



مدلسازی و بهینه سازی نانوامولسیون اسانس موسیر ایرانی حامل اسیدهای چرب امگا سه با استفاده از

## طرح D-Optimal

نسرین فرجی<sup>۱\*</sup>، محمد علیزاده<sup>۲</sup>، سهیلا فرجی<sup>۳</sup>

۱-نسرین فرجی، دانش آموخته دکترای علوم و صنایع غذایی، مدیر تحقیق و توسعه شرکت آذین شوشتر.

۲-محمد علیزاده، استاد دانشگاه ارومیه.

۳-سهیلا فرجی، کارشناس ارشد صنایع غذایی، مدیر کنترل کیفیت شرکت آذین شوشتر.

### اطلاعات مقاله

### چکیده

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۰/۱۰/۳۰

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۲/۱۱

کلمات کلیدی:

نانوامولسیون،

اسیدهای چرب غیراشباع،

امگا سه،

امولسیفیکاسیون خودبخودی،

اسانس موسیر ایرانی.

DOI: 10.22034/FSCT.19.130.307

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.130.24.3

\* مسئول مکاتبات:

Nasrin.faraji88@yahoo.com

استفاده از روش های کم انرژی بدلیل عدم نیاز به تجهیزات گران قیمت و سهولت تولید بسیار رواج یافته است. در این پژوهش، نانوامولسیون اسیدهای چرب امگا سه با استفاده از اسانس موسیر ایرانی به روش امولسیفیکاسیون خودبخودی تهیه گردید. هدف از این مطالعه، بررسی شرایط بهینه تولید نانوامولسیون با استفاده از طرح دی اپتیمال بود. برای این منظور در ابتدا نانوامولسیون های حاوی اسیدهای چرب امگا سه با استفاده از اسانس گیاهی موسیر ایرانی با متغیرهای مستقل غلظت امگا سه ( ۷۵-۲۵ درصد)، نوع سورفاکتانت (توئین ۸۰، توئین ۲۰، توئین ۸۰:۲۰ و کازئینات سدیم)، درصد SOR (نسبت سورفاکتانت به روغن) (۳۰۰-۱۰ درصد) و مدت زمان نگهداری (۶۰-۱ روز) تولید گردیدند و تاثیر آنها بر پارامترهایی مانند میانگین قطر ذرات، شاخص کدورت، اندیس خامه ای شدن، خواص آنتی اکسیدانی، اندیس پراکسید، اندیس تیوباربتوریک اسید و ضریب شکست مورد مطالعه قرار گرفت. اندازه قطرات بسیار تحت تاثیر غلظت سورفاکتانت و نوع سورفاکتانت بود و با افزایش مقدار سورفاکتانت، میانگین قطر قطرات کاهش معنی داری یافت، در واقع افزایش غلظت سورفاکتانت در نانوامولسیون ها در اکثر موارد سبب افزایش میزان جذب سورفاکتانت به سطح W/O گردیده و در نتیجه منجر به کاهش بیشتر کثش سطحی شده و در نهایت سبب کاهش اندازه ذرات، شاخص کدورت و اندیس خامه ای شدن گردید. با استفاده از بهینه سازی عددی مقادیر بهینه متغیرهای مستقل نانو امولسیون اسانس موسیر ایرانی حامل اسیدهای چرب امگا سه به میزان امگا سه (۲۵ درصد)، میزان SOR (۲۶۳/۳۹ درصد)، مدت زمان نگهداری (۳۵ روز) و سورفاکتانت توئین ۸۰ تعیین شدند.

## ۱- مقدمه

در دهه های اخیر بدلیل همه گیر شدن بیماریهای مختلف مانند بیماریهای قلبی-عروقی، چاقی، دیابت و سرطان مردم در سراسر جهان توجه ویژه ای به رژیم غذایی مناسب، افزایش فعالیت های بدنی و تغییرات رفتاری و در کل سلامتی خود داشته اند. در بحث رژیم غذایی مناسب امروزه تقاضا برای غذاهای کم کالری و کم چرب و ترجیحاً غنی شده با ترکیبات فراسودمند نظیر انواع اسیدهای چرب ضروری، ویتامین ها، کاروتنوئیدها، آنتوسیانین ها، فلاونوئیدها و استرول ها رو به افزایش می باشد [۱]. اهمیت فیزیولوژیکی برخی از اسیدهای چرب غیراشباع، زمینه را برای استفاده هدفمند پدید آورده است. روغن ماهی دارای اسیدهای چرب ضروری از جمله اسیدهای چرب امگا سه و امگا شش است که سودمندی آنها در زمینه های بسیاری مورد تأیید قرار گرفته است، به عنوان مثال تأثیرات مفید روغن ماهی در عملکرد قلب و عروق کاملاً اثبات شده است، اسیدهای چرب امگا سه، دسته ای از اسیدهای چرب چند غیراشباع (معمولاً بیش از دو پیوند دوگانه) می باشند که پیش ساز بسیاری از ترکیبات ضروری در بدن هستند، اسیدهای چرب غیر اشباع دوکوزاهگزانوئیک اسید<sup>۱</sup>، ایکوزاپنتانوئیک اسید<sup>۲</sup> و آلفا لینولنیک اسید<sup>۳</sup> مهمترین اسیدهای چرب امگا سه محسوب می شوند [۲]. منابع اصلی تامین امگا سه شامل روغن ماهی، روغن کریل، روغن تخم ماهی، روغن جلبک، گردو، بذر کنان و کلزا است، میزان این اسیدهای چرب ضروری امگا سه در موجودات دریایی مانند ماهی ها بیشتر از سایر مواد غذایی هست، اما استفاده از ماهی بعنوان منبع غنی از اسیدهای چرب غیر اشباع به دلیل قیمت بالای آنها، بوی نامطبوع و میزان آلودگی هایی مانند فلزات سنگین، قابلیت دسترسی و تامین همیشگی آنها محدودیت هایی دارد [۳]. اسیدهای چرب امگا سه نقش مهمی در پیشگیری از بیماریهای قلبی-عروقی به خصوص در جمعیت های در معرض خطر دارند [۴]. وجود امگا سه باعث رشد سلولهای مغزی، سلامت بافت های چشمی، بهبود بیماری های التهابی، کاهش کلسترول خون، کاهش فشار خون، جلوگیری از

سرطان، جلوگیری از رماتیسم مفصلی و کاهش اختلالات ذهنی نظیر افسردگی و پارکینسون می گردد [۵]. غنی سازی مواد غذایی با ترکیبات فراسودمند به ویژه اسیدهای چرب امگا سه به افزایش سلامتی عموم کمک فراوانی میکند اما در رابطه با با غنی سازی مواد غذایی با روغن ماهی مشکلاتی نظیر آبریزی بسیار بالای اسیدهای چرب غیر اشباع، حساسیت به اکسیداسیون در طی دوران نگهداری و تولید ترکیبات نامطبوعی وجود دارد که مصرف را برای مصرف کننده غیرممکن می نماید [۶]. با توجه به اینکه صنایع غذایی همواره در جستجوی روش های جدیدتر و ارزان تر برای تولید و نگهداری غذا است. حوزه فناوری نانو گزینه های زیادی را برای تولید و نگهداری مواد غذایی پیشنهاد می کند. انکپسولاسیون (درون پوشانی) به فرایندی گفته می شود که در آن مواد زیست فعال (مانند ترکیبات فراسودمند) توسط یک ماده دیگر پوشش داده می شود و آنها را از عوامل مخرب بیرونی (نور، حرارت، اکسیژن، فلزات سنگین، آنزیم ها) محافظت می کند. انواع مختلف نانو حاملها در صنایع غذایی قابلیت تولید و کاربرد دارند و شامل نانوکپسول های بر پایه بیوپلیمرها و انواع لیپید (نانو لیپوزومها، نانو نیوزومها، نانوامولسیون ها، میسل های سورفاکتانت ها (میکرومولسیونها) و ذرات لیپیدی جامد) می باشند [۶]. مطالعات پیشین نشان داده اند که سیستم های تحویلی کلوییدی مانند امولسیون ها، امولسیون های چند لایه، امولسیون های چند گانه و نانوامولسیون ها می توانند اسیدهای چرب غیراشباع را درون شرایط آبی قرار داده و پایداری اکسیداسیونی آنها را بهبود دهند [۷]. سیستم امولسیونی مورد استفاده برای انتقال ترکیبات نیز خود به دو دسته اصلی ماکرو امولسیون معمولی (اندازه ذرات بیشتر از ۱۰۰ نانومتر) و نانو امولسیون (اندازه ذرات حدوداً ۵۰۰-۱۰ نانومتر) تقسیم می گردند [۸]. بدلیل کوچک بودن اندازه ذرات نانوامولسیون نور را کمتر پخش نکرده در نتیجه محلولها شفاف هستند [۹]. نانوامولسیون ها کاربردهای عملی بسیاری در ساخت مواد شیمیایی، صنایع غذایی، دارویی و آرایشی و بهداشتی دارند [۱۰]. تشکیل و افزایش سطح بین فاز روغن و فاز آبی نیاز به ورود انرژی به سیستم نانوامولسیون بوده و این انرژی می تواند توسط ابزارهای مکانیکی (روش پر انرژی) یا انرژی پتانسیل اجزای تشکیل دهنده آن (روش کم انرژی) تأمین شود. روش های کم انرژی به طور کل وابسته به پدیده های بین سطحی در مرز بین فازهای آب - روغن هستند و اغلب کارایی

1 Docosahexaenoic acid (DHA)

2 Eicosapentaenoic acid (EPA)

3 Alpha Linolenic (ALA)

فتالین، تری کلرو استیک اسید، کلروفرم، چسب نشاسته از شرکت سیگما آلدریج آمریکا (Sigma Aldrich, USA) خریداری شد. اسانس موسیر ایرانی از شرکت دانش بنیان عطر و طعم ماگنولیا (ایران) تهیه شد و آنالیز اسانس با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی متصل به طیف سنجی جرمی (GC MS-QP2010SE) شرکت SHIMADZU ژاپن انجام شد. آب دو بار تقطیر برای تمام نمونه ها تهیه شد. سایر مواد شیمیایی مورد استفاده با درجه آزمایشگاهی تهیه شدند.

## ۲-۱- روش تهیه نانوامولسیون

سیستم نانوامولسیون حاوی امگا سه با استفاده از روش کم انرژی تشکیل خودبه خودی امولسیون روغن در آب با اضافه کردن قطره قطره فاز روغنی (محلول امگا سه در اسانس روغنی حامل به همراه سورفاکتانت های توئین ۲۰، توئین ۸۰ و کازئینات سدیم) مطابق طرح آماری (جدول ۳-۱) بر روی آب دیونیزه به نسبت ۲۰ به ۸۰ تولید شد، درحین تشکیل، امولسیون به طور مداوم توسط همزن مغناطیسی با سرعت بهینه ۸۰۰ دور بر دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد به مدت ۸ ساعت همزده شد. با توجه به تأثیر دما در اندازه ذرات نانوامولسیون، از همزن مغناطیسی مجهز به سنسور تنظیم دما استفاده گردید، به این ترتیب نانوامولسیون مورد نظر تهیه گردید [۱۴].

## ۲-۲- اندازه گیری ترکیبات موجود در اسانس

### موسیر ایرانی

ترکیبات موجود در اسانس گیاهی موسیر ایرانی با دستگاه گاز کروماتوگرافی - طیف سنجی جرمی Agilent 6890، آمریکا بصورت کمی اندازه گیری شد. این دستگاه با ستون موبینه به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میکرومتر و ضخامت لایه داخلی ۰/۲۵ میکرومتر با برنامه دمایی ۵۰ تا ۲۶۵ درجه سانتی گراد با سرعت ۱۵ درجه سانتی گراد در دقیقه و نگهداری ستون در ۲۶۵ درجه سانتی گراد به مدت ۳۰ دقیقه استفاده شد، دمای اتاق تزریق ۲۵۰ درجه سانتی گراد بود و از گاز هلیوم با سرعت جریان ۱/۵ میلی متر بر دقیقه استفاده شد. طیف نگار جرمی مورد استفاده Agilent 5973 با انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت و دمای منبع یونیزاسیون ۲۵۰ درجه سانتی گراد بود. شناسایی اجزا با مقایسه طیف جرمی آنها با طیف ترکیبات در حافظه کامپیوتر و استانداردهای معتبر صورت گرفت.

بیشتری تولید ذرات ریز نسبت به روش های پر انرژی دارند [۱۱]. تنها محدودیت این روش ها نوع روغن، نوع و غلظت امولسیفایر مورد استفاده است. تولید خودبخودی امولسیون یکی از روش های کم انرژی تولید نانوامولسیون است که در نتیجه تیتراسیون یک فاز آلی حاوی روغن، سورفاکتانت هیدروفیل و حلال قابل امتزاج با آب در فاز آبی رخ می دهد. ویژگی های خودبخودی این روش نتیجه حالت های غیرتعادلی اولیه دو فاز مختلف است که بدون همزدن در تماس با هم قرار می گیرند. اسانس های گیاهی، مایعات روغنی معطر هستند که از بخش های مختلف گیاهان بدست آمده و به عنوان طعم دهنده های غذایی مورد استفاده قرار می گیرند [۱۲]. مطالعات مختلفی ویژگی های ضد میکروبی، ضد قارچی، ضد ویروسی، ضد انگلی و آنتی اکسیدانی اسانس های گیاهی را تایید نمودند و برخی نیز در محافظت مواد غذایی مورد استفاده قرار گرفته اند. اسانس های ضروری برای غلبه بر مشکلات ناشی از اکسیداسیون و ناپایداری فیزیکی می توانند بکار گرفته شوند. علاوه بر این، اسانس ها می توانند عطر و طعم های نامطلوب مانند روغن ماهی را پوشانده و محصولات غنی شده با روغن ماهی با ویژگیهای مطلوب تر برای مصرف کننده، تولید نمایند. موسیر با نام علمی (*Allium hirtifolium Boiss*) گیاهی از راسته سوسن و رسته پیازیان است، گیاه موسیر علاوه بر استفاده در رژیم غذایی، دارای مصارف درمانی سنتی و غذایی نیز می باشد. این گونه گیاهی دارای خواص ضد قارچی، ضد باکتریایی، ضد ویروسی، آنتی اکسیدانی و ضدسرطانی می باشد، گونه های آلیوم منابع سرشاری از فیتوکمیکال ها از جمله فلاونوئیدها هستند که برای درمان و پیشگیری از برخی بیماری ها مثل سرطان ها، چاقی، افزایش چربی خون و انواع دیابت مفید می باشند [۱۳]. هدف این پژوهش، تولید و بهینه سازی نانوامولسیون امگا سه با استفاده از فاز روغنی اسانس موسیر ایرانی به روش امولسیفیکاسیون خودبخودی و همچنین ارزیابی خصوصیات فیزیکوشیمیایی آن می باشد.

## ۲- مواد و روش ها

روغن ماهی از شرکت داروسازی زهراوی تبریز، کازئینات سدیم، DPPH، متانل از شرکت مرک آلمان (Merck Chemical, Germany)، توئین ۸۰، توئین ۲۰، هیدروکسید سدیم، فنل

## ۲-۳- تعیین اندازه ذرات

قطر متوسط ذرات در دستگاه آنالیز کننده ذرات DLS (Shimadzu، ژاپن) (طول موج ۶۳۲/۸) با محدوده ۵۰ نانومتر تا ۵۰ میکرومتر تعیین گردید. این دستگاه بر اساس پراکنش نور لیزر عمل می کند. اندازه گیری ذرات پس از گذشت ۲۴ ساعت از تولید و نگهداری نمونه ها در دمای محیط (۲۵ درجه سانتی گراد) انجام شد. متوسط اندازه ذرات بر اساس قطر میانگین حجمی تعیین شد و کلیه نمونه ها در سه تکرار اندازه گیری شدند [۱۴].

$$[D_{43}] = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3}$$

$N_i$ : تعداد ذرات

$d_i$ : میانگین قطر ذرات

## ۲-۴- اندازه گیری اندیس پراکسید

برای اندازه گیری اندیس پراکسید ۵ گرم نمونه در ۳۰ میلی لیتر محلول اسید استیک- کلروفرم (نسبت ۳ به ۲) با افزودن ۰/۵ میلی لیتر محلول اشباع یدید پتاسیم مخلوط گردیده و پس از گذشت زمان ۱ دقیقه، با افزودن ۳۰ میلی لیتر آب و در حضور شناساگر نشاسته با محلول سدیم تیوسولفات ۰/۰۱ نرمال تیترو شدند [۱۵].

$$\text{Peroxide index} = \frac{N \times V \times 1000}{M}$$

$N$  = نرمالیت تیوسولفات سدیم

$V$  = حجم مصرفی تیوسولفات سدیم

$M$  = جرم نمونه

## ۲-۵- اندازه گیری اندیس اسید تیوباریتوریک

یک گرم نمونه در ۱۰ میلی لیتر تتراکلرید کربن حل شده و به آن ۱۰ میلی لیتر محلول اسید تیوباریتوریک اضافه شد، سپس به مدت ۵ دقیقه در سانتریفوژ با سرعت ۱۰۰۰ دور در دقیقه قرار داده شد، سپس قسمت آبی آن جدا گردیده و به مدت ۳۰ دقیقه در حمام آب جوش قرار گرفت، پس از آن میزان جذب در طول موج ۵۳۲ نانومتر با دستگاه اسپکتروسکوپی UV-VIS اندازه گیری شد [۱۶].

## ۲-۶- اندازه گیری قدرت آنتی اکسیدانی

از پودر DPPH محلول ۰/۱ میلی مولار با متانول تهیه شد (۰/۰۰۴ گرم از DPPH در ۱۰۰ میلی لیتر متانول)، ابتدا دو میلی

لیتر محلول در هر لوله آزمایش ریخته شد، سپس ۱۰۰ میکرولیتر نمونه اضافه گردید و پس از همزدن به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه و تاریکی نگهداری شد. میزان جذب نوری به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ۵۱۷ نانومتر با سه تکرار اندازه گیری شد. محلول DPPH بنفش رنگ پس از اضافه شدن نمونه به آن بر اساس میزان قدرت آنتی اکسیدانی تا رنگ زرد تغییر کرد [۱۷].

## ۲-۷- اندازه گیری کدورت

کدورت نانوامولسیون های تهیه شده با دستگاه اسپکتروفوتومتر UV-VIS (UV-1700 Pharma Spec, Shimadzu Corporation) در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه گیری شد [۱۸].

## ۲-۸- اندازه گیری ضریب شکست

ضریب شکست نمونه ها ۲۴ ساعت بعد از تولید نمونه ها و همچنین در طی دوران نگهداری مطابق طرح آزمایشی با استفاده از دستگاه رفراکتومتر رومیزی (RX7000a; Atago, Japan) در دمای ۲۵ درجه سانتیگراد در سه تکرار اندازه گیری شد [۱۹].

## ۲-۹- اندازه گیری اندیس خامه ای شدن

جهت بررسی میزان خامه ای شدن مقدار ۱۰ میلی لیتر از نمونه تولید شده به یک لوله آزمایش انتقال و در دمای محیط نگهداری شد. حجم و ارتفاع نمونه های لایه رویی (خامه) ناشی از دو فاز شدن محلول در طول دوران نگهداری اندازه گیری گردید [۲۰].

## ۲-۱۰- طرح آماری تولید نانوامولسیون های

اسانس موسیر گیاهی حامل اسیدهای چرب امگا سه

در این تحقیق از طرح دی اپتیمال با بررسی تاثیر چهار فاکتور مستقل شامل میزان امگا سه، زمان نگهداری، نسبت سورفاکتانت به فاز روغنی (SOR) و نوع سورفاکتانت (توئین ۸۰، توئین ۲۰: توئین ۸۰، توئین ۲۰ به نسبت یک به یک و کازئینات سدیم) به منظور بررسی خواص فیزیکوشیمیایی و پایداری فرمولاسیون نانوامولسیون های اسانس موسیر ایرانی حاوی اسیدهای چرب امگا سه مطابق جدول (۱) به تعداد ۳۲ فرمولاسیون استفاده گردید و پس از آنالیز رگرسیون و یا تعیین مدل های مناسب از روش تابع مطلوبیت عددی برای یافتن شرایط بهینه استفاده شد. سطح خطای نوع اول در این مطالعه برابر ۰/۰۵ در نظر گرفته

(چهار فاکتور) و  $0\beta$  ضریب ثابت،  $i\beta$  اثرات خطی،  $ij\beta$  اثرات متقابل و  $ii\beta$  اثرات مربعی می باشند. کل مدل شامل جملات خطی، درجه دوم و حاصل ضرب ها می باشد. برای نشان دادن رابطه هر یک از متغیرهای تابع در مدل رگرسیون با متغیرهای مستقل نمودارهای سطوح پاسخ و کانتورپلات ترسیم شدند، به منظور ارزیابی صحت مدل های برازش داده شده با داده های آزمایشی در شرایط بهینه تعیین شده، آزمون های مورد نظر صورت گرفته و نتایج ارزیابی کمی و کیفی آن با مقادیر پیشگویی شده توسط مدل مقایسه گردید.

شد. از نرم افزار Design Expert 7.1.6 جهت طراحی آزمایشی، تحلیل داده ها، مدل سازی، بهینه کردن پارامترها و رسم نمودارهای مربوط به روش سطح پاسخ استفاده گردید. هر یک از متغیرهای تابع میانگین قطر ذرات، شاخص کدورت، اندیس خامه ای شدن، اندیس پراکسید، اندیس تیوباریتوریک اسید، خواص آنتی اکسیدانی و ضریب شکست در قالب مدل رگرسیون درجه دوم چند متغیره به صورت تابعی از متغیرهای مستقل (A, B, C, D) ارائه شدند.

$$Y = \beta_0 + \sum_{i=1}^a \beta_i X_i + \sum_{i=1}^a \sum_{j=i+1}^a \beta_{ij} X_i X_j + \sum_{i=1}^a \beta_{ii} X_i^2$$

در این مدل Y پاسخ پیش بینی شده،  $X_i$  و  $X_j$  متغیرهای مستقل

Table 1 Matrix of D-Optimal design

Run order	Block	Factors			
		A: Omega3 +(%)	B: Storage Time (day)	C: SOR (%)	D: Surfactant type
1	1	75	24.6	300	SC
2	1	52.75	9.26	91.4276	T80
3	1	50	38.17	155	T20
4	1	65	1	10	SC
5	1	50	38.17	155	T20
6	1	75	60	300	T80
7	1	25	60	276.8	T80:20
8	1	75	30.5	10	T80
9	1	25	60	10	T80
10	1	75	60	68	SC
11	1	25	1	10	T20
12	1	75	1	134.7	T80:20
13	1	52.75	9.26	91.4276	T80
14	1	25	1	10	T80
15	1	25	36.4	10	SC
16	1	75	1	300	T80
17	1	71.25	60	10	T80:20
18	1	25	30.5	300	T80
19	1	25	1	242	SC
20	1	25	1	10	T80:20
21	1	71.75	37.875	161.0556	T80:20
22	1	25	60	300	T20
23	1	43.60223	58.82	10	T20
24	1	25	1	10	T80:20
25	1	75	60	10	T20
26	1	50	38.17	155	T20
27	1	40.95159	1	174.0415	T20
28	1	75	1	300	T20
29	1	25	30.5	300	T80
30	1	47	1	300	T80:20
31	1	56.0709	54.1	300	T80:20
32	1	35.25	60	300	SC

## ۳- نتایج و بحث

## ۳-۱- آنالیز کروماتوگرافی گازی - طیف سنج

## جرمی اسانس موسیر ایرانی

بر اساس آنالیز اسانس موسیر ایرانی با استفاده از دستگاه GC-mass مطابق کروماتوگرام شکل (۲) عمده ترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس موسیر ایرانی شامل متیل متیل تیومتیل دی سولفید

(۳۸/۱۷٪)، دی آلیل تری سولفید (۲۱/۵٪)، متیل دی سولفید (۳۶٪)، دی متیل تری سولفید (۶۲٪)، تری سولفید متیل-۲ پروپنیل (۷/۵٪) و ترکیبات کم مقدار مانند اتیل پلازگونات، دی لیمونین، تتراسولفید دی-۲ پروپنیل، بوتیل بوتیرات و اتیل اکتانات بود.

Table 2 GC-Mass chromatogram of Iranian Shallot

Amount(%)	Time(min)	compositiopn	number
17.36	5.075	Methyl disulfide	1
21.5	5.273	Diallyl trisulfide	2
7.5	7.25	Trisulfide methyl2 propenyl	3
7.62	9.804	Dimethyl trisulfide	4
1.42	9.991	Butyl butyrate	5
1.51	10.683	D-Limonene	6
38.17	12.705	Methyl methylthiomethyl disulfide	7
0.82	13.321	Ethyl octanoate	8
2.13	14.795	Ethyl Pelargonate	9
1.2	16.65	Tetrasulfide di,2-propenyl	10

## ۳-۲- انتخاب مدل کارآمد به منظور پیشگویی

## پاسخ ها

در این آزمایشات از روش های آماری و تحلیلی برای تعیین پارامترهای تاثیرگذاری که بیشترین اثر بر روی متغیرهای پاسخ (خواص مورد نظر) دارند استفاده شد. روش سطح پاسخ از روش های پیشرفته برای تحلیل و مدل سازی داده ها است که دارای روش های گوناگونی برای طراحی آزمایشی می باشد. یکی از پرکاربردترین روش ها روش دی اپتیمال بوده است. در روش سطح پاسخ به ازای هر متغیر وابسته مدل رگرسیونی چند متغیره ای تعریف می شود که تاثیر خطی، درجه دوم و متقابل متغیرهای مستقل را بر هر متغیر وابسته بیان می کند. مدل های بدست آمده از آنالیز داده های واقعی برای نانوامولسیون های موسیر ایرانی نوشته شده است. ضرائب مربوط به مدل های رگرسیونی و نتایج آنالیز واریانس برای هریک از متغیر های تابع استخراج گردید. برای بررسی صحت مدل ها از تست عدم برازش، ضرائب تبیین ( $R^2$ ) و تبیین اصلاح شده ( $Adj R^2$ ) استفاده گردید. از نظر آماری مدلی مناسب است که تست عدم برازش آن معنی دار

E:\GMS\951202\Shallot Extract 224123310 Magnolia-SPME 3- Split 10-T injector 270 splitless\Shallot Extract 224123310 Magnolia-SPME 3- Split 10-T inject

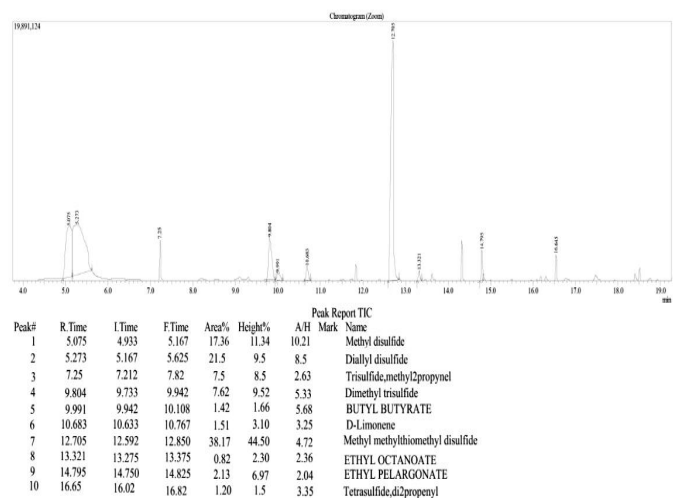


Fig1 GC-Mass chromatogram of Iranian Shallot essential oil and chemical composition

شکل (۲) برهمکنش تاثیر درصد SOR و نوع سورفاکتانت در مقادیر ثابت میانی دو پارامتر دیگر بر میانگین قطر ذرات نانوامولسیون اسانس موسیر ایرانی حاوی اسیدهای چرب امگا سه را نشان می دهد، در تمامی فرمولاسیون ها با افزایش درصد SOR کاهش قابل توجهی در میانگین اندازه ذرات مشاهده گردید. کمترین میانگین قطر ذرات مربوط به فرمولاسیون های حاوی سورفاکتانت توئین ۸۰ بود. با افزایش درصد SOR در فرمولاسیون های حاوی سورفاکتانت کازئینات سدیم، میانگین قطر ذرات تغییرات چندانی معنی دار نداشت ( $P < 0.0001$ ). سورفاکتانت های کوچک مولکولی نسبت به سورفاکتانت های درشت مولکولی فعالیت سطحی بالاتری داشتند و در غلظت های بالاتر سورفاکتانت، تعداد بیشتری از ریزمولکول ها بصورت کاملاً متراکم در سطح بینابینی نسبت به پروتئین ها در کنار هم قرار گرفته و کشش سطحی را بیشتر کاهش می دهد که منجر به تولید ذرات ریزتر می گردد. در این نمودار مشاهده گردید که نمونه ها در حضور سورفاکتانت کازئینات سدیم میانگین قطر ذرات کمتری داشتند که با توجه به ساختار منحصر به فرد این پروتئین و داشتن اسیدهای آمینه مختلف، موقعیت های بیشتری در مقایسه با سورفاکتانت های ریز مولکولی برای برقراری پیوند با اسانس داشته است، همچنین معنی دار نبودن تغییرات میانگین قطر ذرات در حضور سورفاکتانت پروتئینی نشانگر عملکرد بهتر این سورفاکتانت بوده که با مقدار کمتری از پروتئین، اندازه ذرات کوچکتری بدست آمد، از طرفی ضخامت نسبی لایه سورفاکتانت کازئینات سدیم نسبت به سورفاکتانت های ریز مولکولی نیز افزایش داشت که تا حدودی می تواند سبب افزایش اندازه ذرات نیز شود.

نبوده و دارای بالاترین مقادیر  $R^2$  و  $Adj R^2$  باشد. هر چه عدد  $R^2$  به یک نزدیک تر باشد قدرت مدل برازش یافته در توصیف تغییرات پاسخ به عنوان تابعی از متغیرهای مستقل بیشتر می باشد.

### ۳-۳- اندازه گیری میانگین قطر ذرات نانوامولسیون های اسانس موسیر ایرانی حامل اسیدهای چرب امگا سه

به منظور بررسی تاثیر چهار فاکتور مستقل (میزان امگا سه، مدت زمان نگهداری، درصد SOR و نوع سورفاکتانت) بر پارامتر تغییرات میانگین قطر ذرات نانوامولسیون اسانس موسیر ایرانی حاوی اسیدهای چرب امگا سه مدل های خطی، درجه دوم، اثرات متقابل و مکعبی برای برازش داده های حاصل از آزمایش اندازه گیری میانگین قطر ذرات مورد استفاده قرار گرفتند. در میان مدل های مذکور مدل درجه دوم چند متغیره مطابق مدل زیر به صورت مناسبی برازش داده شد.

معادله (۳-۱)

$$D_{43} = 94.26032 - 4.54590A + 13.32244B + 52.75502C - 9.10530D_1 - 31.40702D_2 + 19.94970D_3 - 36.76454AB + 14.93053AC + 56.186823CD_1 - 3.77316CD_2 + 40.36669CD_3 + 49.90324B^2$$

در معادله فوق ضرایب A, B, C, D به ترتیب نشانگر مقدار امگا سه (درصد)، مدت زمان نگهداری (روز)، درصد SOR و نوع سورفاکتانت می باشند.

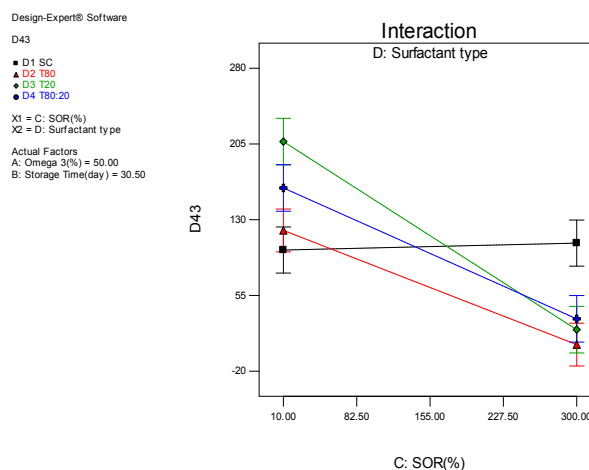


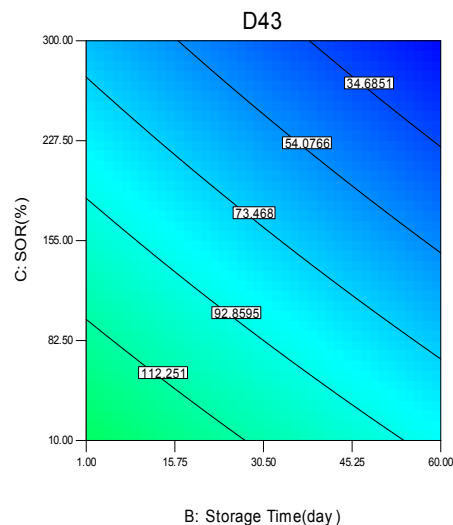
Fig 2 Interaction curve of D43 as a function of SOR% and type of surfactant

اسیدهای آمینه غیر قطبی به سطح ذرات را دارند و برخلاف سورفاکتانت های ریز مولکولی که سریع از سطح ذرات جدا گردیده، برای مدت طولانی در سطح می تواند باقی بمانند و با توجه به اینکه پروتئین ها دارای اندکی بار منفی هستند هم از طریق دافعه الکتروستاتیکی و هم ممانعت فضایی به پایداری بهتر سیستم برای مدت زمان طولانی تر کمک می کند. نتایج به دست آمده از این پژوهش نیز با مشاهدات Krstonošić و همکاران (۲۰۰۹) مطابقت داشت آنها بیان کردند که در مدت نگهداری، قطر قطرات در امولسیون مونو دیسپرس به سمت تولید قطرات ریزتر تغییر پیدا کرد [۲۳].

Design-Expert® Software

D43  
311  
11.6  
X1 = B: Storage Time(day)  
X2 = C: SOR(%)

Actual Factors  
A: Omega 3(%) = 50.00  
D: Surfactant type = T80



**Fig 3** Two-dimensional Contour-Plot of storage time and SOR % on D43 (Intermediate constant of two other parameters)

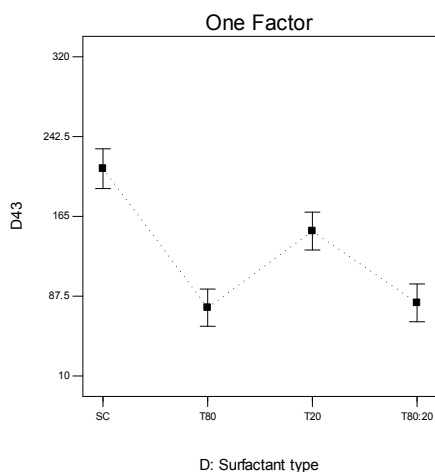
کانتور پلات دو بعدی مدت زمان نگهداری و درصد SOR در نانوامولسیون های اسانس موسیر ایرانی حاوی اسیدهای چرب امگا سه در شکل (۳) نشان داده شده است. در طول مدت نگهداری، میانگین قطر ذرات نانوامولسیون ( $87.5 \pm 0.3$  نانومتر) روند کاهشی نشان داد. کاهش اندازه ذرات در طول مدت نگهداری برخلاف برخی نتایج حاصل از تحقیقات قبلی بود [۲۱]. کاهش میانگین قطر ذرات با گذشت مدت زمان نگهداری در اثر پدیده کاهش اندازه حل شده اتفاق افتاد. از ابتدا در محیط، میسل های سورفاکتانت حضور داشته است، این میسل ها به سطح قطرات روغن نزدیک شده و مولکول های روغن را که به سطح قطرات متصل شده، گرفته و به قطرات دیگر متصل می کنند [۲۲]. به بیان دیگر، با گذشت مدت زمان نگهداری، سورفاکتانت های موجود در توده، بخشی از مولکول های موجود در سطح قطرات را جذب می کنند و قطرک های جدیدی می سازند. سورفاکتانت های ریز مولکولی مانند توئین ۸۰ به علت تحرک بالاتر و کاهش بیشتر کشش سطحی و قابلیت انطباق با انحنا سطح ذرات فعالیت سطحی بالاتر داشته اند و در ابتدای دوران نگهداری اندازه ذرات کمتر خواهد بود، اما در مورد مولکول های بیوپلیمری دارای تعداد زیادی محل اتصال ضعیف از طریق

Design-Expert® Software

D43

X1 = D: Surfactant type

Actual Factors  
A: Omega 3(%) = 50.00  
B: Storage Time(day) = 30.50  
C: SOR(%) = 155.00



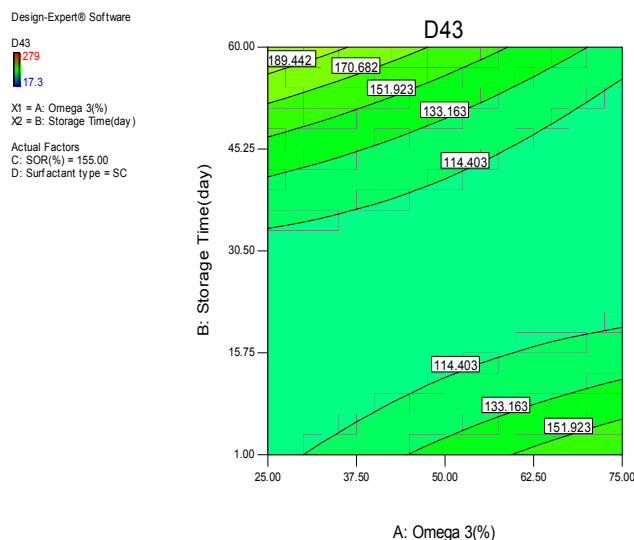
**Fig 4** One-factor curve of the effect of surfactant type on the D43

شکل (۴) نمودار تک فاکتور تاثیر نوع سورفاکتانت بر میانگین قطر ذرات در مقادیر ثابت سه پارامتر میزان امگا سه، مدت زمان نگهداری و درصد SOR را نشان می دهد. بیشترین میانگین قطر ذرات مربوط به فرمولاسیون های حاوی سورفاکتانت کازئینات سدیم بود و کمترین میانگین اندازه ذرات مربوط به فرمولاسیون های حاوی سورفاکتانت های توئین ۸۰ و توئین ۸۰:۲۰ بوده است. میزان کاهش اندازه ذرات به ترتیب کازئینات سدیم (۲۱۲ نانومتر) < توئین ۲۰ (۱۴۱ نانومتر) < توئین ۸۰ (۷۵ نانومتر) و توئین ۸۰:۲۰ (۸۰ نانومتر) می باشد. نوع سورفاکتانت بکار گرفته شده، ماهیت لایه سطحی، ماهیت فازهای پراکنده و پیوسته انعطاف پذیری مولکول های سورفاکتانت، عدد HLB، تحرک و سرعت مهاجرت مولکول های سورفاکتانت به سطح، وزن



به عنوان عامل اصلی در تعیین عملکرد سیستم های کلوییدی بیان کردند [۱۰]. از طرف دیگر، پایین تر بودن وزن مولکولی سورفاکتانت های کوچک مولکولی (توئین ها، ۱۳۰۰ گرم بر مول) نسبت به وزن مولکولی بالاتر سورفاکتانت های پروتئینی (کازئینات سدیم ۲۳۰۰۰ دالتون) باعث می شود که توئین ۸۰ بتواند با سرعت بیشتری خود را به سطح قطرات کوچک روغن رسانده و مانع از به هم پیوستن و امتزاج آنها بعد از تشکیل گردد و به همین دلیل توانایی سورفاکتانت های ریز مولکولی مانند توئین ها نسبت به سورفاکتانت های بیوپلیمری در کیپ شدن، چیده شدن کاملاً متراکم کنار یکدیگر در سطح و پوشش دهی بهتر و کامل ذرات فاز روغنی (فاز پراکنده) موجب می شود که فعالیت سطحی بالاتر داشته باشد، در نتیجه افزایش قطر ذرات در نمونه های حاوی سورفاکتانت پروتئین کازئینات سدیم مشاهده گردید. Ghosh و همکاران (۲۰۱۴) نشان دادند که سورفاکتانت توئین ۸۰ توانایی بیشتر در کاهش میانگین اندازه ذرات در مقایسه با سورفاکتانت توئین ۲۰ را دارا بود [۲۲].

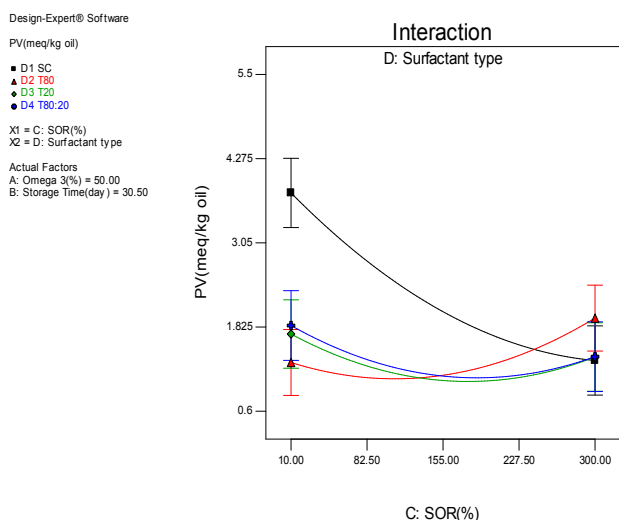
مولکولی سورفاکتانت ها و نحوه چیدمان (شکل هندسی، پارامتر فشرده شدن) مولکول های سورفاکتانت جذب شده در لایه بین سطحی از عوامل بسیار مهم و کلیدی در ویژگی های سیستم های کلوییدی نانومولسیون به روش خودبخودی می باشد، بدلیل تفاوت در ساختار سورفاکتانت ها، انحنا مناسب، نحوه قرارگیری، آرایش و جهت گیری در سطح بینایی بر میانگین اندازه ذرات تاثیر متفاوتی دارند. عدد HLB یکی دیگر از پارامترهای تعیین کننده بر چگونگی فعالیت سورفاکتانت هاست، عدد HLB بالاتر نشاندهنده درجه هیدروفیلی بیشتر می باشد، در این مطالعه، با اینکه عدد HLB توئین ۲۰ (۱۶/۷) در مقایسه با توئین ۸۰ (۱۵) بیشتر بود، اما فرمولاسیون های حاوی سورفاکتانت توئین ۲۰ ذراتی با میانگین قطر بیشتری نسبت به سورفاکتانت توئین ۸۰ داشتند، بنابراین عدد HLB به تنهایی برای توجیه نتایج کفایت نمی کند. که در این شرایط احتمالاً، پارامتر پکینگ نسبت به عدد HLB شاخص کارآمد تری بوده و سورفاکتانت توئین ۸۰ در مقایسه با سورفاکتانت توئین ۲۰ پارامتر پکینگ بالاتری دارد زیرا، سورفاکتانت توئین ۸۰، مولکولی ۱۸ کربنه با باند غیراشباع می باشد و بصورت متراکم تر و کاملاً فشرده کنار همدیگر قرار می گیرند و سطح بینایی را بطور کامل پوشش می دهند، بنابراین، نانومولسیون ها در حضور سورفاکتانت توئین ۸۰ اندازه ذرات کمتری داشتند. دلیل دیگر اینکه، همانطور که اشاره شد، سورفاکتانت توئین ۸۰ (پلی اکسی اتیلن سوربیتان منو اولئات) در ساختار زنجیره آبگریز دارای یک باند دوگانه اولئات بوده، در نتیجه تحرک بالاتری نسبت به سایر سورفاکتانت های با زنجیره اشباع مانند سورفاکتانت توئین ۲۰ و مولکول بیوپلیمری کازئینات سدیم دارد و بنابراین نسبت به سایر سورفاکتانت ها فعالیت سطحی بالاتری داشت و با کاهش بیشتر کشش سطحی منجر به تولید ذرات ریزتر گردید. در مورد مخلوط سورفاکتانت توئین ۲۰:۸۰ به علت وجود مقداری توئین ۸۰ و غیراشباعیت زنجیره نسبت به فرمولاسیون های حاوی سورفاکتانت تکی مانند سورفاکتانت توئین ۲۰ اندازه ذرات کوچک تر بودند. Saberi و همکاران (۲۰۱۳) پس از رد فرضیه اثر HLB روی اندازه قطرات، پارامتر فشرده شدن مربوط به هندسه مولکولی سورفاکتانت (سطح مقطع زنجیره آبگریز (دم سورفاکتانت) نسبت به سطح مقطع سر آبدوست سورفاکتانت) را



**Fig 5** Two-dimensional Contour-Plot of storage time and omega 3% on D43

همانطور که در شکل (۵) مشاهده می گردد، در مقادیر کمتر امگا سه در حضور سورفاکتانت کازئینات سدیم با گذشت مدت زمان نگهداری، میانگین قطر ذرات افزایش یافت و همچنین مطابق شکل بالا افزایش مقدار امگا سه و مدت زمان نگهداری بطور همزمان، سبب افزایش در میانگین اندازه ذرات شد. در هر

در معادله فوق ضرائب A، B، C، D به ترتیب نشانگر مقدار امگا سه (درصد)، مدت زمان نگهداری (روز)، درصد SOR و نوع سورفاکتانت می باشند. با توجه به اینکه این مدل دارای F- Value معادل ۹/۷۷۰ (سطح معنی دار)،  $P < 0.001$ ، Lack of fit غیر معنی دار، ضرائب تبیین و تبیین اصلاح شده ۰/۹۲۲ و ۰/۸۲۸ می باشد. نتایج نشان می دهد که مدل نهایی بدست آمده، کارآمد بوده و قادر است بطور رضایت بخشی تغییرات ویژگی های مورد آزمون را توجیه نماید و در مراحل بعدی پیشگویی و بهینه سازی بعنوان یک شاخص اصلی مورد استفاده قرارگیرد.



**Fig 6** Interaction curve of PV as a function of SOR (%) and type of surfactant

مطابق شکل (۶) نمودار برهم کنش تاثیر متقابل درصد SOR و نوع سورفاکتانت بر میزان اندیس پراکسید در مقادیر ثابت پارامترهای میزان امگا سه ۵۰ درصد و مدت زمان نگهداری ۳۰ روز بر میزان اندیس پراکسید را نشان می دهد. همانطور که مشاهده می شود، با افزایش در غلظت سورفاکتانت اندیس پراکسید کاهش یافته است، کمترین اندیس پراکسید در نمونه های حاوی سورفاکتانت توئین ۸۰ بود. افزایش مقدار سورفاکتانت، در فرمولاسیون های حاوی سورفاکتانت های توئین ۲۰، توئین ۸۰ و توئین ۸۰:۲۰ تغییرات معنی دار نداشت، اندیس پراکسید در نانوامولسیون های پایدار شده با پروتئین کازئینات سدیم نسبت به سایر نمونه ها کاهش بیشتری داشته است. Richard (۲۰۰۵) گزارش کردند که ترکیبات هگزانال و

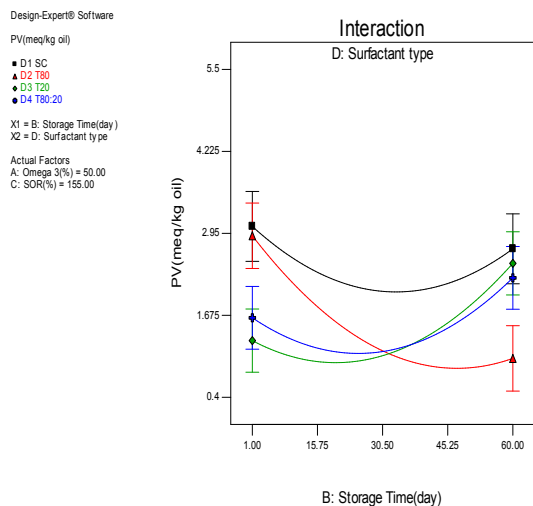
محدوده زمانی، با تغییر در مقدار امگا سه میانگین قطر ذرات تغییر چندانی نداشتند، در طول مدت زمان نگهداری قطر ذرات ابتدا روند کاهشی و سپس افزایشی داشت. از طرف دیگر استفاده از اسانس های گیاهی در نانوامولسیون روغن ماهی به منظور پوشاندن عطر و طعم نامطلوب بوده، اما به علت محلولیت آبی، امکان وقوع پدیده رسیدگی استوالد وجود داشت، مخلوط کردن مقدار معینی از اسانس های گیاهی با روغن ماهی به عنوان بازدارنده رسیدگی استوالد توانست این پدیده را به تعویق بیندازد. در تایید این نتایج Saberi و همکاران (۲۰۱۳) گزارش نمودند که کمترین ویسکوزیته و کشش سطحی مربوط به اسانس های روغنی، تری گلیسیرید متوسط زنجیر و سپس روغن ماهی می باشد و افزایش در اندازه ذرات در نانوامولسیون های حاوی روغن ماهی به تنهایی در مقایسه با نانوامولسیون مخلوط روغن ماهی / اسانس لیمو مشاهده شد [۱۴]. افزایش در مقدار امگا سه به معنای افزایش در ترکیبات با وزن مولکولی بالاتر مانند تری گلیسیریدهای موجود در روغن ماهی در مقایسه با ترکیبات با وزن مولکولی کمتر اسانس بود، بنابراین سورفاکتانت ها از توانایی کافی جهت پوشش کامل سطح ترکیبات با وزن مولکولی بالاتر برخوردار نیستند. از سوی دیگر، فرض ما بر این بود که میزان روغن با اندازه ذرات امواسیون ارتباط مستقیم دارد. در غلظت های بالای روغن، امولسیفایر کافی برای پوشاندن ذرات روغن تازه شکل گرفته وجود ندارد. در نتیجه ذرات جدید شکل گرفته، به یکدیگر پیوسته و ذرات بزرگتری را ایجاد می کنند. Mahmoud Mostafa و همکاران (۲۰۱۵) نیز افزایش اندازه ذرات با افزایش مقدار روغن anise را گزارش نمودند [۲۴].

۳-۴- میزان اندیس پراکسید نانوامولسیون های اسانس موسیر ایرانی حاوی اسیدهای چرب امگاسه

آنالیز داده های آزمایش نشان داد که تغییرات اندیس پراکسید در نمونه های نانوامولسیون اسانس موسیر ایرانی حاوی اسیدهای چرب امگا سه را می توان با معادله زیر توصیف کرد.

معادله (۲-۳)

$$PV(\text{meq/kg}) = 1.33182 + 0.41539A - 0.05422B - 0.32255C - 0.71582D_1 - 0.2092440D_2 - 0.28550D_3 + 0.779130AD_1 - 0.104129AD_2 - 0.1200254BD_1 + 0.89977BD_2 + 0.655018BD_3 + 0.89659CD_1 + 0.64554CD_2 + 0.15512CD_3 + 0.83579B^2 + 0.50912C^2$$



**Fig 7** Interaction curve of PV as a function of Storage time and type of surfactant

مطابق شکل (۷) نمودار برهم کنش متقابل نوع سورفاکتانت و مدت زمان نگهداری بر میزان اندیس پراکسید نشان می‌دهد، با افزایش مدت زمان نگهداری به طور معنی داری در تمامی فرمولاسیون‌ها بجز تغییرات جزئی نانوامولسیون‌های پایدار شده توسط سورفاکتانت توئین ۸۰، ابتدا میزان اندیس پراکسید کاهش و سپس افزایش یافته است. در حضور سورفاکتانت توئین ۸۰ با گذشت مدت نگهداری کاهش قابل توجهی در اندیس پراکسید مشاهده شد که نشانگر اینست که در حضور توئین ۸۰ کاهش خواص آنتی‌اکسیدانی کندتر بوده است. همچنین روند تغییرات اندیس پراکسید در طی مدت نگهداری در مورد فرمولاسیون‌های حاوی کازئینات سدیم کندتر از سایر فرمولاسیون‌ها بوده است. دلیل روند کاهشی در اندیس پراکسید و سپس روند افزایشی این است که در طی ۳۰ روز نگهداری به دلیل حضور ترکیباتی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی در اسانس موسیر ایرانی و حضور موانع فیزیکی سورفاکتانتی بر سطح ذرات از تشکیل هیدروپراکسیدها جلوگیری می‌شود اما با گذشت مدت زمان نگهداری به دلیل مصرف بیشتر ترکیبات موثر در اسانس‌ها در مقابله با عوامل پراکسیدانی و به دلیل تخریب ترکیبات آنتی‌اکسیدانی و فنولیک در طول نگهداری اثرشان از بین رفته و حتی این ترکیبات می‌توانند به عنوان پرواکسیدان عمل کنند، نمونه‌های حاوی سورفاکتانت توئین ۸۰ مطابق نتایج حاصل از آنالیز اندازه ذرات، در طول مدت نگهداری، میانگین قطر ذرات بوسیله محلولیت

۲،۲-هپتادی‌انال در طی اکسیداسیون نانوامولسیون روغن کانولا بوجود آمده است [۲۵]. بر اساس نتایج حاصل از اندازه‌گیری آزمون DLS، فرمولاسیون‌های حاوی سورفاکتانت‌های ریز مولکولی توئین با افزایش مقدار سورفاکتانت، میانگین قطر ذرات کاهش داشت، به عبارتی به دلیل پوشش بهتر سطح ذرات توسط سورفاکتانت‌ها در ذراتی با اندازه کوچکتر میزان واکنش با عوامل پراکسیدان کمتر گردیده است. از طرفی افزایش غلظت سورفاکتانت‌ها، اکسیژن محلول درون ساختار بیشتر شده که می‌تواند باعث افزایش اندیس پراکسید باشد. قابل ذکر است که شاخص تراکم و پکینگ سورفاکتانت اهمیت بیشتری از ضخامت لایه سورفاکتانت دارد، بنابراین ساختار هتروژنی سطح ذرات می‌تواند نفوذپذیری و دسترسی به پراکسیدان‌ها را افزایش دهد، تفاوت ساختاری سورفاکتانت‌ها، زنجیره‌های آلکیلی با طول‌های متفاوت و تفاوت در اشباعیت زنجیره‌ها، در قدرت ضعیف تر پیک شدن و ساختار هتروژنی موثر بوده و به همین دلیل اندیس پراکسید ممکن است بیشتر باشد به همین دلیل اندیس پراکسید سورفاکتانت‌هایی مانند توئین ۲۰ بالاتر بود. Heinzelmann (۲۰۰۰) پایداری اکسیداتیوی را برای روغن ماهی میکروانکپسوله شده نتیجه گرفتند. شیب کاهش اندیس پراکسید برای غلظت‌های بالاتر پروتئین کازئینات سدیم بزرگتر بود [۲۶]. علت این پدیده را می‌توان تشکیل فیلم ویسکوالاستیک و لایه مقاوم بر سطح ذرات چربی دانست و مانع از دسترسی آسان رادیکال‌های آزاد بر سطح ذرات شده و در نتیجه تشکیل محصولات حاصل از اکسیداسیون شوند. کازئینات سدیم قدرت باند کردن و شلاته کردن فلزات واسطه را از طریق بقایای فسفو سیرینی و اسیدهای آمینه هیستیدین، تیروزین، فیل آلانین، تریپتوفان، پرولین و لیزین راداراست و بنابراین دارای خاصیت آنتی‌اکسیدانی بوده و سبب بدام‌اندازی فلزات گردیده و مانع از دسترسی به سطح ذرات چربی می‌شوند. مکانیسم دوم: از طریق بدام‌اندازی رادیکال‌های آزاد توسط گروه‌های سولفیدریلی موجود در ساختار اسیدهای آمینه می‌باشد.

برای محافظت از اکسیداسیون امگا سه فعالیت می کند که منجر به کاهش خاصیت آنتی اکسیدانی و بازداری کمتر از اکسیداسیون می شود و اندیس پراکسید تا حدودی افزایش خواهد یافت. همچنین افزایش میزان امگا سه سبب کاهش میزان غلظت سورفاکتانت گردید و علت را می توان مربوط به احتمال عدم پوشش کافی سطح ذرات چربی توسط سورفاکتانت ها و قرارگیری نواحی از سطح ذرات در معرض عوامل پراکسیدانی و نقصان محافظت توسط سورفاکتانت ها دانست. این نتایج با نتایج تحقیق Ahn و همکاران (۲۰۰۸) مطابقت داشت که نشان دادند اندیس پراکسید و اندیس آنیزیدین در میکروانکپسولسیون روغن آفتابگردان حاوی اولئیک بالا به همراه عصاره رزماری کاهش داشتند [۲۸].

### ۳-۵- اندیس تیوباریتوریک اسید نانوامولسیون های اسانس

#### موسیر ایرانی حاوی اسیدهای چرب امگا سه

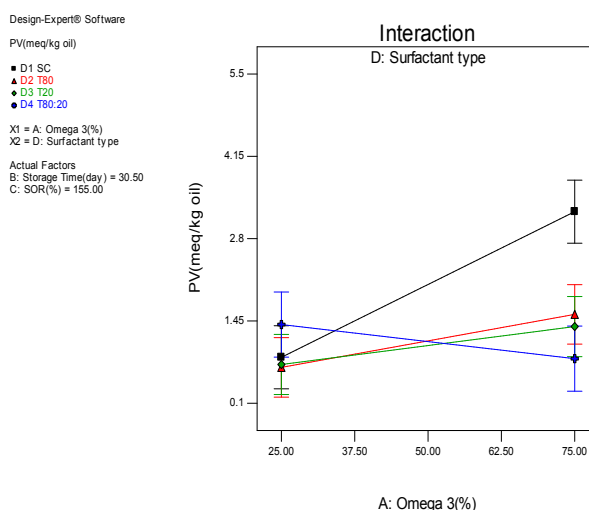
آنالیز داده های آزمایش نشان داد که تغییرات اندیس تیوباریتوریک اسید در نمونه های نانوامولسیون اسانس موسیر ایرانی حاوی اسیدهای چرب امگا سه را می توان با معادله زیر توصیف کرد.

معادله (۳-۳)

$$\begin{aligned} TBA(mgmad/kg) = & 0.09534 + 0.047149A - \\ & 0.01025B + 0.03486D_1 + 0.00917D_2 + 0.05334D_3 + 0.074 \\ & 90AD_1 - 0.006803AD_2 - 0.0052612AD_3 + 0.001959BD_1 - \\ & 0.13779BD_2 + 0.08259BD_3 - \\ & 0.11669CD_1 + 0.11323CD_2 + 0.02467CD_3 + 0.07339A^2 + \\ & 0.086274B^2 \end{aligned}$$

در معادله فوق ضرائب A, B, C, D به ترتیب نشانگر مقدار امگا سه (درصد)، مدت زمان نگهداری (روز)، درصد SOR و نوع سورفاکتانت می باشند. با توجه به جداول آنالیز واریانس اندیس تیوباریتوریک اسید ذرات نانوامولسیون، مدل نهایی دارای سطح معنی دار  $P < 0.0001$  Lack of Fit (عدم برازش) غیر معنی دار می باشند. ضرائب تبیین و تبیین اصلاح شده به ترتیب ۰/۹۱۴ و ۰/۸۰۹ بودند. نتایج حاصل از این تست ها نشان می دهد که مدل نهایی ارائه شده کارآمد بوده و قادر است به طور رضایت بخش اندیس تیوباریتوریک اسید را در نمونه ها توجیه نماید.

بیشتر فاز روغنی در درون میسل ها در طی نگهداری کاهش داشته و همچنین لایه سورفاکتانت متراکم تر توسط سورفاکتانت توئین ۸۰ در مقایسه با سورفاکتانت توئین ۲۰ و مخلوط توئین ۲۰:۸۰ از طریق دم آگریز طولانی تر در اطراف ذرات ایجاد شده و از رسیدن رادیکال های آزاد به هسته چربی دوست ممانعت می کند. این نتایج با نتایج تحقیق Alfaro Sanabria (۲۰۱۲) مطابقت داشت که نشان دادند اندیس پراکسید نانوامولسیون روغن بربنج با گذشت مدت زمان نگهداری افزایش یافت [۲۷].



**Fig 8** Interaction curve of PV as a function of omega3(%) and type of surfactant

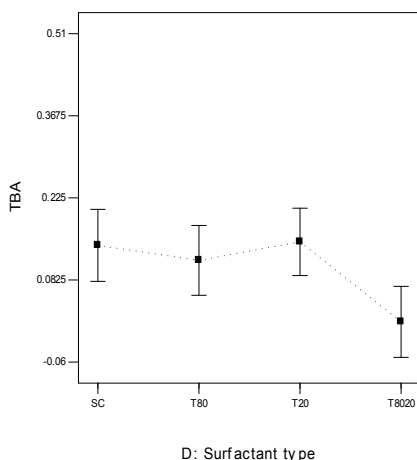
شکل (۸) برهمکنش تاثیر میزان امگا سه و نوع سورفاکتانت در مقادیر ثابت میزان امگا سه ۵۰ درصد و درصد SOR (۱۵۵ درصد) بر میزان اندیس پراکسید را نشان می دهد، در فرمولاسیون های حاوی کازینات سدیم با افزایش میزان امگا سه، اندیس پراکسید افزایش معنی داری داشت، فرمولاسیون های حاوی سورفاکتانت های توئین ۸۰ و توئین ۲۰ اندکی افزایش در اندیس پراکسید را نشان داده است اما تغییرات معنی دار نبوده است. ترکیبات عمده موجود در اسانس روغنی موسیر ایرانی شامل متیل دی سولفید، متیل تیمتیل دی سولفید، دی آلیل سولفید، دی لیمونین، اتیل پلازگونیت، اتیل اکتانویت میباشد که خواص آنتی اکسیدانی آنها اثبات شده است، که به صورت موثری به عنوان دهنده هیدروژن عمل نموده و لذا به عنوان یک آنتی اکسیدان موثر عمل می کنند، افزایش در مقدار امگا سه سبب کاهش میزان اسانس می گردد و بنابراین میزان اسانس کمتری

Design-Expert® Software

TBA

X1 = D: Surfactant type

Actual Factors

A: Omega 3(%) = 50.00  
B: Storage Time(day) = 30.50  
C: SOR(%) = 155.00

D: Surfactant type

**Fig 10** One-factor curve of the effect of surfactant type on TBA

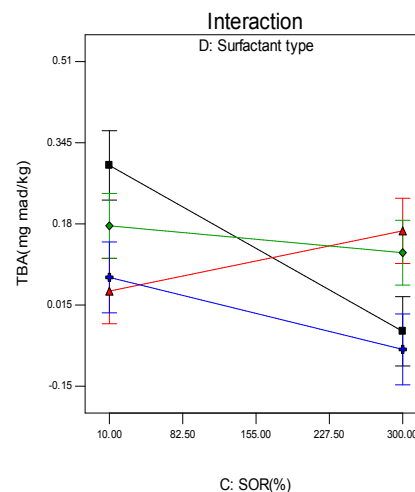
در شکل (۱۰) نشان داده شده است که کمترین میزان اندیس تیوباریتوریک اسید در فرمولاسیون های حاوی مخلوط توئین ها بود و در بین بقیه سورفاکتانت ها تفاوت معنی داری مشاهده نگردید. احتمالاً سورفاکتانت توئین ۸۰ به دلیل داشتن پیوندهای غیر اشباع در ساختار خود و سورفاکتانت های توئین ۲۰ و کازئینات سدیم نیز به دلیل ساختار ناهمگون در سطح ذرات خودشان دسترسی ذرات چربی با عوامل پراکسیدان را تسهیل کرده و در نتیجه میزان اندیس تیوباریتوریک اسید این مخلوط ها در مقایسه با بیشتر از مخلوط حاوی سورفاکتانت توئین ۸۰:۲۰ افزایش نشان داد. کاهش در اندیس پراکسید نشانگر تجزیه محصولات اولیه اکسیداسیونی و ایجاد محصولات ثانویه بوده، پس متعاقباً تبدیل آنها به ترکیبات آلدیدی نیز بیشتر می شود و در نتیجه اندیس تیوباریتوریک اسید افزایش نشان داده است. Yi و همکاران (۲۰۱۴) گزارش نمودند، نانومولسیون های حاوی سورفاکتانت توئین ۸۰ با افزایش مقدار سورفاکتانت به علت ایجاد فشار اسمزی توسط سورفاکتانت های مازاد در فاز پیوسته و انبوهش ناشی از اتصال ذرات به یکدیگر نانومولسیون مستعد اکسیداسیون می شوند [۲۹].

**۳-۶- اندازه گیری خاصیت آنتی اکسیدانی نانومولسیون اسانس موسیر ایرانی حاوی اسیدهای چرب امگا سه**

Design-Expert® Software

TBA(mg mad/kg)

■ D1 SC  
▲ D2 T80  
● D3 T20  
◆ D4 T80:20

X1 = C: SOR(%)  
X2 = D: Surfactant typeActual Factors  
A: Omega 3(%) = 50.00  
B: Storage Time(day) = 30.50

C: SOR(%)

**Fig 9** Interaction curve of TBA as a function of SOR(%) and type of surfactant

شکل (۹) نشان می دهد که افزایش مقدار SOR در تمامی فرمولاسیون های حاوی سورفاکتانت ها بجز سورفاکتانت توئین ۸۰ سبب کاهش میزان اندیس تیوباریتوریک اسید گردید، در حالیکه در فرمولاسیون حاوی سورفاکتانت توئین ۸۰ روند افزایشی نشان داد، کمترین میزان اندیس تیوباریتوریک اسید مربوط به فرمولاسیون های حاوی سورفاکتانت مخلوط توئین ها بود. در مورد سورفاکتانت کازئینات سدیم با افزایش مقدار SOR کاهش شدیدی را نشان داد. در مقادیر کمتر SOR، کمترین میزان اندیس تیوباریتوریک اسید مربوط به فرمولاسیون های حاوی توئین ۸۰ و بیشترین میزان اندیس تیوباریتوریک اسید مربوط به کازئینات سدیم بود اما افزایش در مقدار SOR به ترتیب باعث افزایش و کاهش اندیس تیوباریتوریک اسید با فرمولاسیون حاوی سورفاکتانت توئین ۸۰ و کازئینات سدیم گردید. روند اندیس تیوباریتوریک در مورد همه سورفاکتانت ها بجز توئین ۸۰ بر خلاف برخی از پژوهش های قبلی همسو با روند اندیس پراکسید بوده است نشانگر پیشرفت اکسیداسیون می باشد، که دلیل اصلی را می توان اینگونه توجیه نمود که میزان تبدیل محصولات پراکسید به محصولات ثانویه بسیار کم بوده و آنهایی که تولید می شوند، فراریت بالایی دارند و از محیط خارج می شوند به همین دلیل روند همسو مشاهده شده است. هر کجا مقدار اندیس پراکسید بیشتر بوده، متناسب آن مقدار اندیس تیوباریتوریک نیز بالاتر بود.

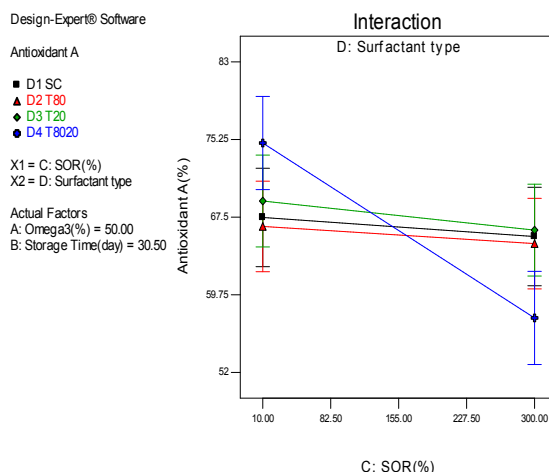
ترکیبات تشکیل دهنده اسانس موسیر ایرانی شامل ترکیبات منو ترپنی هیدروکربن مانند لیمونین و ترکیبات ارگانوسولفوری مانند دی آیل دی سولفید، متیل تیومتیل دی سولفید، متیل دی سولفید، لیمونین و تری سولفید-۲- متیل پروپنیل و به مقدار کمتر مربوط به توکوفرولهای موجود در روغن ماهی و حضور سورفاکتانت ها می باشد. ویژگی های آنتی اکسیدانی عمدتاً ناشی از قدرت احیاکنندگی و ساختار شیمیایی آنهاست که آنها را قادر به خشی کردن رادیکال های آزاد و تشکیل کمپلکس با یون های فلزی و خاموش کردن مولکول های اکسیژن یگانه و سه گانه می سازد. علت کاهش خاصیت آنتی اکسیدانی را می توان با این دلیل توجیه نمود که با افزایش مقدار سورفاکتانت در نانوامولسیون ها، میزان فاز روغنی کاهش می یابد و در نتیجه میزان اسانس موجود در ساختار نیز کمتر می گردد، بنابراین هرچه میزان اسانس موسیر ایرانی بیشتر باشد خواص آنتی اکسیدانی بالاتری را نشان می دهد، بنابراین با افزایش مقدار سورفاکتانت و مقدار امگا سه، میزان اسانس موسیر ایرانی در نانوامولسیون ها و بالتبع خاصیت آنتی اکسیدانی کاهش نشان داد. از سوی دیگر اینکه با افزایش میزان سورفاکتانت و تشکیل سد و غشای محافظتی بر روی سطح ذرات، تماس موثر میان ترکیب DPPH با اسانس موسیر ایرانی کمتر می گردد به بیان دیگر چون در این روش از فرایندهای تخریبی جهت برداشتن غشای سطح ذرات استفاده نمی گردد امکان واکنش ترکیبات با محلول DPPH نبوده و در نتیجه خاصیت آنتی اکسیدانی کمتری نشان دادند. از طرفی اسانس های ضروری توانایی بدام اندازی فلزات را دارند. Gortzi و همکاران (۲۰۰۸) بیان کردند فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره انکپسوله شده در لیپوزوم ۲۵ درصد بیشتر از عصاره خالص بوده است [۳۰].

آنالیز داده های آزمایش نشان داد که خاصیت آنتی اکسیدانی در نمونه های نانوامولسیون اسانس موسیر ایرانی حاوی اسیدهای چرب امگا سه را می توان با معادله زیر توصیف کرد.

معادله (۳-۴)

$$\text{Antioxidant activity} = 66.52 - 0.91A - 3C + 0.0031D_1 - 0.8D_2 + 1.14D_3 + 3.54AC + 2.05CD_1 + 2.14CD_2 + 1.55CD_3$$

در معادله فوق ضرایب A, B, C, D به ترتیب نشانگر مقدار امگا سه (درصد)، مدت زمان نگهداری (روز)، درصد SOR و نوع سورفاکتانت می باشند. با توجه به جداول آنالیز واریانس خاصیت آنتی اکسیدانی ذرات نانوامولسیون، مدل نهایی دارای سطح معنی دار  $P < 0.0001$  Lack of Fit (عدم برازش) غیر معنی دار می باشند. ضرایب تبیین و تبیین اصلاح شده به ترتیب ۰/۸ و ۰/۷۶۲ بودند. نتایج حاصل از این تست ها نشان دادند که مدل نهایی ارائه شده کارآمد بوده و قادر است به طور رضایت بخش خاصیت آنتی اکسیدانی را در نمونه ها توجیه نماید.



**Fig11** Interaction curve of Antioxidant as a function of SOR(%) and type of surfactant

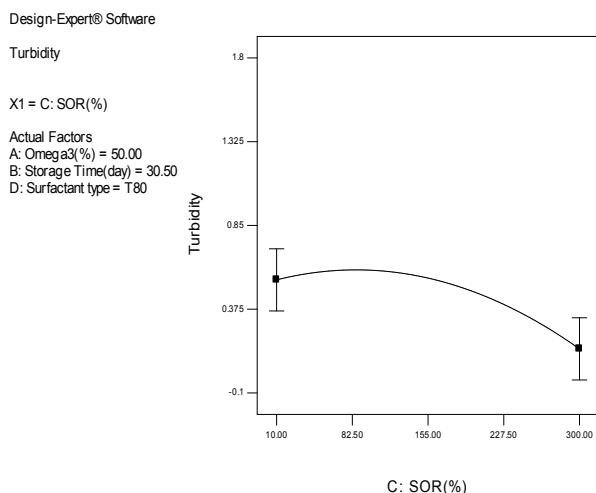
شکل (۱۱) نمودار برهمکنش تاثیر نوع سورفاکتانت و درصد SOR در مقادیر ثابت دو پارامتر دیگر بر تغییرات خاصیت آنتی اکسیدانی را نشان می دهند، در حضور تمامی سورفاکتانت ها، با افزایش در مقدار SOR و همچنین افزایش میزان امگا سه، خاصیت آنتی اکسیدانی کاهش یافته است. خاصیت آنتی اکسیدانی فرمولاسیون ها در درجه اول بطور عمده مربوط به

آنالیز داده های آزمایش نشان داد که تغییرات کدورت نانوامولسیون اسانس موسیر ایرانی حاوی اسیدهای چرب امگا سه را می توان با معادله زیر توصیف کرد.

معادله (۳-۵)

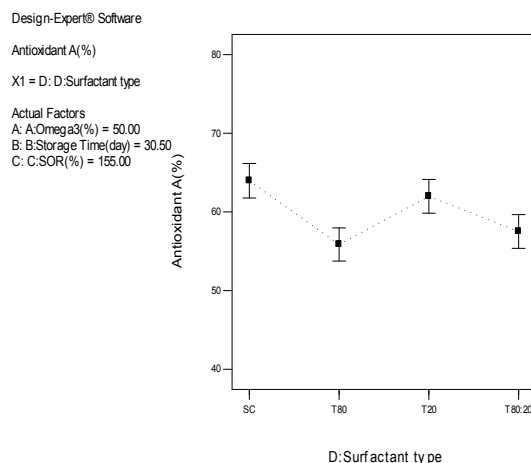
$$\text{Turbidity} = 0.83394 - 0.02328A - 0.05882B - 0.405994C + 0.12491D_1 + 0.33206D_2 - 0.30410D_3 - 0.46249AB + 0.50053CD_1 - 0.28908CD_2 - 0.40159A^2 + 0.68493B^2 - 0.41358C^2$$

در معادله فوق ضرائب A، B، C، D به ترتیب نشانگر مقدار امگا سه (درصد)، مدت زمان نگهداری (روز)، درصد SOR و نوع سورفاکتانت می باشند. با توجه به جداول آنالیز واریانس تغییرات کدورت ذرات نانوامولسیون، مدل نهایی دارای سطح معنی دار  $P < 0.0001$ ، ضریب عدم برازش غیر معنی دار، ضرائب تبیین و تبیین اصلاح شده به ترتیب ۰/۸۸۹ و ۰/۸۰۹ می باشند. نتایج حاصل از این تست ها نشان دادند که مدل نهایی ارائه شده کارآمد بوده و قادر است به طور رضایت بخش میزان کدورت را در نمونه ها توجیه نماید.



**Fig 13** one factor curve of Turbidity as a function of SOR(%)

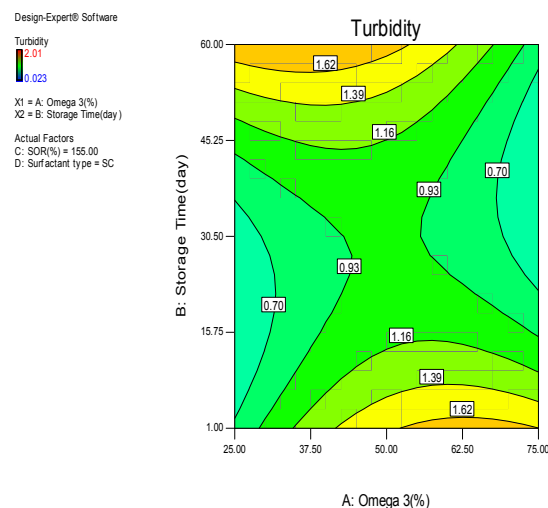
در شکل (۱۳) مشاهده گردید، در تمامی فرمولاسیون ها با افزایش درصد SOR (بیش از ۱۰ درصد) میزان کدورت کاهش داشت. کاهش در میانگین قطر ذرات با افزایش غلظت سورفاکتانت سبب کاهش پراکندگی نور و کاهش در کدورت گردید. تغییرات کدورت در حضور سورفاکتانت کازئینات سدیم معنی دار نبود ( $P < 0.0001$ ). با توجه به نتایج حاصل از اندازه گیری میانگین قطر ذرات در نانوامولسیون موسیر ایرانی، میانگین



**Fig 12** One-factor curve of the effect of surfactant type on Antioxidant Activity

شکل (۱۲) نشان داده شده، بیشترین و کمترین میزان خاصیت آنتی اکسیدانی به ترتیب مربوط به سورفاکتانت کازئینات سدیم، توئین ۲۰ و توئین ۸۰، مخلوط توئین ها بود، گرچه هر چه خاصیت آنتی اکسیدانی بالاتر باشد مطلوب تر می باشد، اما سورفاکتانت ها می توانند با پوشش کامل مناسب سطح ذرات در حفظ خواص آنتی اکسیدانی موثر باشند، بنابراین در فرمولاسیون هایی که پوشش کاملتر سطحی توسط سورفاکتانت ها داشتند خاصیت آنتی اکسیدانی کمتری نشان دادند. از طرف دیگر آنتی اکسیدانها میتوانند با امولسیفایر ها در سطح بینابینی باند شوند اما با ترکیب شدن به دلیل تشکیل باندهای هیدروژنی با هیدروژن های درون ساختار آنتی اکسیدانی از خاصیت آنتی اکسیدانی شان کاسته می شود. اگرچه مطابق توضیحات بیان شده در بخش اندیس پراکسید در ارتباط با پروتئین کازئینات سدیم، خود دارای خاصیت آنتی اکسیدانی به علت بدام اندازی عوامل پرواکسیدان می باشد، اما در اینجا افزایش خاصیت آنتی اکسیدانی به این علت نبوده زیرا اساس، واکنش با DPPH می باشد، بدلیل ساختار هتروژن این پروتئین احتمال خروج ترکیبات به درون محلول و واکنش با ترکیب DPPH وجود داشته که سبب افزایش خاصیت آنتی اکسیدانی گردیده است.

### ۳-۷- اندازه گیری تغییرات کدورت نانوامولسیون اسانس موسیر ایرانی حاوی اسیدهای چرب امگا سه



**Fig 15** Two-dimensional Contour-Plot of Storage time and omega3% on Turbidity

شکل (۱۵) کانتور پلات دو بعدی مقدار امگا سه و مدت زمان نگهداری بر میزان کدورت را نشان می دهد. همزمان با افزایش مقدار امگا سه و افزایش مدت زمان نگهداری تا ۳۰ روز ابتدا میزان کدورت کاهش و سپس با افزایش مدت زمان نگهداری تا ۶۰ روز میزان کدورت افزایش یافت. تغییرات مقدار امگا سه تاثیر چندانی بر میزان کدورت نشان نداد. به عبارتی با گذشت زمان نگهداری، افزایش در مقدار امگا سه میزان کدورت تغییری نیافت. در هر سطح از امگا سه، افزایش در مدت زمان نگهداری ابتدا سبب کاهش میزان کدورت و سپس افزایش کدورت گردید. مدت زمان نگهداری تاثیر بالاتری نسبت به مقدار امگا سه نشان داد، بدلیل افزایش قطر ذرات در طول مدت نگهداری میزان کدورت افزایش نشان داد، از سوی دیگر بدلیل افزایش مقدار امگا سه، چون ذرات امگا سه آزاد در محیط پراکنده بودند میزان کدورت بیشتر گردید.

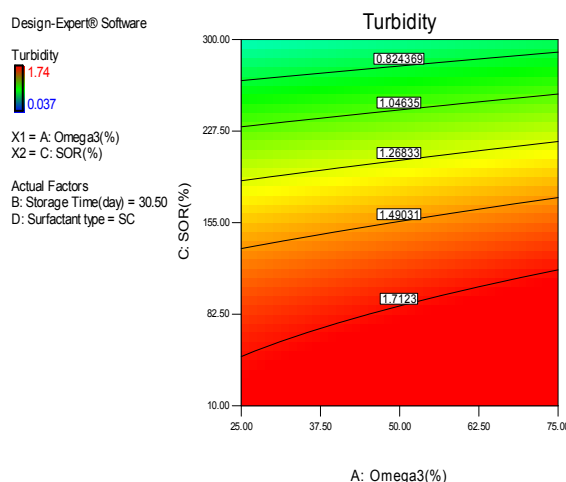
### ۳-۸- اندازه گیری تغییرات ضریب شکست نانوامولسیون

اسانس موسیر ایرانی حاوی اسیدهای چرب امگا سه آنالیز داده های آزمایش نشان داد که تغییرات ضریب شکست در نمونه های نانوامولسیون اسانس موسیر ایرانی حاوی اسیدهای چرب امگا سه را می توان با معادله زیر توصیف کرد.

معادله (۳-۶)

$$RI = 1.3562 + 0.000995A + 0.000234B + 0.000166C + 0.002897D_1 + 0.000783D_2 + 0.00068D_3 -$$

قطر ذرات در فرمولاسیون های حاوی سورفاکتانت کازینات سدیم تغییر معنی داری نداشت ( $P < 0.0001$ ) این نتایج با نتایج حاصل از کدورت همخوانی داشت.



**Fig14** Two-dimensional Contour-Plot of SOR % and omega3% on Turbidity

مطابق شکل (۱۴) با افزایش میزان روغن ماهی (امگا سه)، بدلیل وجود اسیدهای چرب آزاد درون پوشانی نشده به علت ضریب شکست بالاتر آن، میزان کدورت نیز افزایش داشت، این نتیجه با نتایج دیگر محققین Li و همکاران (۲۰۱۲) که بیان کردند کدورت نانوامولسیون ها با افزایش غلظت روغن بیشتر گردید [۳۱]. مدت زمان نگهداری تاثیر بر تغییرات کدورت نداشت. میزان کدورت در حضور سورفاکتانت توئین ۸۰ (۰/۵)  $cm^{-1}$  بسیار کمتر از سایر سورفاکتانت ها ( $0.8 \pm 1/4 cm^{-1}$ ) بود. کاهش میانگین قطر ذرات در غلظت های بالاتر سورفاکتانت سبب کاهش پراکنده شدن نور شد و میزان کدورت کاهش یافت. از طرف دیگر نانوامولسیون های تهیه شده با سورفاکتانت توئین ۸۰ نسبت به سایر سورفاکتانت ها قطر کمتر و پراکنش نوری کمتر داشت و در نتیجه نمونه ها شفاف تر بودند. Li و همکاران (۲۰۱۴) در بررسی نانوامولسیون کورکومین نامحلول در آب نتیجه گرفتند که افزایش میزان روغن تری گلیسیرید متوسط زنجیر باعث افزایش کدورت گردید [۳۲].



## ۳-۹- اندازه گیری اندیس خامه ای شدن

## نانوامولسیون اسانس موسیر ایرانی حاوی

## اسیدهای چرب امگا سه

آنالیز داده های آزمایش نشان داد که تغییرات اندیس خامه ای شدن در نمونه های نانوامولسیون اسانس موسیر ایرانی حاوی اسیدهای چرب امگا سه را می توان با معادله زیر توصیف کرد.

معادله (۳-۷)

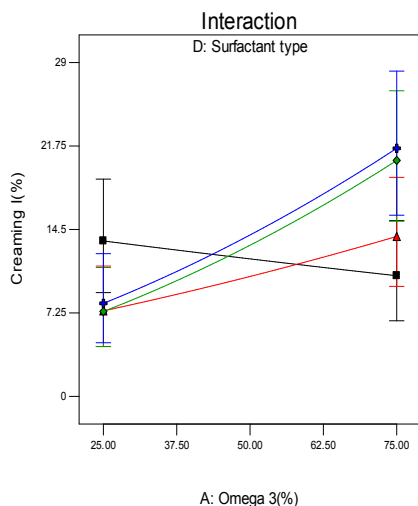
## Creaming Index(%)=

$$12.3806+1.7443A+3.8195B-2.15590C+1.98619D_1-0.86356D_2-0.932805D_3-3.027186AD_1+5.38830CD_1-2.44207CD_2-2.3694CD_3$$

در معادله فوق ضرائب A، B، C، D به ترتیب نشانگر مقدار امگا سه (درصد)، مدت زمان نگهداری (روز)، درصد SOR و نوع سورفاکتانت می باشند. با توجه به جداول آنالیز واریانس اندیس خامه ای شدن ذرات نانوامولسیون اسانس موسیر ایرانی حاوی اسیدهای چرب امگا سه، مدل نهایی عدد F دارای سطح معنی دار بالا،  $P < 0.0001$  Lack of Fit (عدم برازش) غیر معنی دار ( $P < 0.0001$ )، ضرائب تبیین و تبیین اصلاح شده به ترتیب ۰/۸۴۸ و ۰/۷۳۹ می باشند. نتایج حاصل از این تست ها نشان می دهد که مدل نهایی ارائه شده کارآمد بوده و قادر است به طور رضایت بخش اندیس خامه ای شدن را در نمونه ها توجیه نماید.

Design-Expert® Software  
Original Scale  
Sqrt(Creaming (%)) + 0.25

Actual Factors  
B: Storage Time(day) = 30.50  
C: SOR(%) = 155.00



**Fig 17** Interaction curve of Creaming as a function of Omega3(%) and type of surfactant

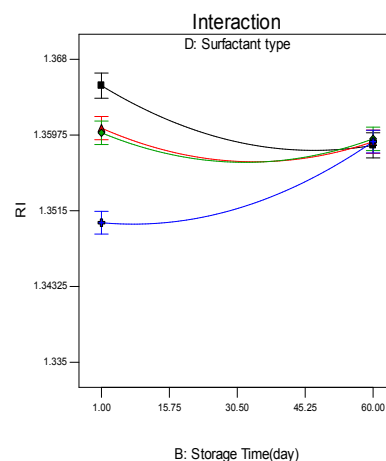
$$0.00234AD_1-0.00179AD_2-0.0008BC-0.003227BD_1-0.00076BD_2-0.00035BD_3-0.00191CD_1-0.00201CD_2-0.00288B^2$$

به ترتیب نشانگر مقدار A، B، C، D در معادله فوق ضرائب و SOR امگا سه (درصد)، مدت زمان نگهداری (روز)، درصد از مقادیر ضریب تبیین (۰/۹۷۵) و نوع سورفاکتانت می باشند. (۰/۹۴۵) مربوط به مدل ها می توان ضریب تبیین اصلاح شده دریافت که مدل چندجمله ای درجه دوم مدلی کارآمد برای ضریب شکست محسوب می شود.

Design-Expert® Software

RI

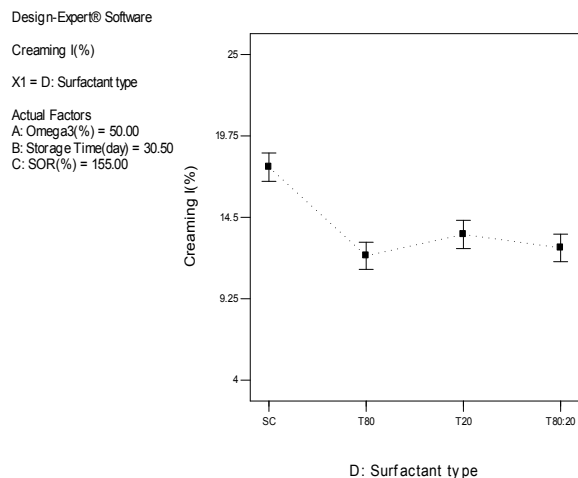
Actual Factors  
A: Omega 3(%) = 50.00  
C: SOR(%) = 155.00



**Fig 16** Interaction curve of TBA as a function of Storage time (%) and type of surfactant

شکل (۱۶) برهمکنش تاثیر پارامترهای مدت زمان نگهداری و نوع سورفاکتانت در مقادیر ثابت میزان امگا سه ۵۰ درصد و میزان SOR (۱۵۵) درصد بر میزان تغییرات ضریب شکست را نشان می دهد. میزان ضریب شکست با گذشت مدت نگهداری در تمامی فرمولاسیون ها به جز نمونه های حاوی سورفاکتانت توئین ۲۰:۸۰ تفاوت چندانی معنی داری نشان ندادند ( $P < 0.0001$ ) اما در فرمولاسیون حاوی سورفاکتانت مخلوط توئین ها افزایش در ضریب شکست مشاهده گردید. در طول مدت نگهداری براساس نتایج قبلی اندیس خامه ای شدن افزایش داشت که نشانگر دو فاز شدن سیستم بود و بنابراین میزان کدورت محلول زیرین کاهش یافته و در نتیجه میزان ضریب شکست نیز کاهش نشان داد.

زمان نگهداری تاثیر معنی داری بر میزان خامه ای شدن نداشت ( $P < 0/0001$ ) و تا حدودی میزان خامه ای شدن افزایش نشان داد. احتمالاً کاهش اندازه ذرات با افزایش غلظت سورفاکتانت را دلیل کاهش خامه ای شدن می توان دانست.



**Fig 19** One-factor curve of the effect of surfactant type on Creaming Index

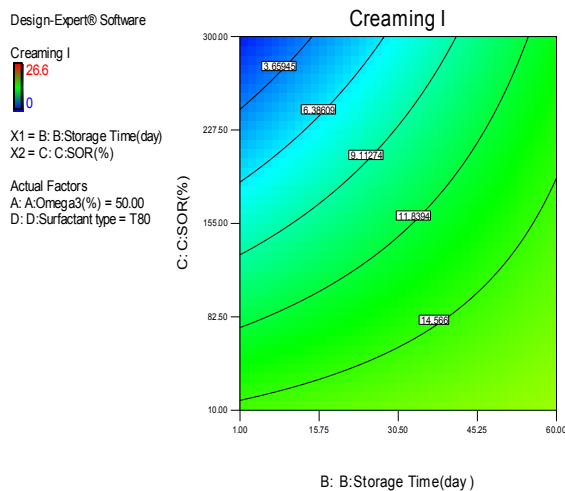
همانطور که در شکل (۱۹) دیده می شود، بیشترین میزان اندیس خامه ای شدن در نمونه های حاوی سورفاکتانت کازئینات سدیم بود و میزان اندیس خامه ای شدن در بین سورفاکتانت های کوچک مولکولی تفاوت معنی داری با یکدیگر نداشتند ( $P < 0/0001$ ) و کمترین میزان اندیس خامه ای شدن مربوط به فرمولهای حاوی توئین ۸۰ و مخلوط توئین ها بود، اگر چه سورفاکتانت پروتئینی ویژگی های کاربردی مهمی دارد اما این سورفاکتانت در نانوامولسیون تولید شده به روش کم انرژی کارایی کمتری نسبت به سورفاکتانت های ریزمولکولی از خود نشان داد و از سوی دیگر دلیل بیشتر بودن میانگین قطر ذرات توسط این پروتئین اندیس خامه ای شدن افزایش داشت.

### ۳-۱۰- بهینه سازی اجزای تشکیل دهنده

#### نانوامولسیون

به منظور بهینه سازی پاسخ های موثر در تولید نانوامولسیون حاوی اسیدهای چرب امگا سه از روش تابع مطلوبیت استفاده شد. در روش تابع مطلوبیت، مطلوبیت آماری بین صفر و یک (شکل ۲۰) است. برای بهینه سازی توام، ابتدا اهداف بهینه سازی مشخص گردید. یعنی پارامترهای میانگین قطر ذرات، شاخص

مطابق شکل (۱۷) مشاهده می گردد، افزایش در مقدار امگا سه در تمامی فرمولاسیون ها به جز کازئینات سدیم افزایش در میزان اندیس خامه ای شدن را سبب گردید، تغییرات در حضور سورفاکتانت پروتئینی معنی دار نبود ( $P < 0/0001$ ). عبارتی با افزایش در مقدار امگا سه، غلظت سورفاکتانت برای پوشش کامل سطحی کاهش و اندازه ذرات افزایش یافت، در نتیجه بر اساس قانون استوک صعود ذرات با افزایش میزان اندازه ذرات افزایش یافت. از طرفی پروتئین کازئینات سدیم بدلیل وزن مولکولی بالاتر، چگالی لایه سطحی را بالاتر می برد و بخشی از امگا سه را بر سطح خود نگهداشته و تشکیل لایه خامه ای را نسبت به سایر سورفاکتانت ها به تعویق بیندازد. با توجه به نتایج این آزمون و نتایج حاصل از نانوامولسیون اسانس موسیر ایرانی حاوی اسیدهای چرب امگا سه میتوان نتیجه گرفت که در بین تمامی سورفاکتانت ها با افزایش غلظت امگا سه، سورفاکتانت کازئینات سدیم عملکرد بهتری در جلوگیری از حرکت ذرات روغن و صعود به سطح ذرات داشت. Chen و همکاران (۲۰۱۵) مشاهده کردند که نانوامولسیون روغن نعناع فلفلی به علت رسیدگی استوالد در طی دوران نگهداری رشد داشته است [۳۳].



**Fig 18** Two-dimensional Contour-Plot of Storage time and SOR% on Creaming

شکل (۱۸) نمودار برهمکنش مقدار SOR و مدت زمان نگهداری در مقادیر ثابت میانی دو پارامتر مقدار امگا سه ۵۰ درصد و سورفاکتانت توئین ۸۰ بر میزان خامه ای شدن نانوامولسیون اسانس موسیر ایرانی را نشان می دهد. با افزایش مقدار سورفاکتانت میزان خامه ای شدن کاهش یافت و مدت

بودن و سادگی برای تولید نانوامولسیون امگا سه در محصولاتی نظیر محصولات لبنی، نوشیدنی های شفاف و انواع سس ها پیشنهاد می گردد.

## ۵- تشکر و قدردانی

بدین وسیله از همکاری مدیریت محترم شرکت آذین شوستر جناب آقای ساسان فنادان در انجام مطالعه حاضر سپاسگزار می گردد.

## ۶- منابع

- [1] Saaerla, M., Lahteenmaki, L., Crittenden, R., Salminen, T. 2002. Gut bacteria and health foods—the European perspective. *International journal of food microbiology*, 78, 99-117
- [2] Maki, K.C., Yurko-mauro, K., Dicklin, M. R., Schild, A. L. and Geohas, J. G. 2014. A new, microalgal DHA-and EPA-containing oil lowers triacylglycerols in adults with mild-to-moderate hypertriglyceridemia. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 91, 141-148.
- [3] Kesavul, M., Kameswararo, B., Apparao, C., Kumar, E. and Harinarayan, A. C. 2002. Effect of omega3 fatty acids on lipid peroxidation and antioxidant enzyme status in type 2 diabetic patients. *Diabetes and Metabolism*, 28, 20-26.
- [4] Kris-etherton, P. M., Grieger, J. A. and Etherton, T. D. 2009. Dietary reference intakes for DHA and EPA. *Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids*, 81, 99-104.
- [5] Lavie, C. J., Milani, R. V., Mehra, M. R. and Ventura, H. O. 2009. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular diseases. *Journal of the American College of Cardiology*, 54, 585-594.
- [6] Nuchi, C. D., McClements, D. J. and Decker, E. A. 2001. Impact of Tween 20 hydroperoxides and iron on the oxidation of methyl linoleate and salmon oil dispersions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 49, 4912-4916.
- [7] McClements, D. J. and Rao, J. 2011. Food-grade nanoemulsions: formulation, fabrication,

کدورت، ضریب شکست، اندیس پراکسید و اندیس تیوباریتوریک اسید و خاصیت آنتی اکسیدانی، شاخص اسپن و ویسکوزیته در کمینه و کارایی درون پوشانی در بیشینه در نظر گرفته شدند و نتایج مقادیر بهینه با مطلوبیت بالا بصورت میزان امگا سه (۲۵ درصد)، میزان SOR (۲۶۳/۳۹ درصد)، مدت زمان نگهداری (۳۵ روز) و نوع سورفاکتانت توئین ۸۰ مشخص گردید.

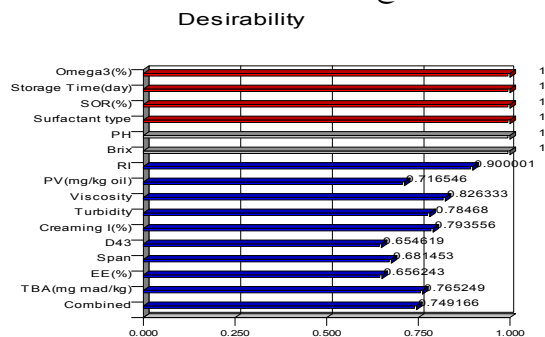


Fig 20 Desirability functions for all factors and responses

## ۴- نتیجه گیری

در این پژوهش تولید نانوامولسیون حاوی اسیدهای چرب امگا سه با استفاده از اسانس گیاهی موسیر ایرانی با بکارگیری روش کم انرژی مورد بررسی قرار گرفت. مشاهده گردید نوع سورفاکتانت، مقدار سورفاکتانت، مقدار امگا سه و مدت زمان نگهداری تاثیر زیادی بر روی اندازه ذرات و پایداری فیزیکی داشتند. پایدارترین نانوامولسیون در نسبت سورفاکتانت به روغن ۲۶۳/۳۹ درصد حاصل شد و نانوامولسیون های حاوی سورفاکتانت توئین ۸۰ کوچکترین میانگین ذرات در مقایسه با سایر سورفاکتانت ها را نشان دادند و کاهش اندازه ذرات و اندیس کدورت با افزایش در مقدار سورفاکتانت و کاهش مقدار امگا سه مشاهده گردید. همچنین از فرمولاسیون بهینه محافظت بیشتر اسیدهای چرب غیراشباع روغن ماهی را تحت شرایط اکسیداسیون و پوشاندن بوی نامطبوع روغن ماهی بدست آمد. با توجه به نتایج حاصل شده بکارگیری روش کم انرژی امولسیفیکاسیون خودبخودی از نظر بهبود کیفی ویژگی های فیزیکوشیمیایی و افزایش ثبات آن در طول مدت زمان نگهداری روش مناسبی و با کارایی مطلوب بود و این روش بدلیل ارزان

- liposomes: preparation, stability and application in fluid milk. *Food research international*, 38, 289-296.
- [19] Martn-diana, A. B., Rico, D., Barat, J. and Barry-rayan, C. 2009. Orange juices enriched with chitosan: Optimisation for extending the shelf-life. *Innovative food science and emerging technologies*, 10, 590-600.
- [20] Chanda, H., Das, P., Chakraborty, R. and Ghosh, A. 2011. Development and evaluation of liposomes of fluconazole. *J Pharm Biomed Sci*, 5, 1-9.
- [21] Walker, R. M., Decker, E. A. and McClements, D. J. 2015b. Physical and oxidative stability of fish oil nanoemulsions produced by spontaneous emulsification: effect of surfactant concentration and particle size. *Journal of Food Engineering*, 164, 10-20.
- [22] Ghosh, V., Mukherjee, A. and Chanrasekaran, N. 2014. Eugenol-loaded antimicrobial nanoemulsion preserves fruit juice against microbial spoilage. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 114, 392-397.
- [23] Krstonosic, V., DOKIĆ, L., Dokic, P. and Dapcevic, T. 2009. Effects of xanthan gum on physicochemical properties and stability of corn oil-in-water emulsions stabilized by polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate. *Food Hydrocolloids*, 23, 2212-2218.
- [24] Mohammadi, A., Jafari, S. M., Esfanjani, A. F. and Akhavan, S. 2016. Application of nano-encapsulated olive leaf extract in controlling the oxidative stability of soybean oil. *Food chemistry*, 190, 513-519.
- [25] Richadson, A. J. 2006. Omega-3 fatty acids in ADHD and related neurodevelopmental disorders. *International review of psychiatry*, 18, 155-172.
- [26] Heinzelmann, K., Franke, K., Jensen, B. and Haahr, A. M. 2000. Protection of fish oil from oxidation by microencapsulation using freeze-drying techniques. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 102, 114-121.
- [27] Alfaro Sanaberia, L. A. 2012. Development of a frozen yogurt fortified with a nano-emulsion containing purple rice bran oil.
- [28] AHN, J.-H., Kim, Y.-P., Lee, Y.-M., SEO, E.-M., LEE, K.-W. and KIM, H.-S. 2008. Optimization of microencapsulation of seed oil by response surface methodology. *Food Chemistry*, 107, 98-105.
- properties, performance, biological fate, and potential toxicity. *Critical reviews in food science and nutrition*, 51, 285-330.
- [8] Rso, J. and McClements, D. J. 2012. Food-grade microemulsions and nanoemulsions: Role of oil phase composition on formation and stability. *Food hydrocolloids*, 29, 326-334.
- [9] Walker, R., Decker, E. A. and McClements, D. J. 2015a. Development of food-grade nanoemulsions and emulsions for delivery of omega-3 fatty acids: opportunities and obstacles in the food industry. *Food and function*, 6, 41-54.
- [10] Saberi, A. H., Fasng, Y. and McClements, D. J. 2013b. Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: factors affecting particle size using spontaneous emulsification. *Journal of colloid and interface science*, 391, 95-102.
- [11] McClements, D. J. 2012. Nanoemulsions versus microemulsions: terminology, differences, and similarities. *Soft matter*, 8, 1719-1729.
- [12] Li, J., Hwang, I.-C., Chen, X. and Park, H. J. 2016. Effects of chitosan coating on curcumin loaded nano-emulsion: Study on stability and in vitro digestibility. *Food Hydrocolloids*, 60, 138-147.
- [13] Jalali, R., Bagheri, S. M., Moghimi, A. and Rasuli, M. B. 2007. Hypoglycemic effect of aqueous shallot and garlic extracts in rats with fructose-induced insulin resistance. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 41, 218-223.
- [14] Saberi, A. H., Fasng, Y. and McClements, D. J. 2014. Effect of salts on formation and stability of vitamin E-enriched mini-emulsions produced by spontaneous emulsification. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62, 11246-11253.
- [15] ISIRI.4179.Peroxide value.1377
- [16] Amirdivani Sh and Salihin Baba A, 2011. Change in yogurt fermentation characteristic and antioxidant potential and in vivo inhibition of angiotensin-I converting enzyme upon the inclusion of peppermint, dill and basil. *Food Science and Technology*, 44:1458-1464
- [17] Molyneux, P. 2004. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. *Songklanakarin J. Sci. Technol*, 2, 219-211, 6
- [18] Xia, S. and Xu, S. 2005. Ferrous sulfate

- biophysics*, 7, 341-353.
- [32] Li, J., Solval, K. M., Alfaro, L., Zhang, J., Chotiko, A., Delgado, J. L. B., Chouljenk, A., Bankston, D., Bechtel, P. J. and Sathivel, S. 2015. Effect of blueberry extract from blueberry pomace on the microencapsulated fish oil. *Journal of Food Processing and Preservation*, 39, 199-206.
- [33] Chen, H., Guan, Y. and Zhong, Q. 2015. Microemulsions based on a sunflower lecithin-Tween 20 blend have high capacity for dissolving peppermint oil and stabilizing coenzyme Q10. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63, 983-989.
- [29] Yi, J., Zhu, Z., McClements, D. J. and Decker, E. A. 2014. Influence of aqueous phase emulsifiers on lipid oxidation in water-in-walnut oil emulsions. *Journal of agricultural and food chemistry*, 62, 2104-2111.
- [30] Gortzi, O., Lalas, S., Chinou, I. and Tsaknis, J. 2008. Reevaluation of bioactivity and antioxidant activity of *Myrtus communis* extract before and after encapsulation in liposomes. *European food research and technology*, 226, 583-590.
- [31] Li, Y., Xiao, H. and McClements, D. J. 2012. Encapsulation and delivery of crystalline hydrophobic nutraceuticals using nanoemulsions: Factors affecting polymethoxyflavone solubility. *Food*



## Modeling and optimization of nanoemulsion of Iranian moosir essential oil carrying omega3 fatty acids using D-Optimal design

Faraji, N. <sup>1\*</sup>, Alizadeh, M. <sup>2</sup>, Fraji, S. <sup>3</sup>

1. phd graduated in Food science and technology, R&D manager at azin company.
2. professor, urmia university.
3. MSc in Food science and technology, QC manager at azin company.

ARTICLE INFO	ABSTRACT
<p><b>Article History:</b></p> <p>Received 2022/ 01/ 20 Accepted 2022/ 03/ 02</p> <p><b>Keywords:</b></p> <p>Nanoemulsion, Unsaturated fatty acid, Omega3, Spontaneous emulsification, Iranian moosir</p> <p><b>DOI:</b> 10.22034/FSCT.19.130.307 <b>DOR:</b> 20.1001.1.20088787.1401.19.130.24.3</p> <p>*Corresponding Author E-Mail: Nasrin.faraji88@yahoo.com</p>	<p>Using of low energy methods has become very popular due to the lack of expensive equipment and ease of production. In this study, nanoemulsions of omega-3 fatty acids were prepared using Iranian shallot essential oil by spontaneous emulsification method. The aim of this study was to investigate the optimal conditions for the production of nanoemulsions contained of (Tween 80, Tween 20, Tween 80:20 and sodium caseinate), SOR (ratio of surfactant to oil) (10-300%) and shelf life (1-60 days) using a D-optimal design. Their effect on parameters such as mean particle size, turbidity index, creaming index, antioxidant properties, peroxide value, thiobarbituric acid index and refractive index were studied. The droplet size was highly affected by the surfactant concentration and the type of surfactant, and with increasing the amount of surfactant, the average droplet diameter decreased significantly. In fact, increasing the concentration of surfactant in nanoemulsions in most cases increased the adsorption of surfactant to the o / w level and as a result led to a further reduction in surface tension and ultimately reduced the particle size, turbidity index and creamy index. Using numerical optimization, the optimal values of independent variables of nanoemulsion of Iranian shallot essential oil containing omega-3 fatty acids were determined as omega-3 (25%), SOR (263.39%), shelf life (35 days) and Tween 80 as the surfactant.</p>