

Research Article

Effect of ultrasonication on the stability and formation of nanoemulsions containing *Nigella sativa* L. seed oil

Masha Khorami¹, Mojtaba Nasr-Esfahani², Somayeh Rahimi^{3*}, Aazam Aarabi⁴

1. Ph.D. Student, Department of Food Science and Technology, Najafabad Branch, Islamic Azad University, Najafabad, Iran

2. Department of Chemistry, Najafabad Branch, Islamic Azad University, Najafabad, Iran

3. Assistant Professor, Department of Food Technology, Institute of Chemical Technologies, Iranian Research Organization for Science and Technology (IROST), Tehran, Iran

4. Department of Food Science and Technology, Najafabad Branch, Islamic Azad University, Najafabad, Iran

(Received 5 August 2023, Received in revised form 14 October 2023, Accepted 18 November 2023)

Introduction: Nowadays, the consumption of medicinal plants in different countries is increasing due to their proven effectiveness in scientific community and acceptability in most human societies. Owing to the increasing concern about the side effects of chemical drugs and the ineffectiveness of some of them in long term consumption, the use of natural compounds as an alternative or a complementary treatment has received increasing attention. *Nigella sativa* (black seed) is a common herbal medicine that renowned in traditional medicine because of its anti-cancer, antimicrobial, anti-inflammatory, and antioxidant activity. It has wide applications in Iran's food and pharmaceutical industries. The seeds of this plant contain large amounts of essential fatty acids such as linolenic acid, antioxidants and vitamins. However, hydrophobic essential oil of *N. sativa* with low bioavailability and sustainability properties is have not been fully usable. The nanoemulsion formulation methods are widely effective approach for increase performance of lipophilic compounds. The aim of this study was to develop black seed oil into nanoemulsions formulation via ultrasonication.

Materials and Methods: In the present study, the collected black seed dried in a dark place at room temperature. After this time, black seed was powdered by milling apparatus, and extracted with methanol by Soxhlet instrument. Methanol was separated from the extracted oil using a rotary evaporator. Then we used a sonicator with a nominal power output of 750 W and an operating frequency of 75 kHz to produce nanoemulsions of *N. sativa* essential oil. Sonication of samples was carried out in a temperature-controlled chamber at a constant temperature of 20 °C for 10 minutes. In this regard, the ultrasonic emulsification method was performed by different ratios of surfactant to emulsion (2, 4, 6 and 8 wt %), different non-ionic surfactants (Tween 80 and Tween 40) and different sonication times (5, 10 and 15 minutes). Finally, nanoemulsions stability, size, turbidity, morphology, and other characteristics were investigated.

Results and Discussion: Variance analysis of laser light scattering data showed the lowest particle size related to samples prepared with 2% and 4% concentration of Tween 40 surfactant during 15 minutes of sonication. The images of the electron microscopy also confirmed the results of measuring the size of droplets by particle size analyzer. The effect of storage temperature on the physical stability of optimum nanoemulsions showed that these nanoemulsions were completely stable at low temperature, but became unstable at high temperature due to the increase in droplet size. Furthermore, the oxidative studying (60 days) showed that the peroxide number and anisidine value increased slightly during the storage period, which indicates the presence of effective antioxidant compounds in honey and *Nigella sativa* L. seed oil (NSO), which prevents the oxidation of the oil. In this study, the nanoemulsion sample containing Tween 40 surfactant with SER 4% showed high antioxidant activity.

*Corresponding author: s.rahimi@irost.ir

Conclusion: Various physicochemical factors are effective on the preparation, physicochemical properties and stability of nanoemulsion particle size and affect their characteristics. In this research, it was shown that the type and concentration of surfactant and ultrasonic time have a significant effect on the mean particle size and polydispersity index (PDI) of nanoemulsions. It was also shown that ultrasonic waves have the ability to break droplets and reduce their size to the nano scale. Therefore, it is expected that the energy of these waves can be used in the production of food grade nanoemulsions and other products in which the size of the droplets has an important effect on the quality or shelf life.

Keywords: *Nanoemulsion* , *Nigella sativa L. seed oil*, *Tween*, *Sonication*, *Surfactant*

How to cite this article:

Khorami, M., Mojtaba Nasr-Esfahani, M., Rahimi, S., & Arabi, A., (2024). Effect of ultrasonication on the stability and formation of nanoemulsions containing *Nigella sativa L.* seed oil. *Innov. Food Technol.*, 11(2), 76-97. DOI: <http://dx.doi.org/10.22104/IFT.2024.6399.2149>

مقاله پژوهشی

بررسی تاثیر استفاده از امواج فراصوت بر تهیه و پایداری نانوامولسیون‌های روغن سیاه دانه

مهسا خرمی^۱، مجتبی نصر اصفهانی^۲، سمیه رحیمی^{۳*}، اعظم اعرابی^۴

۱. دانشجوی دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد نجف آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، نجف آباد، ایران

۲. گروه شیمی، واحد نجف آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، نجف آباد، ایران

۳. استادیار، گروه صنایع غذایی و تبدیلی، پژوهشکده فناوری های شیمیایی، سازمان پژوهش‌های علمی و صنعتی ایران، تهران، ایران

۴. گروه علوم و صنایع غذایی، واحد نجف آباد، دانشگاه آزاد اسلامی، نجف آباد، ایران

(تاریخ ارسال: ۱۴۰۲/۰۵/۱۴، تاریخ آخرین بازنگری: ۱۴۰۲/۰۷/۲۲، تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۸/۲۷)

چکیده

روغن سیاه دانه دارای خواص شناخته شده آنتی‌اکسیدانی، آنتی میکروبی، ضد درد، ضد التهاب و ضد سرطان می‌باشد. به دلیل حلالیت پایین در آب و دسترسی زیستی پایین آن، به منظور استفاده از این روغن در صنایع غذایی و نوشیدنی، سامانه‌های انتقال بر پایه نانوامولسیون پیشنهاد مناسبی می‌باشند. در این پژوهش، نانوامولسیون‌های حاوی روغن سیاه دانه با به کارگیری سورفاکتانت‌های غیر یونی مختلف (توئین ۸۰ و توئین ۴۰)، نسبت‌های مختلف سورفاکتانت به امولسیون (SER) و زمان‌های مختلف سونیکاسیون (۵، ۱۰ و ۱۵) به روش فراصوت تهیه و آزمون‌های تعیین اندازه و توزیع اندازه قطرات و کدورت انجام گرفت. تجزیه واریانس داده‌های پراکنش نور لیزر، کمترین اندازه ذرات را مربوط به نمونه‌های تهیه شده با غلظت ۲ و ۴٪ گرفت. سورفاکتانت توئین ۴۰ در مدت زمان سونیکاسیون ۱۵ min نشان داد. تصاویر میکروسکوپی نیز تأییدی بر نتایج به دست آمده از اندازه‌گیری اندازه قطره‌ها توسط دستگاه اندازه‌گیری ذرات در مقیاس نانو (کمتر از ۱۰۰ nm) بود. اثر دمایی نگهداری بر پایداری فیزیکی نانوامولسیون‌های بهینه نشان داد که این نانوامولسیون‌ها در دمایی پایین به خوبی پایدار بودند اما در دمایی بالا به دلیل افزایش اندازه قطرات (بالاتر از ۴۰۰ nm) دچار ناپایداری شدند. همچنین مطالعات اکسایشی نانوامولسیون‌های منتخب در طول ۶۰ روز نگهداری نشان داد عدد پراکسید و اندیس آنیزیدین طی دوره نگهداری به میزان کمی افزایش یافته که نشان‌دهنده حضور ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مؤثر در عسل و خود روغن سیاه دانه می‌باشد که مانع از اکسایش شدید روغن طی دوره نگهداری می‌شوند. در این پژوهش نمونه نانوامولسیونی حاوی سورفاکتانت توئین ۴۰ با SER ۴ در طول ۶۰ روز درصد قدرت آنتی‌اکسیدانی بالایی را (۰/۱۵ ± ۲/۳) از خود نشان داد.

واژه‌های کلیدی: نانوامولسیون، روغن سیاه دانه، توئین، امواج فراصوت، سورفاکتانت

۱. مقدمه

سکته قلبی و سرطان مؤثر می‌باشد [۴]. عسل و روغن سیاه دانه می‌توانند در فرمولاسیون غذاهای مختلف به علت وجود ترکیبات مغذی استفاده شوند. فرایند غنی‌سازی، وارد کردن یا اضافه کردن یک ترکیب غذا - دارو به مواد غذایی پیچیده است. این فرایند می‌تواند بر ویژگی‌های ترکیبی، فیزیکی شیمیایی و در نتیجه ماندگاری تأثیر بگذارد. اغلب، وارد کردن مستقیم ترکیب غذا - دارو به ماده غذایی ممکن نیست، به این دلیل که بسیاری از ترکیبات غذا - دارو به تجزیه شدن حساس هستند و یا نامحلول در آب بوده و یا ممکن است با ترکیبات دیگر مواد غذایی برهم کنش دهند. لذا وارد کردن ترکیب غذا - دارو به صورت موفقیت‌آمیز نیازمند به طراحی مناسب یک سیستم حامل بوده که اختصاصاً برای محصول هدف، طراحی شده باشد و از ترکیب غذا - دارو محافظت کند. سیستم‌های نانوحامل در مواد غذایی می‌توانند کربوهیدراتی، پروتئینی و لیپیدی باشند. انواع حامل های لیپیدی شامل نانوامولسیون‌ها، نانولیپوزوم‌ها، نانوذرات لیپیدی جامد^۱ و نسل جدیدی از سیستم‌های انکپسولاسیون یعنی حامل‌های لیپیدی نانو ساختار^۱ هستند. نانوامولسیون‌ها، سیستم‌های حامل بر پایه امولسیون بوده که اخیراً به علت پایداری فیزیکی بالا، فراوری ساده و دسترسی زیستی بالا مورد توجه قرار گرفته‌اند [۵]. نانوامولسیون‌ها حاوی قطرات نانو به ابعاد ۲۰ nm تا ۲۰۰ هستند. نانوامولسیون‌ها از لحاظ ظاهری می‌توانند کدر^۲، نیمه شفاف^۳، شفاف^۴ و یا دارای ظاهری شبیه به خامه^۵ بسته به اندازه ذرات باشند. هنگامی که اندازه ذرات آن‌ها به ۱۰۰ nm الی ۲۰۰ افزایش می‌یابد، یک کدورت قابل توجهی در محلول‌های نانوامولسیونی مشاهده می‌شود [۶]. به‌منظور تهیه یک نانوامولسیون، به ترکیباتی چون روغن، آب، پایدارکننده (امولسیفایر) / تعدیل کننده بافت^۱ و انرژی (فیزیکی شیمیایی یا مکانیکی) نیاز می‌باشد. روش‌های مختلفی برای تهیه نانوامولسیون‌ها وجود دارد که به‌طور کلی به دو روش کم‌انرژی^۷ و روش پرانرژی^۸ طبقه‌بندی می‌شوند. در روش‌های

مصرف گیاهان دارویی در کشورهای مختلف روز به روز در حال افزایش است و این به دلیل به اثبات رسیدن اثربخشی بسیاری از این مواد در مجامع علمی و مقبولیت آن در اکثر جوامع بشری است. به دلیل نگرانی روزافزون در مورد عوارض داروهای شیمیایی و بی‌اثر بودن تعدادی از آنها در مصرف طولانی مدت، استفاده از ترکیبات طبیعی به صورت جایگزین یا مکمل درمان، پیش از پیش مورد توجه قرار گرفته است. استفاده انسان از گیاهان به‌عنوان دارو از ابتدای تمدن بشری تاکنون ادامه دارد. داروهای گیاهی به‌عنوان درمان جایگزین با عوارض کمتر و خواص متعدد و در برخی موارد به‌عنوان تنها درمان مؤثر مورد استفاده قرار می‌گیرد. از جمله این گیاهان، گیاه سیاه دانه با نام علمی *Nigella sativa* از خانواده آلاله (*Ranunculales*) می‌باشد [۱]. با وجود این که مرکز اصلی پراکنش سیاه‌دانه اروپا بوده، اما پراکنش آن در آسیای میانه و مناطق کوهستانی غرب آسیا و شمال آفریقا نیز دیده می‌شود [۲]. این گیاه در بعضی نقاط ایران مانند کرمانشاه و اراک به صورت خودرو وجود داشته و در بعضی نقاط دیگر مانند اصفهان و خراسان به صورت زراعی کشت و کار می‌شود و مصارف گسترده‌ای در صنایع غذایی و دارویی کشور دارد. دانه‌های این گیاه حاوی مقادیر زیادی از اسیدهای چرب ضروری مانند لینولئیک اسید، آنتی‌اکسیدان و ویتامین‌ها می‌باشد [۳]. مطالعات فارماکولوژیک نشان می‌دهند سیاه‌دانه به دلیل داشتن ترکیبات زیست فعال گیاهی^۱ مانند پی-سیمن^۲، کارواکرول^۳، تیموکینون^۴، نایجلامین^۵، ۴-ترپینئول^۶ و تی‌انتول^۷ دارای اثرات ضد درد و ضدالتهابی، ضد میکروبی، ضدسرطانی، پایین آورندگی قند خون، آنتی‌اکسیدانی، دیورتیک و پایین آورندگی فشار خون می‌باشد [۱]. دانه‌های سیاه دانه تلخ مزه بوده و همراه با عسل مصرف می‌شوند [۱]. عسل یک فراورده طبیعی حاوی قندهای ساده، اسیدهای آمینه، رنگدانه‌ها، دانه‌های گرده^۸ و کس‌ها و دیگر ترکیبات زیست فعال گیاهی بوده که نقش مهمی در سلامت انسان ایفا می‌کند. مصرف عسل در افزایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تام پلاسما^۹ و کاهش احتمال

10. Solid lipid nanoparticles
11. Nanostructure lipid Carriers (NLC)
12. Turbid
13. Translucent
14. Transparent
15. Creamy optical appearance
16. Texture modifier
17. Low energy
18. High energy

1 Phytochemicals
2 P-cymene
3 Carvacrol
4. Thymoquinone
5. Nigellamine
6. 4-terpineol
7. T-anethole
8. Pollen grains
9. Total antioxidant status (TAS)

از طریق کاهش کشش بین سطحی ایفا می‌کند [۷]. امولسیفایرهای غذایی شامل سورفاکتانت‌های با وزن مولکولی کم، فسفولیپیدها، پروتئین‌های آمفیپاتیک و پلی‌ساکاریدهای آمفیپاتیک می‌باشند که در بین آنها سورفاکتانت‌های با وزن مولکولی کم، مؤثرترین امولسیفایر برای تشکیل نانوامولسیون می‌باشند [۸]. توئین‌ها به‌عنوان سورفاکتانت‌هایی غیر یونی با وزن مولکولی کوچک به میزان وسیعی جهت پایداری نانوامولسیون‌ها استفاده می‌شوند. آنها از طریق کاهش کشش بین سطحی و جذب سریع بر روی سطح قطرات روغن از تجمع و بهم آمیختگی قطرات جلوگیری می‌کنند. مطالعات نشان می‌دهند که در فرایند تهیه سیستم‌های نانوامولسیونی حاوی ترکیبات دارو- غذا، روش اولتراسونیکاسیون به‌عنوان یک روش کارآمد در مقایسه با دیگر روش‌های مکانیکی به‌دلیل تولید قطرات با اندازه کوچک، ظاهر شده است.

علاوه بر این، تحت شرایط یکسان، جهت تهیه نانوامولسیون با اندازه ذرات مطلوب، مقدار سورفاکتانت مصرفی در روش اولتراسونیکاسیون و به‌دنبال آن میزان انرژی مصرفی در مقایسه با دیگر دستگاه‌های مکانیکی کمتر می‌باشد [۶]. از آن جایی که روغن سیاه دانه دارای خواص شناخته‌شده آنتی‌اکسیدانی، آنتی‌میکروبی، ضد درد، ضدالتهاب، ضدسرطان و ... بوده اما استفاده از آن به‌عنوان یک ترکیب زیست فعال در انواع مواد غذایی و نوشیدنی‌ها، به خاطر حلالیت پایین در آب و دسترسی زیستی پایین آن، محدود شده است.

لذا هدف اصلی از این پژوهش ابتدا تولید نانوامولسیون روغن سیاه دانه به‌عنوان سیستم حامل با استفاده از روش سونیکاسیون با به‌کارگیری سورفاکتانت‌های مورد تأیید سازمان غذا و دارو^۴ (توئین ۴۰ و توئین ۸۰) بود در ادامه پس از تولید نانوامولسیون، به بررسی مهم‌ترین عوامل تأثیرگذار بر اندازه قطرات و نیز توزیع آنها پرداخته شد. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده نمونه‌هایی با بیشترین پایداری و کمترین اندازه ذره انتخاب شدند. با توجه به اهمیت تأثیر تغییر دما بر تولید و اندازه قطرات، تأثیر دما بر روی اندازه قطرات نمونه‌های منتخب بررسی شد. مطالعه وضعیت آنتی‌اکسیدانی نانو امولسیون‌های بهینه و وضعیت پایداری اکسایشی روغن نانوامولسون-های منتخب در طی نگهداری از بخش‌های دیگر این پژوهش بود.

پرانرژی از تجهیزات مکانیکی مانند هموژنایزر فشار بالا؛ میکروفلویدایزر^۲ و هموژنایزر فراصوت^۳ برای تهیه امولسیون استفاده می‌شود. در این میان، همگن‌سازهای فراصوت کارایی بالایی برای کاهش اندازه ذرات و در نتیجه پایداری نانوامولسیون دارند. امواج فراصوت با شدت بالا از طریق ظهور اثرات مکانیکی پدیده حفره‌زایی، یعنی ایجاد نیروهای برشی شدید و اعمال فشار و دما قادر به ایجاد تغییر در ویژگی‌های مواد تحت فرایند هستند [۱]. در سال‌های اخیر استفاده از امواج فراصوت در صنایع غذایی به‌عنوان یک روش آزمایش غیر مخرب بسیار مورد توجه قرار گرفته است؛ که استفاده از آن به‌دلیل کارایی، کوتاهی زمان فرایند و صرفه‌جویی در مصرف انرژی در صنایع غذایی رو به گسترش است. از جمله کاربردهای امواج فراصوت در صنایع غذایی هموژنیزاسیون، امولسیفیه کردن، تشخیص رسیدگی میوه‌ها، تأثیرگذاری روی فعالیت برخی آنزیم‌ها، تولید نانوامولسیون‌های غذایی، استخراج روغن‌های گیاهی، کیفیت‌سنجی میوه‌ها و سایر مواد غذایی، تعیین ترکیب‌های مواد غذایی و اندازه ذرات می‌باشد [۱]. با توجه به یافته‌های تحقیقاتی، کاربرد فراصوت به دو صورت با شدت بالا و با شدت پایین است. اولتراسوند با بسامد بالا و توان کم، در اندازه‌گیری ضخامت، تعیین ترکیبات متشکله، بررسی بافت و حالت فیزیکی مواد غذایی است و از امواج با بسامد پایین و توان بالا، به‌عنوان کمک فرایند در مواردی چون استخراج مواد، انجماد، خشک کردن، تولید نانوامولسیون می‌توان استفاده کرد [۶]. در نتیجه می‌توان گفت فراصوت به‌عنوان یک فناوری جدید می‌تواند در کنار سایر روش‌ها به‌طور غیر تخریبی در تعیین ویژگی‌ها و کیفیت مواد غذایی بکار رود. در پژوهشی نجفی و همکاران (۱۳۹۸) به ارزیابی ویژگی‌های فیزیکی و پایداری نانوامولسیون آب در روغن حاوی عصاره زعفران پرداختند که بدین منظور، نانوامولسیون‌های آب در روغن با استفاده از مخلوط اسپان ۸۰ و توئین ۸۰ به‌عنوان امولسیفایر در سه سطح ۱۰، ۱۲/۵ و ۱۵٪ و با کمک امواج فراصوت را تولید کردند. نتایج نشان داد که امولسیون حاوی ۱۵٪ امولسیفایر در مقایسه با سایر امولسیون‌ها همواره اندازه قطرات کمتری داشته و به دلیل پایداری فیزیکی بالا در طول مدت نگهداری تغییری از خود نشان نداده است [۷]. امولسیفایر نقش مهمی در سهولت تشکیل نانوامولسیون

4. Nigella sativa L. seed oil(NSO)

5. Food and Drug Administration (FDA)

1. High pressure homogenizer

2. Microfluidizer

3. Ultrasonic homogenizer

سپس به منظور تهیه نانوامولسیون از یک دستگاه مولد امواج فراصوت نوع پروب با فرکانس ۷۵ kHz، توان ۷۵۰ W و مدت زمان ۱۰ min به طور مداوم استفاده شد. از آنجایی که در طی اعمال امواج فراصوت دمای مخلوط به دلیل تولید انرژی افزایش می‌یافت لذا به منظور کنترل و تثبیت دما، از مخلوط آب و یخ در طول مدت صوت دهی استفاده و دما در محدوده ۲۵-۲۰ °C حفظ گردید.

۳.۲.۲ بررسی تأثیر نوع سورفاکتانت در تولید قطره‌های

ریز نانوامولسیونی

در این پژوهش برای بررسی اثر نوع سورفاکتانت بر روی تشکیل نانوامولسیون از دو نوع سورفاکتانت غیر یونی (توئین ۴۰ و توئین ۸۰) با نسبت‌های ۱:۰ و ۰:۱ استفاده شد.

۴.۲.۲ بررسی تأثیر غلظت سورفاکتانت در تولید قطره‌های

ریز نانوامولسیونی

اثر غلظت سورفاکتانت بر اندازه و توزیع اندازه قطرات نانوامولسیون با تهیه یکسری از امولسیون‌ها با ترکیب ثابت روغن (۱۵ g) اما با نسبت‌های متفاوت میزان سورفاکتانت به امولسیون (SER) بررسی شد [۹] (رابطه ۱).

$$\%SER = 100 \times \frac{M_s}{M_s + M_o + M_w} \quad (1)$$

در رابطه (۱) M_s مقدار سورفاکتانت مورد استفاده، M_w مقدار آب مورد استفاده و M_o مقدار فاز روغنی (۱۵ g)

در این روش، جهت بررسی اثر غلظت بر روی خصوصیات نانوامولسیون از چهار سطح SER (۲٪، ۴٪، ۶٪ و ۸٪) استفاده شد. برای تهیه فاز آبی، صمغ کربوکسی متیل سلولز (۱٪ وزنی/وزنی) با مقادیر مختلفی از آب مقطر با pH=6، گلیسرول (۱/۵٪ وزنی/حجمی)، عسل (۱/۵٪ وزنی/حجمی)، سیتریک اسید (۴/۰٪ وزنی/وزنی) و سدیم بنزوات (۱/۰٪ وزنی/وزنی) توسط همزن مغناطیسی به مدت یک دقیقه کاملاً مخلوط شدند.

۵.۲.۲ تأثیر مدت زمان امولسیفیکاسیون در تولید

قطره‌های ریز نانوامولسیونی

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲ مواد مورد استفاده

سیاه دانه ایرانی کاشت شده در شهر بافت از یک عطاری در اصفهان و ترکیبات فعال سطحی پلی اکسی اتیلن (۲۰) سوربیتان مونوالئات یا پلی سوربات ۸۰ با نام تجاری توئین ۸۰ و پلی اکسی اتیلن (۲۰) سوربیتان مونو پالمیتات یا پلی سوربات ۴۰ با نام تجاری توئین ۴۰ از شرکت Sigma Aldrich کشور آمریکا خریداری شد. متانول، گلیسرول، اسید سیتریک، سدیم بنزوات، اسید استیک، کلروفرم، اتانول و ایزواکتان از مجتمع صنایع شیمیایی دکتر مجللی در ایران، دی فنیل پیکریل هیدرازیل (DPPH)، یدید پتاسیم، نشاسته، تیوسولفات، پتاسیم هیدروکسید، پی آنیزیدین و سولفید سدیم از شرکت Merck کشور آلمان خریداری شد.

۲.۲ روش‌ها

۱.۲.۲ استخراج روغن از سیاه دانه

دانه‌های سیاه دانه پس از خریداری، بوجاری شده و در کیسه‌های پلاستیکی مقاوم نسبت به نفوذ هوا و رطوبت تا زمان آزمایش‌ها، در غیاب نور نگهداری شدند. برای استخراج روغن از دانه‌های سیاه دانه ابتدا دانه‌ها با استفاده از آسیاب پودر شده و سپس عمل استخراج با استفاده از دستگاه سوکسله ساخت شرکت Behr کشور آلمان توسط متانول (به‌عنوان حلال) انجام شد.

۲.۲.۲ آماده‌سازی نانوامولسیون‌ها

برای تهیه نانوامولسیون از روشی که قبلاً توسط Jin و همکاران (۲۰۱۸) گزارش شده بود، با تغییراتی جزئی استفاده شد. برای تهیه فاز آبی، روغن سیاه دانه با سورفاکتانت توسط همزن مغناطیسی در دمای آزمایشگاه (۲۵ °C) به مدت یک دقیقه در ۶۰۰ دور بر دقیقه بهم زده شد. برای تهیه فاز آبی، صمغ کربوکسی متیل سلولز با آب مقطر با pH=6، گلیسرول (به‌عنوان کمک حلال)، عسل (به‌عنوان شیرین‌کننده)، سیتریک اسید (جهت تنظیم pH) و سدیم بنزوات (به‌عنوان نگهدارنده) توسط همزن مغناطیسی و به مدت یک دقیقه کاملاً مخلوط شده و در مرحله بعد فاز آبی به فاز آبی اضافه شد.

نمونه‌های نانوامولسیون بهینه با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی مدل S-400 ساخت شرکت Hitachi کشور آلمان تصویربرداری شدند. مقدار کمی از نمونه به کمک چسب نقره بر روی یک استاب آلومینیومی گذاشته شده و سپس توسط یک لایه نازک از جنس طلا در دستگاه پوشش‌دهنده به مدت ۶ min جهت رسانا شدن قرار گرفتند. نمونه‌ها به اتاقک تحت خلأ منتقل گردیدند. شعاعی از الکترون‌های پر شتاب و با ولتاژ ۳۰ kV و بزرگنمایی ۲۰۰۰ برابر به نمونه‌ها تابیده شد و تصویر بر اساس شعاع الکترونی برگشتی از نمونه‌ها به دست آمد [۵].

۹.۲.۲ اندازه‌گیری پایداری فیزیکی و پایداری حرارتی

برای کاربردهای عملی پایدار باقی ماندن سیستم‌های حامل بر پایه امولسیون در زمان بهره‌برداری امری بسیار مهم است. پایداری بلند مدت نوشیدنی‌های نانوامولسیونی منتخب، با اندازه‌گیری تغییرات حاصل در میانگین اندازه قطرات نانوامولسیون‌ها و همچنین مشاهده وضعیت ظاهری آن‌ها در طی نگهداری در دمای آزمایشگاه (تقریباً دمای °C ۲۰) به مدت دو ماه بررسی شد. جهت اندازه‌گیری پایداری حرارتی، ۱۰ سی‌سی از نانوامولسیون را در لوله آزمایشگاهی ریخته شد و در معرض تیمارهای حرارتی مختلف شامل پاستوریزاسیون (°C ۶۳ به مدت ۳۰ min) و جوشیدن (°C ۹۵ به مدت ۱۰ min) قرار گرفت. سپس جهت پایش تأثیر حرارت روی نمونه‌ها، میزان توزیع اندازه ذرات و خاصیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها اندازه‌گیری شد [۱۲].

۱۰.۲.۲ تعیین پایداری ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های

نانوامولسیونی منتخب

فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های نانوامولسیونی منتخب با استفاده از روش مهار رادیکال ۱،۱-دی فنیل-۲-پیکریل هیدرازیل (DPPH) تعیین شد. حدود ۱ ml از هر نمونه در یک فلاسک حجمی (۱۰ ml) قرار داده شد و سپس ۵ ml محلول اتانول DPPH (۲۰۰ ml) اضافه شد. محلول‌ها در حمام آب در دمای °C ۲۵ انکوبه شدند و پس از ۳۰ min جذب مخلوط در ۵۱۷ nm با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر ماورا بنفش مدل UV 18000 ساخت شرکت Shimadzu کشور ژاپن اندازه‌گیری شد. نمودار درصد مهارکنندگی رادیکال آزاد در برابر غلظت

به‌منظور بررسی اثر مدت زمان امولسیفیکاسیون، پیش مخلوط امولسیونی با فرکانس ۷۵ KHz و توان ۷۵۰ W، در زمان‌های مختلف ۵، ۱۰ و ۱۵ امولسیفیه شده و نتایج با یکدیگر مقایسه شد.

۶.۲.۲ تعیین اندازه و توزیع اندازه ذرات

توزیع اندازه ذرات (PSD) تمامی نمونه‌های نانوامولسیونی، توسط دستگاه‌های تفرق نور دینامیک مدل Zetasizer Nano ساخت شرکت Malvern انگلستان یا تفرق نور استاتیک مدل Mastersizer 2000 ساخت شرکت Malvern انگلستان اندازه‌گیری شد. روش پراکندگی استاتیک نور لیزر، برای تعیین اندازه ذرات در نمونه‌های حاوی قطرات نسبتاً بزرگ ($d > 1 \mu\text{m}$) استفاده شد و اندازه ذرات برحسب عدد ساتر یا قطر سطح به وزن که با نماد d_{32} نشان داده می‌شود، گزارش شد. از طرف دیگر، روش پراکندگی دینامیک نور لیزر، برای آنالیز نمونه‌های نانوامولسیونی حاوی قطرات نسبتاً کوچک ($d < 1 \mu\text{m}$) استفاده گردید و اندازه ذرات به‌صورت Z-average diameter و polydispersity index (PDI) گزارش شد. شاخص بس پاشیدگی نانوامولسیون‌ها PDI به‌صورت تئوری در محدوده صفر تا یک قرار دارد و مقادیر کوچک‌تر از ۰/۲ نشان‌دهنده یک توزیع مونودیسپرس می‌باشد از طرف دیگر مقادیر بزرگتر از ۰/۷ بیانگر یک توزیع اندازه ذرات با پهنای وسیع است [۱۰].

۷.۲.۲ اندازه‌گیری کدورت

کدورت نمونه‌های نانوامولسیونی یک روز پس از تولید و چهارده روز پس از تولید اندازه‌گیری شد. جهت اندازه‌گیری کدورت نمونه‌های نوشیدنی، از روش ژانگ و رینکیوس (۲۰۱۶) استفاده شد. نمونه رقیق شده با آب دیونیزه به نسبت ۱:۲۰۰ بعد از هم زدن به سل دستگاه وارد و میزان کدورت نمونه‌ها با دستگاه توربیدومتر برحسب واحد NTU در طول موج ۴۵۵ نانومتر اندازه‌گیری شد [۱۱].

۸.۲.۲ مورفولوژی نانو امولسیون با استفاده از

میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)^۲

2. Scanning Electron Microscope

1. Nephelometric Turbidity Units

در رابطه (۳)، A_s جذب محلول قبل از واکنش با محلول پارا - آنیزیدین، A_b جذب محلول بعد از واکنش با محلول پارا - آنیزیدین و m جرم نمونه

ترکیب آنتی‌اکسیدانی به کمک نرم‌افزار اکسل ترسیم و شاخص IC50 محاسبه گردید. IC50 بیانگر غلظتی از آنتی‌اکسیدان است که قادر به مهار کردن ۵۰٪ رادیکال‌های آزاد است [۱۳].

۱۲.۲.۲ تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

تجزیه تحلیل آماری داده‌های به‌دست‌آمده از آزمون‌های مختلف در این پژوهش با استفاده از مقایسه میانگین آنوای یک‌طرفه در قالب طرح آزمایشی کاملاً تصادفی و با استفاده از آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵٪ و با استفاده از نرم‌افزار SPSS نسخه ۲۰ انجام شد. برای رسم نمودارها از نرم‌افزار اکسل نسخه ۲۰۱۳ استفاده شد. به‌منظور کاهش خطا کلیه آزمایش‌ها در سه تکرار انجام شد. در این پژوهش تأثیر نوع سورفاکتانت (توئین ۴۰ و توئین ۸۰)، غلظت سورفاکتانت (۲، ۴، ۶ و ۸٪) و مدت زمان امولسیفیکاسیون (۵، ۱۰ و ۱۵) روی اندازه ذرات نانومولسیون‌های روغن سیاه دانه ارزیابی گردید؛ سپس با توجه به‌اندازه ذرات، نمونه‌های نانومولسیونی منتخب دارای کمترین اندازه ذره انتخاب و آنالیز مورفولوژی سطحی نانوذرات، ارزیابی خاصیت آنتی‌اکسیدانی در طی نگهداری و اندازه‌گیری پایداری فیزیکی و حرارتی بررسی و در پایان وضعیت پایداری اکسایشی روغن نمونه‌های منتخب در طی نگهداری نیز مورد مطالعه قرار گرفت.

۳. نتایج و بحث

۱.۳ راندمان روغن سیاه دانه استحصالی

در این پژوهش بازده استخراج روغن سیاه‌دانه ۴۳/۲٪ محاسبه گردید. بازده استخراج روغن در اغلب دانه‌های سیاه‌دانه که تاکنون استخراج شده است بالای ۳۰٪ بوده است [۱۵]. در یک پژوهش، غربی و همکاران (۲۰۱۵) عملکرد روغن استخراجی از دانه‌های سیاه‌دانه به‌دست‌آمده از کشورهای مختلف را مورد بررسی قرار دادند که نشان داد مقدار روغن استخراجی بین ۲۳/۰ تا ۴۰/۰٪ متغیر بود. بیشترین میزان روغن استخراجی مربوط به سیاه‌دانه کشور ایران و کمترین روغن استخراجی مربوط به سیاه‌دانه کشور ترکیه بود [۱۶]. بازده استخراج روغن

۱۱.۲.۲ اندازه‌گیری شاخص‌های اکسیداتیو روغن نمونه‌های نانومولسیونی منتخب

برای استخراج روغن از نمونه‌های نانومولسیونی منتخب، حلال هگزان به نسبت ۱:۱ با نمونه نانومولسیونی ترکیب و به مدت ۳۰ min در ۷۰۰۰ جی سانتریفوژ شد. سپس فاز روغنی و حلال جداسازی شد و از تبخیرکننده چرخان برای حلال‌پرانی استفاده شد. اندازه‌گیری عدد پراکسید مطابق با روش AOCS به شماره Cd 8b-90 [۱۴] انجام شد. ۵ g نمونه روغن به ۳۰ ml محلول اسید استیک کلروفرم (نسبت حجمی ۳ به ۲) افزوده و مخلوط تا انحلال روغن در آن هم‌زده شد. پس از افزودن ۰/۵ ml محلول یدید پتاسیم اشباع‌شده و بعد از یک دقیقه نگهداری در مکان تاریک، ۳۰ ml آب مقطر به محلول فوق اضافه گردید. محلول به‌آرامی با تیوسولفات سدیم ۰/۰۱ نرمال تیتیر شد. بعد از زدوده شدن رنگ زرد، تقریباً ۰/۵ ml شناساگر نشاسته یک درصد اضافه و تیتراسیون تا از بین رفتن رنگ آبی ادامه یافت. عدد پراکسید روغن (میلی‌اکی والان پر اکسید در هر کیلوگرم روغن) مطابق با روش AOCS به شماره Cd 8-53 با استفاده از رابطه (۲) به دست آمد.

$$PV = \frac{S \times M \times 1000}{g} \quad (2)$$

در رابطه (۲)، S حجم تیوسولفات مصرفی برحسب میلی‌لیتر، M مولاریته سدیم تیوسولفات و g وزن روغن برحسب گرم عدد پارا - آنیزیدین مطابق روش AOCS به شماره Cd 18 - 90 اندازه‌گیری گردید. بدین منظور ۰/۵ g روغن در بالن ml ۲۵ به حجم رسانده سپس ۵ ml از این محلول با یک میلی‌لیتر از محلول ۰/۲۵٪ پارا - آنیزیدین در استیک اسید گلاسیال مخلوط شده و پس از گذشت ۱۰ min جذب آن در طول موج ۳۵۰ nm با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل UV-18000 ساخت شرکت Shimadzu کشور ژاپن خوانده شد. عدد پارا - آنیزیدین با استفاده از رابطه (۳) به دست آمد.

$$P - AV = \frac{(25 \times (1.2A_s - Ab))}{m} \quad (3)$$

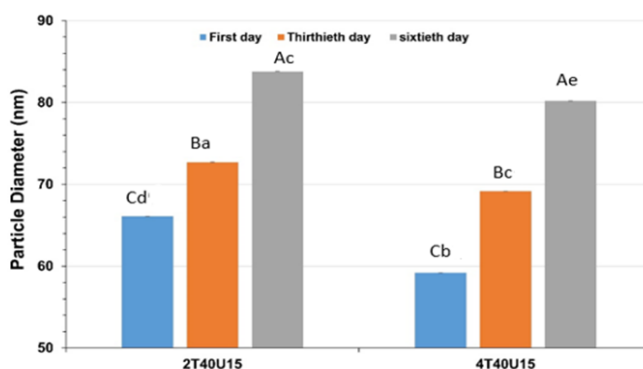
توزیع اندازه قطره‌ها وسیع و دوماه بود. با افزایش غلظت توئین ۸۰ در سیستم یعنی SER های ۴ و ۶٪ اندازه قطره‌ها کاهش یافت که تقریباً اندازه‌های مشابهی داشتند، با این تفاوت که توزیع اندازه قطرات در SER ۶٪ باریک‌تر بود. هر چقدر منحنی توزیع باریک‌تر و هم‌چنین تک مد باشد، یکنواختی در اندازه قطرات سیستم بالاتر می‌باشد. با افزایش غلظت سورفاکتانت تا ۸٪ اندازه قطره‌ها به بالاتر از ۲۰۰ nm در هفته دوم نگهداری رسید و منحنی توزیع اندازه قطرات گسترده‌تر اما تک مد بود (شکل ۱- A) و (شکل ۱- B). مطابق با نتایج حاصل‌شده، بهترین غلظت سورفاکتانت برای نانوامولسیون‌های روغن سیاه دانه - توئین ۸۰ تهیه‌شده با امواج اولتراسوند ۶٪ بود.

خام بستگی به روش استخراج و توانایی حلال برای استخراج ترکیبات لیپیدی دارد.

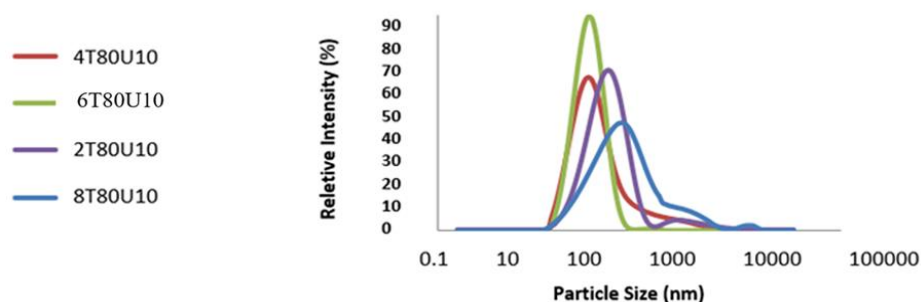
۲.۳ اثر غلظت سورفاکتانت بر اندازه و توزیع اندازه قطره‌ها

اثر غلظت سورفاکتانت بر اندازه ذرات نانوامولسیون با تهیه یک سری از امولسیون‌ها با ترکیب ثابت روغن (۱۵ g روغن سیاه دانه) و با استفاده از سورفاکتانت غیر یونی توئین ۸۰ اما با نسبت‌های متفاوت میزان سورفاکتانت به امولسیون (SER) بررسی شد. مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن در سطح ۵٪، اثر غلظت‌های مختلف سورفاکتانت بر اندازه قطره‌ها را معنی‌دار نشان داد. با وجود اینکه اندازه قطره‌ها در SER ۲٪ زیر ۲۰۰ nm بود ولی

(A)



(B)

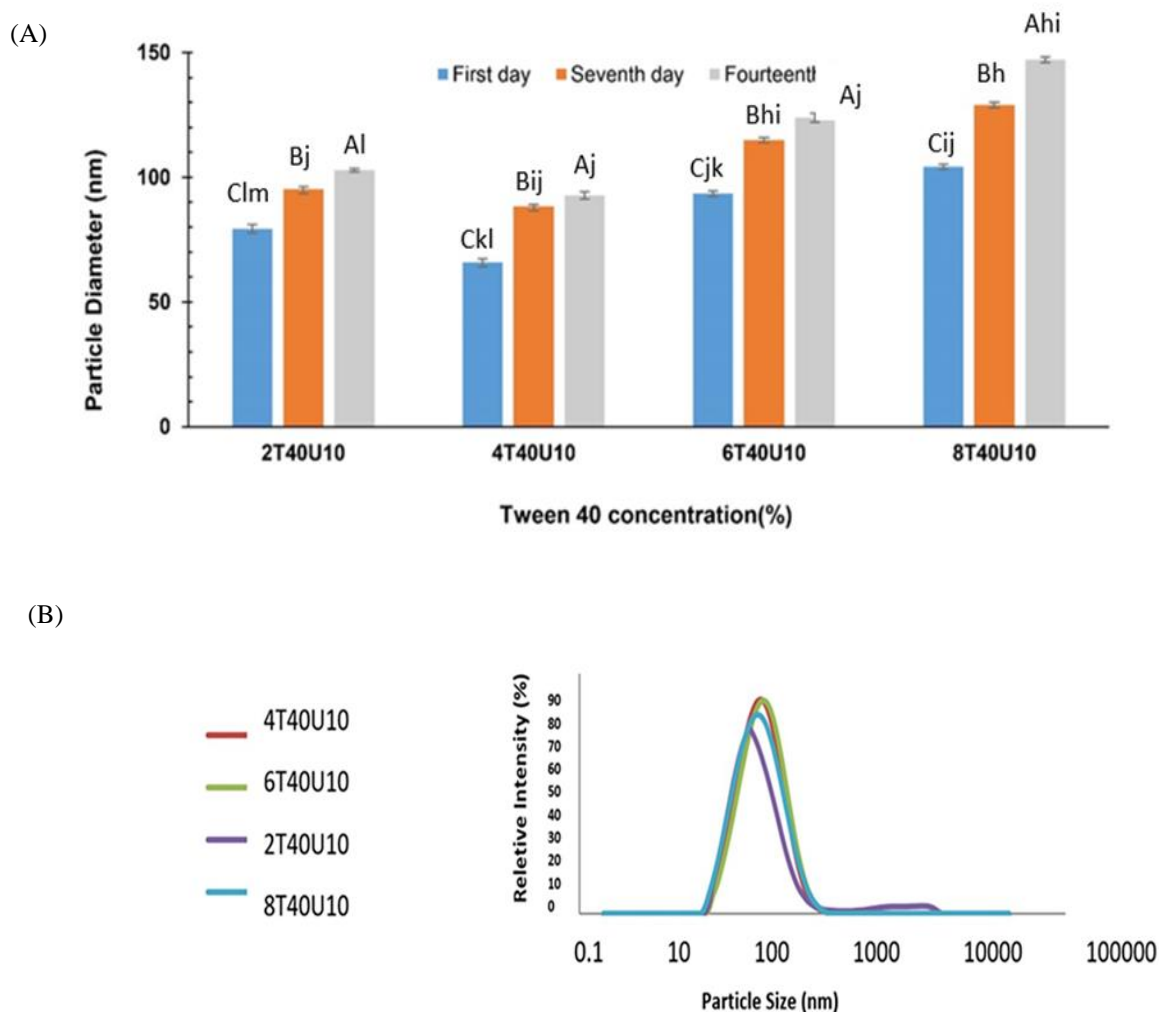


شکل (۱) تأثیر غلظت سورفاکتانت بر اندازه قطرات نانوامولسیون‌های حاوی روغن سیاه دانه - توئین ۸۰ (A) و تأثیر غلظت سورفاکتانت بر توزیع اندازه قطرات نانوامولسیون‌های حاوی روغن سیاه دانه - توئین ۸۰ (B)

Fig 1. Influence of surfactant concentration on the particle size of nanoemulsions containing *Nigella sativa* L. seed oil – Tween80 (A) , influence of surfactant concentration on the particle size distribution of nanoemulsions containing *Nigella sativa* L. seed oil – Tween80

سورفاکتانت در سیستم یعنی SER های ۶ و ۸٪ اندازه قطره‌های تولیدشده افزایش یافت و به بالاتر از ۱۰۰ nm رسید درحالی که توزیع اندازه قطرات تک مد بود (شکل ۲- A) و (شکل ۲- B). با توجه به نتایج حاصل، غلظت اپتیمم سورفاکتانت برای نانوامولسیون‌های روغن سیاه دانه - توئین ۴۰ تهیه‌شده با امواج اولتراسوند ۴٪ بود.

نتایج اثر غلظت سورفاکتانت غیر یونی توئین ۴۰ بر قطر قطرات نانوامولسیون در شکل (۲A-B) ارائه شده‌اند. مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن در سطح ۵٪، اثر غلظت‌های مختلف سورفاکتانت بر اندازه قطره‌ها را معنی‌دار نشان داد. در غلظت‌های پایین سورفاکتانت (SER ۲ و ۴٪) اندازه قطرات تقریباً زیر ۱۰۰ nm به دست آمد که تقریباً اندازه مشابهی داشتند و توزیع اندازه قطرات باریک و تک مد بود. با افزایش غلظت



شکل ۲) تأثیر غلظت سورفاکتانت بر اندازه قطرات نانوامولسیون‌های حاوی روغن سیاه دانه - توئین ۴۰ (A) و تأثیر غلظت سورفاکتانت بر توزیع اندازه قطرات نانوامولسیون‌های حاوی روغن سیاه دانه - توئین ۴۰ (B)

Fig 2. Influence of surfactant concentration on the particle size of nanoemulsions containing *Nigella sativa* L. seed oil - Tween40 (A), influence of surfactant concentration on the particle size distribution of nanoemulsions containing *Nigella sativa* L. seed oil - Tween40 (B)

برای تشکیل نانوامولسیون با قطرات بسیار ریز همواره نیاز به میزان بهینه‌ایی از سورفاکتانت وجود دارد که باید برای هر ترکیب سورفاکتانت - روغن - آب تعیین گردد [۱۷]. سونداری و همکاران (۲۰۱۸) نشان دادند غلظت و ترکیب سورفاکتانت

تأثیر زیادی بر اندازه ذرات و توزیع اندازه ذرات دارد [۱۸]. اگر غلظت سورفاکتانت در سیستم برای پوشاندن کامل لایه بین سطحی روغن - آب کم باشد، در هم آمیختن و تجمع قطره‌ها رخ می‌دهد. دلیل کاهش اندازه قطره‌ها با افزایش غلظت

سورفاکتانت را می‌توان در افزایش جذب مولکول‌های سورفاکتانت به سطح روغن - آب و در نتیجه کاهش بیشتر کشش سطحی بیان نمود [۹]. همچنین افزایش غلظت سورفاکتانت موجب می‌شود تا تعداد مولکول‌های بیشتری از سورفاکتانت از فاز روغنی به فاز آبی پخش شوند و تولید قطرات ریز امولسیون آسان‌تر گردد [۹]. با افزایش غلظت، سورفاکتانت‌ها می‌توانند چندین ساختار از جمله ساختار دولایه اطراف قطرات تشکیل دهند و قطرات را بپوشانند به این ترتیب فاصله قطرات از هم افزایش می‌یابد و از اثر نیروی جاذبه و اندروالس بین قطرات کاسته می‌شود [۶]. همچنین برای نزدیک شدن قطرات به یکدیگر، بایستی این ساختارهای سورفاکتانتی کنار رانده شوند. این ساختارهای سورفاکتانتی ساختارهای کریستال مایع هستند که با این مکانیسم سبب پایدار شدن امولسیون می‌شوند [۶]. لذا می‌توان گفت افزایش در غلظت سورفاکتانت سبب افزایش نسبت ضخامت فیلم سورفاکتانت به شعاع ذره می‌شود. فیلم سورفاکتانت نسبتاً ضخیم‌تر در مقابل تجمع، پایداری استریک بهتری داشته و سبب ناپایداری کمتری می‌شود. البته غلظت بالای سورفاکتانت زمانی که فرآورده نانوامولسیونی مصرف دارویی داشته باشد، ممکن است اثرات سمی در انسان ایجاد کند [۶]. در خصوص افزایش اندازه قطرات در غلظت بیشتر سورفاکتانت

دو دلیل محتمل است: در مورد اول ایجاد کریستال‌های مایع در مرز بین فاز روغن - آب بوده که شکست قطرات و پراکندگی آنها را با مشکل مواجه می‌کند. مورد دوم به دام افتادن مولکول‌های آب در اثر اتصال عرضی با زنجیره‌های سورفاکتانت‌ها بوده که نتیجه آن افزایش ویسکوزیته امولسیون و کاهش حرکت از دانه مولکول‌های سورفاکتانت می‌باشد [۱۸]. انتخاب امولسیفایر مناسب یکی از مهم‌ترین فاکتورها در طراحی فرمولاسیون نانوامولسیون است در این پژوهش نوع سورفاکتانت‌های غیر یونی استفاده شده تأثیر قابل توجهی روی متوسط قطر قطره‌ها و توزیع اندازه آن‌ها در سیستم‌های تشکیل شده داشت به طوری که توئین ۴۰ در مقایسه با توئین ۸۰ قطرات کوچک‌تری را تولید کرد. در این تحقیق از سورفاکتانت‌هایی با HLB تقریباً مشابه استفاده شد (جدول ۱) که نتایج، اختلاف معنی‌دار در اندازه قطرات هریک را نشان داد. به نظر می‌رسد اندازه قطرات تولیدی، تنها به مقدار عددی HLB مربوط نمی‌شود و عوامل دیگری نیز وجود دارد. احتمال می‌رود پایین‌تر بودن وزن مولکولی توئین ۴۰ نسبت به توئین ۸۰ باعث می‌شود که بتواند با سرعت بیشتری خود را به سطح قطرات کوچک روغن رسانده و مانع از بهم پیوستن و امتزاج آن‌ها بعد از تشکیل گردد. هر چقدر کارایی جذب بالاتر باشد، اندازه قطرات تولیدی ریزتر خواهد بود.

جدول (۱) ساختار شیمیایی و خصوصیات فیزیکی سورفاکتانت‌های غیر یونی مورد استفاده در تولید نانوامولسیون

Table 1. Chemical structure and physical properties of nonionic surfactants used in nanoemulsion production

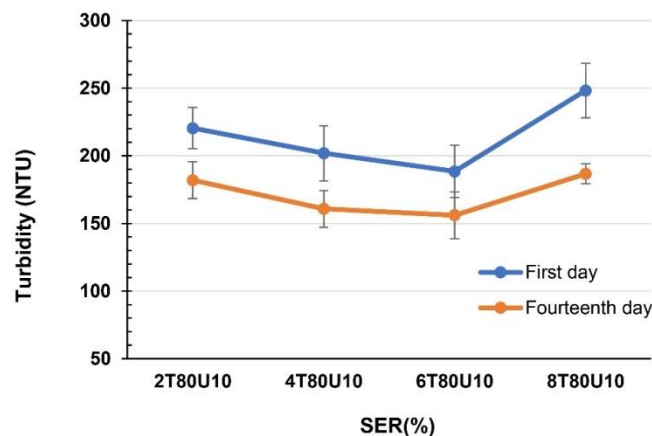
Ionic Surfactant	Molecular Formula	Chemical Name	HLB Value	Molecular Weight (g/mol)
Tween40	C62H122O26	Polyoxyethylene (20)sorbitan monopalmitate	15.6	1283.62
Tween80	C64H124O26	Polyoxyethylene (20) sorbitan monooleate	15	1309.65

۳.۳ بررسی تأثیر غلظت سورفاکتانت بر ویژگی‌های نوری و کدورت سیستم نانوامولسیون
 خصوصیات نوری سیستم‌های حامل جهت کاربرد آن‌ها در نوشیدنی‌ها از اهمیت خاصی برخوردار است. در بعضی مواقع، محصول نهایی می‌بایستی از لحاظ نوری شفاف و یا به میزان اندکی کدر باشد (مانند آب‌های غنی شده با ویتامین یا آب-میوه‌های شفاف). لذا می‌بایستی سعی شود افزودن هر نوع سیستم حامل سبب ایجاد یک ظاهر ابری مانند و یا کدر در

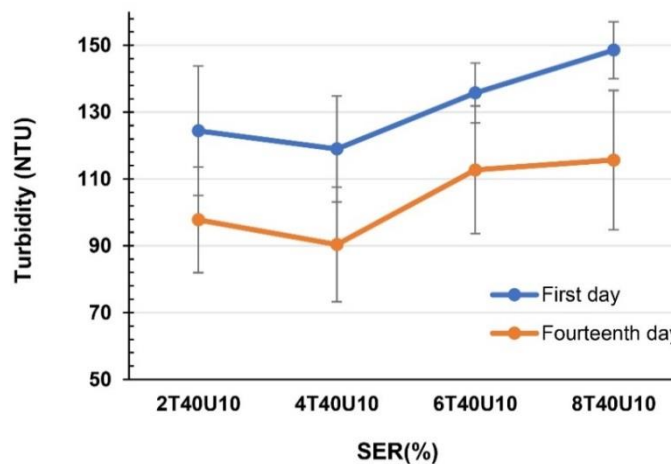
نوشیدنی نشود [۱۹]. نتایج مربوط به ویژگی‌های نوری سیستم‌های نانوامولسیونی تهیه شده به روش اولتراسوند با اندازه‌گیری جذب نور در طول موج ۴۵۵ nm تا ۴ تا ۴ سطح متفاوت مقدار سورفاکتانت (۲، ۴، ۶ و ۸٪) در شکل (۳) قسمت (A) و (B) نشان داده شده است. نتایج نشان داد که استفاده از غلظت‌های مختلف سورفاکتانت با اثر بر اندازه ذرات، کدورت سیستم را تغییر داده و این تغییرات از نظر آماری معنی‌دار می‌باشد. با افزایش غلظت توئین ۸۰ از ۲٪ به ۶٪، کدورت نانوامولسیون‌ها

کاهش یافته و با افزایش بیشتر غلظت سورفاکتانت در سیستم غلظت سورفاکتانت در سیستم یعنی SER های ۶ و ۸٪، کدورت نمونه‌ها کاهش و با زیاد شدن کدورت افزایش یافت. در نمونه‌های نانوامولسیونی با سورفاکتانت توئین ۴۰، با افزایش

(A)



(B)



شکل (۳) تأثیر غلظت سورفاکتانت بر روی کدورت نانوامولسیون‌های حاوی روغن سیاه دانه- توئین ۸۰ (A) و تأثیر غلظت سورفاکتانت بر روی کدورت نانوامولسیون‌های حاوی روغن سیاه دانه- توئین ۴۰ (B)

Fig.3. Influence of surfactant concentration on the turbidity of nanoemulsions containing *Nigella sativa* L. seed oil – Tween80 (A), influence of surfactant concentration on the turbidity of nanoemulsions containing *Nigella sativa* L. seed oil – Tween40 (B)

تغییرات در میزان کدورت را می‌توان به تفاوت‌های قابل توجه در اندازه قطرات نسبت داد. با افزایش اندازه قطرات کدورت افزایش می‌یابد زیرا قطرات بزرگ‌تر نور را به شدت بیشتری پراکنده می‌کنند که این امر منجر به کدورت بیشتر امولسیون می‌شود [۱۸]. با توجه به اینکه در طول مدت نگهداری، میانگین قطر ذرات افزایش داشت، لذا انتظار می‌رود با افزایش

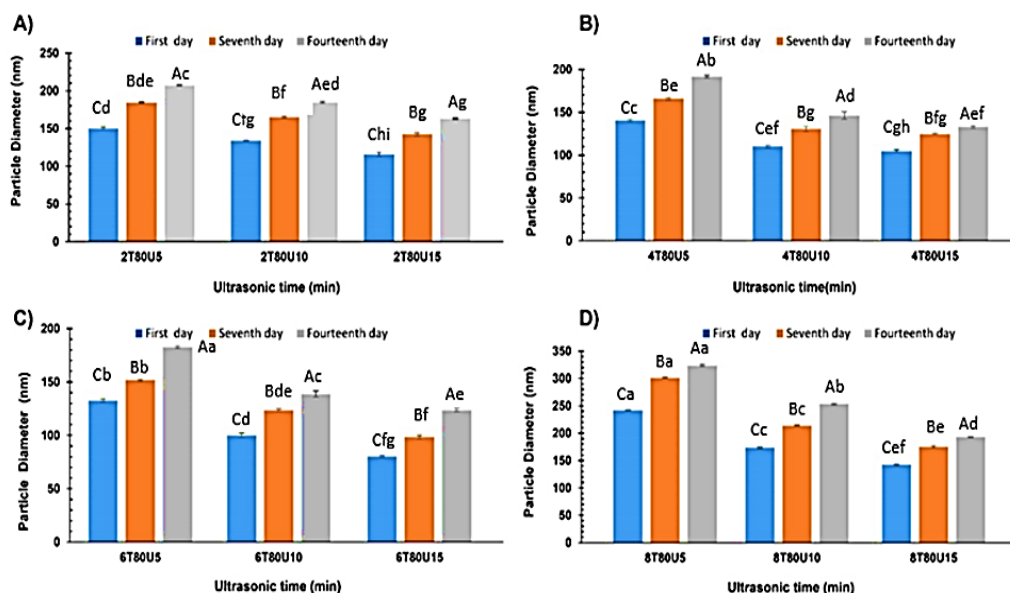
اندازه ذرات، پراکنش نوری افزایش یافته و در نتیجه میزان کدورت نمونه‌ها افزایش یابد اما بالعکس در طول مدت زمان نگهداری، کاهش در میزان کدورت مشاهده گردید که علت آن را افزایش شاخص خامه‌ایی شدن می‌توان دانست که با صعود ذرات به سطح نمونه‌ها، محلول باقی‌مانده شفاف‌تر خواهد بود. Walker و همکاران (۲۰۱۵) کاهش کدورت نمونه‌های

نانوامولسیون‌ها را بعد از ۱۴ روز نگهداری به کاهش تعداد قطرات چربی در طول نگهداری (احتمالاً به علت حلالیت) نسبت دادند [۲۰]. سونداری و تورسیلودی (۲۰۱۸) نیز نشان دادند که با گذشت زمان نگهداری به مدت ۸ هفته کدورت در نمونه‌های نانوامولسیون روغن در آب عصاره *Centella Asiatica* و *Zingiber Officinale* که به روش فراصوت و با استفاده از توئین ۸۵ تهیه شده است، کاهش یافته که این نتایج با نتایج به‌دست‌آمده از این تحقیق هم‌راستا می‌باشد [۱۸]. کدورت توسط مقادیر نور پخش‌شده توسط ذرات موجود در محیط سوسپانسیون تعیین می‌شود و به تعداد و اندازه ذرات موجود در فاز مایع، تفاوت در ضریب انعکاس ذرات و محیط سوسپانسیون و توزیع اندازه ذرات بستگی دارد [۲۱]. نمونه‌های نانوامولسیون‌ها تهیه‌شده به روش فراصوت در این پژوهش، دارای کدورت پایینی بوده که این مسئله را می‌توان به تأثیر قابل توجه کاپیتاسیون در اندازه قطره نانوامولسیون نسبت داد زیرا شکستن قطرات در هنگام فراصوت به میزان قابل توجهی بر کدورت تأثیر می‌گذارد [۲۱]. این نتایج با مطالعات قبلی

که نشان می‌دهد افزایش زمان هموژنیزاسیون یا میزان فشار بالاتر باعث کاهش اندازه کدورت در نمونه‌ها می‌شود، مطابقت دارد. طبق مطالعات انجام‌شده، زمانی یک نانوامولسیون شفاف می‌باشد که مقدار d_{32} ذرات کمتر از ۸۰ nm باشد و به‌علاوه توزیع قطر قطرات در آن باریک باشد. بالاتر از این مقدار سیستم نانوامولسیون شفافیت خود را از دست‌داده و حالت ابری مانند پیدا می‌کند. لذا می‌توان حالت ابری نمونه‌های نانوامولسیون را به d_{32} بالاتر از ۸۰ nm ذرات نسبت داد [۲۲].

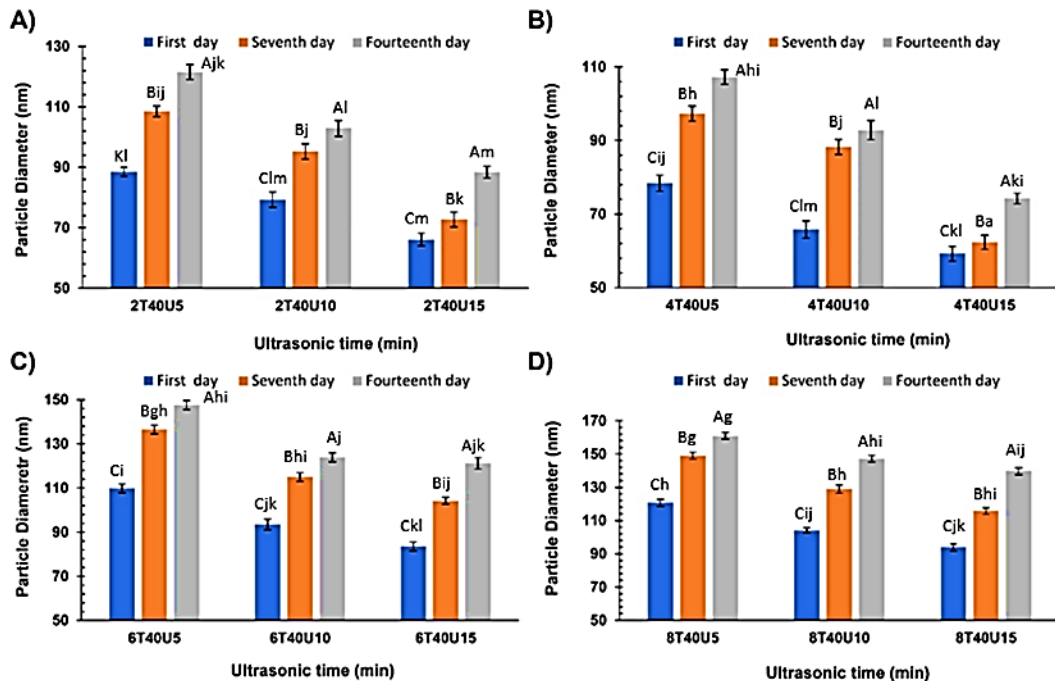
۴.۳ بررسی تأثیر مدت زمان امولسیفیکاسیون

برای بررسی تأثیر مدت زمان امولسیفیکاسیون، اندازه قطرات نانوامولسیون‌ها در زمان‌های ۵، ۱۰ و ۱۵ دقیقه اندازه‌گیری شد. نتایج مقایسه میانگین‌ها به روش دانکن در سطح ۵٪ نشان داد که تأثیر زمان‌های مختلف فراصوت بر اندازه قطره‌ها معنی‌دار بود.



شکل (۴) تأثیر مدت زمان سونیکاسیون بر روی اندازه قطرات نانوامولسیون‌های حاوی روغن سیاه‌دانه - توئین ۸۰

Fig 4. Influence of ultrasonic time on the particle size of nanoemulsions containing *Nigella sativa* L. seed oil – Tween80



شکل (۵) تأثیر مدت زمان سونیکاسیون بر روی اندازه قطرات نانو امولسیون‌های حاوی روغن سیاه دانه- توفین ۴۰

Fig 5. Influence of ultrasonic time on the particle size of nanoemulsions containing *Nigella sativa* L. seed oil – Tween40

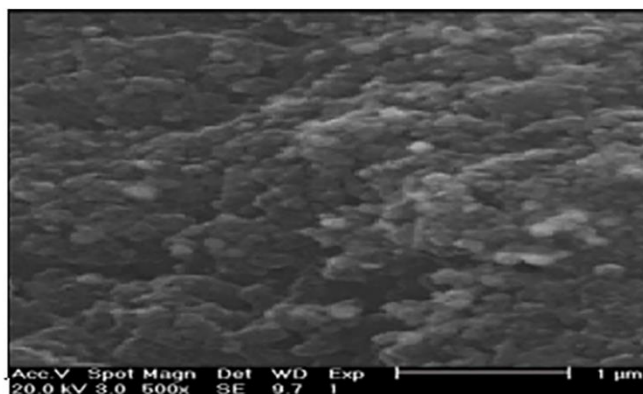
نتایج نشان داد که با افزایش زمان فراصوت از ۵ min به ۱۵، کاهش قابل توجهی در اندازه ذرات نانوامولسیون به دلیل افزایش ورودی انرژی برشی مخرب مشاهده شد (شکل ۴) و (شکل ۵). طبق نتایج به‌دست‌آمده، در طول ۱۰ min آغازین، اندازه ذرات نمونه‌ها به‌سرعت کاهش یافته و سپس با افزایش زمان به ۱۵ min روند نزولی اندازه ذرات با سرعت کمتری ادامه یافت. این نتایج با گزارش‌های Jin و همکارانش (۲۰۱۸) مطابقت دارد [۲۳]. در واقع می‌توان گفت نیروهای برشی هیدرودینامیکی شدید ایجاد شده توسط کایتاسیون‌های اولتراسونیک^۱ حاصل از قدرت آکوستیک بالا قادر به غلبه بر فشار لاپلاس^۲ می‌باشند. فشاری که خود از تغییر شکل قطرات، شکستن و تبدیل ذرات از مقیاس میکرو به نانو جلوگیری می‌کند. البته فشار لاپلاس به‌صورت تدریجی همزمان با افزایش زمان سونیکاسیون و به‌دنبال آن با کاهش اندازه ذرات، زیاد شده و بعد از ۱۰ دقیقه از سونیکاسیون تغییر در اندازه ذرات چشمگیر نمی‌باشد [۲۳].

۵.۳ مورفولوژی سطحی سیستم‌های نانوامولسیونی بهینه

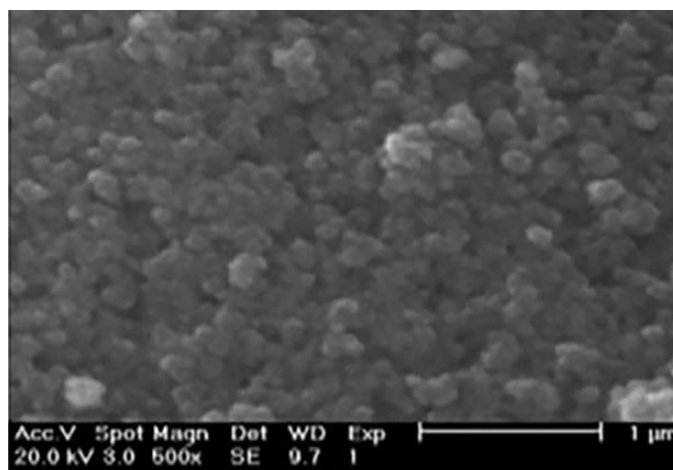
یکی از فاکتورهای بسیار مهم در تهیه سیستم‌های امولسیونی مسئله مورفولوژی سطحی آن‌ها می‌باشد. به‌طور کلی هرچه ساختار ذرات نانوامولسیون کروی‌تر و شکاف در سطح آنها کمتر باشد، بهتر است. این مزیت نشان می‌دهد پایداری نانوامولسیون بیشتر است [۲۴]. نتایج مربوط به تصاویر میکروسکوپ الکترونی روبشی نمونه‌های نانوامولسیونی با فرمولاسیون بهینه در شکل (۶) و شکل (۷) نشان داده شده است. با انجام آزمایش‌های قبلی و مطابق با نتایج به دست آمده، فرمولاسیون‌های ۴T۴۰U۱۵ و ۲T۴۰U۱۵ به‌عنوان فرمولاسیون‌های بهینه انتخاب شدند. همان‌طور که مشاهده می‌شود سیستم‌های نانوامولسیونی منتخب دارای اندازه کوچک با ساختار کروی همسان می‌باشند. تصاویر گرفته‌شده، قطره‌های کروی شکل، بدون رخ دادن تجمع و انبوهش و همچنین جدایی فاز، در اندازه نانو نشان دادند که تأییدی بر نتایج به‌دست‌آمده از دستگاه اندازه‌گیری ذرات بود. همان‌طور که در تصاویر نیز مشاهده می‌گردد نانوذرات به‌صورت تنها و متصل به هم در یک بستر شن مانند قرار دارند.

1. Ultrasonic cavitation

2. Laplace pressure



شکل (۶) تصویر میکروسکوپ الکترونی نانوامولسیون بهینه با فرمولاسیون ۲T۴۰ U۱۵
 Fig 6. Microscopic images of optimal nanoemulsion with formulation 2T40U15



شکل (۷) تصویر میکروسکوپ الکترونی نانوامولسیون بهینه با فرمولاسیون ۴T۴۰ U۱۵
 Fig 7. Microscopic images of optimal nanoemulsion with formulation 4T40U15

۶.۳ بررسی پایداری فیزیکی و حرارتی نانوامولسیون‌های

بهینه طی دوره نگهداری

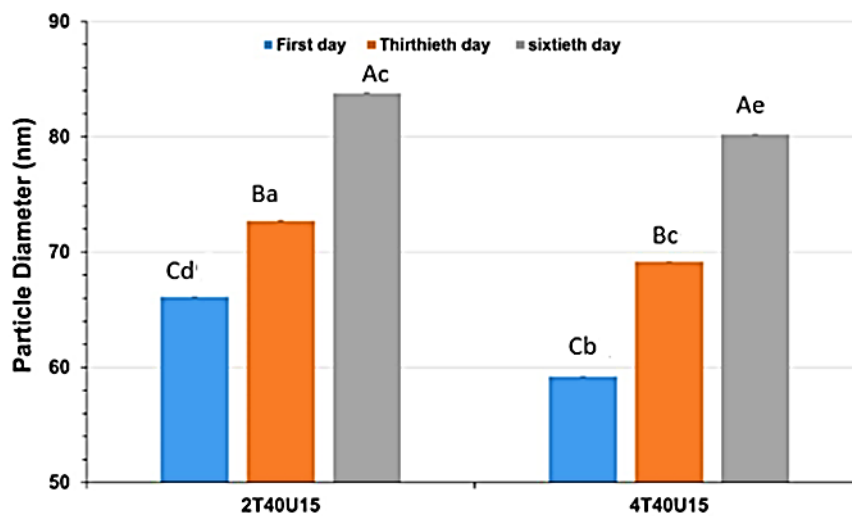
برای کاربردهای عملی پایدار ماندن سیستم‌های حامل بر پایه امولسیون در طول نگهداری و استفاده، بسیار مهم می‌باشد. بر این اساس لازم است پایداری نانوامولسیون‌ها در مقابل دمای محیط بررسی شود. مهم‌ترین روش برای پایدار کردن امولسیون‌ها، از طریق جذب سورفاکتانت در سطح بین ذرات و محیط دیسپرسیون و کاهش کشش بین سطحی است. پایداری سیستم‌های نانوامولسیون تولیدی در این تحقیق نسبت به تفکیک گرانشی را می‌توان به اندازه کوچک قطره‌ها نسبت داده شود، زیرا سرعت خامه بستن یک قطره لیپیدی با افزایش شعاع قطره افزایش می‌یابد. در رسیدگی استوالد،

مولکول‌های روغن از قطره‌های کوچک، از طریق فاز آبی به قطره‌های درشت‌تر انتشار می‌یابند به این ترتیب قطره‌های کوچک، کوچک‌تر و قطره‌های بزرگ، بزرگ‌تر می‌شوند و به تدریج در طول زمان، اندازه متوسط قطره‌ها در امولسیون یا نانوامولسیون افزایش می‌یابد. در عمل مهم‌ترین عاملی که پایداری نانوامولسیون به رسیدگی استوالد را تعیین می‌کند، حلالیت روغن در فاز آبی است [۲۵]. اگر نانوامولسیون با روغن‌هایی تولید شود که عمدتاً متشکل از تری‌آسیل‌گلیسرول‌های زنجیر کوتاه باشد، نسبت به رسیدگی استوالد مقاوم نخواهد بود. با انتشار مولکول‌های فاز پراکنده از قطره‌های ریز به درشت، به تدریج غلظت این ترکیبات درون قطره‌های ریز افزایش می‌یابد [۲۶]. خامه بستن یک قطره لیپیدی با افزایش

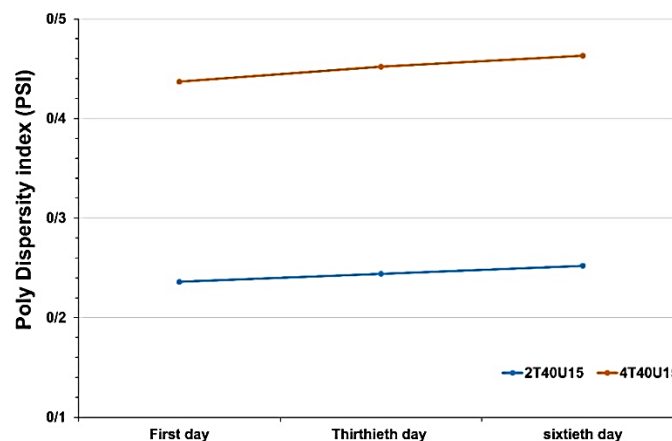
قطر قطره‌ها افزایش می‌یابد؛ بنابراین امولسیون‌های حاوی قطره‌های بزرگ‌تر سریع‌تر از آنهایی که حاوی قطره‌های کوچک‌تر هستند، خامه خواهند بست [۲۵]. علاوه بر اندازه قطرات، توزیع اندازه آن‌ها (شاخص پلی‌دیسپرسیتی) در سیستم‌های کلونیدی اهمیت ویژه‌ای در ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن‌ها دارد. ثابت ماندن این پارامتر در طول یک دوره زمانی طولانی، نشان‌دهنده پایداری سیستم است. نتایج بررسی پایداری بلند مدت نانومولسیون‌های بهینه تهیه شده با اندازه‌گیری تغییرات در اندازه قطره‌ها و شاخص پلی‌دیسپرسیتی و همچنین مشاهده وضعیت ظاهری آن‌ها در طی نگهداری در دمای آزمایشگاه (تقریباً ۲۰ درجه سانتیگراد) طی مدت دو ماه تغییر چشمگیری را در طی روزهای نگهداری نشان نداد و میزان افزایش کمی در اندازه قطرات و توزیع اندازه قطرات با گذشت زمان مشاهده شد که چشمگیر نبود شکل

(۸). عدم تغییرات چشمگیر در اندازه قطرات نشان‌دهنده این است که ذرات سورفاکتانت با نیروهای قوی جذب سطح قطرات شده‌اند. به علت حضور قطرات در اندازه نانومتری در نمونه‌های نانومولسیونی در این پژوهش، آن‌ها دارای پایداری خوبی هستند. چون کاهش اندازه قطرات اولاً موجب غلبه حرکت براونی بر نیروی گرانشی می‌شود و ثانیاً موجب افزایش گرانیروی می‌گردد و در نتیجه از دو مکانیسم ناپایدارکنندگی مهم یعنی تفکیک گرانشی و انبوهش جلوگیری می‌شود. نتایج تحقیقات پیشین نشان داده است که اسیدهای چرب لینولئیک، اولئیک و پالمیتیک در روغن حاصل از روش حلال از سیاه دانه ایرانی ۷۶٪ از اسیدهای چرب کل را تشکیل داده که منجر به پایداری نسبتاً زیاد این نانومولسیون‌ها به رسیدگی استوالد می‌شود.

(A)



(B)

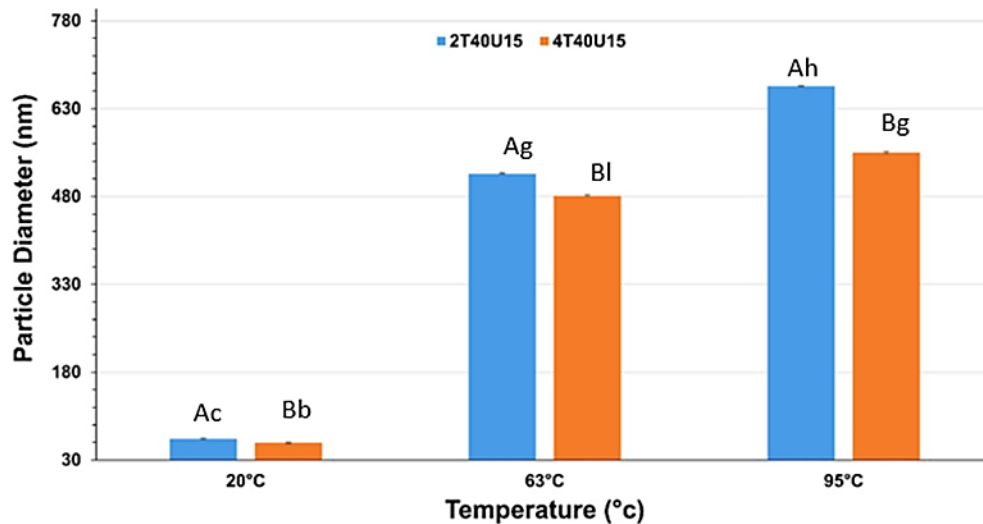


شکل ۸) تأثیر مدت زمان نگهداری بر اندازه ذرات نانوامولسیون‌های بهینه حاوی روغن سیاه دانه - توئین ۴۰ (A) و تأثیر مدت زمان نگهداری بر شاخص پلی دیسپرسیته نانوامولسیون‌های بهینه حاوی روغن سیاه دانه - توئین ۴۰ (B)

Fig 8. Effect of storage time on the particle size of optimal nanoemulsions containing *Nigella sativa* L. seed oil - Tween40 (A), effect of storage time on the poly dispersity index of optimal nanoemulsions containing *Nigella sativa* L. seed oil - Tween40

در این تحقیق، همچنین تأثیر فرآیندهای پاستوریزاسیون (°C) ۶۳ - ۳۰ min و جوشاندن (°C) ۹۵ - ۱۰ min بر پایداری نمونه‌های نانوامولسیونی بهینه مورد بررسی قرار گرفت. در دماهای °C ۶۳ و ۹۵، شاهد افزایش زیادی در متوسط اندازه قطرات بودیم (شکل ۹) که به صورت یک لایه در سطح نانوامولسیون‌ها قابل مشاهده بود. تجزیه شیمیایی یا هیدرولیز سورفاکتانت در دمای بالا ممکن است با کاهش اثربخشی سورفاکتانت، باعث ناپایداری شده باشد همچنین حرارت منجر به دهیدراسیون گروه‌های سر سورفاکتانت‌های غیر یونی شده که این امر سبب تغییرات در حلالیت و انحنا مطلوب آن‌ها می‌شود [۲۷]. نتایج افزایش اندازه ذرات با اعمال فرآیند حرارتی در این پژوهش با نتایج اسنوسی و همکاران (۲۰۲۰)

مطابقت دارد [۲۸]. اسنوسی و همکاران (۲۰۲۰) نشان دادند اعمال فرآیندهای استرلیزاسیون، پاستوریزاسیون و پاستوریزاسیون سریع بر روی نانو کپسول‌های کاتچین که به صورت نانوامولسیون‌های آب در روغن در آب بوده، منجر به افزایش اندازه ذرات شده که بیشترین افزایش اندازه مربوط به نمونه‌های تحت فرآیند استرلیزاسیون بود. تغییرات اندازه در روش پاستوریزاسیون و پاستوریزاسیون سریع قابل توجه نبود [۲۸]. در پژوهش دیگر اسمیریتی و همکاران (۲۰۱۶) فرمولاسیون امولسیونی حاوی روغن سیاه دانه را به مدت ۵ روز در معرض نور آفتاب قرار دادند و نتایج آنها نشان داد قرار گرفتن امولسیون‌ها در معرض نور آفتاب منجر به دستخوش تغییر در پایداری آن‌ها شد [۲۹].



شکل (۹) تأثیر دما بر اندازه ذرات نانوامولسیون‌های بهینه حاوی روغن سیاه دانه - توئین ۴۰

Fig 9. Effect of temperature on the particle size of optimal nanoemulsions containing *Nigella sativa* L. seed oil - Tween40

۷.۳ بررسی وضعیت آنتی‌اکسیدانی نانوامولسیون‌های بهینه طی نگهداری

آنتی‌اکسیدان‌های سنتزی به کرات از لحاظ سم‌شناسی مطالعه شده‌اند و در سال‌های اخیر استفاده از این نوع آنتی‌اکسیدان‌ها به دلیل تأثیرات جانبی منفی بر سلامتی به میزان زیادی محدود شده‌اند. لذا در سال‌های اخیر، تحقیق برای آنتی-اکسیدان‌های طبیعی جدیدتر، خصوصاً با منشأ گیاهی به علت اهمیت چنین مولکول‌هایی در فارماکولوژی، صنایع آرایشی و غذایی افزایش یافته است. اثرات آنتی‌اکسیدانی روغن‌های گیاهی نه تنها مرتبط با جلوگیری از ایجاد تغییر در عطر و طعم ماده غذایی بوده بلکه مانع ایجاد تغییرات بافتی در ماده غذایی نیز می‌شود [۲۳]. نتایج به دست آمده از روش DPPH برای نمونه‌های نانوامولسیونی بهینه در جدول (۴-۴) نشان داده شده است. IC50 (غلظتی از سوبسترا بر حسب میکروگرم بر میلی‌لیتر که برای احیای رادیکال DPPH به میزان ۵۰٪ اولیه نیاز است) IC50 کم‌تر نشان‌دهنده ظرفیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر می‌باشد. در آزمون مهارکنندگی رادیکال، نمونه‌ها از قدرت آنتی‌اکسیدانی بالایی برخوردار می‌باشند. در این پژوهش نمونه نانوامولسیونی حاوی سورفاکتانت توئین ۴۰ با ۴٪ SER قدرت آنتی‌اکسیدانی بالایی را از خود نشان داد. به طور کلی

بالا بودن قدرت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های نانوامولسیونی بهینه در این پژوهش را می‌توان به حضور ترکیباتی با خاصیت آنتی‌اکسیدانی در روغن سیاه دانه نسبت داد که از آن جمله می‌توان به ترکیبات تیموکوئینون، دی تیموکوئینون، تیموهیدروکوئینون و تیمول اشاره کرد. این ترکیبات دارای خاصیت جاروب‌کنندگی رادیکال‌های آزاد هستند و قابلیت مهار استرس‌های اکسیداتیو را دارا هستند. ترکیبات فنولی به سبب ویژگی آنتی‌اکسیدانی خود می‌توانند به طور مستقیم بر روی عدد پراکسید روغن مؤثر باشند. شواهدی وجود دارد که نشان می‌دهد ترکیبات فنولی می‌توانند تا ۳۰٪ پایداری روغن را بهبود بخشند. وارپته، نحوه استخراج روغن، شرایط فراوری و نگهداری فاکتور اساسی در میزان ترکیبات فنولی است [۳۰]. همچنین، در فرمولاسیون این نوشیدنی‌ها از عسل استفاده شده که حاوی ترکیبات فعال زیستی مختلف متشکل از اسیدهای فنولیک، فلاونوئیدها، آنتوسیانین‌ها و پروسیانیدین‌ها می‌باشد که دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بوده و لذا در بالا بودن قدرت آنتی‌اکسیدانی این نوشیدنی‌ها نقش به سزایی ایفا می‌کنند. لازم به ذکر است با گذشت زمان، قدرت آنتی‌اکسیدانی کاهش یافته که البته میزان کاهش چشمگیر نبوده و از لحاظ آماری معنی‌دار نمی‌باشد.

جدول (۲) تأثیر زمان نگهداری بر روی فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانوامولسیون‌های بهینه حاوی روغن سیاه دانه - توئین ۴۰

Table 2. Effect of storage time on antioxidant activity of optimal nanoemulsions containing *Nigella sativa* L. seed oil - Tween40

Samples	SER (%)	First Day	Thirtieth Day	Sixtieth Day
2T40U15	2	2.2±0.02 ^{Cb}	2.8±0.06 ^{Bb}	3.75±0.22 ^{Ab}
4T40U15	4	1.3±0.08 ^{Ca}	1.8±0.02 ^{Ba}	2.3±0.15 ^{Aa}

۸.۳ بررسی پایداری اکسایشی روغن نمونه‌های نانوامولسیون بهینه طی دوره نگهداری

نظارت بر پایداری اکسایشی نانوامولسیون‌ها در کاربردهای غذایی و دارویی به‌ویژه زمانی که اسیدهای چرب چند غیراشباعی حساس به اکسایش در آن‌ها استفاده می‌شود بسیار مهم است. اکسیداسیون لیپید در امولسیون‌ها معمولاً در ناحیه بین سطحی آب و روغن به علت واکنش رادیکال‌های آزاد با چربی‌های غیراشباع داخل قطرات اتفاق می‌افتد. سرعت اکسیداسیون لیپید در امولسیون‌ها به محل نسبی سوپستراهای لیپید (اسیدهای چرب غیراشباع) در سیستم بستگی دارد.

روش‌های به‌کاربرده در ارزیابی پایداری اکسایشی روغن سیاه دانه به این صورت است که بتواند تخمین صحیحی از پیشروی تخریب اکسیداتیو ارائه دهد. در این حالت، اندیس پراکسید به‌عنوان شاخص محصولات اولیه اکسیداسیون و نشان‌دهنده مراحل اولیه تغییرات اکسیداتیو و اندیس آنیزیدین جهت سنجش محصولات ثانویه اکسیداسیون به کار می‌رود [۳۱]. طبق نتایج ارائه‌شده در جدول (۴ و ۳) عدد پراکسید و اندیس آنیزیدین طی دوره نگهداری به میزان کمی افزایش یافته که نشان‌دهنده حضور ترکیبات آنتی‌اکسیدانی مؤثر در عسل و خود روغن سیاه دانه می‌باشد که مانع از اکسایش شدید روغن طی دوره نگهداری می‌شوند.

جدول (۳) تأثیر زمان نگهداری بر عدد پراکسید نانوامولسیون‌های بهینه حاوی روغن سیاه دانه - توئین ۴۰ (میلی اکی و آلان پراکسید بر کیلوگرم روغن)

Table 3. Effect of storage time on peroxide number of optimal nanoemulsions containing *Nigella sativa* L. seed oil - Tween40

Samples	SER (%)	First Day	Thirtieth Day	Sixtieth Day
2T40U15	2	2.78± 0.09 ^{Ca}	3.42±0.37 ^{Ba}	4.92±0.44 ^{Aa}
4T40U15	4	2.31±0.32 ^{Ca}	3.32±0.98 ^{Ba}	4.66±0.09 ^{Aa}

جدول (۴). تأثیر زمان نگهداری بر اندیس آنیزیدین نانوامولسیون‌های بهینه حاوی روغن سیاه دانه - توئین ۴۰

Table 4. Effect of storage time on anisidine value of optimal nanoemulsions containing *Nigella sativa* L. seed oil - Tween40

samples	SER (%)	First Day	Thirtieth Day	Sixtieth Day
2T40U15	2	1.09 ± 0.04 ^{Ca}	1.65±0.01 ^{Ba}	3.19±0.04 ^{Aa}
4T40U15	4	1.08±0.03 ^{Ca}	1.60±0.03 ^{Ba}	4.66±0.02 ^{Aa}

مطابق نتایج آنالیز میانگین ذرات، در طول مدت زمان نگهداری به علت حرکت براونی ذرات و تماس ذرات با یکدیگر میانگین قطر ذرات افزایش می‌یابد در نتیجه احتمالاً به دلیل ادغام ذرات، دسترسی رادیکال‌های آزاد به ذرات چربی، تسهیل شده و با گذشت زمان اندیس پراکسید افزایش می‌یابد. همچنین در مدت زمان نگهداری، به دلیل مصرف بیشتر ترکیبات مؤثر در

روغن سیاه دانه در مقابله با عوامل پرواکسیدانی و به دلیل تخریب ترکیبات آنتی‌اکسیدانی در طول نگهداری اثرشان از بین رفته و حتی این ترکیبات می‌توانند به‌عنوان پرواکسیدان عمل کنند در نتیجه میزان اندیس پراکسید در طول مدت زمان نگهداری افزایش می‌یابد. یکی دیگر از دلایل افزایش اندیس پراکسید این است که علی‌رغم اثرات مثبت

سورفاکتانت‌ها، خود سورفاکتانت‌ها می‌توانند سبب افزایش سرعت اکسیداسیون گردند، به عبارتی دیگر، گروه پلی اترها در ساختار سر سورفاکتانت توئین‌ها به آسانی اکسیده می‌شوند و هیدروپراکسیدها را تشکیل می‌دهند و همچنین وجود ناخالصی‌های همراه سورفاکتانت‌ها مانند فلزات واسطه و اسیدهای چرب آزاد می‌تواند سبب تسریع اکسیداسیون گردند. سورفاکتانت‌ها بر روی بسیاری از خصوصیات یک امولسیون مانند بار الکتریکی ذرات، ضخامت لایه بین سطحی و نفوذپذیری و به دنبال آن بر میزان دسترسی پرواکسیدانت‌ها، رادیکال‌های آزاد و اکسیژن به قطرات روغن تأثیرگذار می‌باشند. سورفاکتانت هم در اطراف قطرات چربی امولسیون و هم به‌عنوان میسل‌های سورفاکتانتی در فاز آبی در نتیجه استفاده از مقادیر بالای سورفاکتانت، حضور دارند. در این حالت، سورفاکتانت‌های غیر یونی حداقل ذرات باردار را تولید کرده لذا انتظار نمی‌رود که بتوانند تا حد زیادی بر اکسیداسیون لیبید تأثیرگذار باشند. سورفاکتانت در لایه بین سطحی می‌تواند یک مانع فیزیکی یا استریک بین پرواکسیدانت‌ها و فاز لیپیدی تشکیل دهد. اثربخشی لایه بین سطحی منوط به ضخامت آن بوده و ضخامت لایه نیز به گروه سر سورفاکتانت بستگی دارد. انتظار می‌رود که غلظت بالاتر سورفاکتانت، سرعت اکسیداسیون امولسیون‌ها را کاهش دهد [۲۰]. مطابق با نتایج ارائه شده با افزایش غلظت سورفاکتانت، اندیس پراکسید روند کاهشی نشان داد که می‌تواند مربوط به پوشش سطح ذرات چربی توسط سورفاکتانت‌ها، افزایش ضخامت لایه سورفاکتانت و محافظت از تماس مستقیم با عوامل پرواکسیدانی باشد. بلافاصله پس از تشکیل نانومولسیون‌ها میزان محصولات ثانویه افزایش چندانی ندارد. به نظر می‌رسد که علت عدم افزایش به این دلیل است که اکسایش یک فرایند وابسته به زمان بوده و برای تشکیل محصولات ثانویه نیاز به گذشت زمان است. یکی از دلایل افزایش محصولات ثانویه، به فرایند آماده‌سازی نانومولسیون‌ها نسبت داده می‌شود. استفاده از روش‌های پراثری موجب افزایش

تقریبی دما و در معرض قرار گرفتن اسیدهای چرب در دمای بالا شده که در تسریع اکسایش مؤثر است. به عبارتی شدت امواج فراصوت می‌تواند گونه‌های رادیکالی (H_2O_2) تولید کند که ممکن است موجب فعال‌سازی واکنش زنجیره‌ای اکسایش چربی شود. همچنین با توجه به اینکه در روش فراصوت، اندازه قطرات کوچک‌تر است، انتظار می‌رود به دلیل ناحیه سطحی بیشتر قطرات روغن، واکنش اکسایش بیشتر اتفاق افتاده و متعاقباً محصولات واکنش اکسایش بیشتر باشد [۲۰].

۴. نتیجه‌گیری

فاکتورهای فیزیکوشیمیایی مختلفی روی تهیه، خواص فیزیکوشیمیایی و پایداری قطره‌های نانومولسیون مؤثر بوده و ویژگی‌های آن‌ها را تحت تأثیر قرار می‌دهد. در این تحقیق نشان داده شد که نوع و غلظت سورفاکتانت و مدت زمان سونیکاسیون تأثیر قابل ملاحظه‌ای بر توزیع اندازه و قطر متوسط قطرات نانومولسیون دارند. همچنین نشان داده شد که امواج فراصوت توانایی شکستن قطرات و کاهش اندازه آن‌ها را تا مقیاس نانو دارند. از این رو انتظار می‌رود که بتوان از انرژی این امواج در تولید نانومولسیون‌های غذایی و سایر محصولاتی که در آنها اندازه ذرات تأثیر مهمی بر کیفیت و یا ماندگاری دارد، استفاده کرد.

تعارض منافع

هیچ‌گونه تعارض منافع توسط نویسندگان بیان نشده است.

تشکر و قدردانی

نگارندگان مقاله مراتب تشکر و سپاس خود را از گروه علوم و مهندسی صنایع غذایی دانشکده مواد دانشگاه نجف‌آباد به دلیل در اختیار قرار دادن امکانات لازم جهت انجام این پژوهش اعلام می‌دارند.

منابع

- [1] Periasamy, V. S., Athinarayanan, J., & Alshatwi, A. (2016). Anticancer activity of an ultrasonic nanoemulsion formulation of *Nigella sativa* L. essential oil on human breast cancer cells. *Ultrason. Sonochem.*, 31, 449-455. doi: 10.1016/j.ultsonch.2016.01.035
- [2] Birhanu, K., Yohannes, P., Feyissa, T., & Mohammed, S. (2015). Molecular diversity study of black cumin (*Nigella sativa* L.) from Ethiopia as revealed by inter simple sequence repeat (ISSR) markers. *Afr. J. Biotechnol.*, 14(18) 1543-1551. doi: 10.5897/AJB2015.14567
- [3] Makouie, S., Alizadeh, M., Maleki, O., & Khosrowshahi, A. (2020). Investigation of physicochemical properties and oxidative stability of encapsulated *Nigella sativa* seed oil. *Flavour Fragr. J.*, 36(2):233-42. doi: 10.1002/ffj.3638.
- [4] Zarei, M., Fazlara, A., & Tulabifard, N. (2019). Effect of thermal treatment on physicochemical and antioxidant properties of honey. *Heliyon.*, 5(6). doi: 10.1016/j.heliyon.2019.e01894
- [5] Razavi, R., Kenari, R. E., Farmani, J., & Jahanshahi, M. (2020). Fabrication of zein/alginate delivery system for nanofood model based on pumpkin. *Int. J. Biol. Macromol.*, 165:3123-3134. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.10.176
- [6] Manickam, S., Sivakumar, K., & Pang, Ch. H. (2020). Investigations on the generation of oil-in-water (O/W) nanoemulsions through the combination of ultrasound and microchannel. *Ultrason. Sonochem.*, 69. doi: 10.1016/j.ultsonch.2020.105258
- [7] Najafi, N., Nemati, M., Mohammadi, S., Thani, A. and Kadkhodai, R. 2019. Evaluation of physical properties and stability of water nanoemulsion in oil containing saffron extract. *Iranian Medicinal Plants Technology.* 2(2), 12- 24. doi: 10.22092/MPT.2020.126339.1040 (In Persian)
- [8] Komaiko, J. S., & McClements, D. J. (2016). Formation of food-grade nanoemulsions using low-energy preparation methods: A review of available methods. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, 15(2), 331-352. doi: 10.1111/1541-4337.12189
- [9] Saberi, A. H., Fang, Y., & McClements, D. J. (2013). Effect of glycerol on formation, stability, and properties of vitamin-E enriched nanoemulsions produced using spontaneous emulsification. *J. Colloid Interface Sci.*, 411, 105-13. doi: 10.1016/j.jcis.2013.08.041
- [10] Branco, I. G., Rinaldi, C., & Sen, K. (2020). Effect of sodium alginate and different types of oil on the physical properties of ultrasound-assisted nanoemulsions. *Chem. Eng. Process.*, 153. doi: 10.1016/j.cep.2020.107942
- [11] Zhang, J., & Reineccius, G. A. (2016). Factors controlling the turbidity of submicron emulsions stabilized by food biopolymers and natural surfactant. *LWT - Food Science and Technology.*, 71, 162-168. doi: 10.1016/j.lwt.2016.03.035
- [12] Sari, T. P., Mann, B., Kumar, R., Singh, R. R. B., Sharma, R., Bhardwaj, M., & Athira. (2015). Preparation and characterization of nanoemulsion encapsulating curcumin. *Food Hydrocolloid.*, 43, 540-546. doi: 10.1016/j.foodhyd.2014.07.011
- [13] Spizzirri, U.G., Caputo, P., Rossi, C.O., Crupi, P., Muraglia, M., Rago, V., Malivindi, R., Clodoveo, M.L., Restuccia, D., & Aiello, F. (2020). A Tara Gum/Olive Mill Wastewaters Phytochemicals Conjugate as a New Ingredient for the Formulation of an Antioxidant-Enriched Pudding. *Foods.*, 11(2), 158. doi: 10.3390/foods11020158
- [14] AOCS. (2017). Peroxide Value, Acetic Acid, Isooctane Method. In (Vol. Cd 8b-90, pp. 20). USA: The American Oil Chemists' Society
- [15] Matthau S, B., & ÖzCaN, M. M. (2011). Fatty acids, tocopherol, and sterol contents of some *Nigella* species seed oil. *Czech J. Food Sci.*, 29(2), 145-150. doi: 10.17221/206/2008-CJFS
- [16] Gharby, S., Harhar, H., Guillaume, D., Roudani, A., Boulbaroud, S., Ibrahimi, M., Ahmad, M., Sultana, Sh., Hadda, T.B., Chafchaoui-Moussaoui, I., & Charrouf, Z. (2015). Chemical investigation of *Nigella sativa* L. seed oil produced in Morocco. *J. Saudi Soc. Agric. Sci.*, 14(2), 172-177. doi: 10.1016/j.jssas.2013.12.001
- [17] Li, S., Zhang, B., Li, Ch., & Fu, X. (2020). Pickering emulsion gel stabilized by octenylsuccinate quinoa starch granule as lutein carrier: Role of the gel network. *Food Chem.*, 305. doi: 10.1016/j.foodchem.2019.125476
- [18] Sondari, D., & Tursiloadi, S. (2018). The effect of surfactant on formulation and stability of nanoemulsion using extract of *Centella Asiatica* and *Zingiber Officinale*. In: Proceedings of the 3rd Int. Cong. of Green Chem., 2049(1), 030014. doi: 10.1063/1.5082515
- [19] Mehmood, T., Ahmed, A., & Ahmed, Z. (2021). Food-Grade Nanoemulsions for the Effective Delivery

- of β -Carotene. *Langmuir.*, 37(10),3086-3092. doi: 10.1021/acs.langmuir.0c03399
- [20]Walker, R. M., Decker, E. A., & McClements, D. J. (2015). Physical and oxidative stability of fish oil nanoemulsions produced by spontaneous emulsification: Effect of surfactant concentration and particle size. *J. Food Eng.*,164,10-20. doi:10.1016/j.jfoodeng.2015.04.028
- [21]Hassanzadeh, H., Alizadeh, M., Hassanzadeh, R., & Ganbarzadeh, B.(2022). Garlic essential oil-based nanoemulsion carrier: Release and stability kinetics of volatile components. *Food Nutr Sci.*,10(5),1613-1625. doi: 10.1002/fsn3.2784
- [22]Lago, A. M. T., Neves, I.C.O., Oliviera, N.L., Botrel, D.A., Minim, L.A., Resende, J.V. (2019). Ultrasound-assisted oil-in-water nanoemulsion produced from *Pereskia aculeata* Miller mucilage. *Ultrason Sonochem.*, 50, 339-353. doi: 10.1016/j.ultsonch.2018.09.036
- [23]Jin, H., Wang, X., Chen, Z., Li, Y., Liu, Ch., & Xu, J. (2018).Fabrication of β -conglycinin-stabilized nanoemulsions via ultrasound process and influence of SDS and PEG 10000 co-emulsifiers on the physicochemical properties of nanoemulsions. *Int. Food Res. J.*, 106, 800-808. doi: 10.1016/j.foodres.2018.01.056
- [24]Onsaard, E., Putthanimoon, J., Singthong, J., & Tammarutwasik, P.(2018). Oxidation stability of sesame oil encapsulated by spray drying. *Int. Food Res. J.*, 25(2), 784-792.
- [25]McClements, D. J. (2015). Food emulsions: principles, practices, and techniques.(3th ed). CRC press
- [26]Ostertag, F., Weiss, J., & McClements, D. J.(2012).Low-energy formation of edible nanoemulsions: Factors influencing droplet size produced by emulsion phase inversion. *J. Colloid Interface Sci.*, 388(1), 95-102. doi: 10.1016/j.jcis.2012.07.089.
- [27]Guttoff, M., Saberi, A.M., & McClements, D. j. (2015). Formation of vitamin D nanoemulsion-based delivery systems by spontaneous emulsification:Factors affecting particle size and stability. *Food Chem.*, 171,117-122. doi: 10.1016/j.foodchem.2014.08.087
- [28]Snoussi, A.,& Chouaibi, M. (2020). Microencapsulation of catechin using water-in-oil-in-water double emulsions (W1/OW2): Study of release kinetics, rheological and thermodynamical properties. *J. Mol. Liq.*, 311,113304. doi:10.1016/j.molliq.2020.113304
- [29]Smrity, S.Z., Saifuddin, A.,& Sultana, S.(2016). Stability Analysis of Formulated Emulsion Containing Black Cumin (*Nigella sativa*) Oil. *Am. J. Biomed. Sci.*, 4(3), 49-53. doi::10.11648/j.ajbbs.20160403.15
- [30]Alwadei, M., Kazi, M.,& Alanazi, F.K.(2019). Novel oral dosage regimen based on self-nanoemulsifying drug delivery systems for codelivery of phytochemicals – Curcumin and thymoquinone. *Saudi J. Med. Pharm. Sci.*, 27(6) ,866-876. doi: 10.1016/j.jsps.2019.05.008
- [31]Ozdemir, N., Kantekin-Erdogan, M. N., Tat, T., & Tekin, A.(2018). Effect of Black Cumin Oil on the Oxidative Stability and Sensory Characteristics of Mayonnaise. *Food Sci. Technol. Int.*, 55 (4),1562-1568. doi: 10.1007/s13197-018-3075-4