{۱۸} SONS پايداري طولاني مدتي نسبت به اسكوربيك اسيد آزاد داشت (۷).

اكثر تحقيقات صورت گرفته با روش پوشاندن توسط ليوپوزوم ها مي باشد و هم چنين هدف از بيشتر مقالات اين بوده است كه اسكوربيك اسيد را محافظت كنند در برابر دما، pH، اكسيژن، يون هاي فلزي، اشعه X و پرتو UV كه اثر سوء بر ثبات اين ويتامين دارند اما هدف اين تحقيق اين بوده كه اين ويتامين در چربي محلول گردد كه بيشتر ماه ها پايدار است و در غلظت بالا در دسترس هستند. در اين پروژه از روش ميكروامولسيون يا نانوميسل استفاده شد. كه علاوه بر غلبه بر مشكلات گفته شده سبب مي شود كه اين ويتامين محلول در چربي شود كه سبب بهبود حلاليت زيستي آن مي شود كه در صنعت غذا و دارو کاربرد فراواني دارد.

نتيجه گيري:

نتايج حاصل از اندازه گيري قطر نانوميسل ها با استفاده از دستگاه زتا سايزر، اندازه ذرات را در ابعاد نانو تا ييد كرد. نانوميسل ها همان طور كه در شكل TEM مشاهده شد كاملا كروي بوده و داراي سايز يكنواختي مي باشند. سايز حاصله ۱۰۰ nm براي فرمولاسيون ها و زتاي منفي ۰/۱۴۱ - نشان مي دهد كه پايداري كلوئيدي خوبي به دست آمده است. فرم بدون رسوب و تجمع يافته و شفافى براي فرمولاسيون ها به دست آمده است كه تاكيدى بر انحلال درست اسكوربيك اسيد است. درصد محصور سازي نانو ذرات در حدود قابل قبول ۷۰٪ بوده است. اين مطالعه نشان داد كه اسكوربيك اسيد مي تواند درون نانوميسل محصور سازي شده و در برابر عوامل محيطي مانند دما، رطوبت، pH و نور محافظت شود، هم چنين با اين روش اين ويتامين در چربي محلول شد.

سپاسگزارى

تمامي مراحل آزمايشگاهي اين پژوهش در مركز پژوهشي فناوري هاي نوين در مهندسي علوم زيستي دانشگاه تهران و شركت توفيق دارو انجام شده است كه بدین وسيله از زحمات مسئولين اين بخش و هم چنين از پروفيسور عظيم اكبرزاده كه با راهنمايي هاي خويش من را ياري كردند سپاسگزارى مي نمايم.

منابع:

1. Abbasi, M. & Niakousari, M. Kinetics of ascorbic acid degradation in unpasteurized Iranian lemon juice and concentrate during regular storage conditions. *Electron J Environ Agric Food Chem*,2007;6, 1735-1741.
2. Ahmad, I. Sheraz, M. Ahmed, S. Shaikh, R. Vaid, F. ur Rehman Khattak, S. et al. Photostability and interaction of ascorbic acid in cream formulations. *AAPS Pharm Sci Technol*, 2011;12, 917-923.
3. Anitra C Carr and Balz Frei. Toward a new recommended dietary allowance for vitamin C based on antioxidant and health effects in humans. *Am J Clin Nutr*,1999;69:1086–107.
4. Behnam D. Aqueous solution of ascorbic acid and method for producing same. patent US 6774247B2. 2004.
5. Farhang, B. Kakuda, Y. & Corredig, M. Encapsulation of ascorbic acid in liposomes prepared with milk fat globule membrane-derived phospholipids. *Dairy Sci Technol*,2012; 92(4), 353–366.
6. Gallarate, M., M.E. Carlotti, M. Trotta, S. Bovo, On the stability of ascorbic acid in emulsified systems for topical and cosmetic use. *Int J Pharm*,1999;188,233–241.
7. Hongyu Piao, Noriho Kamiya, Fude Cui, Masahiro Goto. Preparation of a solid-in-oil nano-suspension containing l-ascorbic acid as a novel long-term stable topical formulation, *Int J Pharm*,2011;420, 156– 160.
8. Jang, K. I. & Lee, H. G. Stability of chitosan nanoparticles for l-ascorbic acid during heat treatment in aqueous solution. *J Agric Food Chem*, 2008;56(6), 1936-1941.
9. Jong-Suk Lee et.al. The stabilization of L-ascorbic acid in aqueous solution and water-in-oil-in-water double emulsion by controlling pH and electrolyte concentration. *J Cosmet Sci*.2003;55,1-12.
10. Khalid, N. Kobayashi, I. Neves, M.A. Uemura, K. Nakajima, M. Preparation and characterization of water-in-oil emulsions loaded with high concentration of L-ascorbic acid. *LWT - Food Sci Technol*,2013;51, 448-454.
11. Kirby, C. J. Whittle, C. J. Rigby, N. Coxon, D. T. & Law, B. A. Stabilization of ascorbic acid by microencapsulation in liposomes. *Int J Food Sci Technol*, 1991;26(5), 437-449.
12. Lee, J. -B. Ahn, J. & Kwak, H. -S. L-Ascorbic acid microencapsulated with polyacylglycerol monostearate for milk fortification. *J Biosci Biotechnol Biochemis*, 2004;68, 495–500.
13. Luka Wechtersbach, Natasa Poklar Ulrih, Blaz Cigic. Liposomal stabilization of ascorbic acid in model systems and in food matrices. *LWT - Food Sci Technol*,2012;45.43-49.
14. Matel, N, Birghila, S, Popescu, V, Dobrin, S, Soceanu, A, Oprea, C, et al. Kinetic study of vitamin degradation from pharmaceutical products. *Rom J Phys*. 2008; 53, 1–2, 343–351.
15. Nan Liu, Hyun-Jin Park. Factors effect on the loading efficiency of Vitamin C loaded chitosan-coated nanoliposomes. *Colloids Surf B Biointerfaces*,2010; 76, 16–19.
16. Nirmala Devi, Dilip Kumar Kakati. Smart porous microparticles based on gelatin/sodium alginate polyelectrolyte complex. *J Food Eng*,2013;117,193–204
17. Nzikou, J.M. Matos, G. Bouanga-Kalou, C.B. Ndangui, N.P.G. Pambou-Tobi, A. Kimbonguila, Th. Silou, M. Linder and S. Desobry. Chemical Composition on the Seeds and Oil of Sesame (*Sesamum indicum* L.) Grown in Congo-Brazzaville. *Advance. J Food Sci Technol*, 2009;1(1): 6-11
18. Oberbremer et al. A. Oberbremer, R. Muller-Hurtig and F. Wagner. Effect of the addition of microbial surfactants on hydrocarbon degradation in a soil population in a stirred reactor. *Appl Microbiol Biotechnol*,1990;32, 485–489.

19. Pierucci, A. P. T. R. Andrade, L. R. Baptista, E. B. Volpato, N. M. & Rocha-Leao, M. H. M. New microencapsulation system for ascorbic acid using pea protein concentrate as coat protector. *J Microencapsul*, 2006;23(6),654-662.
20. Rozman, B. & Gasperlin, M. Stability of vitamins C and E in topical microemulsions for combined antioxidant therapy. *Drug Delivery*, 2007;14, 235–245.
21. Talita A. Comunian, Marcelo Thomazini, Ana Julia Gouvêa Alves, Fernando Eustáquio de Matos Junior, Júlio C. de Carvalho Balieiro, Carmen S. Favaro-Trindade, Microencapsulation of ascorbic acid by complex coacervation: Protection and controlled release. *Food Res Int*, 2013;52, 373–379.
22. Trindade, M. A. & Grosso, C. R. F. The stability of ascorbic acid microencapsulated in granules of rice starch and in gum arabic. *J Microencapsul*, 2000; 17, 169–176.
23. Uddin, M. S. Hawlader, M. N. A. and Zhu, H. J. Microencapsulation of ascorbic acid: effect of process variables on product characteristics. *J Microencapsul*, 2001;18 (2): 199-209.
24. Wilson, N. and Shah, N.P. Microencapsulation of Vitamins. *ASEAN Food J*, 2007;14 (1): 1-14
25. Yuan, J.P. & Chen, F. Degradation of ascorbic acid in aqueous solution. *J Agric Food Chem*, 1998; 46, 5078-5082.

