

تهیه و ارزیابی نانوامولسیون خوراکی ویتامین E با روش خودبه خودی

نوشین نیک نیا¹، بابک قنبرزاده²، حامد همیشه کار³، رضا رضایی مکرم⁴، امیرمحمد مرتضویان⁵

- 1- دانشجوی کارشناسی ارشد مهندسی علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران
- 2- نویسنده مسئول: دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران، پست الکترونیکی: Ghanbarzadeh@tabrizu.ac.ir
- 3- استادیار مرکز تحقیقات دارویی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران
- 4- استادیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز، ایران
- 5- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، انستیتو تحقیقات تغذیه‌ای و صنایع غذایی کشور، دانشکده علوم تغذیه و صنایع غذایی، دانشگاه علوم پزشکی شهید بهشتی، تهران، ایران

تاریخ دریافت: 92/3/2

تاریخ پذیرش: 92/6/20

چکیده

سابقه و هدف: از نانوامولسیون‌های روغن در آب به طور وسیع به منظور غنی‌سازی ترکیبات فعال زیستی لیپوفیل در نوشیدنی‌های خوراکی استفاده می‌شوند. در کشور ما، پژوهش در این زمینه با روش‌های پرانرژی امکان پذیر نیست. به همین دلیل هدف از این پژوهش، تولید نانوامولسیون خوراکی حاوی ویتامین E استات با روش کم‌انرژی تولید خودبه خودی بود.

مواد و روش‌ها: امکان تشکیل نانوامولسیون در پنج سطح نسبت سورفاکتانت به روغن (SOR) 10، 16، 50 و 66 و 83 درصد، در مقدار ثابت آب (16/7٪ وزنی/وزنی فاز روغن) با دو نوع توپین 20 و 80 بررسی گردید. تأثیر مقدار فاز پیوسته و دما بر تولید، در سطوح 28/6 و 50 درصد وزنی/وزنی فاز روغنی به ترتیب در مورد هر دو نوع سورفاکتانت و توپین 80 نیز بررسی شد. آزمون‌های کدورت، پایداری و خواص رئولوژیکی نیز برای تعیین خصوصیات فیزیکوشیمایی انجام گرفتند.

یافته‌ها: سیستم بهینه در $SOR = 16\%$ - توپین 80 تولید شد و میانگین حجمی قطر قطرات، 78 نانومتر بود. نتایج، نشان دهنده وابستگی شدید تولید با این روش به نوع سورفاکتانت بود، همچنین در $SOR\%$ بهینه، تغییر دادن مقدار فاز پیوسته و دما، تأثیری بر قطر قطرات تولیدی نداشت. غلظت بهینه افزودن نانوامولسیون بهینه با در نظر گرفتن حداکثر مقدار مجاز دریافت روزانه بدن خصوصیات جریان و ظاهری نهایی نوشیدنی خوراکی، 0/003٪ تعیین شد. تغییری در قطر قطرات نانوامولسیون بهینه در دمای $20^{\circ}C$ در مدت 30 روز نگهداری، مشاهده نشد.

نتیجه گیری: با تنظیم کردن SOR، تغییر دادن مقدار آب و دمای محیط تأثیری بر تولید نداشته و قطر قطرات سیستم‌های تولیدی در این شرایط بهینه، در طول مدت نگهداری 30 روز تغییری از خود نشان نمی‌دهند.

واژگان کلیدی: نانوامولسیون، ویتامین E- استات، تولید خودبه خودی، توپین 80 و توپین 20

• مقدمه

اسیدهای چرب چند غیراشباعی در غشاهای لیپوپروتئین‌های کم دانیسته (LDL) محافظت می‌کند، چسبندگی پلاکت‌ها در خون را کاهش می‌دهد، تکثیر سلولی ماهیچه‌های صاف را مهار می‌کند و همچنین از فعالیت پروتئین کیناز C جلوگیری می‌نماید (3، 4). اما، منابع غذایی این ویتامین کافی نیست و از طرف دیگر، حلالیت کم α -توکوفرول در آب و حساسیت به اکسیداسیون و دماهای بالا، مشکل اصلی استفاده از آن در غنی سازی و فرمولاسیون مواد غذایی است

ویتامین E، ترکیبی محلول در چربی و مهمترین آنتی‌اکسیدان طبیعی بدن بوده و سیستم ایمنی بدن را تقویت کرده و از بیماری‌های عروق کرونری قلب جلوگیری می‌نماید. آن چندین ایزومر دارد که شامل α ، β ، γ ، δ -توکوفرول و توکوترینول ها می‌باشند و فعالیت زیستی و دسترسی زیستی (Bioavailability) هر کدام متفاوت بوده و در بین توکوفرول‌ها، α -توکوفرول بیشترین فعالیت زیستی را داراست (1، 2). ویتامین E در شکل α -توکوفرول، از

در پژوهشی برای تولید نانوامولسیون با روش پراورزی از میکروفلودایزر برای تولید نانوذرات حاوی ویتامین E استفاده شد که اندازه ذرات حدوداً 100 نانومتر بودند (4). در اکثر پژوهش‌هایی که اخیراً برای تولید نانوامولسیون، در هر دو نوع روش کم و پراورزی صورت گرفته است، از حلال‌های صنعتی برای تولید و نیز کوچکتر نمودن قطر قطرات، استفاده شده است که این، کاربرد آن‌ها را در صنعت غذا محدود می‌کند. در تولید نانوامولسیون با روش‌های کم‌انرژی، از غلظت‌های بالایی سورفاکتانت استفاده می‌شود به علاوه اکثر سورفاکتانت‌های مورد استفاده کاربرد خوراکی ندارند (10-16). در این پژوهش، امکان تولید نانوامولسیون خوراکی حاوی ویتامین E بر اساس روش خودبه‌خودی و بدون استفاده از حلال و مصرف حداقل مقدار سورفاکتانت، مورد بررسی قرار گرفت و نشان داده شد که روش‌های کم‌انرژی همانند روش‌های پراورزی کارایی بالایی در تولید قطرات زیر 100 نانومتر را دارند. سپس تأثیر نسبت دو سورفاکتانت توپین 80 و توپین 20 به فاز روغن (SOR%) و سپس تأثیر نسبت فاز روغنی به آبی در قطر قطرات و توزیع اندازه آن‌ها مطالعه شد. مطالعه ویژگی‌های نوری، رئولوژیکی و نیز پایداری در برابر تغییر قطر قطرات فرمولاسیون بهینه در برابر رقیق‌سازی نیز، از بخش‌های دیگر این پژوهش بود.

• مواد و روش‌ها

مواد: ویتامین E- استات با خلوص 99%، ترکیبات فعال سطحی پلی اکسی اتیلن (20) سوربیتان مونوالات -توین 80 با وزن مولکولی 1310 گرم بر مول (HLB=15) و پلی اکسی اتیلن (20) سوربیتان مونوالات -توین 20 با وزن مولکولی 1227 گرم بر مول (HLB=16/7) به ترتیب از شرکت های داروسازی زهراوی، مرک آلمان و اسکارلو اسپانیا خریداری شد. در تمامی فرمولاسیون ها از آب مقطر استفاده شد.

روش های تولید: روش تولید نانوامولسیون ویتامین E- توپین 80 و توپین 20: برای تولید نانوامولسیون، فاز آلی حاوی سورفاکتانت هیدورفیل و ویتامین E به عنوان فاز روغن به فاز آبی اضافه شد (7). سرعت اضافه شدن فاز آلی به آبی در تهیه تمامی فرمولاسیون‌ها ثابت بود. پس از اتمام ریختن فاز روغن، اجازه داده شد تا سیستم به منظور رسیدن به حالت تعادل، همزه شوند.

بررسی تأثیر غلظت سورفاکتانت: به منظور بررسی تأثیر غلظت سورفاکتانت بر تولید و توزیع قطر قطرات از دو فاکتور

و منجر به دسترسی زیستی ناکافی می‌شود، به همین دلیل از فرم استات آن در صنعت داروسازی، غذا و مکمل‌های غذایی استفاده می‌شود. زیرا پایداری شکل استات آن بیشتر از حالت آزاد است (5). نانودیسپرسسیون‌ها (Nanodispersions)، روش امیدوارکننده‌ای برای غلبه بر مشکلات مربوط به حلالیت پایین و دسترسی زیستی این ترکیبات هستند و از آن‌ها برای طراحی و تولید سیستم‌های حامل (Delivery Systems) لیپیدی استفاده می‌شود. در سال‌های اخیر، از نانوامولسیون‌ها برای پایداری و تحویل داروهای کم محلول در آب استفاده می‌شود، اما اخیراً فرمولاسیون نانوامولسیون های حاوی مواد زیست فعال و غذا- داروهای (Nutraceuticals) شدیداً لیپوفیل در تولید نوشابه‌ها، غذاهای مایع و ژل‌ها نیز مورد هدف‌های پژوهشی قرار گرفته است (6). نانوامولسیون‌های روغن در آب، حاوی قطرات کوچک روغن با قطر کمتر از 100 نانومتر هستند که در میان یک فاز پیوسته آبی پراکنده شده‌اند و هر قطره روغن توسط مولکول‌های امولسیفایر به صورت لایه‌ای نازک احاطه شده است (7). نانوامولسیون‌ها نسبت به امولسیون‌های متداول (ماکروامولسیون‌ها) مزایای متعددی دارند که مهم‌ترین آن‌ها عبارتند از (8-10):

- دسترسی زیستی و حلالیت بالاتر به علت نسبت سطح به حجم بالاتر قطرات؛
 - شفافیت بالاتر به علت کوچکتر بودن اندازه ذرات از طول موج نور؛
 - پایداری فیزیکی و سنتیکی بالاتر به علت تفکیک گرانشی، انبوهش و هم‌آمیختن کمتر قطرات.
- روش‌های تولید نانوامولسیون‌ها را می‌توان به دو دسته کم‌انرژی و پراورزی تقسیم کرد: در روش‌های پراورزی از تجهیزات مکانیکی مانند میکروفلودایزرها و هموژنایزرهای فشار بالا برای تولید استفاده می‌شود در حالی که روش‌های کم‌انرژی به شدت وابسته به کنترل پدیده‌های بین‌سطحی و برگشت فاز هستند (6). مهم‌ترین روش‌های کم‌انرژی شامل روش خودبه‌خودی (Spontaneous Emulsification)، برگشت فاز از طریق افزایش حجم فاز پیوسته (روش نقطه معکوس شدن امولسیون (Emulsion Inversion Point)، برگشت فاز توسط تغییر دما (روش دمای برگشت فاز (Phase-Inversion Temperature) و برگشت فاز با تغییر ترکیب امولسیون (Phase Inversion Composition) می‌باشند (7, 11).

کل قطرات موجود در سیستم را تشکیل می‌دهد، می‌باشند. در مورد فرمولاسیون بهینه، رقیق سازی امولسیون اولیه با آب مقطر انجام شد (14).

بررسی پایداری قطر قطرات امولسیون‌ها در طول مدت نگهداری: به منظور بررسی پایداری نسبت به پدیده های ناپایدار کننده ی امولسیون (تفکیک گرانشی، انبوهش، ادغام و رسیدگی استوالد)، قطر قطرات تمامی نمونه ها (در دمای 30°C تولید شده بودند) به طور مدت به ترتیب یک شب پس از تولید، هشت، بیست و سی روز پس از تولید اندازه گرفته شد. نمونه‌ها در دمای محیط (20°C) نگهداری شده بودند (13).

اندازه گیری خواص رئولوژیکی پایا: خصوصیات جریان پذیری کلیه امولسیون های تهیه شده $16/7\%$ وزنی/وزنی، در دمای محیط توسط دستگاه رئومتر Physica Anton Paar (مدل MCR 301 ساخت کشور اتریش) مجهز به رئومتری استوانه‌های هم مرکز تعیین شد برای اندازه‌گیری تنش برشی و ویسکوزیته به صورت تابعی از سرعت برشی و تعیین نوع رفتار جریانی نمونه‌ها در یک فاصله زمانی 10 دقیقه، سرعت برشی از 2 S^{-1} به 100 S^{-1} رسید، سپس به منظور توصیف رفتار جریانی، مدل قانون توان ($\tau = K\dot{\gamma}^n$) بر داده‌های تجربی برازش داده شد و ضریب قوام و اندیس جریان تعیین گردید (12).

اندازه‌گیری کدورت: کدورت فرمولاسیون بهینه در طول موج 600 نانومتر با استفاده از اسپکتروفتومتر uv-visible اندازه گرفته شد (مدل Ultraspec 2000، ساخت انگلیس). قبل از اندازه گیری، نمونه‌ها از غلظت 0 (آب مقطر به عنوان شاهد) تا $0/1\%$ با آب مقطر رقیق شدند. افزایش کدورت با محاسبه شیب خط منحنی کدورت در مقابل غلظت فاز روغن تعیین شد (16).

میکروسکوپ نوری و پلاریزه: از میکروسکوپ نوری مجهز به دوربین دیجیتال (Nikon Eclipse 80i, Melville, NY) به منظور بررسی خصوصیات بافتی امولسیون های تولیدی استفاده شد (12). پس از آماده سازی نمونه ها بر روی لام، از بزرگنمایی 10 و 100 برای مشاهده ی یکنواختی نمونه ها استفاده شد و از میکروسکوپ پلاریزه (Nikon Eclipse E800) به منظور مشاهده ترکیبات با خصوصیت بریفرینجس (Birefringence) استفاده شد (17). **تجزیه و تحلیل آماری:** 15 فرمولاسیون بر پایه توپین 80 در دو دمای 20°C و 30°C و 15 فرمولاسیون دیگر در دمای

و تغییر آن‌ها استفاده شد: 1- نخست غلظت سورفاکتانت (در نسبت ثابت آب) در مخلوط سورفاکتانت و روغن درصد SOR (Surfactant-Oil-Ratio) تغییر داده شد. برای این منظور مقادیر $1/8$ ، $1/7$ ، 1 ، $0/7$ و $0/3$ گرم ویتامین E و نیز مقادیر $0/2$ ، $0/3$ ، 1 ، $1/3$ و $1/7$ گرم توپین 80 وزن شدند (جدول 1). در ادامه، توپین، به ویتامین E اضافه شد و آن دو به خوبی مخلوط شدند. اضافه کردن فاز روغن (ویتامین E و توپین 80 و 20) به فازهای آبی در نسبت ثابت انجام شد. 2- به منظور بررسی تأثیر مجموع غلظت سورفاکتانت و روغن به کل امولسیون (وزنی/وزنی)، نسبت اولیه آب مورد استفاده برای تولید تغییر داده شد و از نسبت های $16/7\%$ ، $28/6$ و 50% استفاده شد. به این ترتیب مقدار آب اولیه مورد استفاده در تهیه 10، 5 و 2 گرم آب تعیین شد.

جدول 1. مقادیر وزنی و نسبت ویتامین E - استات و سورفاکتانت در تهیه امولسیون‌ها (نمونه در 3 تکرار)

16/7% وزنی/وزنی					
SOR	10	16	50	66	83
ویتامین E-استات	1/8	1/7	1	0/7	0/3
سورفاکتانت	0/2	0/3	1	1/3	1/7

SOR نسبت سورفاکتانت به مجموع روغن و روغن

تأثیر دما: تأثیر دمای تهیه امولسیون بر تولید و توزیع قطر قطرات با تغییر دادن دما و در دو دمای 20°C و 30°C در مورد سورفاکتانت توپین 80 مورد بررسی قرار گرفت. نمونه‌های توپین 20 فقط در دمای 30°C تولید شدند.

اندازه گیری قطر قطرات و پراکنش آن‌ها: برای اندازه گیری اندازه ذرات و توزیع آن‌ها از دستگاه اندازه گیری ذرات استفاده شد (Shimadzu, Sald, 2101 ساخت ژاپن). اندازه گیری‌ها بر روی نمونه‌ها یک شب پس از نگهداری آن‌ها انجام شد. و به علاوه آن‌ها 1000 برابر غلظت اولیه رقیق شدند. برای رقیق کردن نمونه ها از آب مقطر استفاده شد. در نهایت قطر قطرات براساس قطر حجمی متوسط (D_{43}) توسط دستگاه محاسبه و گزارش شد (14). برای محاسبه اندیس پراکنش قطرات از رابطه زیر استفاده شد:

$$\text{Span} = \frac{D(90\%) - D(10\%)}{D(50\%)}$$

در این رابطه (D_{90}) قطری که حجم قطرات کوچکتر از آن، 90% حجم کل قطرات موجود در سیستم را تشکیل می‌دهد؛ (D_{10}) قطری که حجم قطرات کوچکتر از آن، 10% حجم کل قطرات موجود در سیستم را تشکیل می‌دهد؛ (D_{50}) قطری که حجم قطرات کوچکتر از آن، 50% حجم

مجددا کاهش یافت که به تشکیل میکروامولسیون می‌توان نسبت داد. توپین 80 نسبت به توپین 20، توانایی تولید نانوامولسیون در غلظت پایین‌تر سورفاکتانت را داشت. در سیستم‌های حاوی توپین 20، برخلاف امولسیون‌های پایدار شده توسط توپین 80، با افزایش غلظت سورفاکتانت، میانگین قطر قطرات کاهش یافت و در غلظت‌های بسیار بالای سورفاکتانت ($SOR = 83\%$) احتمالاً میکروامولسیون با قطر حدود 30 نانومتر تشکیل شد (شکل 1-ب). غلظت بحرانی تشکیل میسل (CMC) توپین 80 و 20 به ترتیب 0/012 و 0/06 میلی مولار می‌باشد.

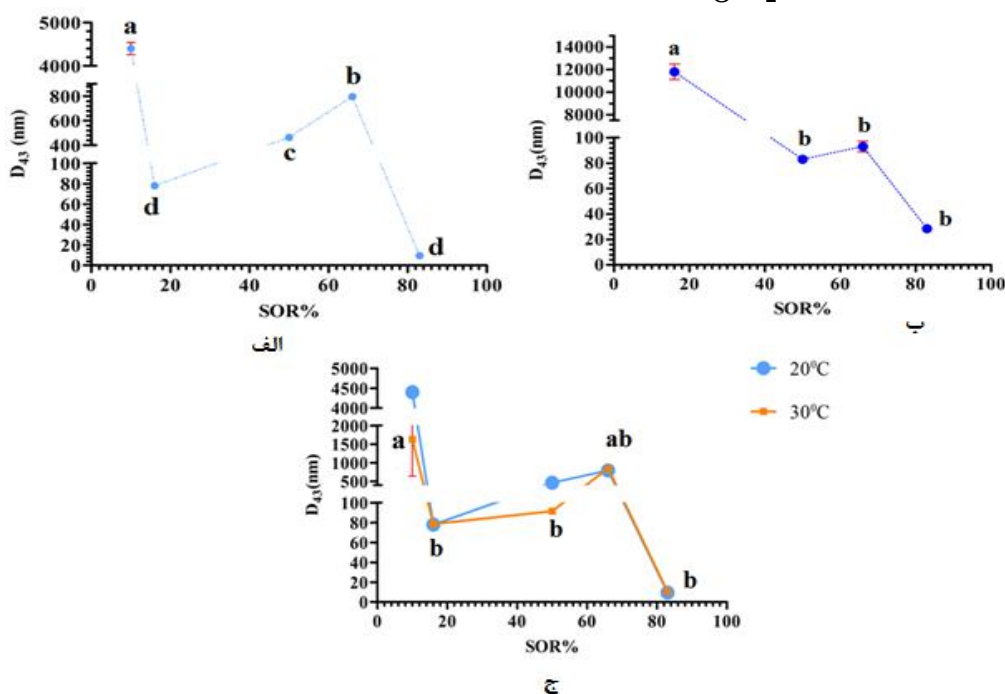
بررسی اثر دما: برای بررسی اثر دما، اندازه و توزیع قطر قطرات سیستم‌های پایدار شده توسط توپین 80، در دو دمای 20 و 30°C در SOR های مختلف اندازه‌گیری شد (شکل 1-ج). در دمای 30°C ، قطر قطرات در 10SOR و 50 % کمتر از قطر نمونه‌های تولید شده در دمای 20°C بودند. در مورد نمونه‌هایی که SOR آن‌ها برابر با 16، 66 و 83 % بود، با افزایش دما تغییر قابل ملاحظه‌ای در قطر قطرات تولیدی و پراکنش آن‌ها ایجاد نشد.

30°C در سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شدند. تحلیل و ارزیابی (ANOVA) با استفاده از مدل خطی (G.L.M) نرم افزار آماری (SPSS version 16.0 for Windows, SPSS Inc) در سطح احتمال 5% ($P < 0/05$) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای تأیید وجود اختلاف بین میانگین‌ها انجام گرفت.

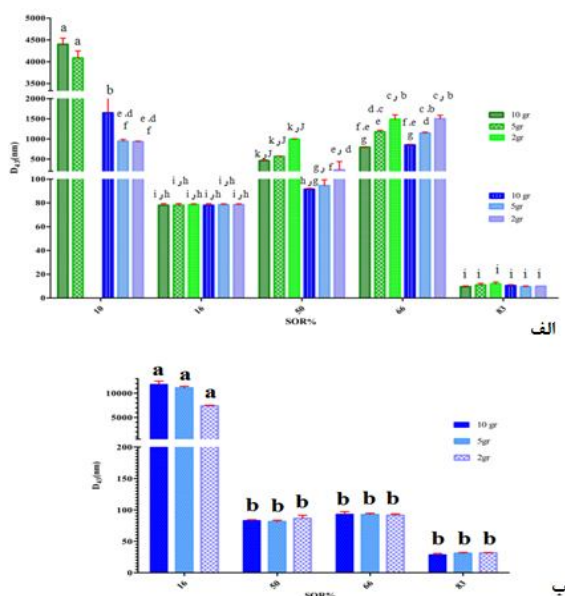
• یافته‌ها

قطر قطرات: بررسی قطر قطرات در پنج بخش مجزا انجام شد و یافته‌های زیر به دست آمد:

بررسی تأثیر نوع و نسبت سورفاکتانت به فاز روغنی (ویتامین E استات): باتوجه به شکل 1-الف در پایین‌ترین غلظت مورد استفاده سورفاکتانت توپین 80 به فاز روغنی ($SOR = 10\%$, $\frac{S}{O} = \frac{1}{9}$) و در دمای 30°C ، قطر قطرات بزرگتر از محدوده مقیاس نانو بود و ماکروامولسیون تشکیل شد. با افزایش غلظت سورفاکتانت، در $SOR = 16\%$ (یعنی $\frac{S}{O} = \frac{1}{5}$) نانوامولسیون تشکیل شد و سپس در $SOR = 50\%$ و 66 قطر قطرات دوباره افزایش یافت. در بالاترین غلظت مورد استفاده سورفاکتانت ($SOR = 83\%$, $\frac{S}{O} = \frac{5}{1}$)، قطر قطرات



شکل 1. الف و ب-به ترتیب تأثیر درصد SOR بر اندازه ی قطرات تولیدی در سیستم ویتامین E استات - توپین 80 و 20، ج- مقایسه تأثیر دما بر قطر قطرات تولیدی در سیستم ویتامین E استات - توپین 80.
(حروف غیرمشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح 5% آزمون دانکن می‌باشد)



شکل 2. الف-مقایسه تأثیر دما (30 و 20 درجه سانتی‌گراد به ترتیب رنگ های آبی و سبز) در مقادیر 16/7، 28/6 و 50% وزنی/وزنی آب در SOR% های مختلف توپین 80 و ب- تأثیر مقدار فاز پیوسته بر قطر قطرات تولیدی در SOR% های 16، 50، 66 و 83 (حروف غیرمشابه نشان دهنده وجود اختلاف معنی دار در سطح 5% در آزمون دانکن است)

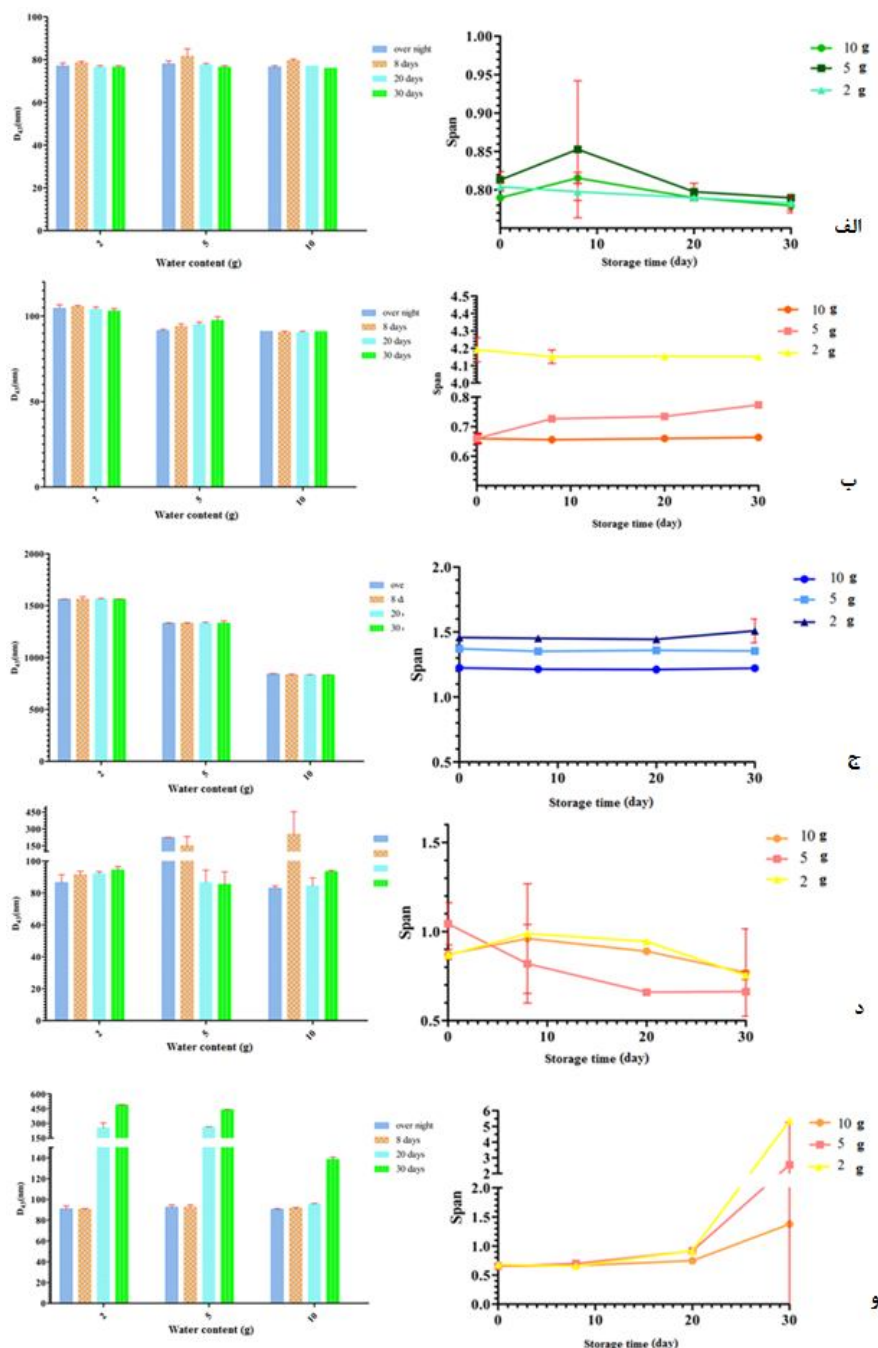
مقادیر اندازه و توزیع قطر قطرات در طول زمان نگهداری در شکل 3 ارائه شده‌اند. پایداری نانومولسیون‌ها بسته به نوع سورفاکتانت، نسبت SOR و مقدار آب در طول زمان نگهداری متفاوت بود. در سیستم حاوی توپین 80، در سطح SOR = 16%، سورفاکتانت-روغن در هر سه سطح 2، 5 و 10 گرم آب پس از 8 روز نگهداری، میانگین قطر قطرات افزایش یافته و در ادامه در روزهای 20 و 30 کاهش یافته و به سطح ثابت و پایداری رسید (شکل 3-الف). در SOR = 50% در مقادیر مختلف آب، رفتارهای متفاوتی مشاهده شد. بالاترین و کمترین اندازه قطر و توزیع، به ترتیب مربوط به سیستم حاوی 2 گرم و 10 گرم آب بود و با گذشت زمان، این روند ثابت ماند ولی در سطح 5 گرم آب، میانگین قطر قطرات افزایش یافت (شکل 3-ب). در نمونه‌های با SOR = 66% حاوی 10 گرم آب، در طول مدت نگهداری 30 روزه، پایدار بودند ولی در نمونه‌های تهیه شده در مقادیر 5 و 2 گرم آب، اگرچه در طول مدت نگهداری پراکنش اندازه ی قطرات تغییرات قابل ملاحظه‌ای نشان نداد ولی مشاهدات چشمی حاکی از وقوع ناپایداری در سیستم بود (شکل 3-ج). نمونه

تأثیر مقدار آب (فاز پیوسته): نتایج اثر مقدار فاز آبی بر قطر قطرات امولسیون در شکل‌های 2-الف و ب ارائه شده‌اند. بررسی اثر مقدار آب بر قطر قطرات در سیستم توپین 80 و در غلظت‌های مختلف سورفاکتانت نشان داد که در دمای 20°C در SOR = 10%، اندازه ی قطرات در دو سطح 10 و 5 گرم مشابه هم بودند ولی در سطح 2 گرم آب، بخش اعظم روغن وارد قطرات امولسیون نشده بود. در دمای 30°C میانگین قطر قطرات در هر سه سطح کاهش یافت و مشاهدات چشمی نمونه‌ها حاکی از امولسیفیه شدن بخش اعظم روغن در این دما نسبت به دمای 20°C بود. در SOR = 16% در مورد توپین 80، رقیق سازی در هر دو دما، تأثیری در قطر قطرات تولیدی نداشت. در SOR = 50% و دمای 20°C با رقیق سازی امولسیون، قطر قطرات کاهش یافت ولی در دمای 30°C تغییری در میانگین قطر قطرات در اثر رقیق سازی مشاهده نشد. در سطح SOR = 66% نمونه‌های توپین 80 در دو دمای 20 و 30°C در اثر رقیق سازی، میانگین قطر قطرات افزایش یافت. ولی در مورد توپین 20 و SOR = 16% برخلاف توپین 80، با رقیق سازی امولسیون، قطر قطرات افزایش یافت. در SOR = 50% رفتار متفاوتی در مقایسه با توپین 80 با رقیق سازی مشاهده شد؛ به طوریکه در مقدار آب 10 و 2 گرم، میانگین قطر اولیه قطرات و نیز توزیع آن‌ها همانند هم بودند ولی در سطح 5 گرم آب، میانگین قطر اولیه افزایش یافت. در سطح SOR = 66% رقیق سازی تأثیری در قطر قطرات نداشت. در SOR = 83% در مورد هر دو نوع سورفاکتانت، مقدار آب و دمای محیط تأثیری بر قطر قطرات نداشت.

بررسی پایداری قطر قطرات امولسیون‌ها در طول مدت نگهداری: نانومولسیون‌ها همانند امولسیون‌های متداول، سیستم‌های نیمه پایداری هستند و در طول زمان در اثر فرآیندهای فیزیکوشیمیایی مختلف اعم از تفکیک گرانشی، انبوهش، ادغام و رسیدگی استوالد دچار شکست می‌شوند. در مقایسه با امولسیون‌های متداول، نانومولسیون‌ها نسبت به پدیده‌های تفکیک گرانشی و انبوهش قطرات از پایداری بیشتری برخوردار هستند (6). ولی به علت کوچک بودن اندازه ذراتشان، به شدت مستعد رسیدگی استوالد می‌باشند. در این قسمت تأثیر اندازه ذرات بر پایداری فیزیکی نانومولسیون‌ها مورد بررسی قرار می‌گیرد.

افزایش یافت که در ادامه روند کاهشی به خود گرفت و در طول 30 روز نگهداری به سطح ثابت رسید (شکل 3-د). در $\text{SOR} = 66\%$ ، میانگین قطر اولیه قطرات تقریباً همانند هم بودند ولی در طول مدت نگهداری 30 روزه، هرسه نمونه تهیه شده در مقادیر مختلف آب، بزرگ شدن قطر میانگین را نشان دادند (شکل 3-و).

های تهیه شده با توپین 20 با $\text{SOR} = 50\%$ حاوی 2 گرم آب، در طول مدت نگهداری، میانگین قطر قطرات افزایش یافت ولی برعکس، در مقدار 5 گرم آب، میانگین قطر قطرات در طول 20 روز اول، به صورت چشمگیری کاهش یافت و در ادامه به مقدار ثابت رسید و در سیستم حاوی 10 گرم آب، 8 روز پس از تولید، قطر میانگین به مقدار قابل ملاحظه ای



شکل 3. پایداری و تغییر توزیع اندازه قطرات امولسیون های توپین 80 با $\text{SOR} = 16\%$ (الف)، با $\text{SOR} = 50\%$ (ب)، با $\text{SOR} = 66\%$ (ج)، توپین 20 با $\text{SOR} = 50\%$ (د) و $\text{SOR} = 66\%$ (و) در مقادیر 2، 5 و 10 گرم آب در مدت نگهداری

بررسی خصوصیات نوری: یک امولسیون را در صورتی می‌توان شفاف در نظر گرفت که کدورت آن کمتر از $0/05 \text{ cm}^{-1}$ باشد، کدورت نانوامولسیون در صورتی که قطر متوسط قطرات آن کمتر از 80 نانومتر باشد و به علاوه توزیع قطر قطرات در آن باریک باشد (اندیس پراکنش کمتر از 1)، زیر $0/05 \text{ cm}^{-1}$ خواهد بود که از لحاظ نوری شفاف بوده و مناسب برای استفاده در نوشیدنی‌های شفاف خواهد بود، غلظت روغنی که در آن، کدورت کمتر از $0/05 \text{ cm}^{-1}$ بود، تعیین شد که این غلظت 0/003% است.

بررسی خصوصیات رئولوژیکی: در مورد سیستم‌های حاوی ویتامین E استات تهیه شده با سورفاکتانت‌های توپین 20 و 80 بین تنش برشی و سرعت برشی در نمونه‌های حاوی مقادیر متفاوت ویتامین استات و سورفاکتانت، رابطه نسبتاً خطی وجود داشت که این رفتار موید رفتار نزدیک به رفتار نیوتنی می‌باشد (شکل 5-الف)، ویسکوزیته نمونه‌های توپین 80 در سرعت‌های برشی 20 تا 100 برثانیه در محدوده 2/1 تا 2/2 میلی پاسکال ثانیه بودند، نمونه‌های توپین 20 در همین محدوده سرعت برشی، دارای ویسکوزیته 1/4 تا 2/1 میلی پاسکال ثانیه بودند (شکل 5-ب).

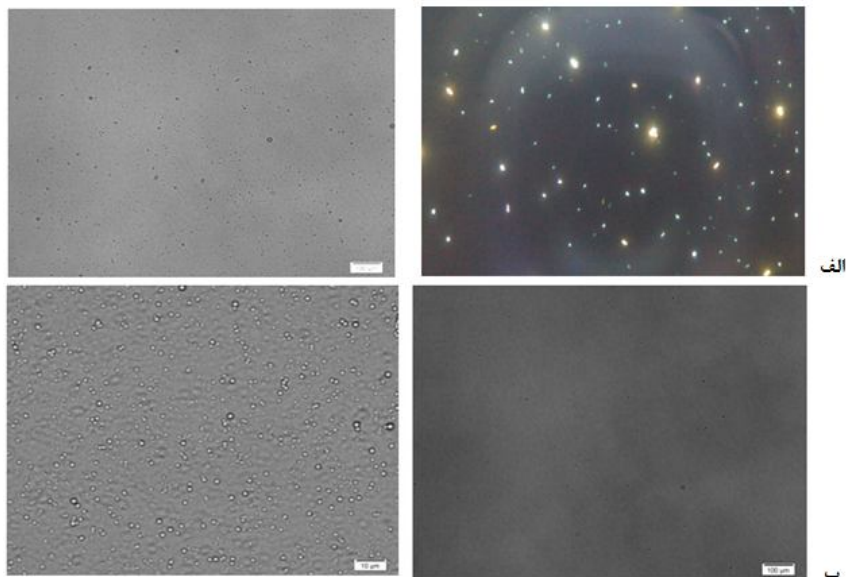
جدول 2. الف. پارامترهای محاسبه شده نمونه ویتامین E استات - توپین 80 (نمونه 4)

SOR%	شاخص جریان (n)	ضریب قوام $k(\text{mPa.s}^n)$	R^2
10	0/6847	5/81	90/17
16	0/9068	2/44	98/84
50	0/9664	2/08	98/73
66	0/9296	2/79	99/33

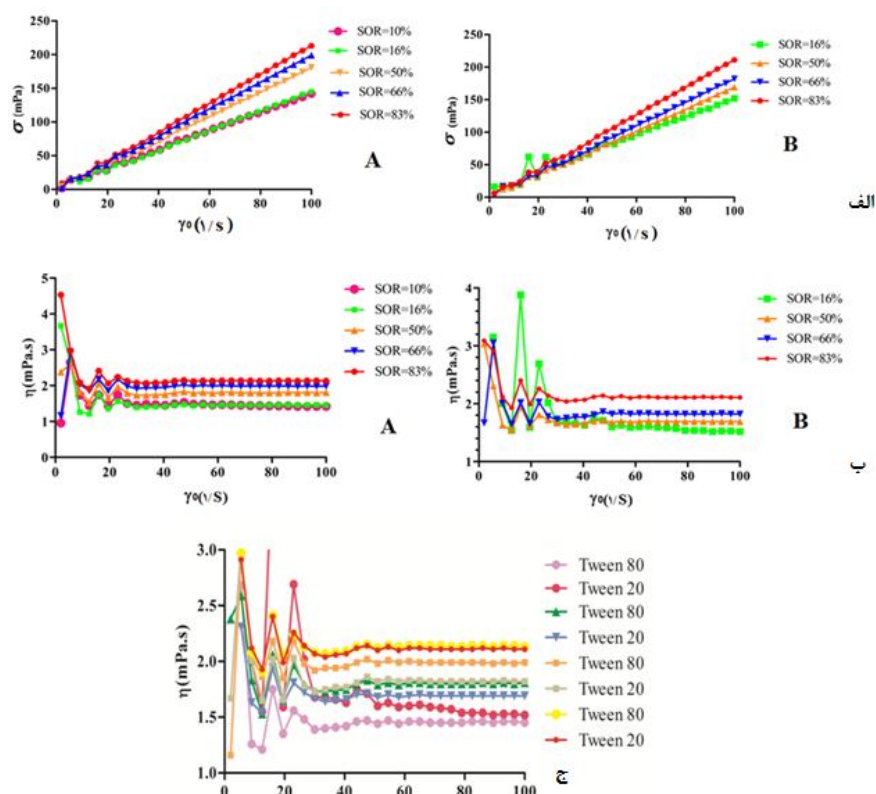
SOR نسبت سورفاکتانت به مجموع روغن و روغن، n شاخص جریان، k ضریب قوام (mPa: میلی پاسکال، s: ثانیه)، R^2 ضریب رگرسیون

جدول 2. ب. پارامترهای محاسبه شده برای نمونه ویتامین E استات - توپین 20 (نمونه 3)

SOR%	شاخص جریان (n)	ضریب قوام $k(\text{mPa.s}^n)$	R^2
16	0/8533	2/59	96/05
50	0/942	2/26	99/18
66	0/9833	1/75	98/33



شکل 4. الف- نمونه حاوی غلظت سورفاکتانت بالا (SOR = 66%) زیر میکروسکوپ نوری (سمت چپ) و میکروسکوپ پلاریزه (سمت راست با بزرگمایی 40)، ب- نمونه‌های با SOR = 66% تهیه شده در مقدار 5 گرم اولیه آب، تصویر سمت چپ نمونه بدون رقیق سازی زیر میکروسکوپ نوری، تصویر سمت راست با رقت 100



شکل 5. الف- نمودار تنش برشی - سرعت برشی برای نمونه های حاوی غلظت های مختلف سورفاکتانت (تویین 80: A - تویین ب- نمودار ویسکوزیته و سرعت برشی نمونه های تهیه شده در غلظت های مختلف سورفاکتانت تویین 80 (A) و تویین 20 (B) در مقدار ثابت 10 گرم آب، ج- نمودار ویسکوزیته و سرعت برشی نمونه های تویین 80 و 20 در غلظت های مختلف سورفاکتانت های 16% (دایره)، 50% (مثلث)، 66% (مربع)، 83% (شش ضلعی)

• بحث

بررسی تأثیر نسبت سورفاکتانت به ویتامین E استات :

در $SOR = 16\%$ نانومولسیون تشکیل شد، در پژوهش های پیشین پیشنهاد شده است که ویتامین E استات در حضور تویین 80 به عنوان کوسورفاکتانت عمل می کند؛ به عبارت دیگر با قرار گرفتن مابین مولکول های سورفاکتانت، آن ها انحنای مطلوب خود را خواهند داشت، این توانایی ویتامین E استات به حضور گروه های عاملی در ساختار آن نسبت داده می شود، ویتامین E حاوی گروه اتتری و کربونیل آبدوست بوده و توانایی تشکیل پیوند هیدروژنی با مولکول های آب را دارد، از سوی دیگر، زنجیر طویل کربنی در ساختار آن، گروه آبگریز بوده و به انحلال ویتامین در فاز روغن کمک می کند بنابراین ویتامین E استات دارای ساختار آمفی فیلک می باشد (20 و 19)، در پژوهشی که بر روی تولید نانومولسیون ویتامین E استات و در حضور کرموفور ELP (Cremophor ELP) به عنوان ترکیب فعال سطحی با روش

خودبه خودی انجام شد (7)، مشاهده گردید که در SOR برابر با 40%، قطراتی با قطر زیر 100 نانومتر تشکیل می شود، همچنین، در پژوهش بر روی سیستم میگلیول (Miglyol) -تویین 80 مشاهده شد که با افزایش غلظت سورفاکتانت، اندازه قطرات کاهش می یابد به طوری که در SOR برابر با 55%، کوچکترین قطر قطرات حاصل می شود (21)، در پژوهش ما، در SOR 50 و 66% اندازه ی قطرات افزایش یافت، در حالی که انتظار می رفت افزایش غلظت سورفاکتانت، با کاهش بیشتر کشش سطحی در محیط، سبب کاهش اندازه ی قطرات شود، مکانیسمی که احتمالاً در غلظت های بالاتر سورفاکتانت، سبب افزایش قطر قطرات می شود، تشکیل ساختارهای کریستال مایع در لایه بین سطحی روغن-آب است که باعث ویسکوز شدن آن و مانع از انتشار سورفاکتانت ها به فاز آبی می شوند که این مهاجرت اساس تشکیل نانومولسیون به روش خودبه خودی است و

بررسی تأثیر تغییرات دما: کاهش چشمگیر در اندازه (از 463 ± 19 نانومتر به $90 \pm 0/70$ نانومتر) و توزیع قطرات (از $0/75 \pm 0/1$ به $0/66 \pm 0/07$) اتفاق در $SOR = 50\%$ با افزایش دما از 20 به 30 درجه سانتی‌گراد را می‌توان به افزایش سرعت مهاجرت سورفاکتانت و روغن و در نتیجه تسریع مکانیسم جوانه‌زنی در روش خودبه‌خودی نسبت داد. هردوی این نمونه‌ها با میکروسکوپ پلاریزه، به منظور بررسی حضور ساختارهای کریستال مایع بررسی شدند که در مورد نمونه تهیه شده در دمای $20^\circ C$ ، ترکیبات با خصوصیت شکست دوگانه (بریفریجنس) مشاهده شدند ولی در نمونه تهیه شده در دمای $30^\circ C$ شکست دوگانه مشاهده نشد. همان‌طور که ذکر شد، تشکیل کریستال مایع در سطح، از انتشار سورفاکتانت و روغن جلوگیری به عمل می‌آورد. در $SOR = 66\%$ احتمالاً افزایش دما به اندازه کافی زیاد نبوده تا بتواند به پراکنده شدن کامل ساختارهای کریستال مایع منجر شده و سبب تولید نانوامولسیون شود. مشاهدات میکروسکوپی این نمونه‌ها با میکروسکوپ پلاریزه حاکی از حضور ساختارهایی با خصوصیت بریفریجنس بودند. در پژوهشی که بر روی سیستم میگیلول-توین 80 انجام شد، نشان داده شد که تولید امولسیون در این سیستم به شدت وابسته به دما می‌باشد (21). به طوری که با افزایش دما از 25 به $30^\circ C$ ، در $SOR\%$ بزرگتر مساوی 40، شاهد کاهش اندازه ی قطرات در این سیستم بودند و دمای بهینه برای تولید امولسیون $30^\circ C$ تعیین شد. در سیستم ایمیتور 742 (Imwitor 742) توین 80 با افزایش دما از 25 به $37^\circ C$ ، اندازه ی قطرات کاهش یافت که این نتایج کاملاً با نتایج سیستم ویتامین E استات توین 80 هماهنگی داشت (24). براساس نتایج به دست آمده می‌توان نتیجه گرفت، در شرایطی که در فرمولاسیونی نسبت سورفاکتانت به ماده حامل رعایت شده باشد، دما، تأثیری بر تولید و توزیع قطر قطرات نخواهد داشت.

تأثیر مقدار آب: در $SOR = 10\%$ و دمای $30^\circ C$ ، با افزایش مقدار آب در محیط، اگرچه میانگین قطر قطرات تغییر قابل ملاحظه‌ای پیدا نکرد، ولی در سه سطح مختلف آب، قطر قطرات توزیع متفاوتی داشتند و با افزایش مقدار آب در محیط از 5 به 10 گرم، اندیس پراکنش آن‌ها کاهش یافت ($2/18 \pm 0/02$ به $1/54 \pm 0/01$). پایین بودن اندیس اسپن در نمونه تهیه شده در مقدار 2 گرم آب ($1/77 \pm 0/01$) نسبت به نمونه حاوی 5 گرم آب ($2/18 \pm 0/02$)، احتمالاً به

بدین ترتیب تولید خودبه‌خودی نانوامولسیون به تأخیر می‌افتد. همچنین پیشنهاد شده است که ورود انرژی به سیستم، به طور بلقوه می‌تواند تشکیل نانوامولسیون در این سیستم‌ها را تسهیل کند (22 و 23). ورود انرژی به سیستم می‌تواند به صورت گرما و افزایش دما باشد. در بالاترین غلظت سورفاکتانت مورد استفاده، کاهش مجدد قطر قطرات به تشکیل سیستم جدید میکروامولسیون نسبت داده شد. در این غلظت، تک لایه سورفاکتانت می‌تواند سیستم میسل سورفاکتانت حاوی هسته ویتامینی را تولید کند و انحنا ی مطلوب خود را داشته باشد که در نتیجه آن، کشش سطحی به حداقل مقدار خود می‌رسد. افزایش انرژی انتروپی سیستم نیز موجب کاهش انرژی آزاد سیستم و تشکیل دیسپرسیون کلوئیدی با میسل‌های متورم می‌باشد (9). در مورد سیستم‌های حاوی توین 20 در $SOR = 16\%$ علت تشکیل ماکروامولسیون مربوط به امولسیفیه نشدن مقداری از فاز روغن در سیستم بود که نشان دهنده پایین بودن غلظت آن برای تولید قطرات پایدار در برابر هم آمیختن (کوالسنس) به هنگام تولید است. در این سطح سورفاکتانت، طیف وسیعی از قطرات با قطرهای مختلف حضور دارند (اسپن $= 2/57 \pm 0/82$). برخلاف پژوهش جاری، در تولید نانوامولسیون با روش نقطه معکوس شدن امولسیون، توین 20 قادر به تولید قطرات با شعاع کمتر نسبت به توین 80 بود (25). در غلظت بیشتر توین 20 ($SOR = 50$) نانوامولسیون تشکیل شد. رفتار ضعیف‌تر توین 20 نسبت به توین 80 در تولید خودبه‌خودی امولسیون، احتمالاً به اشباعیت بیشتر زنجیرهای اسید چرب در توین 20 و در نتیجه تحرک کمتر آن مربوط باشد (21). همچنین به نظر می‌رسد که تولید خودبه‌خودی امولسیون و قطر قطرات تولیدی به مقدار عددی HLB سورفاکتانت وابستگی زیادی ندارد (HLB توین 80 و 20 به ترتیب 15 و $16/7$ می‌باشد (22). در $SOR = 66\%$ ، رفتار توین 20 مشابه توین 80 بود و اگرچه قطر متوسط قطرات به صورت جزئی، افزایش یافت، ولی توزیع قطر قطرات از $0/89 \pm 0/03$ به $0/65 \pm 0/00$ کاهش یافت که علت توزیع یکنواخت احتمالاً مربوط به ایجاد تعداد زیاد میسل‌های سورفاکتانت باشد قطرات که به انتقال فاز روغن بین قطرات و در نتیجه توزیع قطر قطرات کمک کرده‌اند. همان‌طور که قبلاً بیان شد، نتایج نشان‌دهنده وابستگی تولید نانوامولسیون با این روش به ساختار مولکولی سورفاکتانت مورد استفاده در تولید می‌باشد.

قطر قطرات طی رقیق سازی امولسیون نشان دهنده عدم نقش چشمگیر این مکانیسم در ناپایداری و افزایش قطر قطرات می باشد. با توجه به اینکه با کاهش قطر قطرات به زیر 300 نانومتر، به علت غلبه حرکت براونی به نیروی گرانش، تفکیک گرانشی و انبوهش (فلاکولاسیون) شدیداً کاهش می یابد می توان علت این موضوع را توجیه کرد. براساس نتایج به دست آمده در مورد هر دو نوع سورفاکتانت می توان بیان داشت که با در SOR بهینه در مقدار فاز پیوسته، تأثیری بر تولید امولسیون، قطر قطرات و توزیع آنها نداشت.

بررسی پایداری امولسیون ها در طول مدت نگهداری:

برای اینکه بتوان از فرمولاسیونی در صنایع غذایی و نوشیدنی استفاده کرد، بایستی آن، در دراز مدت پایدار باشد. با بررسی قطر قطرات و تغییر توزیع اندازه آن ها، پایداری امولسیون ها ارزیابی شد. بررسی پایداری نانوامولسیون حاوی SOR = 16% -تویین 80، نشان می دهد در این سطح سورفاکتانت-روغن در هر سه سطح 2، 5 و 10 گرم آب پس از 8 روز نگهداری، میانگین قطر قطرات افزایش یافته و در ادامه در روزهای 20 و 30 کاهش یافته و به سطح ثابت و پایداری رسیده است (شکل 3-الف). به منظور روشن تر شدن علت این افزایش و در نهایت کاهش میانگین قطر قطرات، تغییر توزیع پراکنش آن ها نیز مورد بررسی قرار گرفت. همان طور که در شکل 3-الف مشاهده می شود، توزیع قطر قطرات در طول مدت نگهداری ابتدا افزایش یافت. در ادامه تغییر توزیع قطر قطرات، روند کاهش به خود گرفت و در نهایت هر سه سیستم به قطراتی با شعاع تقریباً ثابت و یکسانی رسیدند. این پدیده یعنی کاهش قطر قطرات، حل شدن (Solubilization) نامیده می شود (29) که شباهت بسیار زیادی به تولید اولیه امولسیون از طریق مکانیسم جوانه زنی دارد. همان طور که در شکل 3-الف دیده می شود، در مدت 8 روز اولیه، توزیع قطر قطرات افزایش یافته است؛ به عبارت دیگر انتقال ویتامین از درون قطرات ریز به قطرات درشت انجام یافته و در ادامه در 12 روز بعد، رفته رفته توزیع قطر قطرات کاهش یافته است. علت این پدیده احتمالاً این باشد که با گذشت زمان، سورفاکتانت های موجود در توده، بخشی از مولکول های موجود در سطح قطرات را جذب می کنند و قطرک های جدیدی می سازند. در پژوهشی (30) مشاهده شد که در مدت نگهداری قطر قطرات در امولسیون مونو دیسپرس به سمت تولید قطرات ریزتر تغییر پیدا می کند.

علت مشارکت کمتر روغن در تولید امولسیون و در نتیجه کارایی بهتر سورفاکتانت در تولید قطراتی با توزیع اندازه یکنواخت در سیستم بود (18). در SOR = 16%، افزایش مقدار آب و دمای محیط تأثیری بر اندازه و نیز توزیع اندازه ی قطرات تولیدی نداشت. در SOR = 50% و دمای 20 °C با رقیق سازی امولسیون، قطر قطرات کاهش یافت ولی در دمای 30 °C تغییر در میانگین قطر قطرات در اثر رقیق سازی مشاهده نشد. با رقیق سازی امولسیون از 2 به 5 و 10 گرم آب، اندیس اسپن آن ها به ترتیب $4/34 \pm 0/005$ و $0/66 \pm 0/03$ و $0/66 \pm 0/07$ بودند (دمای 30 °C) در مقادیر 10 و 5 گرم آب، منحنی توزیع قطر قطرات تک مد (Monomodal) بود ولی در سیستم حاوی 2 گرم آب، اگرچه قطر میانگین قطرات تقریباً مشابه نمونه های قبل بود، ولی توزیع قطر قطرات دو مد (Bimodal) بود. مشاهدات چشمی پس از تولید این نمونه، حاکی از وقوع تفکیک گرانشی در سیستم بود. این پدیده شاید به این علت باشد که در غلظت های بالای سورفاکتانت، انبوهش ناشی از تهی شدن (Depletion flocculation) در سیستم اتفاق افتاده و سبب انبوهش تعدادی از قطرات شده است. در غلظت های بالای سورفاکتانت، بخشی از آن ها به جای قرار گرفتن در سطح، در توده قرار می گیرند و فشار اسمزی را بالا می برند و در نتیجه فاز پیوسته بین قطرات به این مکان منتقل می گردد و در مقدار اندک آب محیط، قطرات انبوهش می یابند. قطرات انبوهش یافته با آهنگ بیشتری در قسمت فوقانی نمونه تجمع می یابند به طوری که با نمونه برداری از قسمت تحتانی نمونه، توزیع قطر قطرات تک مد بود. در مورد امولسیون هایی که با سورفاکتانت های ریز مولکول پایدار شده اند، ناپایداری ناشی از انبوهش ناشی از تهی شدن گزارش شده است: (26، 27). در پژوهش دیگر (28) مشاهده شد که در غلظت های بالای سورفاکتانت غیریونی، انبوهش ناشی از تهی شدن منجر به ناپایدار شدن نانوامولسیون نیز می شود.

با توجه به شکل (2-ب)، با افزایش مقدار آب در هر نسبت SOR در امولسیون پایدار شده توسط تویین 20، تغییر معنی داری در قطر قطرات مشاهده نمی شود یعنی رقیق سازی امولسیون تأثیری در کاهش قطر قطرات نداشت. با وجود اینکه اصولاً کاهش کسر حجمی به دلیل افزایش فاز پیوسته، موجب کاهش تصادم قطرات و در نتیجه کاهش انبوهش و هم آمیختگی می گردد، با این وجود، عدم کاهش

میکروسکوپ نوری بررسی شدند (شکل 4-الف). همان طور که در این شکل مشخص است، این نمونه‌ها حاوی ترکیباتی با خاصیت شکست دوگانه بودند و قادر به پراکنده ساختن نور پلاریزه بودند. در نمونه‌های تهیه شده در مقادیر 5 و 2 گرم آب در همین SOR، به منظور تعیین علت مشاهدات چشمی حاکی از وقوع ناپایداری سیستم، ساختار میکروسکوپی این نمونه‌ها یکبار بدون رقیق سازی و بار دیگر پس از رقیق سازی (100 برابر) توسط میکروسکوپ نوری بررسی شدند (شکل 4-ب). همان طور که در تصاویر تهیه شده با میکروسکوپ نوری دیده می‌شود، قطرات در سیستم اولیه انبوهش یافته اند ولی پس از رقیق سازی، قطرات از هم جدا شده اند. به عبارت دیگر، کنارهم قرار گرفتن قطرات فیزیکی بوده و فقط کنار هم تجمع یافته بودند. برای اندازه‌گیری قطر قطرات توسط دستگاه پارتیکل سایزر، بایستی حتماً قبل از اندازه‌گیری نمونه‌ها رقیق شوند. به همین دلیل می‌توان علت این عدم تغییر قابل ملاحظه در توزیع قطر قطرات در طول مدت را به رقیق سازی قبل از اندازه‌گیری نسبت داد. به عبارت دیگر قطرات در طول مدت نگهداری دچار ناپایداری از نوع هم‌آمیختن نشده اند. در مورد نمونه‌های تهیه شده با توپین 20 در SOR 50% (شکل 3-د)، در مقدار 2 گرم آب، در طول مدت نگهداری، میانگین قطر قطرات افزایش یافت که این پدیده را می‌توان به حضور احتمالی میسل‌های سورفاکتانت نسبت داد که موجب افزایش میانگین قطر قطرات می‌شود. رسم نمودار میانگین قطر قطرات به توان سه در مقابل زمان نیز $r^2=85/5$ به دست می‌دهد. در مورد سیستم تهیه شده در مقدار 5 گرم آب، میانگین قطر قطرات در طول 20 روز اول، به صورت چشمگیری کاهش یافت و در ادامه به مقدار ثابت رسید. اندیس اسپن بالا، بلافاصله پس از تولید مربوط به دو مد بودن سیستم می‌باشد که سبب شده توزیع قطر قطرات در محدوده وسیع‌تری قرار بگیرد. اندیس پراکنش نیز با کاهش قطر میانگین قطرات، کاهش یافت. در سیستم حاوی 10 گرم آب، 8 روز پس از تولید، قطر میانگین به مقدار قابل ملاحظه‌ای افزایش یافت که این پدیده را می‌توان به ناپایدار شدن احتمالی سیستم در اثر رقیق سازی نسبت داد. به این صورت که در مدت نگهداری، حضور مقادیر بالای آب در سیستم، سورفاکتانت‌ها ناحیه بین سطحی را رها کرده و وارد فاز آبی می‌شوند. زیرا احتمالاً از لحاظ ترمودینامیکی برای آن‌ها تشکیل میسل جداگانه در داخل فاز آبی مطلوب‌تر

در SOR = 50% در سیستم حاوی 5 گرم آب، می‌توان به رسیدگی استتوالد نسبت داد و سبب بزرگ شدن قطر میانگین قطرات و نیز افزایش اندیس پراکنش آن‌ها در طول زمان شده است (شکل 3-ب). با رسم نمودار مکعب شعاع قطرات در طول مدت نگهداری در مقابل زمان، r^2 خط حاصل 0/98 به دست آمد. ارتباط خطی بین میانگین قطر قطرات به توان سه در مقابل زمان، در یک امولسیون نشان دهنده وقوع رسیدگی استتوالد در سیستم می‌باشد. در غلظت‌های بالای سورفاکتانت که غلظت آن به حد بحرانی رسیده (2 گرم آب)، انبوهش ناشی از تهی شدن رخ داده است. زیرا در آن بخشی از قطرات که انبوهش اتفاق افتاده بود، بدون اینکه هم‌آمیختنی در طول مدت نگهداری 30 روزه اتفاق بیفتد باقی ماندند و در بخش دیگر قطرات که دارای قطر مشابه نمونه حاوی 10 گرم آب بودند، تغییر قابل ملاحظه‌ای اتفاق نیفتاد. به همین دلیل قطر میانگین قطرات ثابت ماند. در این نوع انبوهش، برهمکنش بین قطرات، ضعیف می‌باشد و انتظار می‌رفت با هم‌زدن در داخل سیستم، پخش می‌شدند ولی احتمالاً به علت غلیظ بودن امولسیون، هم‌زدن برای دیسپرس کردن قطرات انبوهش یافته موثر نبوده و رقیق سازی بعدی برای آنالیز با پارتیکل سایزر تأثیری بر قطر قطرات و توزیع آن‌ها نداشته است. میانگین قطر قطرات و اندیس پراکنش بالا برای این نمونه‌ها به علت دومد بودن سیستم می‌باشد. در SOR = 66% و در مورد نمونه تهیه شده در مقدار 10 گرم آب، با توجه به این که اندازه اولیه قطرات حدوداً 850 نانومتر بود، انتظار می‌رفت در طول مدت نگهداری اندازه آن‌ها افزایش یابد ولی میانگین قطر قطرات و نیز اندیس پراکنش آن‌ها در طول مدت نگهداری 30 روز تغییر قابل ملاحظه‌ای نکرد. در پژوهش بر روی تولید امولسیون روغن ذرت در آب، پایدار شده با سورفاکتانت توپین 80، مشاهده شد که امولسیون با قطر قطرات اولیه 2 میکرومتر به شدت ناپایدار بوده و پس از 10 روز نگهداری تفکیک فازها به طور کامل رخ می‌دهد (31). در پژوهشی دیگر (21)، پیشنهاد شد که به هنگام تولید نانوآمولسیون به روش خود به خودی، زمانی که فاز آلی حاوی روغن و سورفاکتانت به فاز آبی افزوده می‌شوند، با رقیق کردن سیستم، فاز کریستال مایع در لایه بین سطحی روغن-آب تشکیل می‌شود که می‌تواند سبب پایدار شدن سیستم شود. به منظور بررسی حضور احتمالی ساختارهای کریستال مایع، ابتدا خصوصیات مورفولوژی و شکست دوگانه این نمونه‌ها با

کوچکتر، کمتر از نمونه توپین 20 با قطر متوسط بزرگتر، است که غیر عادی به نظر می‌رسد. معمولاً در یک سیستم مشابه (از نظر ترکیب و دما) و کسر حجمی ثابت، با کاهش قطر قطرات، ویسکوزیته سیستم افزایش می‌یابد که به افزایش نسبت سطح به حجم نسبت داده می‌شود. اما لخته شدن قطرات در امولسیون می‌تواند علاوه بر افزایش قطر قطرات، موجب افزایش ویسکوزیته در کسر حجمی ثابت گردد چون، مقادیری از فاز پیوسته در بین قطرات گیر می‌افتند. از طرف دیگر، ضخامت و ساختار فیلم تشکیل شده توسط سورفاکتانت، در لایه سطحی نیز می‌تواند در مقادیر ویسکوزیته امولسیون موثر باشد. در $SOR = 50\%$ ، میانگین قطر قطرات به ترتیب در مورد نمونه‌های توپین 80 و 20 به ترتیب $90 \pm 0/70$ و $83 \pm 1/41$ بود. همان طور که در شکل 5-ج مشاهده می‌شود، ویسکوزیته نمونه توپین 80 اندکی بیشتر از نمونه توپین 20 است. با توجه به اینکه قطر قطرات در این دو سیستم تقریباً مشابه هم می‌باشد، تفاوت ویسکوزیته این دو سیستم را می‌توان به نوع سورفاکتانت به کار رفته، نسبت داد. در $SOR = 66\%$ نیز ویسکوزیته نمونه توپین 80، بیشتر از نمونه توپین 20 با میانگین قطر قطرات به ترتیب $853 \pm 13/43$ و $93 \pm 4/24$ می‌باشد. در $SOR = 83\%$ نیز نمودار ویسکوزیته در مقابل سرعت برشی دو نمونه توپین 80 و 20 نیز برهم منطبق می‌باشند. رئولوژی امولسیون‌ها علاوه بر کسر حجمی فاز پراکنده، به عواملی نظیر رئولوژی فازهای تشکیل دهنده، اندازه و توزیع قطر قطرات، برهم‌کنش بین قطرات، میزان انبوهش (فلاکولاسیون) قطرات، نوع و ضخامت لایه سورفاکتانت و قدرت یونی فاز پیوسته نیز وابسته است (34، 18). نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که نوع سورفاکتانت و نسبت آن به فاز پراکنده، تأثیر زیادی در ویسکوزیته نانو امولسیون‌ها دارد. در جدول 2-الف و ب شاخص جریان (n) و ضریب قوام و نیز ضریب تبیین R^2 برای نمونه‌ها در دمای $25^\circ C$ آورده شده است. ضریب تبیین برای اکثر نمونه‌ها، بالاتر از 98% می‌باشد که نشان دهنده مناسب بودن مدل قانون توان برای توصیف خصوصیات جریان‌ی نمونه‌ها می‌باشد. در این رابطه هرچقدر n به 1 نزدیک تر باشد، نشانه دهنده تمایل سیال به رفتار نیوتنی و هرچقدر به صفر نزدیک تر باشد، نشان دهنده تمایل به رفتار سودوپلاستیک است. همان طور که در جدول 2-الف و ب مشاهده می‌شود، مقادیر شاخص رفتار جریان برای اکثر نمونه‌ها نزدیک به یک می‌باشد که دلالت

می‌باشد (15) ولی در ادامه احتمالاً پدیده حل شدن در سیستم اتفاق افتاده و میسل‌ها با جابجا کردن ویتامین E استات بین قطرات، به یکنواخت‌تر شدن توزیع قطر قطرات و کاهش اندیس اسپن کمک کرده‌اند. پس از اینکه توزیع قطر قطرات یکنواخت شد، احتمالاً رسیدگی استوالد، سبب بزرگ شدن قطر قطرات و کاهش اندیس اسپن شده است. این رفتار متفاوت توپین 20 نسبت به توپین 80 را می‌توان به تفاوت غلظت بحرانی تشکیل میسل آن‌ها نسبت داد. به طور کلی می‌توان مدت 20 روز را در مورد این سیستم، زمان رسیدن به تعادل در نظر گرفت. در $SOR = 66\%$ ، میانگین قطر اولیه قطرات تقریباً همانند هم بودند (شکل 3-و). ولی در طول مدت نگهداری 30 روزه، هر سه نمونه تهیه شده در مقادیر افزایشی آب از 2 به 10 گرم آب، بزرگ شدن قطر میانگین را نشان دادند که این افزایش، مقارن بود با پهن‌تر شدن نمودار پراکنش قطر متوسط قطرات (شکل 3-و)، که این هم دلیلی بر وقوع هم‌آمیختگی قطرات در طول مدت نگهداری می‌باشد (33). ناپایداری در امولسیون‌های غلیظ‌تر، شدیدتر اتفاق افتاده است. با غلیظ‌تر شدن امولسیون، قطرات به صورت فشرده‌تری کنارهم قرار می‌گیرند که در طول مدت نگهداری امکان یکی شدن آن‌ها افزایش می‌یابد.

بررسی خصوصیات رئولوژیکی: در منابع، اطلاعات اندکی در مورد رئولوژی نانوامولسیون‌ها وجود دارد. همان طور که در شکل 5-الف دیده می‌شود، در مورد سیستم‌های حاوی ویتامین E استات تهیه شده با سورفاکتانت‌های توپین 20 و 80، در سرعت‌های برشی پایین (پایین تر از 20 برثانیه)، ویسکوزیته به صورت ناگهانی کاهش یافت که به تغییر شکل قطرات و تفکیک قطرات انبوهه شده نسبت داده شد. در سرعت‌های برشی بالاتر، ویسکوزیته به سرعت برشی وابسته نیست و با افزایش سرعت برشی، ویسکوزیته در تمام سرعت‌های اعمال شده، ثابت می‌ماند (شکل 5-ب). بین تنش برشی و سرعت برشی در نمونه‌های حاوی مقادیر متفاوت ویتامین استات و سورفاکتانت، رابطه نسبتاً خطی وجود دارد که این رفتار نشانگر رفتار نزدیک به رفتار نیوتنی می‌باشد (شکل 5-الف)

همان طور که در شکل 5-ج دیده می‌شود، در مورد امولسیون‌های تهیه شده با توپین 80 و توپین 20، ویسکوزیته‌ی نمونه‌های حاوی $SOR = 16\%$ که به ترتیب حاوی قطراتی با قطر $78 \pm 0/70$ و $11798 \pm 5/673/87$ نانومتر می‌باشند، ویسکوزیته نمونه توپین 80 با قطرات

به این ترتیب امولسیون اولیه بایستی حدوداً 4700 برابر رقیق شود، بررسی رقیق سازی امولسیون اولیه نسبت به آزمون رقیق سازی نشان داد که بدون اینکه تغییری در قطر قطرات و نیز پراکنش آن‌ها اتفاق بیفتد، می‌توان عمل رقیق سازی نانوامولسیون اولیه را انجام داد. سروینگ سائز (حجم ظروف) نوشیدنی‌های شفاف 200 میلی لیتر می‌باشد، و از طرفی مقدار مجاز دریافت روزانه برای ویتامین E استات 15 میلی گرم می‌باشد، با حفظ شفاف بودن نوشیدنی پس از افزودن نانوامولسیون، مقدار ویتامین آن حدوداً 6 میلی گرم در هر سروینگ خواهد بود. به این ترتیب می‌توان نوشیدنی‌های شفاف را بدون تغییر در خصوصیات ظاهری آن‌ها غنی سازی نمود.

فرمولاسیون بهینه در غلظت 16% SOR با کمترین مصرف سورفاکتانت تولید شد. پس از تعیین غلظت سورفاکتانت بهینه برای تولید، تغییر دادن درصد وزنی فاز پیوسته و دما تأثیری بر تولید نداشت. نانوامولسیون بهینه نسبت به رقیق سازی مقاوم بود. به این ترتیب آن را می‌توان تا رسیدن به حداکثر مقدار مجاز دریافت روزانه بدن رقیق نمود و نوشیدنی‌های خوراکی شفاف را بدون اینکه تغییری در خصوصیات ظاهری آن‌ها ایجاد شود رقیق سازی نمود.

بر رفتار نیوتنی دارد. تنها در مقادیر با سورفاکتانت پایین، رفتار نسبتاً سودوپلاستیک مشاهده می‌شود که ممکن است به انبوهش قطرات مربوط باشد. رفتار نیوتنی این سیستم‌ها به علت توانایی میسل‌ها در تشکیل ساختارهای کروی می‌باشد که این ساختارهای کروی، رئولوژی امولسیون را به صورت جزئی تحت تأثیر قرار می‌دهند (35).

خصوصیات نوری: خصوصیات نوری امولسیون‌ها در این پژوهش با اندازه گیری کدورت سیستم‌ها در طول موج 600 نانومتر تعیین شدند. یک امولسیون را در صورتی می‌توان شفاف در نظر گرفت که کدورت آن کمتر از $0/05 \text{ cm}^{-1}$ باشد. کدورت نانوامولسیون در صورتی که قطر متوسط قطرات آن کمتر از 80 نانومتر باشد و به علاوه توزیع قطر قطرات در آن باریک باشد (اندیس پراکنش کمتر از 1)، زیر $0/05 \text{ cm}^{-1}$ خواهد بود که در نتیجه از لحاظ نوری شفاف بوده و مناسب برای استفاده در نوشیدنی‌های شفاف خواهد بود. در پژوهشی (16) نشان داده شد که کدورت نانوامولسیون‌ها با افزایش غلظت روغن افزایش می‌یابد. در این پژوهش نیز ابتدا کدورت نانوامولسیون بهینه (SOR=16%-تویین 80) در محتوای روغنی 0 تا 0/1% بررسی شد و غلظت روغنی که در آن کدورت کمتر از $0/05 \text{ cm}^{-1}$ بود، تعیین شد که این غلظت 0/003% است.

• References

- Gonnet M, Lethuaut L, Boury F. New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. *J. Controll. Release.* 2010; 146: 276-90.
- Somchue W, Sermsri W, Shiowatana J, Siripinyanond A. Encapsulation of a-tocopherol in protein-based delivery particles. *Food Res Int* 2009; 42: 909-14.
- Cardeo Z, Dragon D, Weikert C, Boeing H. Vitamin E and risk of cardiovascular diseases: a review of epidemiologic and clinical trial studies. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2010; 50(5): 420-40.
- Chen C, Wagner G. Vitamin E nanoparticle for beverage applications. *Chem. Eng. Res* 2004; 82(A11): 1423-37.
- Westergren T, Kalikstad B. Dosage and formulation issues: oral vitamin E therapy in children. *Eur. J. Clin. Pharmacol* 2010; 66: 109-18.
- McClements D, Rao J. Food-Grade Nanoemulsions: Formulation, Fabrication, Properties, Performance, Biological Fate, and Potential Toxicity. *Crit Rev Food Sci Nutr* 2011; 51: 285-330.
- Anton N, Vandamme T. The universality of low-energy nano-emulsification. *Int. J. Pharm* 2009; 377: 142-7.
- Tadros T, Izquierdo P, Esquena J, Solans C. Formation and stability of nano-emulsions. *Adv. Colloid Interface Sci* 2004; 108-109: 303-18.
- McClements DJ. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *ISO 4* 2012; 8: 1719-29.
- Acosta E. Bioavailability of nanoparticles in nutrient and nutraceutical delivery. *J Colloid Interf Sci* 2009; 14(1): 3-15.
- Anton N, Vandamme T. Low-energy nano-emulsifications: overview and potentials in microencapsulation. In: Groningen, Netherlands: : proceedings of the XVII International Conference on Bioencapsulation, Groningen, Netherlands, 24-26 September. p 1-4.

12. Bouchemal K, Briançon S, Perrier E, Fessi H. Nano-emulsion formulation using spontaneous emulsification: solvent, oil and surfactant optimization. *Int. J. Pharm* 2004; 280 : 241–25.
13. Yang Y, Marshall-Breton C, Leser M, Sher A, McClements DJ. Fabrication of ultrafine edible emulsions: Comparison of high-energy and low-energy homogenization methods. *Food Hydrocolloid* 2012; 29: 398-406.
14. Qian C, McClements DJ. Formation of nanoemulsions stabilized by model food-grade emulsifiers using high-pressure homogenization: Factors affecting particle size. *Food Hydrocolloid* 2010; 25: 1000-8.
15. Ziani K, Fang Y, McClements DJ. Fabrication and stability of colloidal delivery systems for flavor oils: Effect of composition and storage conditions. *Food Res Int* 2012; 46: 209–16.
16. Lee S, McClements DJ. Fabrication of protein-stabilized nanoemulsions using a combined homogenization and amphiphilic solvent dissolution /evaporation Approach. *Food Hydrocolloid* 2010; 24: 560-9.
17. Liu Y, Friberg. Role of liquid crystal in the emulsification of a gel emulsion with high internal phase fraction. *J Colloid Interf Sci* 2009; 340: 261-8.
18. McClements DJ. Food emulsions: principles, practice, and techniques. Second edition. CRC Press; 2004.
19. Horn D, Rieger J. Organic Nanoparticles in the Aqueous Phase–Theory, Experiment, and Use. *Angew. Chem. Int. Ed* 2001; 40: 4330-61.
20. Teo B, Basri M, Zakaria M, Salleh A, Rahman R, Rahamn M. A potential tocopherol acetate loaded palm oil nanocosmeceuticals esters-in-water nanoemulsions for nanocosmeceuticals. *J Nanobiotechnology* 2010; 8:4.
21. Wakerly MW, Pouton CW, Meakin BJ, Morton FS. In: Self-emulsification of vegetable oil-non-ionic surfactant mixtures. Scamehron, J.F. Phenomena in mixed surfacyan systems. ACS Publications; 1986. p242-55.
22. Pouton CW. Self-emulsifying drug delivery systems: assessment of the efficiency of emulsification *Int. J. Pharm* 1985; 27: 335-348.
23. Pouton CW. Formulation of self-emulsifying drug delivery systems. *Adv. Drug Deliv* 1997; 25: 47-58.
24. Carig DQM, Barker SA, Banning D, Booth SW. An investigation into the mechanisms of self-emulsification using particle size analysis and low frequency dielectric spectroscopy. *Int. J. Pharm* 1995; 114(1): 103-110.
25. Weiszhar Z, Czucz J, Revesz C, Rosivall L, Szebeni J, Rozsnyay Z. Complement activation by polyethoxylated pharmaceutical surfactants: Cremophor-EL, Tween-80 and Tween-20. *Eur J Pharm Sci* 2012; 45(4):. 492-8.
26. Furusawa K, Sato A, Shirai J, Nashima T. Depletion Flocculation of Latex Dispersion in Ionic Micellar Systems. *J Colloid Interf Sci* 2002; 253: 273-8.
27. Leal-Calderon F, Homer S, Goh A, Lundin L. W/O/W emulsions with high internal droplet volume fraction. *Food Hydrocolloid* 2012; 27: 30-41.
28. Wulff-Pérez M, Torcello-Go´mez A, Ga´ lvez-Rui´z MJ, Martı´n-Rodrı´guez A. Stability of emulsions for parenteral feeding: Preparation and characterization of o/w nanoemulsions with natural oils and Pluronic f68 as surfactant. *Food Hydrocolloid* 2009; 23: 1096- 1102.
29. Miller C. In: Solubilization in Surfactant Systems. In Birdi KS. Handbook of Surface and Colloid Chemistry. CRC press; 2009. p 415-438.
30. Ariyaprakai S, Dungan SR. Solubilization in monodisperse emulsions. *J Colloid Interf Sci* 2007; 314: 673-82.
31. Krstonos´ic V, Dokic L, Dokic P, Dapc´evic T. Effects of xanthan gum on physicochemical properties and stability of corn oilin-water emulsions stabilized by polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate. *Food Hydrocolloid* 2009; 23: 2212–18.
32. Friberg S, Jansson P. Surfactant association structure and emulsion stability. *J Colloid Interf Sci* 1976; 55(3): 614-23.
33. Kabalnov AS, Shchukin E. Ostwald ripening theory: applications to fluorocarbon emulsion stability. *Adv. Colloid Interface Sci* 1992; 38: 69-97.
34. Derkach SR. Rheology of emulsions. *Adv. Colloid Interface Sci* 2009; 151: 1-23.
35. Jiang L, Basri M, Omar D, Rahman M, Salleh A, Rahman R. Physicochemical Characterization of Nonionic Surfactants in oil-in-water (O/W) Nano-emulsions for New Pesticide Formulations. *Inst. Appl. Sci Tech* 2011; 1(5): 131-42.

Production and Evaluation of Vitamin E based Nanoemulsion by Spontaneous Method

Niknia N¹, Ghanbarzadeh B^{2*}, Hamishekar H³, Rezayi Mokarram R⁴, Mortazaviyan AM⁵

1- M. Sc. in Food Sciences and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran.

2-*Corresponding author: Associated Prof, Dept. of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran, E-mail: Ghanbarzadeh@tabrizu.ac.ir

3- Assistant Prof, Drug Applied Research Center, Medical Research and Development Complex, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

4- Assistant Professor of Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, University of Tabriz, Tabriz, Iran

5- Associate prof, Dept. of Food Sciences and Technology, National Nutrition and Food Technology Research Institute, Shahid Beheshti University of Medical Science, Tehran, Iran

Received 23 May, 2013

Accepted 11 Sept, 2013

Background and Objectives: Oil-in-water nano-emulsions (NEs) are increasingly used as delivery systems to encapsulate lipophilic bioactive components in functional foods. NEs are usually produced using high-energy methods, which can limit production in Iran because of a lack of suitable equipment. The present study investigated the production of NEs using the low energy method of spontaneous emulsification.

Materials and Methods: The effect of oil composition was first determined for Tween 80 and Tween 20 by changing the surfactant-to-oil ratio (SOR) from 10% to 83% at fixed increments in the continuous phase (16.7% w/w oil phase). The effect of the length of the continuous phase and temperature on production of NEs was investigated for different amounts of initial water (28.6% and 50% w/w oil phase) for both Tweens; the effect of temperature change was only tested for Tween 80. The prepared samples were tested for turbidity, stability, rheological properties, and dilution.

Results: Optimum NEs formed at a SOR of 16% for Tween 80. In this method, surfactant type had an appreciable effect on the production of NEs. It was found that SOR had a major effect on production of NEs. There was no effect for the continuous phase or temperature on production and particle size. The NEs were stable (no change in size) at ambient temperatures (20°C) for one month. A concentration of about 0.003% NE was determined to be the optimal addition for beverages without changing their optical and rheological properties.

Conclusions: In the optimum formulation (OF), changes in temperature and oil phase did not affect the production of NEs and the OF was stable for 30 d.

Keywords: Nano-emulsion, Vitamin E acetate, Spontaneous emulsification, Tween 80, Tween 20