



## ارزیابی نانو ذرات لیپیدی جامد حاصل از موم زنبور عسل و موم استخراج شده از بره موم تهیه شده با روش ته نشینی ضد حلال

عاطفه شیروانی<sup>۱</sup>، سید امیرحسین گلی<sup>۲\*</sup>، ژاله ورشوساز<sup>۳</sup>

۱- دانشجوی دکتری علوم و مهندسی صنایع غذایی، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران.

۲- دانشیار، گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه صنعتی اصفهان، اصفهان، ایران.

۳- استاد، گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، ایران.

### اطلاعات مقاله

### چکیده

#### تاریخ های مقاله:

تاریخ دریافت: ۹۹/۰۲/۱۵

تاریخ پذیرش: ۹۹/۰۸/۱۱

#### کلمات کلیدی:

نانوذرات جامد لیپیدی،

موم،

موم حاصل از بره موم،

ته نشینی ضد حلال.

DOI: 10.52547/fsct.18.02.08

\*مسئول مکاتبات:

amirgoli@cc.iut.ac.ir

روش ته نشینی ضد حلال، یکی از روش های مطلوب تولید نانوذرات کلوئیدی از ترکیبات غذایی است. هدف از این مطالعه، تولید نانوذرات جامد کلوئیدی بر پایه موم زنبور عسل و موم استخراجی از بره موم به روش ته نشینی ضد حلال است. به این منظور، اثر عوامل مختلف شامل نوع حلال (اتانول مطلق و ایزوپروپانول)، نوع امولسیفایر (پلی سوربات ۸۰، کازینات سدیم و مخلوط ۱ به ۱ آنها) و نوع ماده لیپیدی (موم و موم استخراجی از بره موم) بر پارامترهای اندازه ذرات، شاخص پراکندگی ذرات و راندمان تولید آنها به روش ته نشینی ضد حلال مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصل، کمترین اندازه ذرات متعلق به حلال اتانول مطلق (۲۰۵ نانومتر) و امولسیفایر کازینات سدیم (۱۹۲ نانومتر) می باشد. نوع امولسیفایر به صورت خطی و نوع امولسیفایر/ نوع حلال به صورت اثر متقابل بر شاخص پراکندگی ذرات اثر معنی داری ( $p < 0/05$ ) داشتند. شاخص پراکندگی ذرات تهیه شده در هر دو نوع موم کمتر از ۰/۲۱ و در حد مطلوب بود. نتایج حاصل از راندمان تولید ذرات نشان دادند که استفاده از مخلوط امولسیفایرها، حلال اتانول و موم بیشترین راندمان تولید (به ترتیب ۹۲، ۹۳ و ۹۰ درصد) را دارا هستند. مطابق نتایج حاصل از اثر متقابل عوامل بر راندمان تولید، مخلوط امولسیفایرها فارغ از نوع حلال و نوع موم مورد استفاده، بالاترین راندمان را نشان داد. هم چنین، نانو ذرات موم تهیه شده با استفاده از حلال اتانول (حدود ۹۱/۵ درصد)، بیشترین راندمان تولید را نسبت به ذرات تولید شده از هر دو نوع موم با حلال ایزوپروپانول دارند. نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که روش ته نشینی ضد حلال می تواند به عنوان یک روش کارآمد برای تولید نانوذرات جامد لیپیدی مورد استفاده قرار گیرد. هم چنین مشخص گردید که موم و موم استخراجی از بره موم از پتانسیل خوبی برای تهیه نانوذرات لیپیدی برخوردار هستند.

## ۱- مقدمه

نانوذرات لیپیدی جامد<sup>۱</sup>، سیستم کلوئیدی هستند که به صورت ذرات چربی جامد در آب یا محلول آبی حاوی امولسیفایر پراکنده شده‌اند. این ترکیبات لیپیدی می‌توانند از اسیدهای چرب با نقطه ذوب بالا و تری‌گلیسیریدها ساخته شوند. این نانوذرات به دلیل کوچک بودن و همچنین دارا بودن سطوح زیاد ویژگی‌های خاصی را نشان می‌دهند و بدین ترتیب می‌توانند به طور مناسبی برای حفاظت و رهایش ترکیبات زیست فعال چربی دوست ریزپوشانی شده استفاده شوند [۱]. از دیگر کاربردهای نانوذرات جامد لیپیدی می‌توان به پایدار کردن امولسیون‌های روغن در آب و تولید امولسیون‌های پیکرینگ (امولسیون‌های پایدار شده با ذرات جامد) اشاره کرد [۲]. از جمله مزایای استفاده از نانوذرات لیپیدی جامد می‌توان به شرایط ملایم تولید، پتانسیل اجرا در مقیاس صنعتی، سازگاری با سایر ترکیبات و به طور خاص، تمایل زیاد میان این سیستم و ترکیبات زیست فعال چربی دوست اشاره نمود که این ویژگی اخیر می‌تواند منجر به افزایش راندمان ریزپوشانی و نیز کاهش سرعت رهایش ترکیبات گردد [۳]. شرودر و همکاران (۲۰۱۸) نانوذرات جامد تری پالمیتین پایدار شده با امولسیفایر کازئینات سدیم را به کمک روش هموژنایزر با سرعت بالا (اولترا تورا کس) همراه با میکروفلوئیدایزر تولید کردند. سپس این ذرات جامد لیپیدی کروی شکل (۱۷۰ نانومتر) را برای پایدار کردن امولسیون پیکرینگ روغن در آب به کار گرفتند [۴].

ماهیت موم‌ها لیپیدی بوده و آب گریز می‌باشند. این ترکیبات استری متشکل از الکل‌ها و اسیدهای چرب بلند زنجیر هستند که ترکیب آن‌ها به منشا و نحوه استخراج بستگی دارد. تجدیدپذیر بودن، زیست تخریب پذیر بودن و استفاده مستقیم برای انسان را می‌توان از مزایای استفاده از موم‌های طبیعی نام برد [۵]. موم‌ها با داشتن نقطه ذوب بالا، دسترسی گسترده، سادگی در تولید، عدم حساسیت نسبت به pH و نمک، ساختار قابل تنظیم و عدم تغییر در ساختار حین هموژن شدن، پتانسیل خوبی برای تولید ذرات جامد لیپیدی دارند [۴]. از نظر رفتار کریستالی، فرم غالب در موم‌ها بتا پریم است و به سبب داشتن زنجیره بلند استری سرعت تغییر فرم کریستالی در آنها کند بوده و بنابراین از پایداری بیشتری برخوردار هستند [۶]. زفیری و

همکاران (۲۰۱۷) نانوذرات جامد موم ستیل پالمیتات پایدار شده با کازئینات سدیم و یا پلی‌سوربات ۸۰ را تهیه و سپس از آن‌ها برای پایدار کردن امولسیون روغن در آب استفاده کردند. سپس رفتار این ذرات را تحت اثر حرارت و نیز پایداری حرارتی امولسیون حاصل از آنها را مورد بررسی قرار دادند [۲].

موم یکی از مهمترین محصولات جانبی است که از غده‌های شکمی زنبور عسل ترشح می‌شود. این محصول به طور مشخص از پالمیتات، پالمیتواتولات، هیدروکسی پالمیتات و استرهای اولئات الکل‌های آلیفاتیک بلند زنجیر (۳۰ تا ۳۲ کربنه) تشکیل شده است. پروپولیس یا چسب زنبور، رزین طبیعی است که به وسیله مخلوط کردن ترشحات گل‌ها و گرده آنها با آنزیم‌های مترشحه توسط زنبور تهیه می‌شود. ترکیب پروپولیس بر اساس نوع گل‌ها و گیاهان موجود، شرایط آب و هوایی، میزان رزین روی شکوفه‌ها، زمان جمع‌آوری و حضور آلاینده‌ها متفاوت بوده و حاوی رزین، موم، اسانس، گرده و سایر ترکیبات مانند مواد معدنی، ویتامین‌ها و ترکیبات آلی دیگر می‌باشد [۷]. سلیمانیان و همکاران (۲۰۱۸)، حامل‌های لیپیدی نانو ساختار<sup>۲</sup> (NLC) را با استفاده از این دو نوع موم تهیه کرده و سپس از روغن هسته انار و موم استخراجی از بره موم برای ریزپوشانی ماده زیست فعال بتاستوسترول استفاده کردند [۶ و ۸].

روش ته نشینی ضد حلال<sup>۳</sup> یکی از روش‌های مطلوب تولید نانوذرات از دامنه وسیعی از ترکیبات غذایی است. از جمله مزایای این روش می‌توان به افزایش کنترل بر ویژگی ذرات جامد (اندازه، شکل و حالت فیزیکی)، عدم نیاز به تجهیزات خاص، شرایط ساده عملیات، هزینه پایین و قابلیت اجرا در مقیاس بزرگتر اشاره نمود. در این روش، ضد حلال (معمولاً آب حاوی امولسیفایر) به حلال آلی قابل امتزاج با آب حاوی ماده حل‌شونده اضافه شده و منجر به کاهش کیفیت حلال، فوق اشباعیت، هسته زایی، رشد هسته‌های حاصل و در نهایت رسوب نانوذرات تولید شده می‌گردد. عدم تعادل واکنش‌های مولکولی میان ماده حل‌شونده، حلال و ضد حلال نیروی محرکه اصلی برای تشکیل نانو ذرات است. عوامل متعددی بر اندازه ذرات تشکیل شده با استفاده از این روش اثر دارند که از جمله می‌توان به سرعت و ترتیب اضافه کردن حلال به ضد

2. Nanostructured lipid carrier  
3. Antisolvent precipitation

1. Solid Lipid Nanoparticle (SLN)

بر همین اساس، میزان ۱ درصد موم یا موم حاصل از بره موم (۰/۲ گرم) به ۲۰ میلی‌لیتر از هر یک از حلال‌ها افزوده و تا دمای ۶۵-۶۲ درجه سانتیگراد حرارت داده شد. ۰/۰۸ گرم از امولسیفایرهای مورد نظر در آب دیونیز حل شده و تا هم دما شدن با فاز حلال حرارت داده شد. فاز حلال حاوی موم به یکباره به فاز آبی حاوی امولسیفایر اضافه شد و به مدت ۵۰ ثانیه توسط هموژنایزر با دور rpm ۱۲۸۰۰ مخلوط گردید. پس از حذف حلال توسط تبخیرکننده چرخان در دمای °C ۴۵، ذرات جامد واکس در آب تشکیل شدند [۱۲]. نسبت میزان حلال آلی به ضد حلال (آب) به صورت ثابت ۱ به ۵ در نظر گرفته شد. نمونه بدون امولسیفایر از هر دو نوع موم نیز مطابق روش گفته شده به عنوان نمونه شاهد تهیه گردید.

## ۲-۴- بررسی ویژگی‌های ذرات جامد واکس

### ۲-۴-۱- اندازه ذرات و شاخص پراکندگی آن

قطر میانگین و توزیع اندازه ذرات (شاخص پراکندگی ذرات) توسط دستگاه زتاسایزر (شرکت مالورن، انگلستان) به روش تفرق دینامیکی نور (DLS) با زاویه ۱۷۳ درجه و با رقیق کردن ۴۰ برابری نمونه‌ها با استفاده از آب دیونیز به منظور جلوگیری از اثر پراکندگی چندگانه در دمای °C ۲۵ اندازه‌گیری شد. نتایج قطر میانگین و توزیع اندازه ذرات بر اساس ممان‌های تابع توزیع<sup>۲</sup> آنالیز و تحلیل شدند. ضریب شکست واکس‌ها و آب به ترتیب ۱/۴۴ و ۱/۳۳۰ بوده و ضریب جذب آب ۰/۰۱ در نظر گرفته شد.

### ۲-۴-۲- راندمان تولید ذرات

راندمان تولید نانوذرات واکس بر اساس روش صداقت دوست و همکاران (۲۰۱۸) اندازه‌گیری شد [۱۲]. سوسپانسیون‌های تولید شده حاوی نانوذرات واکس به منظور حذف ذرات بزرگتر در rpm ۴۰۰۰ به مدت ۲۰ دقیقه در دمای ۴ درجه سانتیگراد ساتریفیوژ شد. سپس محلول رویی جمع‌آوری شده و با استفاده از آون تا رسیدن به وزن ثابت خشک گردید. درصد راندمان تولید نانو ذرات واکس با استفاده از فرمول زیر محاسبه شد:

= درصد راندمان

۱۰۰ × (وزن کل واکس و امولسیفایر استفاده شده / وزن ذرات خشک شده)

حلال، نسبت آنها، غلظت ماده حل شونده، انتخاب حلال و ضد حلال مناسب و نوع و غلظت امولسیفایر مورد استفاده اشاره کرد [۹]. لیو و تانگ (۲۰۱۴) ذرات فیتواسترویل (متوسط اندازه حجمی برابر ۴۴/۷ میکرومتر) را با استفاده از روش ضدحلال تهیه نموده و برای پایدار کردن قطرات روغن در امولسیون روغن در آب استفاده کردند [۱۰].

هدف از این مطالعه تولید نانوذرات جامد لیپیدی با استفاده از موم زنبور عسل و موم استخراجی از بره موم به روش ته نشینی ضد حلال در نظر گرفته شد. بر همین اساس اثر عوامل تأثیرگذار از جمله نوع موم مورد استفاده (موم زنبور و موم استخراجی از بره موم)، نوع امولسیفایر (پلی‌سوربات ۸۰، کازئینات سدیم و مخلوط ۱ به ۱ آنها) و نوع حلال به کاربرده شده (اتانول خالص و ایزوپروپانول) بر پارامترهای اندازه ذرات، شاخص پراکندگی آنها و نیز راندمان تولید نانو ذرات مورد بررسی قرار گرفت.

## ۲- مواد و روش‌ها

### ۲-۱- مواد اولیه

موم و بره موم زنبور عسل مورد استفاده در این تحقیق که به ترتیب از زنبورستان‌های اصفهان و اردبیل جمع‌آوری شده بودند از جهاد کشاورزی استان اصفهان خریداری شد. سدیم کازئینات از شرکت آگروکمپلکس (لهستان) و پلی‌سوربات ۸۰ (توئین ۸۰) و سایر مواد شیمیایی از شرکت مرک آلمان خریداری شد.

### ۲-۲- استخراج موم از بره موم

پروپولیس ماده‌ای قهوه‌ای رنگ است که پس از منجمد کردن در دمای ۱۸- درجه سانتیگراد آسیاب گردید. استخراج موم از بره موم به روش سوکسله و با استفاده از حلال آلی هگزان در دمای °C ۶۸-۷۰ به مدت ۸ ساعت انجام شد [۱۱].

### ۲-۳- تهیه نانوذرات موم به روش ته‌نشینی ضد

### حلال

به منظور انتخاب حلال و امولسیفایر مناسب، حلال‌های آلی اتانول مطلق و ایزوپروپانول و امولسیفایرهای توئین ۸۰، کازئینات سدیم و مخلوط ۱ به ۱ از آنها مد نظر قرار گرفت.

1. Polydispersity index (PDI)  
2. Cumulant analysis

## ۲-۵- آنالیز آماری

آزمایشات با سه تکرار انجام شد و تجزیه و تحلیل آماری نتایج حاصل با استفاده از نرم افزار SAS و بر اساس طرح فاکتوریل در قالب کاملاً تصادفی صورت گرفت. به منظور مقایسه میانگین داده‌ها از آزمون حداقل تفاوت معنی دار داده‌ها (LSD) در سطح اطمینان ۹۵ درصد استفاده شد.

## ۳- نتایج و بحث

## ۳-۱- موم استخراج شده از بره موم

میزان موم استخراج شده از بره موم  $0/05 \pm 48/3$  درصد به دست آمد.

## ۳-۲- انتخاب حلال و امولسیفایر مناسب

به منظور انتخاب حلال (اتانول مطلق و ایزوپروپانول) و امولسیفایر مناسب (توئین ۸۰، سدیم کازئینات و مخلوط ۱:۱ آنها) آزمون‌های تعیین اندازه ذرات، شاخص پراکندگی ذرات و درصد راندمان برای هر دو نوع ماده لیپیدی (موم و موم استخراجی از بره موم) انجام گرفت. بیشترین درصد راندمان، کمترین اندازه و شاخص پراکندگی ذرات به عنوان پارامترهای مطلوب در نظر گرفته شد.

## ۳-۲-۱- اندازه ذرات

همانگونه که در جدول ۱ (جدول تجزیه واریانس) مشاهده می‌شود، نوع حلال، نوع امولسیفایر و نوع موم هر یک به تنهایی اثر معنی داری (سطح اطمینان ۹۵٪) را بر اندازه ذرات نشان دادند در صورتیکه اثر متقابل دوتایی و یا حتی سه تایی آنها معنی دار نبود.

Table 1 Analysis of variance for particle size

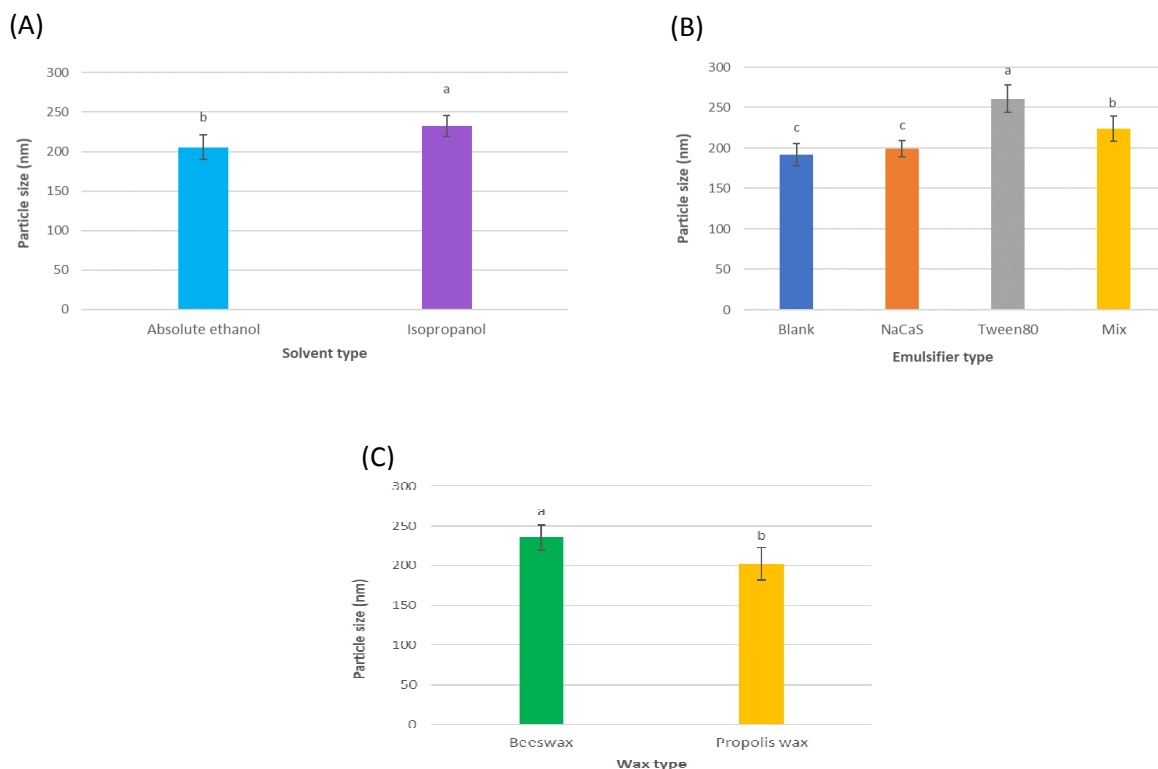
| Source                   | DF | SS       | MS      | F value | Prob > F         |
|--------------------------|----|----------|---------|---------|------------------|
| Model                    | 15 | 40739.04 | 2715.93 | 5.89    | 0.0005           |
| <u>Solvent type</u>      | 1  | 5783.50  | 5783.50 | 12.55   | <u>0.0027</u>    |
| <u>Emulsifier type</u>   | 3  | 23300.97 | 7766.99 | 16.85   | <u>&lt;.0001</u> |
| <u>Wax type</u>          | 1  | 8593.60  | 8593.60 | 18.65   | <u>0.0005</u>    |
| Solvent* Emulsifier      | 3  | 1787.88  | 595.96  | 1.29    | 0.3109           |
| Solvent* Wax             | 1  | 22.78    | 22.78   | 0.05    | 0.8269           |
| Emulsifier* Wax          | 3  | 946.41   | 315.47  | 0.68    | 0.5744           |
| Solvent* Emulsifier* Wax | 3  | 303.87   | 101.29  | 0.22    | 0.8812           |
| Error                    | 16 | 7374.30  | 460.89  | -       | -                |
| Total                    | 31 | 48113.34 | -       | -       | -                |

ایزوپروپانول برابر  $10^{-5} \times 0/92$  سانتیمترمربع بر ثانیه می‌باشد و نیز ویسکوزیته اتانول (۱/۲۲ سانتی‌پواز) کمتر از ایزوپروپانول (۲/۳۷ سانتی‌پواز) است، کوچک بودن ذرات تهیه شده با اتانول مطلق نسبت به ایزوپروپانول قابل توجیه است [۹]. هم‌چنین مطابق نتایج حاصل (شکل ۱-۱B)، استفاده از امولسیفایر کازئینات سدیم منجر به تولید ذرات کوچکتری (۱۹۱/۹ نانومتر) نسبت به توئین ۸۰ (۲۶۰/۸ نانومتر) و مخلوط ۱:۱ توئین و کازئینات سدیم (۲۲۳/۷ نانومتر) شده است. این در حالی است که اندازه ذرات نمونه شاهد بدون امولسیفایر (۱۹۸/۹ نانومتر) تفاوت معنی‌داری را با نمونه‌های حاوی امولسیفایر کازئینات سدیم نشان نداد. نمونه‌های شاهد علیرغم داشتن ذراتی با اندازه کوچک به دلیل عدم وجود امولسیفایر پس از مدتی ناپایدار شده و پدیده دو فاز شدن رخ داد که نهایتاً منجر به تجمع ذرات و کاهش راندمان تولید شد. توئین ۸۰، امولسیفایر کوچک مولکول و غیر یونی است که به صورت

با توجه به نتایج حاصل، استفاده از حلال اتانول مطلق منجر به تولید ذرات کوچکتری (۲۰۵ نانومتر) در مقایسه با حلال ایزوپروپانول (۲۳۲ نانومتر) می‌شود (شکل ۱-۱A). به طور کلی با افزودن فاز حلال حاوی موم به فاز آبی، محلول به صورت فوق اشباع در آمده و هسته‌زایی رخ می‌دهد که پس از رشد کریستال‌ها و رسوب گذاری، ذرات تشکیل می‌شوند. انتقال جرم و ضریب دیفیوژن بین حلال و آب یکی از عوامل تأثیرگذار بر اندازه ذرات تشکیل شده است. به طوری که با افزایش ضریب دیفیوژن، فوق اشباعیت با یکنواختی بیشتر حاصل شده و سرعت هسته‌زایی بیشتر شده و به این ترتیب ذرات کوچکتری تولید می‌شود. از سوی دیگر، ویسکوزیته محلول حاصل نیز از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است، زیرا با افزایش ویسکوزیته محیط سرعت دیفیوژن حلال به داخل فاز آبی کاهش یافته و ذرات بزرگتری تولید می‌شوند [۹]. با توجه به اینکه، ضریب دیفیوژن اتانول برابر  $10^{-5} \times 1/14$  و

یونی توئین ۸۰ تعلق داشت. آنها هم‌چنین اعلام کردند که اختلاط امولسیفایر غیر یونی توئین ۸۰ با لستین باردار سبب افزایش اندازه ذرات می‌شود [۱۴]. تروتا و همکاران (۲۰۰۱) با استفاده از توئین ۸۰ به تنهایی و نیز مخلوط آن با لستین نانوسوسپانسیون داروی میتوتان (Mitotane) را با استفاده از هموژنایزر با سرعت بالا و به روش دیفوزیون حلال تهیه کردند. آنها دریافتند که ذرات تولید شده با مخلوط امولسیفایرها اندازه کوچکتری (۲۱۴ نانومتر) را نسبت به ذرات تولید شده با توئین ۸۰ (۲۶۰ نانومتر) داشتند [۱۵]. نتایج حاصل از این دو مطالعه با نتایج این تحقیق به خوبی مطابقت دارد. براساس نتایجی که در شکل ۱- C، قابل مشاهده است، موم استخراجی از بره موم (۲۰۲ نانومتر) ذراتی با اندازه کوچکتر نسبت به موم (۲۳۵ نانومتر) تولید کرده است. با توجه به اینکه نقطه ذوب موم (۶۷-۶۴ °C) بیشتر از موم حاصل از بره موم (۶۴-۶۱ °C) می‌باشد، می‌توان دلیل اندازه بزرگتر نانوذرات موم حاصل از بره موم نسبت به موم را به کارایی کمتر هموژنایزر در مرحله اختلاط فاز حلال با فاز آبی نسبت داد [۸].

ممانعت فضایی عمل می‌کند، در حالیکه کازئینات سدیم مولکول درشتی است که دارای بار مثبت بوده و با ایجاد ممانعت فضایی و هم‌چنین نیروهای رانشی الکترواستاتیک می‌تواند به عدم اتصال ذرات به یکدیگر کمک کند [۱۳]. نتایج حاصل نشان دادند که امولسیفایر کازئینات سدیم از کارایی بیشتری برای تولید ذرات از مومها برخوردار است و می‌تواند ذرات کوچکتری را به واسطه ایجاد دافعه الکترواستاتیک و نیز ممانعت فضایی تولید کند. مخلوط امولسیفایرها به سبب داشتن میزان کمتری از امولسیفایر باردار، قادر به ایجاد نیروی دافعه کمتری در بین ذرات بوده که همین امر می‌تواند سبب تولید ذرات با اندازه بزرگتر گردد. به علاوه نتایج نشان می‌دهد که توئین ۸۰ علیرغم کوچک مولکول بودن و ایجاد ممانعت فضایی ذرات موم با بزرگترین اندازه را تولید کرده است. نتایج تروتا و همکاران (۲۰۰۳) نشان داد که اندازه ذرات گلیسرول مونواستئارات تولید شده به روش امولسیفیکاسیون- دیفوزیون حلال پایدار شده با امولسیفایر باردار لستین کمترین مقدار را داشته است، در حالیکه بیشترین اندازه ذرات به امولسیفایر غیر



**Fig 1** Significant linear effects of solvent type (A), Emulsifier type (B) and wax type (C) on particle size ( $p < 0.05$ )

بود. نتایج حاصل از تجزیه واریانس در جدول ۲ نشان می‌دهد که نوع امولسیفایر به تنهایی و اثر متقابل دوتایی نوع حلال/ نوع امولسیفایر اثر معنی داری (سطح اطمینان ۹۵٪) را بر شاخص پراکندگی ذرات دارند.

### ۳-۲-۲- شاخص پراکندگی ذرات

شاخص پراکندگی ذرات چگونگی توزیع اندازه ذرات را در دیسپرسیون‌ها مشخص می‌کند. به نحوی که هر چه اندازه ذرات یکنواخت تر باشد این شاخص به صفر نزدیک‌تر خواهد

Table 2 Analysis of variance for polydispersity index

| Source                     | DF        | SS    | MS     | F value | Prob > F |
|----------------------------|-----------|-------|--------|---------|----------|
| <b>Model</b>               | <b>15</b> | 0.041 | 0.002  | 6.28    | 0.0004   |
| <b>Solvent type</b>        | <b>1</b>  | 0.000 | 0.000  | 0.18    | 0.6811   |
| <b>Emulsifier type</b>     | <b>3</b>  | 0.029 | 0.009  | 21.91   | <.0001   |
| <b>Wax type</b>            | <b>1</b>  | 0.000 | 0.000  | 0.00    | 0.9868   |
| <b>Solvent* Emulsifier</b> | <b>3</b>  | 0.008 | 0.002  | 6.27    | 0.0051   |
| <b>Solvent* Wax</b>        | <b>1</b>  | 0.001 | 0.0017 | 3.84    | 0.0678   |
| <b>Emulsifier* Wax</b>     | <b>3</b>  | 0.001 | 0.0005 | 1.21    | 0.3368   |
| <b>Solvent*</b>            | <b>3</b>  | 0.000 | 0.0002 | 0.66    | 0.5908   |
| <b>Emulsifier*Wax</b>      | <b>3</b>  | 0.000 | 0.0002 | 0.66    | 0.5908   |
| <b>Error</b>               | <b>16</b> | 0.007 | 0.0004 | -       | -        |
| <b>Total</b>               | <b>31</b> | 0.049 | -      | -       | -        |

دارای بار مثبت) ذراتی با شاخص پراکندگی ۰/۱۹ و توئین ۸۰ به تنهایی ذراتی با شاخص پراکندگی ۰/۲۱ تولید کردند که با نتایج حاصل از این تحقیق مطابقت دارد [۱۵]. با توجه به شکل ۲-B، ذرات تولید شده با استفاده از حلال اتانول و توئین ۸۰ به عنوان پایدارکننده، بیشترین شاخص پراکندگی را نشان داده است، با این حال این شاخص برای این تیمار حدود ۰/۲۳ به دست آمده که در محدوده مطلوب به شمار می‌آید. از سوی دیگر کمترین شاخص پراکندگی ذرات متعلق به ذرات تولید شده با هر دو نوع حلال و پایدار شده با کازئینات سدیم است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت که نوع امولسیفایر اثر بیشتری نسبت به نوع حلال بر این شاخص داشته است. اسکوبرت و میلر-گایمن (۲۰۰۳) نشان دادند که حلال ایزوپروپانول شاخص پراکندگی کمتری را در ذرات جامد تری‌گلیسیریدی تولید شده به روش ضد حلال نسبت به اتانول نشان داده است (به ترتیب ۰/۱۸۲ و ۰/۳۴۰) [۱۶].

استفاده از امولسیفایر سدیم کازئینات منجر به تولید ذراتی با شاخص پراکندگی کمتر (۰/۱۲) نسبت به توئین ۸۰ (۰/۲۰) و مخلوط ۱ به ۱ آنها (۰/۱۷) شد (شکل ۲-A). با توجه به اینکه این شاخص اگر کمتر از ۰/۴ باشد، دیسپرسیون دارای پراکندگی مطلوبی است بنابراین تمامی نمونه‌ها را می‌توان از نظر این شاخص مناسب دانست [۱۳]. نتایج حاصل از این بخش با نتایج به دست آمده در مورد اندازه ذرات هماهنگ بود، به طوری که امولسیفایر کازئینات سدیم به دلیل ایجاد ممانعت فضایی و نیروهای دفعه الکترواستاتیک توانست ذراتی با یکنواختی اندازه بیشتر نسبت به توئین ۸۰ که تنها با ممانعت فضایی به پایداری ذرات کمک می‌کند، تولید نماید. تروتا و همکاران (۲۰۰۱) نانوسوسپانسیون داروی میتوتان (Mitotane) را با استفاده از روش دیفوزیون حلال و به کمک هموزنایزر سرعت بالا تهیه کردند. طبق نتایج آنها، مخلوط برابر امولسیفایرهای توئین ۸۰ (غیریونی) و لسیتین

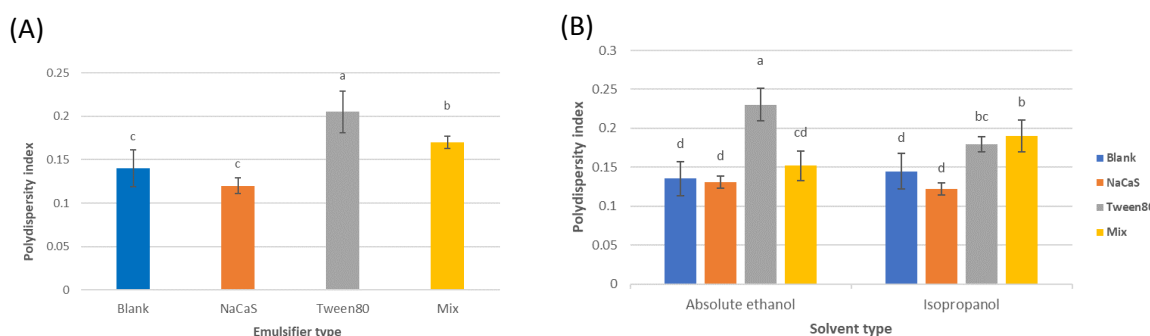


Fig 2 Significant linear effect of emulsifier type (A) and interactive effect of solvent and emulsifier type (B) on polydispersity index ( $p < 0.05$ )

راندمان بیشتر باشد، نشان‌دهنده این است که ذراتی با پایداری بیشتر تشکیل شده‌اند. از این‌رو این ذرات در طی فرایند سانتریفوژ کردن با هم تجمع نشده و جدا نمی‌گردند. نتایج

### ۳-۲-۳- راندمان تولید ذرات

میزان راندمان تولید ذرات، نشان‌دهنده مقدار نانوذرات موم تولید شده نسبت به مقدار موم استفاده شده است. هر چه این

۹۵٪) را بر درصد راندمان تولید ذرات نشان دادند. به علاوه، اثر متقابل معنی داری میان نوع امولسیفایر/ نوع حلال، نوع امولسیفایر/ نوع واکس و نیز نوع حلال/ نوع واکس وجود دارد.

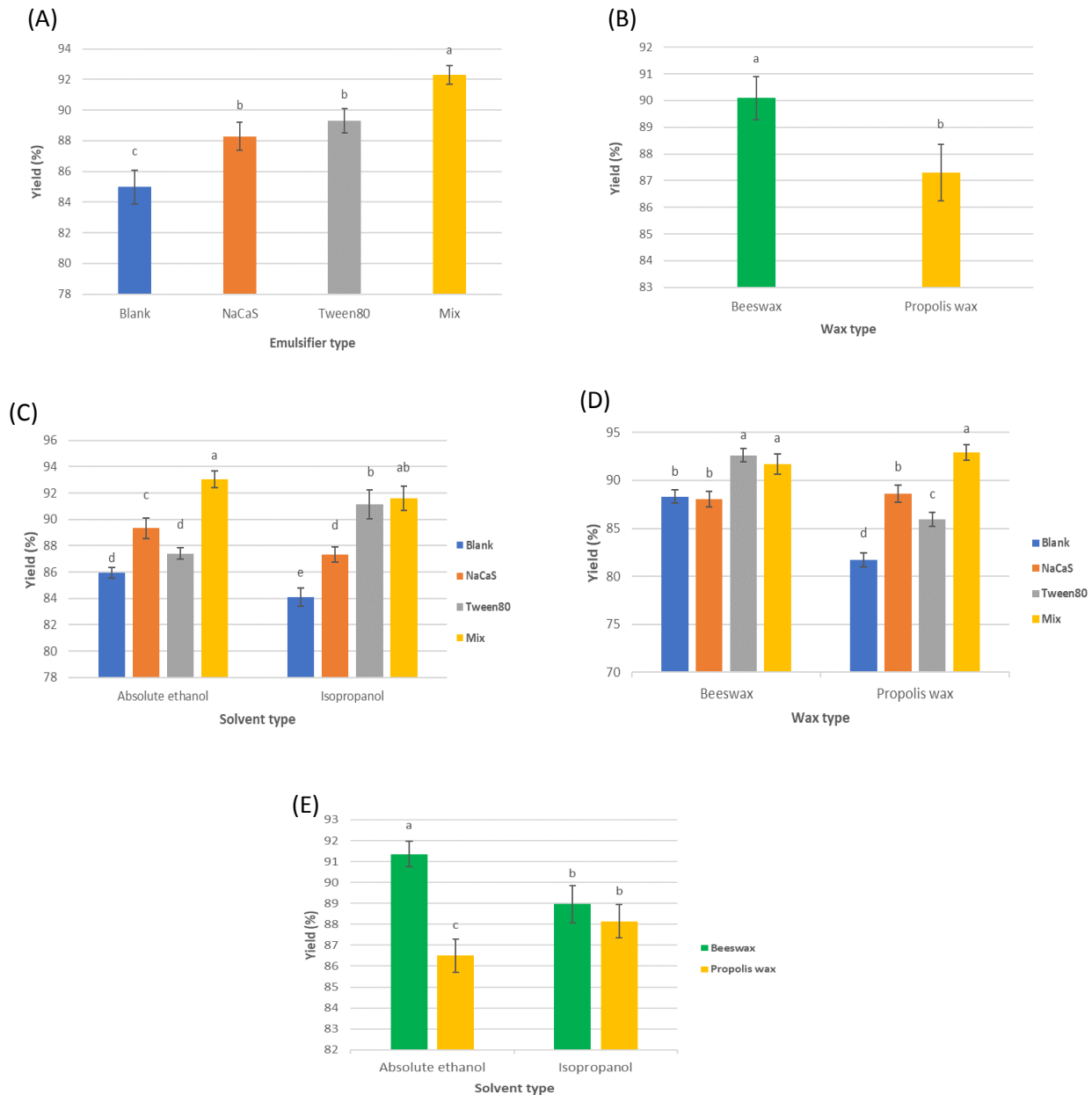
حاصل از تجزیه واریانس داده‌های به دست آمده از این شاخص در جدول ۳ نشان داده شده است. بر اساس نتایج، نوع امولسیفایر و نوع موم به تنهایی اثر معنی داری (سطح اطمینان

Table 3 Analysis of variance for production yield

| Source                         | DF        | SS     | MS    | F value | Prob > F         |
|--------------------------------|-----------|--------|-------|---------|------------------|
| <b>Model</b>                   | <b>15</b> | 482.88 | 32.19 | 22.95   | <u>&lt;.0001</u> |
| <b>Solvent type</b>            | <b>1</b>  | 1.16   | 1.16  | 0.83    | 0.37             |
| <b>Emulsifier type</b>         | <b>3</b>  | 216.40 | 72.13 | 51.43   | <u>&lt;.0001</u> |
| <b>Wax type</b>                | <b>1</b>  | 64.38  | 64.38 | 45.90   | <u>&lt;.0001</u> |
| <b>Solvent* Emulsifier</b>     | <b>3</b>  | 45.69  | 15.23 | 10.86   | <u>0.0004</u>    |
| <b>Solvent* Wax</b>            | <b>1</b>  | 32.50  | 32.50 | 23.17   | <u>0.0002</u>    |
| <b>Emulsifier* Wax</b>         | <b>3</b>  | 113.57 | 37.85 | 26.99   | <u>&lt;.0001</u> |
| <b>Solvent* Emulsifier*Wax</b> | <b>3</b>  | 9.16   | 3.05  | 2.18    | 0.13             |
| <b>Error</b>                   | <b>16</b> | 22.44  | 1.40  | -       | -                |
| <b>Total</b>                   | <b>31</b> | 505.33 | -     | -       | -                |

ایزوپروپانول با حدود ۸۴٪ مشاهده کرد. عدم حضور امولسیفایر در نمونه شاهد و نیز پایین بودن ضریب دیفوزیون ایزوپروپانول نسبت به اتانول منجر به تولید ذرات درشت و ناپایدار شده است. از سوی دیگر به مرور زمان ذرات تولیدی رشد و تجمع کرده و سبب تشکیل ذرات بزرگتر و در نهایت کاهش راندمان تولید می‌شوند. در شکل ۳ (D)، اثر متقابل نوع موم/ نوع امولسیفایر مشاهده می‌شود که بیانگر این مطلب است که به طور کلی حلال اتانول فارغ از نوع امولسیفایر، دارای راندمان بیشتری نسبت به ایزوپروپانول است که ناشی از ضریب دیفوزیون بالاتر این حلال نسبت به ایزوپروپانول می‌باشد. به علاوه این شکل نشان می‌دهد که استفاده از مخلوط برابری از امولسیفایرها منجر به افزایش راندمان تولید ذرات در هر دو نوع موم می‌شود که به دلیل اثر هم‌افزایی توئین ۸۰ کوچک مولکول با کازئینات سدیم با بار مثبت است [۱۴-۱۳]. مطابق انتظار، نمونه شاهد تهیه شده از موم استخراجی از بره موم به دلیل عدم حضور امولسیفایر و نیز خاصیت چسبندگی بیشتر، کمترین راندمان (حدود ۸۲٪) را نشان می‌دهد. اثر متقابل معنی‌دار نوع حلال/ نوع موم در شکل ۳ (E) نشان داده شده است. بر این اساس، اتانول مطلق قادر به تولید ذرات جامد موم با راندمان بیش از ۹۱ درصد است، در حالیکه کمترین راندمان متعلق به موم استخراجی از بره موم تهیه شده با حلال اتانول است. این مسأله نشان‌دهنده تأثیر بیشتر خاصیت چسبندگی موم نسبت به اثر ضریب دیفوزیون است. هم‌چنین با توجه به این شکل می‌توان دریافت که نوع موم مورد استفاده تأثیری بر راندمان تولید ذرات جامد تهیه شده با حلال ایزوپروپانول ندارد.

همانگونه که در شکل ۳-A، مشاهده می‌شود، بیشترین راندمان با ۹۲/۳ درصد متعلق به نمونه‌های حاوی مخلوط ۱ به ۱ امولسیفایرهای مورد استفاده و کمترین مقدار مربوط به نمونه‌های شاهد بدون امولسیفایر (۸۵٪) است. امولسیفایر توئین ۸۰ به سبب کوچک مولکول بودن می‌تواند به خوبی مناطقی از سطح ذرات واکس را که کازئینات سدیم به دلیل درشت بودن نتوانسته پوشش دهد، پر نماید، بنابراین کاربرد همزمان این دو نوع امولسیفایر با پوشش‌دهی کافی سطح و نیز ایجاد دافعه الکترواستاتیک به پایداری بیشتر ذرات در برابر نیروی گریز از مرکز سانتریفیوژ کمک کرده و از تجمع ذرات و ایجاد ذرات درشت ناپایدار جلوگیری می‌کند [۱۴-۱۳]. در مورد نمونه‌های شاهد نیز عدم استفاده از امولسیفایر سبب ناپایداری ذرات، الحاق آنها به یکدیگر و تشکیل ذرات درشتی می‌گردد که در طی فرایند سانتریفیوژ به راحتی جدا شده و منجر به کاهش راندمان تولید می‌شوند. بر اساس نتایج مشاهده شده در شکل ۳-B، راندمان تولید ذرات تهیه شده با استفاده از موم حدود ۹۰ درصد است، در حالیکه این مقدار برای موم استخراجی از بره موم ۸۷ درصد به دست آمد. این اختلاف را می‌توان به دلیل چسبندگی بیشتر موم استخراجی از بره موم نسبت به موم دانست به طوری که این ماهیت چسبناک منجر به تصادم ذرات در طی فرایند سانتریفیوژ شده و به این ترتیب سبب الحاق بیشتر ذرات، درشت شدن آنها، جداشدن در فرایند سانتریفیوژ و نهایتاً کاهش راندمان می‌شوند [۱۷]. همانطور که در شکل ۳ (C) مشاهده می‌شود، مخلوط مساوی از امولسیفایرهای مورد استفاده، بالاترین میزان راندمان را در هر دو نوع حلال نشان داده اند (۹۳٪ اتانول و ۹۱٪ ایزوپروپانول). از سوی دیگر، کمترین راندمان را می‌توان در نمونه شاهد تهیه شده با حلال



**Fig 3** Significant linear effect of emulsifier type (A), wax type and interactive effects between solvent and emulsifier type (B), wax and emulsifier type (C), solvent and wax type on polydispersity index ( $p < 0.05$ )

#### ۴- نتیجه گیری

شاخص پراکندگی ذرات در تمامی نمونه‌ها کمتر از ۰/۲۰ بوده و مطلوب به شمار می‌آید. بیشترین راندمان تولید متعلق به نانوذرات موم تولید شده با حلال اتانول و مخلوط برابری امولسیفایرها است. با توجه به نتایج حاصل از این تحقیق می‌توان روش ته‌نشینی ضد حلال را یکی از روش‌های مطلوب برای تولید نانوذرات دانست. به علاوه، مواد لیپیدی موم زنبور عسل و موم استخراجی از بره‌موم از پتانسیل مناسبی برای تولید نانوذرات لیپیدی برخوردار هستند.

در این پژوهش اثر عوامل مختلف از جمله نوع حلال (اتانول مطلق و ایزوپروپانول)، نوع امولسیفایر (توئین ۸۰، کازئینات سدیم و مخلوط برابری آنها) و نوع ماده لیپیدی (موم زنبور عسل و موم استخراجی از بره‌موم) بر پارامترهای اندازه ذرات، شاخص پراکندگی و راندمان تولید نانوذرات لیپیدی به روش ته‌نشینی ضد حلال مورد بررسی قرار گرفت. بر اساس نتایج حاصل، استفاده از امولسیفایر کازئینات سدیم، حلال اتانول و موم استخراجی از بره‌موم کمترین اندازه ذرات را نشان داد.



sitosterol: Effect of formulation variables on physicochemical properties. *Food Chemistry*, 260, 97-105.

- [9] Joye, I.J., McClements, D.J. 2013. Production of nanoparticles by antisolvent precipitation for use in food systems. *Trends in Food Science & Technology*, 34 109-123.
- [10] Liu, F., Tang, C.-H. 2014. Phytosterol colloidal particles as Pickering stabilizers for emulsions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 62 5133-5141.
- [11] Fayaz, G., Goli, S.A.H., Kadivar, M. 2017. A novel propolis wax-based organogel: effect of oil type on its formation, crystal structure and thermal properties. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 94, 47-55.
- [12] Sedaghat Doost, A., Aji Muhammad, D.R., Stevens, C.V., Dewettinck, K., Van der Meeren, P. 2018. Fabrication and characterization of quercetin loaded almond gum-shellac nanoparticles prepared by antisolvent precipitation. *Food Hydrocolloids*, 83, 190-201.
- [13] Tan, T.B., Yussof, N.S., Abas, F., Mirhosseini, H., Nehdi, I.A., Tan, C.P. 2016. Forming a lutein nanodispersion via solvent displacement method: The effects of processing parameters and emulsifiers with different stabilizing mechanisms. *Food Chemistry*, 194, 416-423.
- [14] Trotta, M., Debernardi, F., Caputo, O. 2003. Preparation of solid lipid nanoparticles by a solvent emulsification-diffusion technique. *International Journal of Pharmaceutics*, 257, 153-160.
- [15] Trotta, M., Gallarate, M., Pattarino, F., Morel, S. 2001. Emulsions containing partially water-miscible solvents for the preparation of drug nanosuspensions. *Journal of Controlled Release*, 76, 119-128.
- [16] Schubert, M.A., Müller-Goymann, C.C. 2003. Solvent injection as a new approach for manufacturing lipid nanoparticles – evaluation of the method and process parameters. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 55, 125-131.
- [17] Domingos Fontana, J., Adelman, J., Passos, M., Maraschin, M., de Lacerda, C.A., Mauro Lancas, F. 2004. Propolis: chemical micro-heterogeneity and bioactivity. In J. F. T. Spencer, & A. L. Ragout de Spencer (Eds), *Methods in biotechnology: Environmental microbiology: Methods and protocols* (pp. 203-218). New Jersey, USA: Humana Press.

## ۵- سپاسگزاری

نویسندگان مقاله حاضر از دانشگاه صنعتی اصفهان و صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (INSF) به جهت حمایت‌های مالی برای انجام این پژوهش کمال تشکر را دارند.

## ۶- منابع

- [1] Mühlen, A.Z., Schwarz, C., Mehnert, W. 1998. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery– Drug release and release mechanism. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 45, 149-155.
- [2] Zafeiri, I., Smith, P., Norton, I.T., Spyropoulos, F. 2017. Fabrication, characterization and stability of oil-in water emulsions stabilized by solid lipid particles: the role of particle characteristics and emulsion microstructure upon Pickering functionality. *Food and Function*, 8, 2583-2591.
- [3] Xue, J., Wang, T., Hu, Q., Zhou, M., Luo, Y. 2018. Insight into natural biopolymer-emulsified solid lipid nanoparticles for encapsulation of curcumin: Effect of loading methods. *Food Hydrocolloids*, 79, 110-116.
- [4] Schröder, A., Sprakel, J., Schroën, K., Spaen, J.N., Berton-Carabin, C.C. 2018. Coalescence stability of Pickering emulsions produced with lipid particles: A microfluidic study. *Journal of Food Engineering*, 234, 63-72.
- [5] Binks, B.P., Rocher, A. 2009. Effects of temperature on water-in-oil emulsions stabilized solely by wax microparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, 335, 94-104.
- [6] Soleimani, Y., Goli, S.A.H., Varshosaz, J., Sahafi, S.M. 2018. Formulation and characterization of novel nanostructured lipid carriers made from beeswax, propolis wax and pomegranate seed oil. *Food Chemistry*, 244, 83-92.
- [7] Bevilacqua, M., Bevilacqua, M., Serra, E., Vianello, A., Garrou, E., Sparagna, B., Barale, U., Alberto Zaccagna, C. 1997. Natural resin association such as incense and propolis in zootechnology. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 62, 247-252.
- [8] Soleimani, Y., Goli, S.A.H., Varshosaz, J., Maestrelli, F. 2018. Propolis wax nanostructured lipid carrier for delivery of β



## Investigation of Lipidic Solid Nanoparticles from Propolis and Bees Waxes produced by Antisolvent Precipitation Method

Shirvani, A.<sup>1</sup>, Goli, S. A. H.<sup>2\*</sup>, Varshosaz, J.<sup>3</sup>

1. PhD student of Food Science and Technology, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.
2. Associated professor, Department of Food Science and Technology, College of Agriculture, Isfahan University of Technology, Isfahan, Iran.
3. Professor, Department of Pharmaceutics, College of Pharmacy, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran.

### ARTICLE INFO

### ABSTRACT

#### Article History:

Received 04 May 2020

Accepted 01 November 2020

#### Keywords:

Solid lipid nanoparticle,  
Beeswax,  
Propolis wax,  
Antisolvent precipitation.

**DOI:** 10.52547/fsct.18.02.08

\*Corresponding Author E-Mail:  
amirgoli@cc.iut.ac.ir

Antisolvent precipitation is one of the desirable methods to fabricate colloidal nanoparticles from food ingredients. The aim of this study was colloidal wax-based nanoparticles production from beeswax and propolis wax by antisolvent precipitation method. For this purpose, the effect of different parameters including solvent type (absolute ethanol, isopropanol), emulsifier type (Tween 80, sodium caseinate and their mixture in a ratio of 1:1) and the type of lipidic compounds (beeswax, propolis wax) was investigated on the parameters of particle size, polydispersity index and production yield. According to obtained results, the lowest amount of particle size belonged to absolute ethanol (205 nm) and sodium caseinate (192 nm). Emulsifier type, solvent/emulsifier type had significant ( $p < 0.05$ ) linear and interactive effects respectively on polydispersity index. The polydispersity index level of both waxes was less than 0.21 and in desirable range. The results of production yield showed that mixture of emulsifier, ethanol and beeswax had the maximum amount of yield (92%, 93% and 90%, respectively). The interactive effects on production yield demonstrated that the mixture of emulsifiers, regardless to solvent and wax type used, had the highest amount. In addition, beeswax nanoparticles, which were prepared by absolute ethanol (ca. 91.5%), showed the maximum amount of yield compared to fabricated nanoparticles from both waxes with isopropanol. As results showed, antisolvent precipitation can be used as a feasible way to produce solid lipid nanoparticles. It was also determined that beeswax and propolis wax had a good potential for preparing lipid nanoparticles.