

ẢNH HƯỞNG CỦA SUCROSE ĐẾN CÁC TÍNH CHẤT LÝ HÓA CỦA LIPOSOME SẮT(II) SULFATE ĐÔNG KHÔ DỰA TRÊN GLYCEROL

Đến tòa soạn 28-10-2025

Võ Ngọc Bình, Trần Thị Yên, Nguyễn Thị Thúy Hằng, Ngô Quốc Anh*

Viện Hóa học, Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam,
18 Hoàng Quốc Việt, Cầu Giấy, Hà Nội, Việt Nam

*E-mail: ngoquanh@ich.vast.vn

SUMMARY

EFFECT OF SUCROSE ON THE PHYSICO-CHEMICAL PROPERTIES OF GLYCEROL-BASED FREEZE-DRIED FERROUS SULFATE LIPOSOMES

This study investigated the effect of sucrose as a freeze-drying protectant for glycerol-based ferrous sulfate liposomes at sucrose/lipid mass ratios of 5:1 and 8:1 (w/w) on particle size, polydispersity index (PDI), and zeta potential. Sucrose at a mass ratio of 8:1 proved superior in maintaining the desired properties of the final product, such as reproducibility of size, PDI, and zeta potential, similar to the liposomes before freeze-drying. Furthermore, FTIR-ATR analysis confirmed the incorporation of iron sulfate into the liposome matrix through the reduction of sulfate vibrations and the alteration of phospholipid phosphate bands, indicating the absence of free crystalline salts. FESEM images confirmed the formation of freeze-dried ferrous sulfate liposomes as spherical structures. Furthermore, short-term stability assessment after 7 days at 4°C showed that the sucrose/lipid ratio = 8 : 1 effectively preserved the integrity of the liposomes after freeze-drying. These results highlight the important role of sucrose in stabilizing glycerol-based ferrous sulfate liposomes.

Keywords: liposomes, ferrous sulfate, freeze drying/lyophilization, sucrose, glycerol

1. MỞ ĐẦU

Thiếu máu do thiếu sắt vẫn là một trong những vấn đề sức khỏe cộng đồng phổ biến nhất trên toàn cầu, đặc biệt tại các quốc gia đang phát triển, ảnh hưởng nghiêm trọng đến sức khỏe thể chất, nhận thức và năng suất lao động [8; 13]. Sắt(II) sulfate (FeSO_4) là dạng muối sắt được sử dụng rộng rãi nhất trong điều trị và bổ sung sắt nhờ sinh khả dụng cao và chi phí thấp [9; 29]. Tuy nhiên, việc sử dụng FeSO_4 theo đường uống thường gặp các hạn chế đáng kể như kích ứng đường tiêu hóa, độ ổn định hóa học kém trong môi trường sinh lý và khả năng oxy hóa dễ dàng của ion Fe^{2+} , làm giảm hiệu quả

điều trị và tuân thủ của bệnh nhân [9; 29]. Do đó, việc phát triển các hệ dẫn truyền mới nhằm cải thiện độ ổn định, khả năng dung nạp và hiệu quả sinh học của sắt là một hướng nghiên cứu có ý nghĩa khoa học và thực tiễn cao.

Liposome đã trở thành một trong những hệ mang vật chất hoạt tính được nghiên cứu rộng rãi nhất trong các lĩnh vực dược phẩm, thực phẩm và khoa học vật liệu nhờ khả năng bao gói cả các phân tử ưa nước lẫn kỵ nước, tính tương thích sinh học cao và khả năng điều chỉnh cấu trúc màng linh hoạt [19; 27]. Tuy nhiên, liposome ở dạng phân tán nước thường kém ổn định về mặt lý-hóa, dễ gặp hiện

tượng kết tụ, hợp nhất túi, tăng kích thước hạt và rò rỉ hoạt chất theo thời gian [7]. Điều này đặc biệt nghiêm trọng đối với các liposome chứa ion kim loại hóa trị II như Fe^{2+} , vốn có thể xúc tác các phản ứng oxy hóa lipid, làm suy giảm tính toàn vẹn màng và giảm hiệu quả bao gói [7]. Do đó, việc chuyển đổi liposome về trạng thái khô thông qua đông khô (lyophilization) là một giải pháp quan trọng nhằm tăng độ ổn định, thuận tiện cho bảo quản, vận chuyển và duy trì các đặc tính cấu trúc mong muốn [7; 26].

Trong kỹ thuật đông khô liposome, chất bảo vệ đông lạnh/đông khô đóng vai trò then chốt trong việc duy trì tính toàn vẹn của màng trong suốt quá trình đóng băng và sấy thăng hoa. Quá trình đông lạnh có thể gây tổn thương màng do ứng suất cơ học từ tinh thể băng, trong khi sự khử nước làm tăng nồng độ chất tan, dẫn đến bất ổn vật lý và hóa học của liposome [15]. Việc bổ sung các polyol hoặc carbohydrate giúp hạn chế các tác động này thông qua việc hình thành ma trận vô định hình, ngăn chặn sự hợp nhất và giảm hư hại màng [4; 12; 18]. Đặc biệt, các disaccharide như sucrose hoặc trehalose được xem là chất bảo vệ đông khô hiệu quả nhờ khả năng tương tác với các nhóm đầu phospholipid và tạo cấu trúc thủy tinh có độ linh động phân tử thấp, từ đó bảo toàn các đặc tính vật lý-hóa học của liposome sau khi tái hydrat hóa [17; 22; 24; 26].

Trong nghiên cứu trước đây của nhóm chúng tôi [16], liposome sắt sulfate đã được điều chế bằng một phương pháp xanh sử dụng glycerol làm dung môi cho lipid trong được hỗ trợ bởi siêu âm, các đặc tính hạt ở dạng dung dịch cũng đã được mô tả chi tiết. Chúng tôi nhận thấy rằng, ngoài vai trò như là một dung môi cho lipid của glycerol, nó cũng được biết là một chất có tác dụng bảo vệ lạnh cho

liposome bằng cách giảm căng thẳng màng do băng gây ra và điều chỉnh hành vi đông lạnh [16; 28]. Do đó, việc kết hợp glycerol với saccharide như sucrose được kỳ vọng mang lại cơ chế bảo vệ kép, đồng thời tận dụng lợi thế của công thức liposome ban đầu. Vai trò kép của nó vừa là dung môi điều chế vừa là chất bảo vệ lạnh mang lại một chiến lược hợp lý và thuận tiện khi kết hợp với sucrose để ổn định liposome trong quá trình đông khô.

Theo hiểu biết của chúng tôi, chưa có báo cáo nào trước đây nghiên cứu về điều chế liposome sắt(II) sulfate đông khô dựa trên glycerol, sử dụng sucrose làm chất bảo vệ đông khô. Trong bài báo này, chúng tôi bước đầu đánh giá ảnh hưởng của hai tỷ lệ sucrose/lipid (5:1 và 8:1, w/w) đến đặc tính của liposome sắt(II) sulfate đông khô dựa trên glycerol, bao gồm kích thước hạt, phân bố kích thước (PDI), thế zeta, đồng thời đánh giá sự ổn định ngắn hạn của hệ trong quá trình bảo quản sau đông khô.

2. THỰC NGHIỆM

2.1. Nguyên liệu và hóa chất

Phospholipid đậu nành được lấy đạt tiêu chuẩn USP từ VAV Pvt. Ltd. (Mumbai, Ấn Độ). Acid L(+)-Ascorbic (AA) và glycerol được mua từ Samchun Chemical Co. (Seoul, Hàn Quốc). Nước siêu tinh khiết (điện trở suất 18,2 M Ω ·cm) được sản xuất bởi hệ thống Easy Pure II (Thermo Scientific, Hoa Kỳ) được sử dụng trong tất cả các thí nghiệm. Sắt(II) sulfate heptahydrate ($FeSO_4 \cdot 7H_2O$) được cung cấp bởi VWR Chemicals (Pháp).

2.2. Điều chế liposome sắt sulfate đông khô

Quy trình điều chế liposome sắt sulfate dạng bột đông khô dựa trên quy trình đã được công bố trước đó của chúng tôi với

một số sửa đổi [16]. Cụ thể, một hỗn dịch liposome sắt được điều chế bằng cách trộn một hỗn hợp chứa lipid : glycerol (1:1, w/w) với một dung dịch nước chứa sắt sulfate và ascorbic acid (AA), với tỷ lệ $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}/\text{AA}$ là 10: 1 (w/w) [3; 25]. Nồng độ lipid cuối cùng là khoảng 30 mg/mL, tỷ lệ trọng lượng sắt sulfate/lipid = 0,365 (w/w) [10]. Hai dung dịch nói trên được trộn lẫn với nhau bằng cách khuấy từ với tốc độ 200 vòng/phút cho đến khi thu được một hỗn hợp đồng nhất màu nâu nhạt, dung dịch được để ổn định ở nhiệt độ phòng trong hai giờ [3]. Hỗn dịch liposome được siêu âm trong bồn nước đá 5 phút [30], sử dụng máy siêu âm đầu dò Cole-Parmer công suất 500 W, biên độ 40%, tần số 20 kHz.

Sau đó, các mẫu tươi (10 mL) được bổ sung sucrose với tỷ lệ sucrose/lipid = 5 : 1 (w/w) và 8 : 1 (w/w) được làm đông lạnh nhanh chóng bằng acetone đá khô, bảo quản ở -18°C qua đêm và đông khô trong 24 giờ bằng máy đông khô ModulyoD (Thermo Scientific, Mỹ), ở -55°C . Hai liposome đông khô được ký hiệu lần lượt là Lipo5.1 và Lipo8.1 được nghiền thành bột và bảo quản trong các lọ thủy tinh kín, ở 4°C trong tủ lạnh và tránh ánh sáng.

2.3. Quang phổ hồng ngoại (ATR-FTIR)

Phổ hồng ngoại được ghi lại bằng máy quang phổ hồng ngoại Nicolet iS50 (Thermo Electron Scientific) được trang bị phụ kiện tinh thể lăng kính ATR. Các mẫu liposome đông khô được đặt trên bề mặt tinh thể ATR và sau đó được đo trong khoảng từ 4000 đến 500 cm^{-1} với độ phân giải 4 cm^{-1} và 32 lần quét trung bình đối với mỗi phổ, ở nhiệt độ phòng.

2.4. Hình thái của liposome

Phân tích hình thái được thực hiện qua phép đo FESEM của mẫu bột được quan

sát bằng kính hiển vi điện tử quét phát xạ trường (FE-SEM) bằng thiết bị (HITACHI S-4800, Nhật Bản), ở điện áp 3 kV.

2.5. Kích thước và điện thế zeta

Kích thước hạt trung bình, chỉ số đa phân tán (PDI) và thế zeta của mẫu được thực hiện bằng phương pháp tán xạ ánh sáng động (DLS) sử dụng thiết bị Horiba SZ-100 (Horiba Ltd., Nhật Bản). Các mẫu được pha loãng 9 lần bằng nước khử ion ở nhiệt độ phòng, được chuyển vào các cuvet thích hợp và sử dụng góc phát hiện 90° [16].

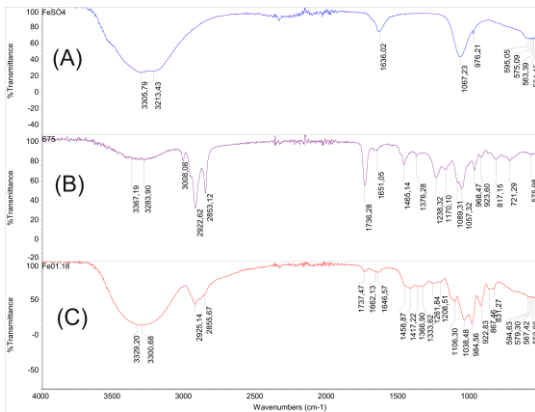
3. KẾT QUẢ VÀ THẢO LUẬN

3.1. Quang phổ hồng ngoại (ATR-FTIR)

Phổ FTIR-ATR của $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Hình 1A) nguyên chất thể hiện các đặc điểm đặc trưng của sắt sulfate ngậm nước, bao gồm dải kéo dài O–H rộng trong vùng $3305\text{--}3213\text{ cm}^{-1}$ và một dải rõ ràng ở 1636 cm^{-1} được quy cho dao động uốn H–O–H của nước kết tinh và các dao động đặc trưng cho ion sulfate ở 1067 cm^{-1} , 976 cm^{-1} và vùng thấp $600\text{--}550\text{ cm}^{-1}$ [14]. Lecithin (Hình 1B) thể hiện các đặc điểm điển hình của phospholipid, bao gồm các dải kéo dài $\text{--CH}_2\text{--}$ bất đối xứng và đối xứng ở 2925 và 2856 cm^{-1} , dải carbonyl ester (C=O) ở 1736 cm^{-1} và các dao động liên quan đến phosphate trong phạm vi $1238\text{--}1057\text{ cm}^{-1}$ được quy cho sự kéo dài P=O và P–O–C của nhóm đầu phosphocholine [20; 26].

Ở mẫu liposome sắt sulfate đông khô (Hình 1C), các dải $\text{--CH}_2\text{--}$ tại ~ 2925 và $\sim 2856\text{ cm}^{-1}$ vẫn được bảo toàn, cho thấy cấu trúc chuỗi lipid của lecithin không bị phá hủy trong quá trình tạo liposome và đông khô. Các dải O–H rộng trong vùng $3329\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$ được quy cho sự chồng lấp của các nhóm hydroxyl từ sucrose và

glycerol [5], phù hợp với cơ chế thủy tinh hóa và thay thế nước [26]. Đáng chú ý, dải dao động uốn H–O–H đặc trưng của $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ở $\sim 1636 \text{ cm}^{-1}$ biến mất, và các dải liên quan đến sulfate bị suy giảm đáng kể và chồng chéo lên nhau, chứng tỏ sắt sulfate không còn tồn tại dưới dạng pha tinh thể ngậm nước tự do. Đồng thời, các dải liên quan đến phosphat của lecithin cho thấy sự mở rộng và dịch chuyển nhẹ, phản ánh những thay đổi trong môi trường cục bộ của các nhóm đầu phospholipid ở trạng thái rắn. Những thay đổi quang phổ này phù hợp với sự kết hợp và che chắn của sắt sulfate bên trong ma trận liposome đông khô, nơi các tương tác giữa các nhóm đầu phospholipid và các tá dược giàu hydroxyl như sucrose và glycerol. Nhìn chung, kết quả FTIR-ATR cung cấp bằng chứng cho thấy sự hình thành của liposome chứa sắt sulfate đông khô được ổn định trong ma trận sucrose và glycerol.

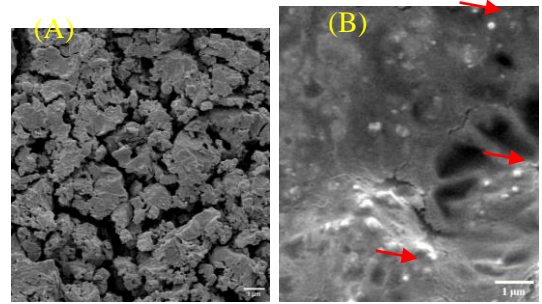


Hình 1. Phổ FTIR ATR của (A) $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, (B) Lecithin, (C) Lipo8.1

3.2. Hình thái của liposome sắt sulfate đông khô

Hình thái của $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ và liposome sắt sulfate đông khô được thể hiện trong hình 2. Ảnh FESEM của $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (Hình 2A) cho thấy vật liệu tồn tại dưới dạng các hạt tinh thể kết tụ không đều, với kích thước ở thang sub-micron đến

micron và bề mặt gồ ghề, có cạnh tương đối sắc.



Hình 2. Ảnh hiển vi điện tử quét (SEM) của (A) $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ và (B) Lipo8.1. Các hình ảnh được chụp với độ phóng đại 5000x.

Hình thái này phản ánh bản chất tinh thể của muối sắt(II) ngậm nước, đồng thời cho thấy xu hướng kết tụ mạnh do tính hút ẩm và khả năng mất nước cục bộ trong điều kiện chân không FESEM [2]. Ngược lại, ảnh SEM (Hình 2B) của bột liposome sắt sulfate sau đông khô xác nhận sự hình thành nanoliposome là cái túi hình cầu. Những quan sát này phù hợp với kết quả đã được công bố trước đây về liposome phủ chitosan chứa sắt(II) sulfate [21] và các liposome chứa oxit kẽm [23] bằng hình ảnh SEM.

3.3. Kích thước hạt, PDI và điện thế zeta

Dựa trên các quan sát trước đây, chúng tôi thấy rằng các tỷ lệ sucrose/lipid là 5 : 1 đến 8 : 1 (w/w) cho thấy mang lại hiệu quả bảo vệ đông lạnh/đông khô tốt cho các liposome đông khô [1; 6; 11; 26].

Do đó trong nghiên cứu này, chúng tôi đã tiến hành nghiên cứu về đặc tính hạt của các liposome sắt sulfate đông khô ở hai tỷ lệ sucrose/lipid là 5 : 1 (Lipo5.1) và 8:1 (Lipo8.1), hai mẫu đông khô sẽ được so sánh với mẫu tươi (chưa đông khô). Kết quả đo kích thước hạt và điện thế zeta của 3 mẫu được thể hiện trong bảng 1. Sau đông khô, kích thước trung bình tăng từ 134 nm (mẫu tươi) lên 194 nm (Lipo5.1) và 180 nm (Lipo8.1), đồng thời PDI tăng (0,24 → 0,34 / 0,28). Những thay đổi này

chỉ ra một phần kết tụ/ít đồng nhất sau tái phân tán; tỉ lệ sucrose cao hơn (8:1) cải thiện phần nào hồi phục kích thước và phân bố, phù hợp với vai trò lyoprotectant đã được báo cáo [11; 26]. Những kết quả

này cho thấy nồng độ sucrose cao hơn giúp cải thiện đáng kể khả năng bảo vệ khỏi đông khô và tái tạo liposome sau hydrat hóa.

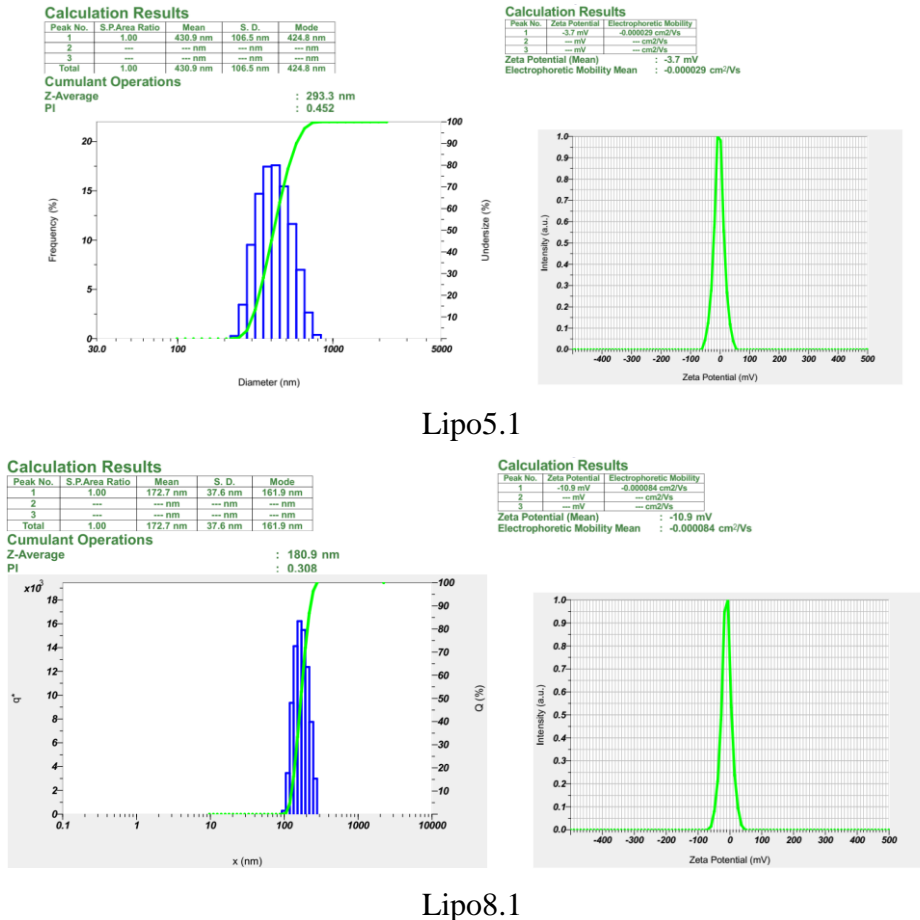
Bảng 1. Kích thước hạt, PDI và điện thế zeta của 3 mẫu liposome sắt(II) sulfate. Kết quả được biểu thị dưới dạng trung bình của ba lần đo và được báo cáo cùng với độ lệch chuẩn (SD).

Mẫu	Kích thước (nm)	PDI	Điện thế Zeta (mV)
Liposome (tươi, chưa đông khô) ± SD	133,9 ± 2,80	0,241 ± 0,044	-11,00 ± 0,26
Lipo5.1 (sucrose:lipid 5:1, w/w) ± SD	193,6 ± 5,32	0,342 ± 0,048	-6,73 ± 0,21
Lipo8.1 (sucrose:lipid 8:1, w/w) ± SD	180,3 ± 3,55	0,276 ± 0,079	-11,50 ± 0,92

3.4. Độ ổn định của liposome sắt sulfate đông khô

Hai công thức liposome đông khô Lipo5.1 và Lipo8.1 được bảo quản trong các lọ thủy tinh màu hổ phách ở nhiệt độ 4 °C trong 7 ngày. Để kiểm tra các đặc tính về

kích thước hạt và thế zeta của chúng, trước khi đo các mẫu đông khô được phân tán lại trong nước deion để đạt nồng độ lipid ban đầu. Quá trình hydrat hóa được hoàn tất trong vòng 5 phút bằng máy lắc ở nhiệt độ phòng.



Hình 3. Kích thước hạt và điện thế zeta của Lipo5.1 và Lipo8.1 sau 7 ngày ở 4 °C.

Dữ liệu về độ ổn định của liposome đông khô được thể hiện trong Hình 3. Kết quả cho thấy, rõ ràng mẫu Lipo8.1 có độ ổn định tuyệt vời về các chỉ số kích thước hạt (180,9 nm), PDI (0,308) và thế zeta (-10,9 mV). Ngược lại, mẫu Lipo5.1 cho thấy, các chỉ số về kích thước hạt (293,3 nm) và PDI (0,452) và thế zeta (-3,7) đều tăng mạnh so với mẫu Lipo8.1 và liposome tươi (Xem bảng 1) sau 7 ngày bảo quản. Điều này cho thấy tỷ lệ sucrose/lipid = 8 : 1 (w/w) hiệu quả vượt trội so với tỷ lệ 5 : 1, điều này cũng có nghĩa là mặc dù trong thành phần của công thức liposome đã có sẵn glycerol được coi là chất bảo vệ đông lạnh, tuy nhiên một tỷ lệ cao của sucrose/lipid là cần thiết cho khả năng bảo vệ của các liposome sắt(II) sulfate đông khô dựa trên glycerol.

4. KẾT LUẬN

Nghiên cứu này chứng minh rằng sucrose đóng vai trò quan trọng trong việc bảo tồn các tính chất lý hóa của liposome sắt(II) sulfate gốc glycerol trong quá trình đông khô. Việc bổ sung sucrose đã làm giảm thiểu hiệu quả tổn thương màng do đông khô và mất nước gây ra, dẫn đến cải thiện phân bố kích thước hạt, độ phân tán và điện thế zeta sau khi tái hydrat hóa. Trong số các công thức được nghiên cứu, tỷ lệ khối lượng sucrose/lipid là 8:1 (w/w) cho thấy khả năng ổn định vượt trội so với tỷ lệ 5 : 1, cho thấy tác dụng bảo vệ phụ thuộc vào nồng độ. Việc sử dụng kết hợp glycerol vừa làm dung môi vừa làm chất bảo vệ đông lạnh nội tại, cùng với sucrose làm chất bảo vệ đông khô, là một chiến lược đơn giản và hiệu quả để sản xuất liposome sắt(II) sulfate đông khô ổn định trong tương lai. Theo hiểu biết của chúng tôi, đây là báo cáo đầu tiên về phương pháp đông khô có hỗ trợ sucrose đối với liposome sắt(II) sulfate dựa trên glycerol. Những phát hiện này tạo nền tảng cho việc phát triển các chế phẩm sắt liposome

dạng rắn với độ ổn định được cải thiện và tiềm năng ứng dụng trong điều trị thiếu máu do thiếu sắt. Các nghiên cứu về độ ổn định dài hạn, cũng như các đặc tính lý hóa khác đang được tiến hành trong phòng thí nghiệm của chúng tôi.

Lời cảm ơn: Nghiên cứu này được tài trợ bởi Viện Hàn lâm Khoa học và Công nghệ Việt Nam (VAST), theo mã số tài trợ NVCC06.01/25-25.

Cam kết: Tôi xin cam đoan đây là công trình của nhóm nghiên cứu và chưa gửi đăng nội dung này ở bất kỳ tạp chí nào.

TÀI LIỆU THAM KHẢO

- [1] Guimarães D, and others, (2019). Protective Effect of Saccharides on Freeze-Dried Liposomes Encapsulating Drugs. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, **7**, 424.
- [2] Ali A, Zhang N, Santos R M, (2023). Mineral Characterization Using Scanning Electron Microscopy (SEM): A Review of the Fundamentals, Advancements, and Research Directions. *Applied Sciences*, **13(23)**, 12600.
- [3] Bochicchio S, Dalmoro A, Lamberti G, Barba A A, (2020). Advances in Nanoliposomes Production for Ferrous Sulfate Delivery. *Pharmaceutics*, **12(5)**, 445.
- [4] Crowe J H, Oliver A E, Hoekstra F A, Crowe L M, (1997). Stabilization of Dry Membranes by Mixtures of Hydroxyethyl Starch and Glucose: The Role of Vitrification. *Cryobiology*, **35(1)**, 20-30.
- [5] Chamorro A F, Lerma T A, Palencia M, (2024). CTAB Surfactant Promotes Rapid, Efficient, and Simultaneous Removal of Cationic and Anionic Dyes through Adsorption on Glycerol/Citrate Polyester. *Water*, **16(13)**, 1860.
- [6] Chaudhury A, and others, (2012).

- Lyophilization of cholesterol-free PEGylated liposomes and its impact on drug loading by passive equilibration. *International Journal of Pharmaceutics*, **430(1)**, 167-175.
- [7] Franzé S, and others, (2018). Lyophilization of Liposomal Formulations: Still Necessary, Still Challenging. *Pharmaceutics*, **10(3)**, 139.
- [8] Gardner W M, and others, (2023). Prevalence, years lived with disability, and trends in anaemia burden by severity and cause, 1990-2021: findings from the Global Burden of Disease Study 2021. *The Lancet Haematology*, **10(9)**, e713-e734.
- [9] Gopi S, Balakrishnan P. 2022. *Liposomes for Functional Foods and Nutraceuticals: From Research to Application*. CRC Press.
- [10] Gupta C, Chawla P, Arora S, (2015). Development and evaluation of iron microencapsules for milk fortification. *CyTA - Journal of Food*, **13(1)**, 116-123.
- [11] Kannan V, Balabathula P, Thoma L A, Wood G C, (2015). Effect of sucrose as a lyoprotectant on the integrity of paclitaxel-loaded liposomes during lyophilization. *Journal of Liposome Research*, **25(4)**, 270-278.
- [12] Koster K L, Webb M S, Bryant G, Lynch D V, (1994). Interactions between soluble sugars and POPC (1-palmitoyl-2-oleoylphosphatidylcholine) during dehydration: vitrification of sugars alters the phase behavior of the phospholipid. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, **1193(1)**, 143-150.
- [13] Li N, and others, (2020). The Efficacy and Safety of Vitamin C for Iron Supplementation in Adult Patients With Iron Deficiency Anemia: A Randomized Clinical Trial. *JAMA Network Open*, **3(11)**, e2023644-e2023644.
- [14] Marta U, Măluț an T, Ciovița S, (2009). Iron gall inks influence on papers' thermal degradation FTIR spectroscopy applications. *European Journal of Science and Theology*, **5**, 71-84.
- [15] Nakhla T, Marek M, Kovalcik T, (2002). Issues associated with large-scale production of liposomal formulations. *Drug Deliv. Technol*, **2**, 1-6.
- [16] Võ Ngọc Bình, Đào Thu Nga, Trần Thị Yến, Ngô Quốc Anh, (2025). Điều chế và đặc tính của công thức liposome sắt sulfate: ảnh hưởng của tỷ lệ sắt-phospholipid. *Tạp chí Khoa học và Công nghệ Trường Đại học Công nghiệp Hà Nội*. 61(3), 172-178.
- [17] Ohtake S, Schebor C, Palecek S P, de Pablo J J, (2005). Phase behavior of freeze-dried phospholipid-cholesterol mixtures stabilized with trehalose. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, **1713(1)**, 57-64.
- [18] Ozaki K, Hayashi M, (1996). Cryoprotective Effects of Cycloinulohexaose on Freezing and Freeze-Drying of Liposomes. *Chemical & Pharmaceutical Bulletin*, **44(11)**, 2116-2120.
- [19] Paserin D, and others, (2023). Coating Materials to Increase the Stability of Liposomes. *Polymers*, **15(3)**, 782.
- [20] Pohle W, and others, (2001). FTIR-spectroscopic characterization of phosphocholine-headgroup model compounds. *Journal of Molecular Structure*, **563-564**, 463-467.
- [21] Shirnough N, Emamifar A, Davati N, (2025). Preparation and characteristics evaluation of chitosan-coated nanoliposomes containing ferrous sulfate. *Scientific Reports*, **15(1)**, 19161.
- [22] Slade L, Levine H, (1995). Glass Transitions and Water-Food Structure Interactions. In John E. Kinsella and Steve L. Taylor (eds.), *Advances in Food and Nutrition Research*, **38**, 103-269. Academic Press.
- [23] Sourì P, Emamifar A, Davati N, (2023).

- Physical and Antimicrobial Properties of Nano-ZnO-loaded Nanoliposomes Prepared by Thin Layer Hydration-Sonication and Heating Methods. *Food and Bioprocess Technology*, **16(8)**, 1822-1836.
- [24] Stark B, Pabst G, Prassl R, (2010). Long-term stability of sterically stabilized liposomes by freezing and freeze-drying: Effects of cryoprotectants on structure. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **41(3)**, 546-555.
- [25] Suryani A, Laksitorini M D, Sulaiman T N S, (2024). Ferrous fumarate nanoliposomes: Formulation, characterization, and diffusion profiles. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, **14(5)**, 157-165.
- [26] Sylvester B, and others, (2018). Formulation Optimization of Freeze-Dried Long-Circulating Liposomes and In-Line Monitoring of the Freeze-Drying Process Using an NIR Spectroscopy Tool. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, **107(1)**, 139-148.
- [27] Szostak-Paluch K, Drabik D, Jędruchiewicz N, Dwornikowska-Dąbrowska M, (2024). In vitro studies of a novel liposomal formulation for safe and efficient iron delivery. *European Journal of Lipid Science and Technology*, **126(2)**, 2300217.
- [28] Taladrid D, and others, (2017). Effect of chemical composition and sonication procedure on properties of food-grade soy lecithin liposomes with added glycerol. *Food Research International*, **100**, 541-550.
- [29] Tolkien Z, and others, (2015). Ferrous Sulfate Supplementation Causes Significant Gastrointestinal Side-Effects in Adults: A Systematic Review and Meta-Analysis. *PLOS ONE*, **10(2)**, e0117383.
- [30] Xia S, Xu S, (2005). Ferrous sulfate liposomes: preparation, stability and application in fluid milk. *Food Research International*, **38(3)**, 289-296.