

مقاله پژوهشی

بررسی تأثیر غلظت نانوذره و محتوای روغن بر پایداری فیزیکی امولسیون پیکرینگ پایدار شده توسط نانو ذرات کیتوزان

فاطمه حیدری دلفاردا^۱، امان محمد ضیایی فر^{۲*}، سید مهدی جعفری^{۳*}، نیکلاس آنتون^۴

۱. دانشجوی دکتری، گروه مهندسی مواد و طراحی صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۲. دانشیار، گروه مهندسی مواد و طراحی صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۳. استاد، گروه مهندسی مواد و طراحی صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان

۴. دانشیار، گروه نانوپزشکی، دانشکده داروسازی، دانشگاه استراسبورگ، استراسبورگ، فرانسه

(تاریخ ارسال: ۱۴۰۰/۰۶/۱۳، تاریخ آخرین بازنگری: ۱۴۰۰/۰۷/۱۸، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۰/۰۷)

چکیده

در سال‌های اخیر تهیه امولسیون پیکرینگ به دلیل گستره وسیعی از کاربردهای آن در صنایع غذایی، دارویی و آرایشی توجه زیادی را به خود جلب کرده است. هدف از این پژوهش تهیه امولسیون پیکرینگ روغن در آب پایدار شده با نانو ذرات کیتوزان و بررسی تأثیر غلظت نانوذره و محتوای روغن بر پایداری فیزیکی امولسیون تهیه شده بود. ابتدا نانو ذرات کیتوزان با استفاده از روش ژل شدن یونی تشکیل شدند. مورفولوژی، توزیع اندازه ذره، ترشوندگی و طیف FTIR نانو ذرات تعیین شد. نتایج میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی، تشکیل نانو ذرات نسبتاً کروی شکل با متوسط اندازه 69 ± 1 نانومتر را نشان داد. همچنین نتایج طیف FTIR و ترشوندگی تشکیل نانو ذرات را اثبات کرد. در مرحله دوم امولسیون‌های پیکرینگ در سه سطح غلظت ۰/۴۵، ۰/۶۰ و ۰/۷۵ درصد نانو ذرات کیتوزان و نسبت‌های ۱۰، ۲۰ و ۳۰٪ روغن به آب تهیه شدند. نتایج نشان‌دهنده تأثیر معنی‌دار غلظت نانوذره و محتوای روغن بر پایداری فیزیکی امولسیون بود. اندازه قطرات، کوالسنس و شاخص خامه‌ای شدن در یک نسبت ثابت روغن به آب با افزایش غلظت نانوذره کاهش یافت. در حالی که محتوای روغن بر خواص امولسیون‌های تهیه شده با غلظت‌های مختلف نانوذره تأثیر متفاوتی داشت.

واژه‌های کلیدی: نانوذره کیتوزان، امولسیون پیکرینگ، پایداری فیزیکی.

* نویسنده مسئول: ziiaifar@gmail.com

* نویسنده مسئول: [Email: Smjafari@gau.ac.ir](mailto:Smjafari@gau.ac.ir)

۱. مقدمه

امولسیون به سیستم کلوئیدی ناهمگنی گفته می‌شود که متشکل از دو یا چند مایع غیرقابل امتزاج است. از آنجایی که سیستم‌های امولسیون به لحاظ ترمودینامیکی ناپایدار هستند، اساساً به‌کارگیری یک امولسیفایر مناسب برای رسیدن به پایداری مطلوب ضروری است. به‌کارگیری برخی از امولسیفایرها به‌ویژه انواع سنتزی، برای سلامتی انسان مضر می‌باشد؛ علاوه بر این وجود مشکلاتی از قبیل به دام افتادن هوا، کف کردن و غیره منجر به توجه بیشتر محققین برای ساخت سیستم‌های امولسیون بدون امولسیفایر شده است [۱]. امولسیون‌های پیکرینگ^۱ سیستم‌های امولسیونی پایدار شده توسط ذرات کلوئیدی جامد می‌باشند [۲-۳]. ذرات جامد پایدارکننده دارای ترشوندگی معینی در هر دو فاز آبی و روغنی بوده و در عین حال در هر فاز نامحلول می‌باشند؛ بنابراین آن‌ها می‌توانند به‌طور برگشت‌ناپذیر بر روی سطح مشترک آب و روغن و سپس اطراف قطرات فاز غیرپیوسته جذب شده و لایه جذبی چگال را تشکیل دهند که این لایه ممانعت فیزیکی در فضا برای جلوگیری از تماس بین قطرات ایجاد می‌کند. علاوه بر این، خاصیت ترشوندگی متفاوت ذرات در دو فاز که با استفاده از زاویه تماس θ نشان داده می‌شود، می‌تواند تعیین‌کننده نوع امولسیون پیکرینگ باشد. به‌طوری‌که ذرات با زاویه تماس کمتر از ۹۰ درجه امولسیون روغن در آب و ذرات با زاویه تماس بزرگتر از ۹۰ درجه امولسیون آب در روغن تشکیل خواهند داد [۴].

در مقایسه با امولسیون‌های معمولی، امولسیون‌های پیکرینگ مزایای منحصر به فردی به شرح زیر دارند: (۱) در امولسیون‌های پیکرینگ از ذرات جامد به عنوان امولسیون‌کننده برای پایداری امولسیون استفاده می‌شود که می‌توانند به‌طور برگشت‌ناپذیری در سطح مشترک آب و روغن جذب شوند و فیلمی برای جلوگیری از تجمع قطرات تشکیل دهند. (۲) غالباً نسبت به تغییرات شرایط محیطی مانند pH، قدرت یونی، دما و ترکیب فاز روغن مقاوم می‌باشند. (۳) در مقایسه با امولسیون‌های پایدار شده با سورفکتانت‌های معمولی، به مقادیر کمتری پایدارکننده در طی مراحل آماده‌سازی نیاز

دارند. (۴) زیست‌سازگاری خوبی دارند و می‌توانند به عنوان حامل برای انتقال ترکیبات زیست‌فعال مورد استفاده قرار گیرند. ذرات جامدی که به‌طور معمول برای تثبیت امولسیون‌های پیکرینگ استفاده می‌شوند عبارت‌اند از: مواد آلی با درجه خوراکی مانند ذرات پلی‌ساکاریدی، ذرات پروتئینی، ذرات چربی، پلی‌فنول‌ها و ذرات معدنی سالم مانند سیلیکا، کربنات کلسیم و هیدروکسی آپاتیت [۵-۶]؛ بنابراین امولسیون پیکرینگ به یک سیستم امولسیونی بسیار کارآمد تبدیل شد و در سال‌های اخیر به‌طور گسترده‌ای در فرآوری محصولات غذایی مورد استفاده قرار گرفت. در این راستا، محققان با تمرکز بر استفاده از ذرات جامد ایمن و طبیعی در پایدارسازی امولسیون‌های پیکرینگ، از بیوپلیمرهای زیستی مختلف به عنوان مواد خام برای بدست آوردن ذرات جامد از طریق اصلاح، ترکیب و دیگر روش‌های کنترل استفاده می‌کنند [۷].

کیتوزان دومین بیوپلیمر فراوان در طبیعت بعد از سلولز است که از اسکلت خارجی میگو و دیگر سخت‌پوستان به دست می‌آید و یکی از معدود پلیمرهای طبیعی دارای بار مثبت می‌باشد. به دلیل خصوصیات منحصر به فرد زیست‌تخریب‌پذیری، زیست‌سازگاری و عدم سمیت، نانوذره‌های کیتوزان به عنوان سیستم‌های دارورسانی، نانوالیاف، زیست‌حسگرها و فیلم‌های خوراکی استفاده می‌شوند [۸-۹]. قابل ذکر است که کیتوزان آمفی‌فیل می‌تواند برای تشکیل امولسیون پیکرینگ به دلیل گروه‌های جانبی استیل غیرقطبی و چندین گروه‌های هیدروکسیل و آمینه قطبی مفید باشد. چندین روش برای تولید نانو ذرات کیتوزان پایدار برای کاربردهای مختلف معرفی شده است که در این بین سنتز نانو ذرات کیتوزان با روش ژل شدن یونی^۳ توجه بیشتری را به خود جلب کرده است؛ زیرا این فرایند غیررسمی، بدون حلال آلی، راحت و قابل کنترل است. تکنیک ژل شدن یونی شامل برهمکنش الکتروستاتیک بین گروه‌های آمین اولیه با بار مثبت از کیتوزان و گروه‌های با بار منفی از پلی‌آنیون مانند تری پلی فسفات (STPP)^۴ است که به دلیل خاصیت غیررسمی و چند ظرفیتی آن، به عنوان پرمصرف‌ترین عامل

3. ionic gelatin technique
4. Sodium Tripolyphosphate (STPP)

1. Pickering emulsion
2. contact angle

۷۵ تا ۸۵٪) از سیگما آلدریج خریداری شد. سدیم تری پلی فسفات، اسید استیک و سدیم هیدروکسید از شرکت مرک آلمان تهیه شدند. روغن آفتابگردان از فروشگاه محلی تهیه گردید. همچنین برای حذف رسوبات و مواد حل نشده از فیلتر سرنگی $0.45 \mu\text{m}$ و 0.22 استفاده شد.

۲.۲. روش‌ها

۲.۲.۱. تولید نانو ذرات کیتوزان - سدیم تری پلی فسفات

نانو ذرات با استفاده از روش ژل شدن یونی و مطابق با روش ارائه شده توسط کالوو و همکاران (۱۹۹۷) با اندکی تغییرات تهیه شدند [۱۷]. ابتدا محلول‌های کیتوزان با حل کردن غلظت‌های مختلف پودر کیتوزان تحت شرایط استیرر ملایم به مدت ۲۴ ساعت در محلول اسید استیک ۱٪ حجمی/حجمی تهیه شدند. pH محلول نهایی با استفاده از سدیم هیدروکسید ۱ M روی ۵ تنظیم شد. محلول STPP با حل کردن پودر آن در آب دیونیزه تهیه شد. pH محلول حاصل با استفاده از اسید استیک روی ۴ تنظیم شد. محلول‌های کیتوزان و STPP به ترتیب از فیلترهای $0.45 \mu\text{m}$ و 0.22 عبور داده شدند. به منظور تشکیل نانو ذرات با غلظت‌های مختلف (جدول ۱)، محلول STPP به آرامی و به صورت قطره قطره به محلول کیتوزان در حال استیرر اضافه شد و تا زمان تشکیل یک سوسپانسیون شیری رنگ ادامه یافت. تشکیل سوسپانسیون مذکور نشان‌دهنده تشکیل ذرات کیتوزان - سدیم تری پلی فسفات است.

۲.۲.۲. طیف سنجی مادون قرمز (FTIR)

برای توصیف فعل و انفعالات شیمیایی بین گروه آمین کیتوزان و گروه فسفات در STPP طیف ATR^۲ محلول کیتوزان و نانو ذرات کیتوزان - سدیم تری پلی فسفات که دستگاه جانبی FTIR (مدل AVATAR ساخت کشور آمریکا) می‌باشد ثبت شد.

اتصال‌دهنده یونی مورد استفاده قرار می‌گیرد [۱۱-۱۰]. این برهمکنش تنها به شرایط ملایم دما و pH نیاز داشته و اندازه نانو ذرات حاصل می‌تواند با تغییر pH، وزن مولکولی کیتوزان و نسبت آن به تری پلی فسفات کنترل شود. پایداری امولسیون‌های پیکرینگ به پارامترهای زیادی مانند نسبت روغن به آب، غلظت نانو ذرات، فعالیت سطحی، pH و قدرت یونی بستگی دارد [۱۲]. غلظت نانو ذرات و نسبت محتوای روغن به آب، اندازه قطرات تشکیل شده و پایداری قطرات امولسیون نسبت به کوالسنس^۱ و خامه‌ای شدن را تعیین خواهد کرد [۱۳]. مطالعاتی در این زمینه انجام گرفته است که در ادامه به چند مورد اشاره خواهد شد.

داماک و همکاران (۲۰۱۷) از ترکیب نانوذره کیتوزان سنتز شده توسط روش تنظیم pH و لستین برای پایداری امولسیون پیکرینگ روغن در آب استفاده نمودند و تأثیر عوامل فرمولاسیون (نسبت روغن به آب، غلظت نانوذره و لستین) بر پایداری فیزیکی امولسیون را بررسی کردند. نتایج نشان داد که نسبت روغن به آب بیشترین تأثیر را بر پایداری امولسیون نسبت به فاکتورهای دیگر دارد [۱۴]. مونگی و همکاران (۲۰۱۶) در تحقیقی نشان دادند که امولسیون‌های پیکرینگ پایدار شده با نانو ذرات کیتوزان - تری پلی فسفات دارای توزیع اندازه باریکی هستند [۱۵]. ریبیو و همکاران (۲۰۲۰) تأثیر روش سنتز نانوذره (ژل شدن یونی و تنظیم pH) را بر امولسیون‌های پیکرینگ حاصل بررسی کردند. نانو ذرات کیتوزان سنتز شده توسط روش تنظیم PH بزرگتر بودند و منجر به تشکیل امولسیون‌هایی با قطرات روغن بزرگتر شدند و رفتار رئولوژیکی امولسیون‌ها تا حد زیادی تحت تأثیر افزایش غلظت کیتوزان قرار گرفت [۱۶]. هدف از مطالعه حاضر تهیه سیستم امولسیون پیکرینگ پایدار شده توسط نانو ذرات کیتوزان - تری پلی فسفات و بررسی تأثیر متغیرهای مستقل غلظت نانو ذره و نسبت روغن به آب بر پایداری فیزیکی آن است.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. مواد

کیتوزان با وزن مولکولی پایین (درجه داستیلاسیون بین

2. Attenuated Total Reflection- Fourier Transform Infra-Red

1. coalescence



جدول (۱) تهیه نانو ذرات کیتوزات در شرایط مختلف.

Table 1. Chitosan nanoparticles prepared under different conditions

غلظت نانوذره Nanoparticle concentration	نسبت کیتوزان به سدیم تری پلی فسفات Volumetric ratio (CS:STPP)	غلظت محلول ب Concentration of solution B (STTP mg/mL)	غلظت محلول الف Concentration of solution A (CS mg/mL)
0.75	5:2	4	9
0.6	4:1	2	7
0.45	5:1	2	5

ساخت کشور انگلیس) استفاده شد. اندازه ذرات به صورت قطر میانگین Z بیان شده است.

۷.۲.۲. اندازه‌گیری شاخص خامه‌ای شدن

شاخص خامه‌ای شدن توسط معادله (۱) تعیین شد. برای این منظور نمونه‌ها به لوله‌های شیشه‌ای منتقل و بدون هرگونه جابجایی به مدت سه هفته در شرایط محیط نگه‌داری شدند. برای اندازه‌گیری ارتفاع لایه خامه‌ای شده از کولیس دیجیتالی استفاده شد. شاخص خامه‌ای شدن در طول نگاه‌داری توسط رابطه زیر محاسبه شد:

$$CI(\%) = \frac{H_c}{H_t} \times 100\% \quad (1)$$

در معادله بالا CI ، H_c و H_t به ترتیب شاخص خامه‌ای شدن، ارتفاع خامه‌ای شدن و ارتفاع کل امولسیون می‌باشند [۱۵].

۸.۲.۲. مشاهده مورفولوژی امولسیون

ساختار قطرات امولسیون با استفاده از میکروسکوپ نوری بررسی شد. تصویرها در بزرگنمایی $40\times$ گرفته شدند.

۹.۲.۲. آنالیز آماری

تمام آزمایش‌ها به جزء FESEM و FTIR در قالب فاکتوریل به صورت طرح کاملاً تصادفی در دو تکرار انجام گرفت. آنالیز واریانس و مقایسه میانگین‌ها توسط آزمون دانکن^۳ چند دامنه‌ای در سطح ۵ درصد توسط نرم‌افزار 16 SPSS انجام شد.

۳.۲.۲. مورفولوژی و اندازه نانو ذرات

ویژگی‌های مورفولوژیکی و اندازه ذرات با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FESEM)^۱ تعیین شدند. ابتدا نمونه سوسپانسیون نانو ذرات رقیق‌سازی شد. در ادامه یک قطره از نمونه روی سطح فویل آلومینیومی ریخته و در دمای محیط خشک شد.

۴.۲.۲. خاصیت ترشوندگی

قابلیت ترشوندگی نانو ذرات، با استفاده از دستگاه اندازه‌گیری زاویه تماس بررسی شد. در این آزمایش زاویه تماس نانو ذرات توسط عکس برداری اندازه‌گیری شد.

۵.۲.۲. تهیه امولسیون‌های پیکرینگ

امولسیون‌های پیکرینگ از طریق مخلوط کردن سوسپانسیون‌های آبی شامل غلظت‌های مختلفی از نانو ذرات با نسبت‌های مختلف روغن آفتابگردان (۱۰، ۲۰ و ۳۰٪ حجم نهایی) تهیه شدند. نمونه‌ها با استفاده از هموژنایزر اولتراتراکس (مدل Heidolph ساخت کشور آلمان) در ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۴ min همگن شدند. سپس در یک حمام یخ در سطح توان ۰/۲ KV کیلووات به مدت ۳ min تحت تیمار فراصوت (مدل UP200S ساخت کشور آمریکا) قرار گرفتند.

۶.۲.۲. بررسی اندازه ذرات امولسیون پیکرینگ

برای اندازه‌گیری اندازه قطرات امولسیون از دستگاه پراش نور دینامیک^۲ (مدل Malvern Instruments Worcestershire).

1. Field emission scanning electron microscope
2. Dynamic Light Scattering

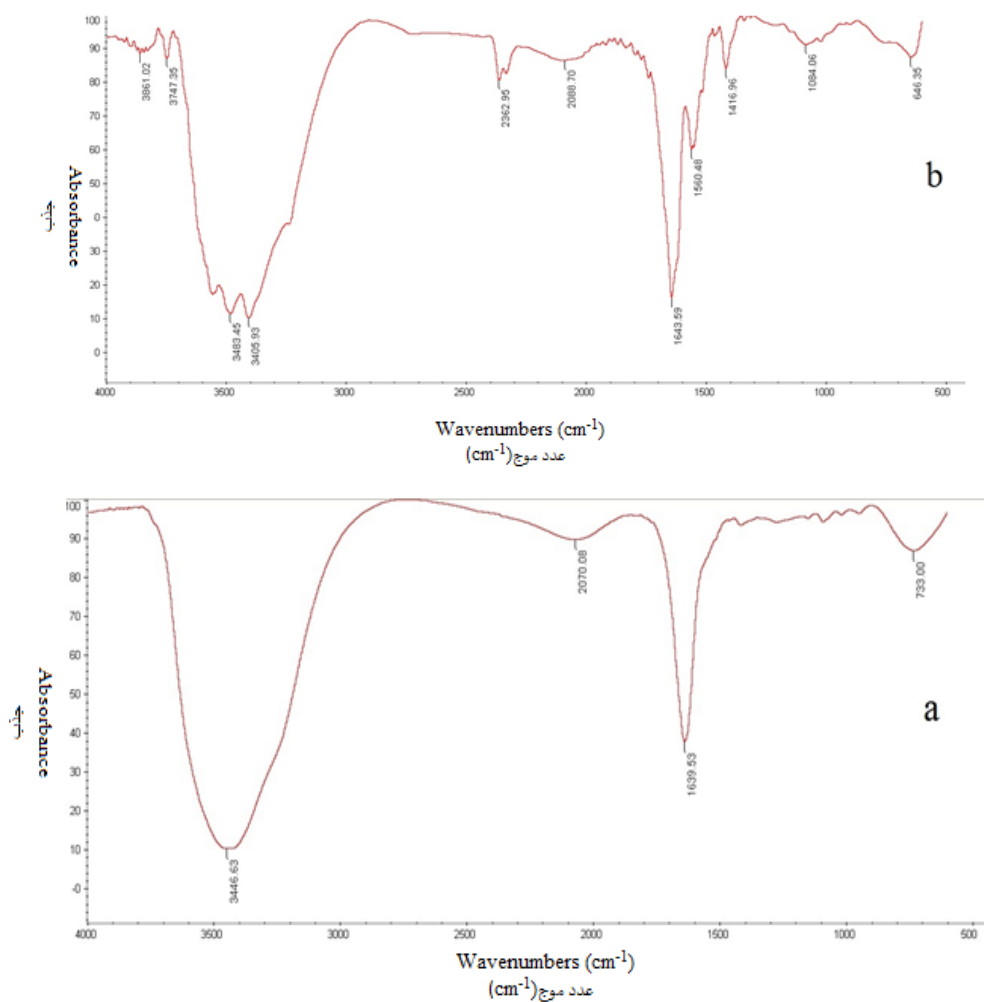
مولکولی کیتوزان می‌باشند. برهمکنش بین گروه‌های آمین کیتوزان و یون‌های TPP را می‌توان با تغییر در پیک‌های گروه‌های آمین و تشکیل شدن پیک‌های مربوط به گروه‌های فسفات در طیف حاصل از نانو ذرات کیتوزان-تری پلی فسفات تأیید کرد [۱۵]. پیک جدید در موقعیت عدد موجی $1084/06 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به وجود P=O در ساختار نانو ذرات است. تغییر عدد موجی $1639/53 \text{ cm}^{-1}$ به $1643/59 \text{ cm}^{-1}$ و تشکیل پیک‌های جدید در موقعیت عدد‌های موجی $1560/48$ و $1416/96$ برهمکنش بین گروه‌های N- و C=O را تأیید می‌کند. ریبیریو و همکاران (۲۰۲۰) نیز نتایج مشابه با کار حاضر را گزارش کردند [۱۶].

۳. نتایج و بحث

۱.۳. بررسی نانو ذرات کیتوزان

نانو ذرات با استفاده از روش ژل شدن یونی با افزودن محلول STPP به‌صورت قطره قطره به محلول کیتوزان تهیه شدند. به منظور تأیید تعامل ایجاد شده بین گروه آمین کیتوزان و گروه فسفات در STPP آنالیز طیف FTIR مربوط به محلول کیتوزان با آنالیز طیف FTIR نانو ذرات مقایسه شد. در شکل (۱) طیف‌های FTIR مربوط به کیتوزان و نانو ذرات کیتوزان-تری پلی فسفات نشان داده شده است.

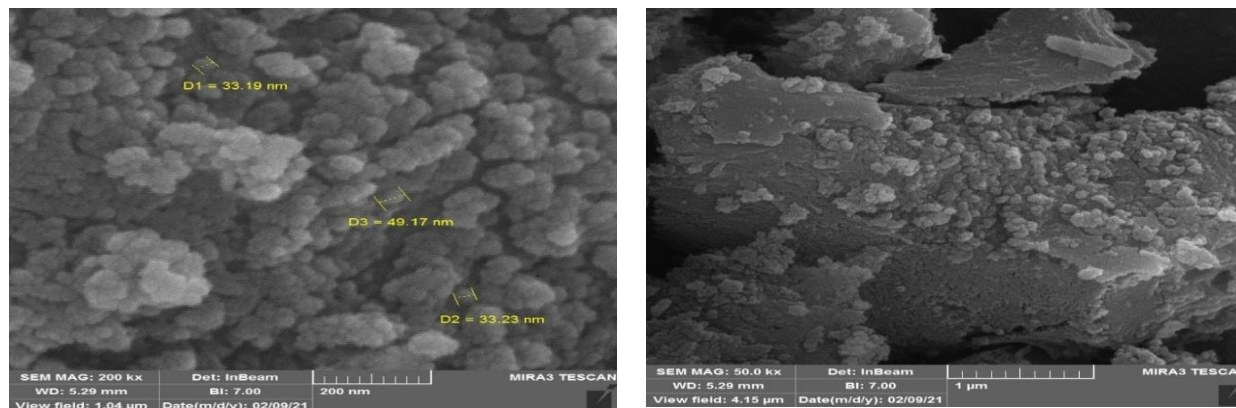
در طیف کیتوزان پیک‌های شاخص در محدوده عدد‌های موجی $3446/63$ ، $2070/08$ ، $1639/53$ و $1039/53 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به گروه‌های O-H، N-C، R-CO-NH و N-C در ساختار



شکل (۱) نتایج آنالیز طیف‌سنجی مادون قرمز (FTIR) کیتوزان (a) و کیتوزان - تری پلی فسفات (b).

Fig 1. FTIR spectra of CSP (a) and CS-TPP (b)

در شکل (۲) تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نانو ذرات کیتوزان-تری پلی فسفات نشان داده شده است. تصاویر به دست آمده بیانگر ساختار همگن و تقریباً کروی نانو ذرات می‌باشد. همچنین نتایج اندازه‌گیری اندازه ذرات، متوسط اندازه 1 ± 69 نانومتر را نشان داد (شکل ۳).

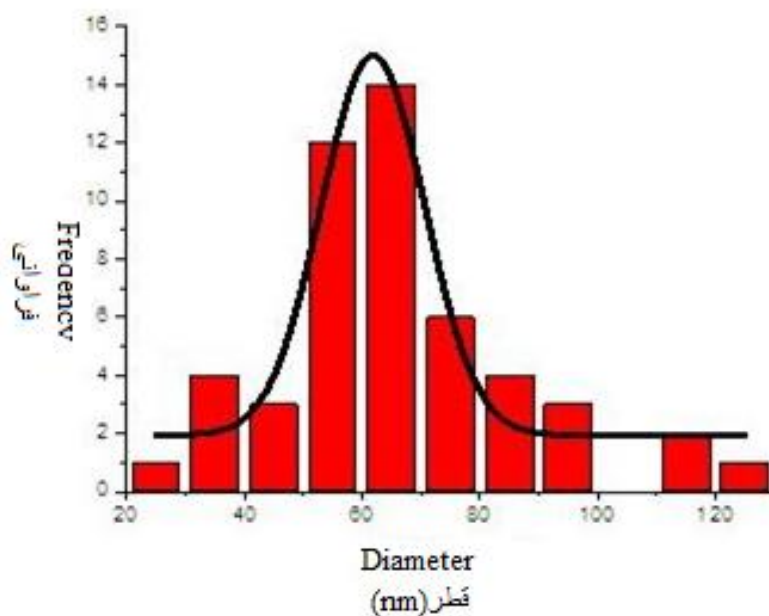


شکل (۲) تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FESEM) نانو ذرات کیتوزان.

Fig 2. FESEM images of CS/TPP NPs.

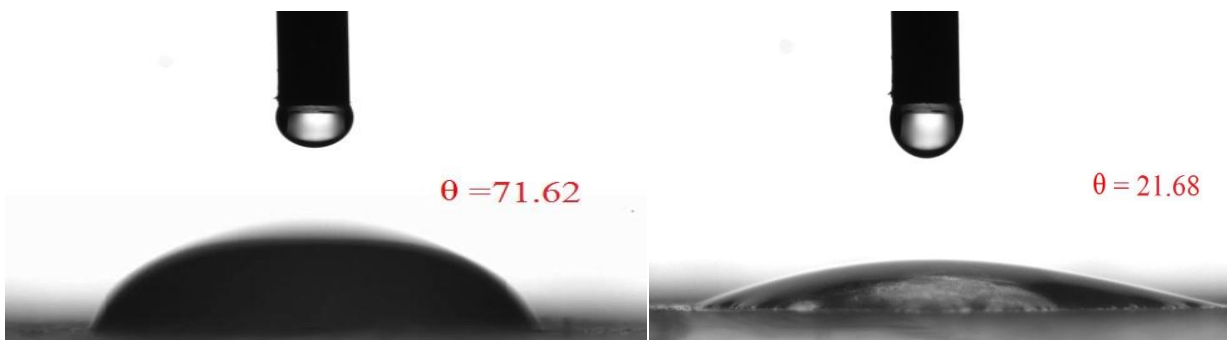
زاویه تماس نانوذره، شاخص تعیین ماهیت آبدوستی یا آگریزی نانوذره است. نانو ذرات با زاویه تماس کمتر از 90° درجه دارای ماهیت آبدوست و با زاویه تماس بیشتر از 90° درجه دارای ماهیت آگریزی می‌باشند [۴]. زاویه تماس کیتوزان $21/68$ درجه بود در حالی که زاویه تماس نانو ذرات

کیتوزان $71/62$ درجه بود (شکل ۴). کیتوزان به دلیل گروه‌های آمین دارای ماهیت آبدوست است. بنابراین می‌توان نتیجه گرفت اتصال بین گروه فسفات TPP با گروه آمین کیتوزان باعث افزایش ماهیت آگریزی نانو ذرات می‌شود.



شکل (۳) توزیع اندازه نانو ذرات.

Fig 3. Nanoparticle size distribution.



شکل (۴) زاویه تماس کیتوزان و نانو ذرات کیتوزان.

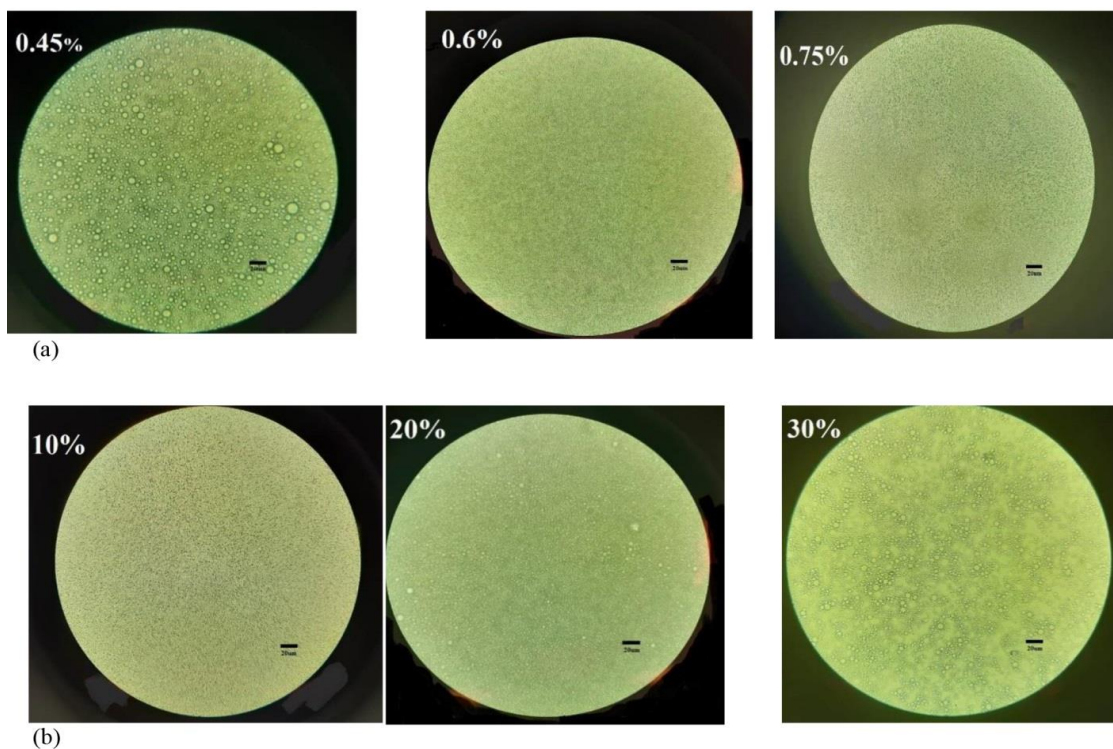
Fig 4. Contact angle of CS and CS-TPP.

۱.۲.۳. ساختار و مورفولوژی امولسیون‌های پیکرینگ

تصاویر میکروسکوپی امولسیون‌های پیکرینگ تشکیل شده با غلظت‌های مختلف نانوذره در یک نسبت ثابت روغن در شکل (۵-ا) نشان داده شده است.

۲.۳. بررسی خصوصیات امولسیون پیکرینگ

در این پژوهش تأثیر غلظت نانوذره و نسبت محتوای روغن به آب بر خصوصیات فیزیکی (ساختار و مورفولوژی، اندازه قطرات، شاخص خامه‌ای شدن و کوالسنس) امولسیون پیکرینگ مورد بررسی قرار گرفت.



شکل (۵) تصاویر میکروسکوپ نوری امولسیون‌های پیکرینگ. (a) امولسیون‌های تهیه شده با غلظت‌های مختلف نانوذرات در یک کسر حجمی ثابت روغن (۱۰ درصد). (b) امولسیون‌های تهیه شده با نسبت‌های مختلف روغن به آب در یک غلظت ثابت نانوذرات (۰.۰۱۶٪).

Fig 5. Optical microscope images of Pickering emulsions (Scale bars of 20 μ m). (a) with different contents of chitosan nanoparticles and a fixed oil volume fraction (10%). (b) with different oil volume fractions and a fixed concentration of nanoparticles (0.6%).

آنجایی که غلظت نانوذره در سیستم ثابت بود، به نظر می‌رسد که اضافه کردن مقدار روغن، فضای بین سطحی پوشانده نشده توسط ذرات موجود را افزایش می‌دهد؛ بنابراین قطرات متعاقباً با هم ادغام می‌شوند و ذرات کوچک‌تر با سرعت بیشتری به هم می‌پیوندند. نسبت روغن به آب یک فاکتور قابل توجه است که پایداری امولسیون پیکرینگ و حتی نوع امولسیون را تحت تأثیر قرار می‌دهد [۱۴]. همچنین بر اساس نتایج این آزمون در نسبت‌های بالاتر روغن به آب، غلظت نانو ذرات تأثیر بیشتری بر اندازه قطرات امولسیون داشتند. این یافته مشابه نتایج گزارش شده توسط شارکای و همکاران (۲۰۱۹) و شیائو و همکاران (۲۰۱۶) که به ترتیب پایداری امولسیون‌های پیکرینگ پایدار شده توسط نانو ذرات کیتوزان- صمغ عربی و کافیرین را بررسی کردند، می‌باشد [۲۱-۹].

برای ارزیابی تأثیر هر کدام از متغیرهای مستقل غلظت نانوذره و محتوای روغن بر اندازه قطرات نمونه‌های امولسیون آنالیز واریانس انجام شد. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که غلظت نانوذره نسبت به محتوای روغن تأثیر بیشتری بر تغییرات اندازه قطرات امولسیون‌ها داشته است. به منظور ارائه مدلی مناسب که رابطه بین تغییرات اندازه قطرات امولسیون با تغییرات غلظت نانوذره و محتوای روغن را نشان دهد، از رگرسیون چندگانه استفاده شد. مدل رگرسیونی به دست آمده یک مدل خطی دو متغیره بوده که ضریب تبیین آن (R^2) ، 0.978 و با اطمینان 95% معنی‌دار می‌باشد. مقادیر ضرایب B بیانگر آن است که افزایش یک درصدی غلظت نانوذره کاهش حدود $14/63$ درصدی اندازه قطرات را در بردارد؛ درحالی‌که افزایش یک درصدی روغن باعث افزایش حدود $6/41$ درصدی اندازه قطرات خواهد شد. همچنین مقادیر ضرایب استاندارد β حاکی از شدت تأثیر بیشتر تغییرات غلظت نانوذره بر اندازه قطرات امولسیون نسبت به تغییرات محتوای روغن است (جدول ۲). رابطه خطی به دست آمده بین متغیر وابسته اندازه قطرات امولسیون و متغیرهای مستقل غلظت نانوذره و محتوای روغن به صورت زیر می‌باشد:

$$D_s = 1139.067 - 14.636C_N + 6.413C_O \quad (2)$$

$$R^2 = 0.978$$

شکل قطرات در تمام امولسیون‌های تولید شده کروی بود که با کارهای قبلی مطابقت خوبی داشت [۱۵-۱۸]. قابل ذکر است که نمونه امولسیون آماده شده با پراکندگی غلظت پایین نانو ذرات الگوی کروی غیریکنواختی را نشان داد. یکنواختی مورفولوژی قطرات امولسیون با افزایش غلظت نانو ذرات افزایش یافت. علاوه بر این مشاهده شد که اندازه متوسط قطرات با افزایش غلظت نانوذره کاهش می‌یابد. تغییرات در اندازه و توزیع قطرات امولسیون که در اثر تغییر غلظت نانو ذرات ایجاد می‌شوند را می‌توان به پوشش سطح مشترک آب و روغن توسط نانو ذرات نسبت داد که با تشکیل یک لایه رابط قوی از تجمع قطرات پراکنده روغن محافظت می‌کند. با افزایش غلظت نانوذره، سطح مشترک پوشش داده شده افزایش پیدا می‌کند؛ در نتیجه ادغام قطرات کمتر شده و منجر به تشکیل قطراتی با اندازه کوچک‌تر می‌گردد [۱۹-۱۵].

یکنواختی مورفولوژی قطرات امولسیون در مقادیر بالاتر روغن در غلظت ثابت نانوذره کاهش پیدا می‌کند (شکل b-۵). این کاهش یکنواختی در مقادیر بالاتر روغن به احتمال زیاد به دلیل عدم کافی بودن نانو ذرات موجود برای پوشش کامل سطح قطرات روغن می‌باشد [۲۰]. علاوه بر این در امولسیون‌های پایدارشده با غلظت $0/45$ نانو ذره، هنگامی که نسبت روغن به امولسیون به بالای 20% افزایش یافت، رهایش روغن^۱ و لخته شدن^۲ قطرات مشاهده شد. قطرات با از دست دادن شکل کروی خود شروع به از بین رفتن کردند که نشان می‌دهد تعداد نانو ذرات موجود برای پایدار کردن قطرات در برابر کوالسنس کافی نیست.

۲.۲.۳ اندازه قطرات امولسیون‌های پیکرینگ

بر اساس نتایج به دست آمده از پراکنش نور دینامیک، میانگین قطر قطرات با نسبت روغن به امولسیون رابطه معکوس و با غلظت نانوذره رابطه مستقیم نشان داد (شکل ۶). نمونه‌های با نسبت بالای روغن به آب (۳ به ۷) با اندازه قطرات بزرگتر در مقایسه با نسبت کمتر روغن به آب (۱ به ۹)، با همان غلظت نانو ذرات کیتوزان مشاهده شدند. از

1. oiling off
2. flocculation

در رابطه با C_N ، غلظت نانوذره و C_O ، نسبت روغن به امولسیون می‌باشد. تحقیقات مرتبط نشان داده‌اند که پایداری امولسیون‌های پیکرینگ تولید شده به طور مستقیم به اندازه [۱۲].

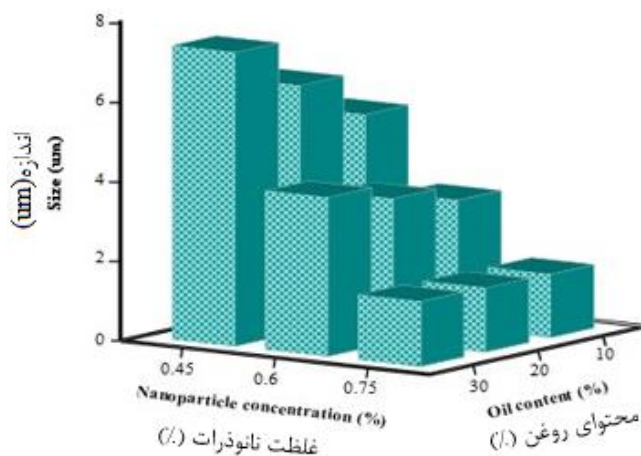
جدول (۲) ضرایب همبستگی.

معنی‌داری در سطح ۰/۰۵

Table 2. Correlation coefficients

**significance level of 0.05

		ضرایب معادله Equation coefficients (B)	ضرایب استاندارد (β) Beta standard coefficients (β)	آزمون t t test	Sig
اندازه قطرات امولسیون Emulsion droplet size	ضریب ثابت Constant	1139.067		10.324**	0.000
	غلظت نانوذره Nanoparticle concentration	-14.636	-0.886	-9.430**	0.000
	محتوای روغن Oil content	6.413	0.286	2.756**	0.004



شکل (۶) اندازه متوسط قطرات امولسیون.

Fig 6. Mean droplet size of emulsions.

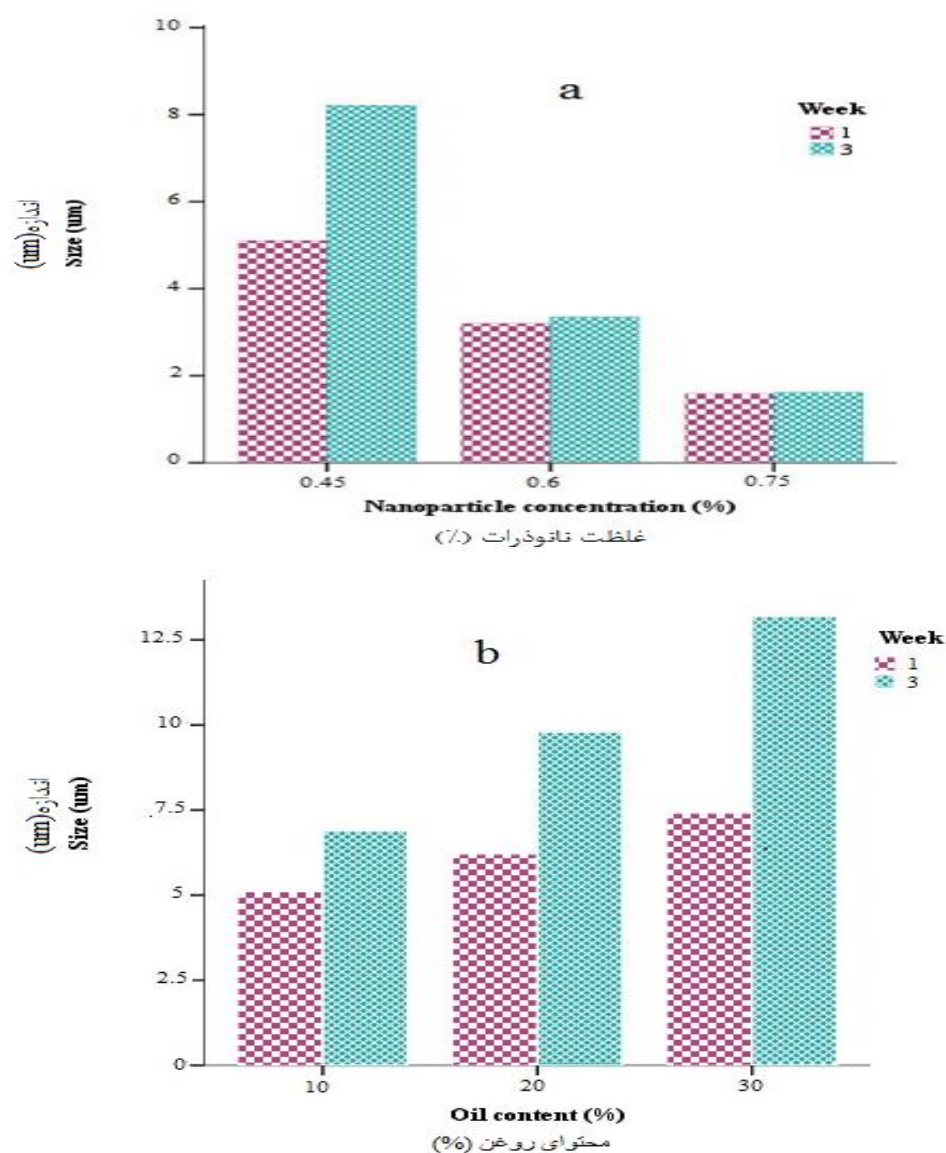
پارامتر مهم در رابطه با پایداری آن‌ها در مقابل کوالسنس می‌باشد. بر این اساس غلظت ذرات بر پایداری امولسیون تأثیر مثبت دارد [۲۳]. اندازه ذرات امولسیون‌های پایدار شده با غلظت ۰/۴۵ نانوذره در مقایسه با امولسیون‌های پایدار شده با غلظت ۰/۷۵ نانوذره در طول دوره نگهداری به شدت تغییر کرد (شکل ۷). این افزایش پایداری به کوالسنس به واسطه افزایش غلظت نانو ذرات را می‌توان به جذب چندلایه‌ای پلی‌ساکارید کیتوزان و تشکیل یک شبکه

۳.۲.۳. شاخص خامه‌ای شدن و کوالسنس

به منظور بررسی تأثیر زمان نگهداری بر پایداری امولسیون‌ها، نمونه‌های امولسیون در دمای اتاق به مدت سه هفته نگهداری شدند و شاخص خامه‌ای شدن و کوالسنس اندازه‌گیری شد. هنگامی که هیچ تغییر اساسی در توزیع اندازه ذرات، حالت تجمع یا آرایش فضایی در سیستم کلوئیدی در طول یک دوره مشاهده وجود نداشته باشد، امولسیون‌ها پایدار به کوالسنس در نظر گرفته می‌شوند [۲۰]. غلظت ذرات یک

آن‌ها بیان کردند که با افزایش غلظت نانوذره، افزایش پایداری به کوالسنس در امولسیون مشاهده شد [۱۹]. هنگامی که نسبت روغن به آب در امولسیون‌های پیکرینگ از ۰/۲۵ به ۰/۱۰ به ۳۰٪ افزایش می‌یابد، شاخص خامه‌ای شدن از ۳۱/۹ به ترتیب در امولسیون-های پایداری شده با غلظت‌های ۰/۷۵، ۰/۶ و ۰/۴۵ نانوذره افزایش می‌یابد.

سه بعدی متشکل از پلیمرها و قطرات امولسیون نسبت داد [۲۴]. توزیع اندازه برای امولسیون‌های پایداری شده با غلظت ۰/۷۵ نانوذره در هر سه سطح محتوای روغن، باریک و یکنواخت بود. همچنین پایداری به کوالسنس برای امولسیون‌های پایداری شده با غلظت ۰/۶ نانوذره با نسبت روغن به آب ۳۰٪ با شیب تندتری کاهش یافت. تان و همکاران (۲۰۱۴) نیز نتایج مشابهی را برای امولسیون پیکرینگ پایداری شده با نانو ذرات نشاسته گزارش نمودند،



شکل (۷) متوسط اندازه قطرات بعد از سه هفته نگهداری در دمای اتاق. (a) امولسیون‌های تهیه شده با غلظت‌های مختلف نانو ذرات در یک کسر حجمی ثابت روغن (۱۰ درصد). (b) امولسیون‌های تهیه شده با نسبت‌های مختلف روغن به آب در یک غلظت ثابت نانو ذرات (۰/۴۵٪).
Fig 7. average droplet size after 3 weeks at room temperature. (a) with different contents of chitosan nanoparticles and a fixed oil volume fraction (10%). (b) with different oil volume fractions and a fixed concentration of nanoparticles (0.45%).

خوراکی می‌توانند به‌طور گسترده در صنعت غذا و بدون نیاز به استفاده از امولسیفایر استفاده شوند. این رویکرد موجب کاهش قابل‌توجه کاربرد سورفکتانت‌های سنتزی و گران قیمتی می‌شود که عامل افزایش پیمادهای منفی سلامتی و زیست محیطی می‌باشند. در این پژوهش امکان تولید امولسیون پیکرینگ روغن در آب پایدار شده توسط نانو ذرات کیتوزان بررسی گردید. برای بهینه‌سازی شرایط تولید امولسیون تحت شرایط مختلف تهیه شد. غلظت نانو ذرات تأثیر مثبتی بر خواص فیزیکی امولسیون نشان داد. اندازه قطرات امولسیون، کوالسنس و شاخص خامه‌ای شدن با افزایش غلظت نانوذره به‌طور چشمگیری کاهش یافت. هم-چنین در امولسیون‌های پایدار شده با غلظت کمتر از ۰/۷۵، هنگامی که نسبت روغن به آب از ۱۰٪ به ۳۰٪ افزایش یافت، کوالسنس و شاخص خامه‌ای شدن در امولسیون‌ها به‌طور قابل توجهی افزایش پیدا کرد. عدد موج (cm^{-1})

تشکر و قدردانی

بر خود لازم می‌دانیم از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (INSF) به جهت حمایت‌های مادی تشکر و قدردانی نماییم (این اثر تحت حمایت مادی صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور برگرفته شده از طرح شماره ۴۰۰۱۰۰۴ انجام شده است).

در امولسیون پیکرینگ که غلظت نانوذره ۰/۷۵ بود در هر سه سطح روغن، دو لایه جدا از هم (خامه و امولسیون) مشاهده شد. درحالی‌که در امولسیون پایدار شده با غلظت ۰/۶ نانوذره در نسبت روغن به آب ۳۰٪ و امولسیون پایدار شده با غلظت ۰/۴۵ نانوذره در هر سه سطح روغن، سه لایه خامه، سرم و امولسیون مشاهده شد. در پژوهشی که در آن از نانو ذرات زئین - صمغ عربی برای پایداری امولسیون‌های پیکرینگ استفاده کردند، شاخص خامه‌ای شدن با افزایش نسبت روغن به آب به‌طور چشمگیری افزایش پیدا کرد [۲۵]. بنابراین می‌توان گفت افزایش محتوای روغن در امولسیون‌های پیکرینگ منجر به کاهش پایداری نمونه‌های امولسیون از طریق افزایش اندازه قطرات فاز پراکنده آن‌ها و تسریع فرایند جداسازی فاز گردید [۱۲]. بعد از چند ساعت نگهداری، در امولسیون‌های تهیه شده با غلظت ۰/۴۵ نانوذره خامه‌ای شدن اتفاق می‌افتد. این پدیده به پایداری پایین امولسیون‌ها در مقابل کوالسنس نسبت داده می‌شود. برای

امولسیون‌های پایدار شده با غلظت ۰/۷۵ نانوذره خامه‌ای شدن مشاهده نشد، به این دلیل که وجود مقادیر کافی ذرات جامد برای جذب بر روی سطح مشترک آب و روغن منجر به کاهش حرکت قطرات روغن شد [۱۵].

۴. نتیجه‌گیری

امولسیون‌های پیکرینگ پایدار شده با نانو ذرات دارای گرید

منابع

- [1] Dickinson, E. (2010). Food emulsions and foams: Stabilization by particles. *Curr Opin Colloid.*, 15(1-2), 40-49.
- [2] Tavernier, I., Wijaya, W., Van der Meeren, P., Dewettinck, K., & Patel, A. R. (2016). Food-grade particles for emulsion stabilization. *Trends Food Sci. Technol.*, 50, 159-174.
- [3] Yang, Y., Fang, Z., Chen, X., Zhang, W., Xie, Y., Chen, Y., ... & Yuan, W. (2017). An overview of Pickering emulsions: solid-particle materials, classification, morphology, and applications. *Front. Pharmacol.*, 8, 287.
- [4] Binks, B. P. (2002). Particles as surfactants—similarities and differences. *Curr Opin Colloid.*, 7(1-2), 21-41.
- [5] Mwangi, W. W., Lim, H. P., Low, L. E., Tey, B. T., & Chan, E. S. (2020). Food-grade Pickering emulsions for encapsulation and delivery of bioactives. *Trends Food Sci. Technol.*, 100, 320-332.
- [6] Patel, A. R. (2020). Functional and engineered colloids from edible materials for emerging applications in designing the food of the future. *Adv. Funct. Mater.*, 30(18), 1806809.
- [7] Dickinson, E. (2020). Advances in food emulsions and foams: reflections on research in the neo-Pickering era. *Curr. Opin. Food Sci.*, 33, 52-60.
- [8] Lim, H. P., Ho, K. W., Singh, C. K. S., Ooi, C. W., Tey, B. T., & Chan, E. S. (2020). Pickering emulsion hydrogel as a promising food delivery system: Synergistic effects of chitosan Pickering

- emulsifier and alginate matrix on hydrogel stability and emulsion delivery. *Food Hydrocoll.*, 103, 105659.
- [9] Sharkawy, A., Casimiro, F. M., Barreiro, M. F., & Rodrigues, A. E. (2020). Enhancing trans-resveratrol topical delivery and photostability through entrapment in chitosan/gum Arabic Pickering emulsions. *Int. J. Biol. Macromol.*, 147, 150-159.
- [10] Rinaudo, M., Auzely, R., Vallin, C., & Mullagaliev, I. (2005). Specific interactions in modified chitosan systems. *Biomacromolecules.*, 6(5), 2396-2407.
- [11] Berger, J., Reist, M., Mayer, J. M., Felt, O., Peppas, N. A., & Gurny, R. (2004). Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications. *Eur J Pharm Biopharm.*, 57(1), 19-34.
- [12] Zhou, Y., Sun, S., Bei, W., Zahi, M. R., Yuan, Q., & Liang, H. (2018). Preparation and antimicrobial activity of oregano essential oil Pickering emulsion stabilized by cellulose nanocrystals. *Int. J. Biol. Macromol.*, 112, 7-13.
- [13] Aveyard, R., Binks, B. P., & Clint, J. H. (2003). Emulsions stabilised solely by colloidal particles. *Adv. Colloid Interface Sci.*, 100, 503-546.
- [14] Dammak, I., & do Amaral Sobral, P. J. (2018). Formulation optimization of lecithin-enhanced pickering emulsions stabilized by chitosan nanoparticles for hesperidin encapsulation. *J. Food Eng.*, 229, 2-11.
- [15] Mwangi, W. W., Ho, K. W., Ooi, C. W., Tey, B. T., & Chan, E. S. (2016). Facile method for forming ionically cross-linked chitosan microcapsules from Pickering emulsion templates. *Food Hydrocoll.*, 55, 26-33.
- [16] Ribeiro, E. F., de Barros-Alexandrino, T. T., Assis, O. B. G., Junior, A. C., Quiles, A., Hernando, I., & Nicoletti, V. R. (2020). Chitosan and crosslinked chitosan nanoparticles: Synthesis, characterization and their role as Pickering emulsifiers. *Carbohydr. Polym.*, 250, 116878.
- [17] Calvo, P., Remunan-Lopez, C., Vila-Jato, J. L., & Alonso, M. J. (1997). Novel hydrophilic chitosan-polyethylene oxide nanoparticles as protein carriers. *J. Appl. Polym. Sci.*, 63(1), 125-132.
- [18] Shah, B. R., Li, Y., Jin, W., An, Y., He, L., Li, Z., ... & Li, B. (2016). Preparation and optimization of Pickering emulsion stabilized by chitosan-tripolyphosphate nanoparticles for curcumin encapsulation. *Food Hydrocoll.*, 52, 369-377.
- [19] Tan, Y., Xu, K., Niu, C., Liu, C., Li, Y., Wang, P., & Binks, B. P. (2014). Triglyceride-water emulsions stabilised by starch-based nanoparticles. *Food Hydrocoll.*, 36, 70-75.
- [20] Wen, C., Yuan, Q., Liang, H., & Vriesekoop, F. (2014). Preparation and stabilization of d-limonene Pickering emulsions by cellulose nanocrystals. *Carbohydr. Polym.*, 112, 695-700.
- [21] Xiao, J., Gonzalez, A. J. P., & Huang, Q. (2016). Kafirin nanoparticles-stabilized Pickering emulsions: Microstructure and rheological behavior. *Food Hydrocoll.*, 54, 30-39.
- [22] Yan, H., Chen, X., Song, H., Li, J., Feng, Y., Shi, Z., ... & Lin, Q. (2017). Synthesis of bacterial cellulose and bacterial cellulose nanocrystals for their applications in the stabilization of olive oil pickering emulsion. *Food Hydrocoll.*, 72, 127-135.
- [23] Khoshakhlagh, K., Koocheki, A., Mohebbi, M., & Allafchian, A. (2017). Development and characterization of electrosprayed Alyssum homolocarpum seed gum nanoparticles for encapsulation of d-limonene. *J. Colloid Interface Sci.*, 490, 562-575.
- [24] Karlberg, M., Thuresson, K., & Lindman, B. (2005). Hydrophobically modified ethyl (hydroxyethyl) cellulose as stabilizer and emulsifying agent in macroemulsions. *Colloids Surf, A Physicochem Eng Asp.*, 262(1-3), 158-167.
- [25] Li, J., Xu, X., Chen, Z., Wang, T., Lu, Z., Hu, W., & Wang, L. (2018). Zein/gum Arabic nanoparticle-stabilized Pickering emulsion with thymol as an antibacterial delivery system. *Carbohydr. Polym.*, 200, 416-426.

*Research Article***Investigating the effect of nanoparticle concentration and oil content on the physical stability of Pickering emulsion stabilized by chitosan nanoparticles****Fatemeh heidari dalfard¹, Aman mohammad ziaifarf^{2*}, Seid Mahdi Jafari^{3*}, Nicolas Anton⁴****1. PhD. student, Department of Food Materials and Process Design Engineering, Faculty of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.****2. Associate Professor, Department of Food Materials and Process Design Engineering, Faculty of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.****3. Professor, Department of Food Materials and Process Design Engineering, Faculty of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.****4. Associate Professor, Department of Nanomedicine, Faculty of Pharmacy, University of Strasbourg, Strasbourg, France****Abstract**

Recently, the preparation of Pickering emulsion has attracted particular attention due to its wide range of applications in various industries, including the food and pharmaceutical industries. The present study aimed to prepare a Pickering emulsion stabilized with Chitosan nanoparticles (CSNPs) and investigate the effect of nanoparticle concentration and oil content on physical stability. First, the nanoparticles were prepared by the ionic gelation technique. Then, morphology, particle size distribution, wettability, Fourier-transform infrared (FTIR) spectra of nanoparticles were determined. FSEM results revealed that the nanoparticles are predominantly spherical, with an average size of 69 ± 1 nm. Also, the results of the FTIR spectrum analysis and wettability confirmed the formation of nanoparticles. In the second stage, emulsions were prepared at different concentrations of CSNPs (0.45, 0.6, and 0.75% w/v) and ratio of oil to the aqueous phase (10, 20, and 30%). The results revealed that nanoparticle concentration and oil content had a significant effect on emulsion physical stability. In a fixed oil volume fraction, physical stability increases with the increase of nanoparticles' concentration. In contrast, the oil content showed different effects on the properties of emulsions prepared with different concentrations of nanoparticles.

Keywords: Chitosan nanoparticles, Pickering emulsion, Physical stability.

* Corresponding Author: Email: Smjafari@gau.ac.ir

* Corresponding Author: ziaifarf@gmail.com