



## حامل‌های لیپیدی نانوساختار حامل اسید لینولئیک کنژوگه و غنی سازی شیر کم چرب پاستوریزه با آن

فرین فرزادنیا<sup>۱</sup>، اکرم پزشکی نجف آبادی<sup>۲\*</sup>

۱. دانش آموخته کارشناسی ارشد، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد ممقان، دانشگاه آزاد اسلامی، ممقان، ایران

۲. استادیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشکده کشاورزی، دانشگاه تبریز

(تاریخ دریافت: ۹۶/۳/۱۱، تاریخ آخرین بازنگری: ۹۶/۷/۸، تاریخ پذیرش: ۹۶/۸/۲۱)

### چکیده

درون پوشانی اسیدهای چرب ضروری در انواع نانوحامل، روشی مؤثر در بهبود کارایی بیولوژیکی آن‌ها و تحویل کنترل شده در مقدار و مکان معین است. در این مطالعه به تولید حامل‌های لیپیدی نانوساختار حامل اسید لینولئیک کنژوگه (CLA) با استفاده از روش هموژنیزاسیون گرم- نیروی برشی بالا، با فرمولاسیون بر پایه ۳٪ (w/v) سورفاکتانت (پلوکسامر ۴۰۷) و نسبت ۱۰ به ۱ کره کاکائو (فاز لیپید) به روغن مایع (CLA) و در ادامه غنی سازی شیر کم چرب پاستوریزه با آن پرداخته شده است. آزمون‌های اندازه ذرات، مورفولوژی، تعیین میزان کدورت، پتانسیل زتا در طی مدت نگهداری، پایداری اندازه ذرات و پایداری اکسیداتیو نمونه‌ها و در ادامه غنی سازی انجام شد. نانو ذرات حاصله دارای اندازه قطرات ۸۱ nm با توزیع پراکندگی ۰/۸۳ یک روز پس از تولید بود. تصاویر به دست آمده از میکروسکوپ الکترونی روبشی، تأییدی بر اندازه ذرات به دست آمده از دستگاه اندازه گیری ذرات بود. سیستم حامل لیپیدی نانوساختار حاوی اسید لینولئیک کنژوگه حاصله شفاف و بدون کدورت بوده و اندازه ذرات در طی مدت زمان نگهداری (۶۰ روزه) در مقیاس نانو بود و اندازه ذرات سیستم پایدار بود. مقدار پتانسیل زتای نمونه‌ها خیلی جزئی و نزدیک صفر به دست آمد. نتایج حاصل از پایداری اکسیداتیو نشان داد با درون پوشانی CLA در سیستم نانوحامل لیپیدی محافظت این ترکیب در برابر اکسیداسیون بیش تر و تولید محصولات ثانویه اکسیداسیون (مالون آلدهیدها) کم تر بود ( $p < 0.05$ ). نتایج غنی سازی شیر کم چرب با نانوحامل حاوی CLA نشان داد استفاده از این نانوحامل بر روی پایداری و حفظ CLA در برابر فرایند حرارتی (پاستوریزاسیون) اثرگذار است و CLA طی مدت نگهداری به میزان ۳/۹٪ اسیدهای چرب شیر حفظ شد. با توجه به نتایج به دست آمده می توان از سیستم نانوحامل لیپیدی در محافظت بیش تر CLA در برابر اکسیداسیون، حرارت دهی و سایر فرایندها جهت غنی سازی محصولات کم چرب با این ترکیب استفاده کرد.

واژه‌های کلیدی: حامل لیپیدی نانوساختار، اسید لینولئیک کنژوگه، درون پوشانی، غنی سازی.

## ۱. مقدمه

هیسپرتین [۱۱]، لوتین [۱۲]، کوئرستین [۱۳]، ویتامین A پالمیتات [۱۴] و اسید لینولئیک کنژوگه (CLA) [۱۵]، در ساختارهای NLC با کارایی درون‌پوشانی بیش‌تر از ۹۰٪ در تمام فرمولاسیون‌ها، اشاره کرد.

شیر و فراورده‌های لبنی حاصل از آن، مهم‌ترین منابع غذایی مورد استفاده در تغذیه هستند که احتیاجات انرژی و پروتئین با کیفیت بالا و انواع ویتامین‌ها و مواد معدنی را برآورد می‌کنند. چربی شیر حاوی چندین ترکیب بیولوژیکی ویژه است که نقش موثر آن‌ها به‌عنوان عوامل ضدسرطان شناخته شده است. یکی از این ترکیبات، CLA است و فراورده‌های مختلف لبنی منبع عمده این ترکیبات بوده و عمدتاً در رژیم غذایی انسان گنجانده می‌شود. اثرات مفید CLA شامل ضد سرطان بودن آن، ضد تصلب شرایین، ضد دیابت نوع دوم، افزایش دهنده عملکرد سیستم ایمنی و جلوگیری از پوکی استخوان است [۱۶]. این ترکیب، به تازگی به علت اثرات متعددی مانند اثر بر ترکیب بدن و کاهش بافت چربی و اثرات ضد سرطانی که دارد علاقه علمی زیادی را به خود جلب کرده است.

ولی با توجه به این‌که به تازگی محورهای تحقیقاتی بر روی تغییر محتوای چربی شیر و تغییرات ترکیبات با ارزش تغذیه‌ای متمرکز شده است و با توجه به حساسیت ترکیبات شیر (اسیدهای چرب آزاد، ویتامین‌ها و ترکیبات عملگر) به اکسیداسیون و شرایط محیطی و فرایند حین تولید مانند پاستوریزاسیون و حساسیت زیاد CLA به اکسیداسیون، نور و حرارت و هم‌چنین به خاطر دارا بودن ساختار شیمیایی غیراشباع و به منظور جبران کمبودهای ناشی از دریافت آن در مواد غذایی و شیر کم‌چرب نیاز به غنی‌سازی شیر با ترکیبات مغذی از جمله CLA و هم‌چنین استفاده از درون‌پوشانی این ترکیبات در غنی‌سازی شیر با آن است.

هدف این تحقیق، تولید فرمولاسیون بهینه از حامل‌های لیپیدی نانو ساختار حاوی CLA و بررسی ویژگی‌های شیمیایی آن در انتقال، رهايش و قابلیت حفاظت‌کنندگی از CLA است تا در نهایت بتوان با استفاده از آن به غنی‌سازی شیر کم‌چرب پاستوریزه پرداخت.

با کاهش میزان چربی در رژیم غذایی، بسیاری از مواد مغذی مورد نیاز بدن مانند انواع ویتامین‌های محلول در چربی، آنتی-اکسیدان‌ها و اسیدهای چرب چند غیراشباعی دچار کمبود می‌شود. حلالیت بسیار پایین ترکیبات غذا- دارو (نوتریسیتیکال<sup>۱</sup>) آبگریز در محیط‌های آبی و انواع نوشیدنی‌ها و ناپایداری آن‌ها در حضور عوامل اکسید کننده، فلزات سنگین و ترکیبات تولید کننده رادیکال آزاد و هم‌چنین نور مشکلی در غنی‌سازی مواد غذایی با این گروه ترکیبات ضروری برای بدن است. در سال‌های اخیر، کاربرد نانو ذرات جهت محافظت و انتقال ترکیبات محلول در چربی بیش‌تر مورد توجه واقع شده و استفاده از نانو تکنولوژی راهکاری مفید در غنی‌سازی مواد غذایی است و می‌توان با استفاده از فناوری نانو قابلیت پخش‌پذیری و پایداری ترکیبات آبگریز را با وارد کردن آن‌ها در نانو حامل‌های کلوئیدی بهبود بخشید [۱، ۲] و درون‌پوشانی<sup>۲</sup> می‌تواند روشی مؤثر بر بهبود کارایی بیولوژیکی آن‌ها باشد. یکی از متداول‌ترین نانوحامل‌های بر پایه لیپیدی در صنایع غذایی، حامل‌های لیپیدی نانو ساختار (NLC)<sup>۳</sup> است [۵-۳]. این ساختارها متشکل از فاز لیپیدی جامد، فاز لیپیدی مایع، عامل فعال سطحی (امولسیفایر) و آب می‌باشند که در آن پوشش لیپیدی جامد، لیپید مایع را در بر می‌گیرد [۵]. ساختار حامل‌های لیپیدی نانو ساختار از مزایای منحصر به فرد و ویژه‌ای برای درون‌پوشانی ترکیبات چربی‌دوست از جمله بازده و کارایی بالا در درون‌پوشانی، پایداری بالاتر در برابر تفکیک گرانشی به علت بالاتر بودن چگالی ذرات، سرعت رهايش پایین [۶] عدم استفاده از حلال‌های آلی در تهیه آن‌ها، وجود غلظت-های بالا از ترکیبات عملگر در هر ذره و امکان تولید استریلیزاسیون آن‌ها در مقیاس‌های بزرگ صنعتی برخوردار هستند [۷، ۸]. در سال‌های اخیر، تحقیقات متعددی برای توسعه کاربرد حامل‌های لیپیدی نانو ساختار در غنی‌سازی مواد غذایی با ویتامین‌ها و ترکیبات نوتریسیتیکال صورت گرفته است. در این زمینه می‌توان به تولید حامل‌های لیپیدی نانو ساختار حاوی ویتامین D3 [۹] نانوحامل‌های حاوی بتاکاروتن با استفاده از روغن اسکوالن و روغن هسته انگور [۱۰]، درون‌پوشانی

1. Nutricetical
2. Encapsulation
3. Nano Lipid Carrier



## ۲. مواد و روش‌ها

### ۱.۲. مواد مورد استفاده

آب دوار تقطیر، اسید لینولئیک کنژوگه با خلوص نزدیک ۸۰٪ مخلوطی از ایزومرهای ۹-سیس ۱۱-ترانس و ۱۰-ترانس ۱۲، سیس، محصول شرکت داروسازی زهراوی تهران، شیر پاستوریزه کم چرب (کم‌تر از ۰/۶ درصد چربی)، شرکت سهامی پگاه تبریز- ایران، کره کاکائو به‌عنوان لیپید جامد، سورفاکتانت هیدروفیل غیر یونی پلوکسامر ۴۰۷ از شرکت سیگما ساخت کشور آلمان و کلیه مواد شیمیایی جهت انجام آزمایشات از شرکت مرک ساخت کشور آلمان با درجه خلوص تجزیه‌ای تهیه شدند.

### ۲.۲. روش‌ها

**۱.۲.۲. روش تهیه حامل لیپیدی نانوساختار (NLC) حاوی CLA**  
تهیه NLC‌های حاوی CLA به روش هموژنیزاسیون داغ با نیروی برشی بالا (Hot-HSH) صورت پذیرفت [۷]. ابتدا فاز روغنی، شامل کره کاکائو و CLA، در مقادیر وزنی مشخص شده در حمام آبی تا ۵ درجه بالاتر از نقطه ذوب کره کاکائو (دمای ۸۰°C) حرارت داده شدند. سپس محلول سورفاکتانت فاز آبی (پولوکسامر ۴۰۷) با دمای ۸۰°C، به‌صورت قطره قطره به داخل فاز روغنی حاوی CLA تحت دمای ۸۰°C و در زیر هموژنایزر نیروی برشی بالا شرکت Hiedolph، ساخت آلمان، اضافه گردید. در این مرحله امولسیون روغن در آب متشکل از قطرات چربی حاوی CLA، تولید شده و سپس با سرد شدن سیستم در دمای اتاق، نانوقطره‌ها کریستالیزه گشته و NLC تولید شد. در تهیه NLC‌ها رعایت شرایط هم دمایی در تهیه هر دو فاز و هنگام مخلوط کردن بسیار ضروری است [۱۴].

### ۲.۲.۲. تعیین اندازه ذرات

قطر معادل و شاخص توزیع (اسپن<sup>۱</sup>) حامل‌های لیپیدی نانوساختار حاوی CLA از روی توزیع اندازه ذرات در دستگاه اندازه‌گیری اندازه ذرات SHIMADZO، مدل SALD 2101 ساخت ژاپن، تعیین گردید. اندازه‌گیری اندازه ذرات پس از گذشت ۲۴ ساعت از تولید و نگهداری نمونه در دمای محیط انجام شد. متوسط اندازه ذرات بر اساس میانگین قطر حجمی

(رابطه ۱) تعیین شد [۱۴].

$$\overline{D}_{[4,3]} = \frac{\sum n_i d_i^4}{\sum n_i d_i^3} \quad (1)$$

ni: تعداد ذرات، di: قطر میانگین ذرات

توزیع اندازه ذرات نیز با استفاده از رابطه (۲) محاسبه شد:

$$Span = \frac{D(90\%) - D(10\%)}{D(50\%)} \quad (2)$$

D(90%): قطری که حجم ذرات کوچک‌تر از آن، ۹۰٪ حجم کل ذرات موجود در سیستم را تشکیل می‌دهد.

D(50%): قطری که حجم ذرات کوچک‌تر از آن، ۵۰٪ حجم کل ذرات موجود در سیستم را تشکیل می‌دهد (قطر میانه).

D(10%): قطری که حجم ذرات کوچک‌تر از آن، ۱۰٪ حجم کل ذرات موجود در سیستم را تشکیل می‌دهد.

### ۳.۲.۲. میزان کدورت

کدورت نانوحامل لیپیدی حاوی CLA، در دستگاه طیف‌سنج نوری و در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. برای اندازه‌گیری کدورت، از مقادیر متفاوت لیپید جامد چهار سطح (۰/۵، ۱، ۲ و ۲/۷۵ گرم در تولید یک سیستم نانوحامل) استفاده شد. ابتدا یک میلی‌لیتر از نمونه با ۲ میلی‌لیتر آب مقطر رقیق و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق نگهداری شد. بعد نمونه‌ها در سل مربوط به اسپکتوفتومتر ریخته و کدورت نمونه‌ها اندازه‌گیری شدند [۱۵].

### ۴.۲.۲. بررسی پایداری اندازه ذرات NLC در طی مدت زمان نگهداری

به‌منظور بررسی پایداری فیزیکی سیستم کلوییدی طی مدت نگهداری سیستم، آزمون تعیین میزان پایداری اندازه ذرات با اندازه‌گیری اندازه ذرات طی روزهای نگهداری ۷، ۱۴، ۲۱، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روز پس از تولید انجام شد [۱۷].

### ۵.۲.۲. پتانسیل زتا

برای مشخص شدن نحوه عمل نیروهای دافعه الکتروستاتیک بین ذرات NLC و میزان پایداری سیستم حاصل، از نتایج تحرک الکتروفوریتیک و پتانسیل زتای با استفاده از دستگاه زتا سائزر



### ۸.۲.۲. تهیه نمونه‌های شیر غنی‌سازی شده و بررسی پایداری اسید لینولئیک کنژوگه در شیر پاستوریزه طی نگاه‌داری در دمای یخچال

هر سیستم حامل لیپیدی نانوساختار (۳۵ ml) حاوی CLA  $2/5 \mu\text{g/ml}$  بود و با توجه به مقدار غنی‌سازی  $50000 \mu\text{g}$  به شیر کم‌چرب، به ازای ۱۰۰ میلی‌لیتر شیر کم‌چرب،  $177 \mu\text{l}$  از فرمولاسیون نانوحامل لیپیدی و به ازای ۱۰۰ سی‌سی شیر کم‌چرب،  $250 \mu\text{l}$  از کنژوگه لینولئیک مزدوج خالص (نمونه کنترل) اضافه گردید و در ادامه تحت فرایند پاستوریزاسیون،  $65^\circ\text{C}$  به مدت ۳۰ دقیقه در بن ماری، قرار گرفتند. از نمونه‌های شیر پاستوریزه شده نمونه برداری جهت استخراج اسید چرب از شیر صورت گرفت. هم‌چنین از نمونه شیر خام و فرایندشده بدون اضافه کردن هیچ سیستمی، جهت تعیین مقدار اولیه اسید چرب مزدوج پیک گرفته شد. در جدول (۱) مشخصات اولیه شیر خام مورد استفاده نشان داده شده است.

### ۱.۸.۲.۲. اندازه‌گیری پروفایل اسیدهای چرب در شیر و میزان کنژوگه لینولئیک اسید

شناسایی و تعیین مقدار اسیدهای چرب موجود در چربی‌های استخراج شده با سیستم GC مجهز به آشکارساز یونی شعله و ستون موئین انجام شد. اسپلایت دستگاه ۱ به ۱۰۰ تنظیم و دمای محل تزریق و آشکارساز به ترتیب بر روی  $270^\circ\text{C}$  و  $300^\circ\text{C}$

در طی ۹۰ روز نگاه‌داری استفاده شد. برای این منظور، هریک از نمونه‌ها نخست با استفاده از آب مقطر رقیق و اندازه‌گیری پتانسیل زتا در  $\text{pH}=7/4$  و در دمای  $25^\circ\text{C}$  و توان ۱۴۹ وات انجام شد [۱۸].

### ۶.۲.۲. ریخت‌شناسی<sup>۱</sup> حامل لیپیدی نانوساختار با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

نمونه NLC تولیدی با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی Leo 906، مدل (SEM) Zeiss 100 KV، ساخت کشور آلمان، تصویربرداری شد [۱۹].

### ۷.۲.۲. بررسی پایداری اکسیداتیو CLA

پایداری اکسیداتیو NLC حاوی اسید لینولئیک کنژوگه در طی روزهای ۳۰، ۴۵ و ۶۰ با استفاده از آزمایش تیوباریوتیک اسید (TBA) اندازه‌گیری شد. ۱ میلی‌لیتر از نمونه NLC با ۲ میلی‌لیتر از محلول واکنشگر TBA (۱۵ گرم تری کلرو استیک اسید، ۰/۳۴ گرم واکنشگر TBA،  $1/76$  میلی‌لیتر از هیدروکلریک اسید ۱۲ مولار و  $8/28$  میلی‌لیتر آب) مخلوط شده و به مدت ۳۰ دقیقه داخل آب جوش قرار گرفت و سپس با جریان آب سرد به مدت ۵ دقیقه سرد و در  $4000\text{g}$  به مدت ۲۰ دقیقه سانتریفورژ شد، جذب در طول موج ۵۳۲ نانومتر با استفاده از اسپکتوفتومتر اندازه‌گیری شد [۱۵].

جدول (۱) مشخصات اولیه شیر خام مورد استفاده

Table 1 primary properties of used raw milk

واحد Unit	کمیت quantity
pH	6.6
فعالیت Acidity	15 Dornic degree
چربی Lipid	0.6%
پروتئین Protein	2.95%
کل مواد جامد Total Solid (TS)	9.8%
مواد جامد غیر چربی Solid Non Fat (SNF)	9.2%

(شکل ۱). در تحقیقات مشابه نیز فریدآقایی و همکاران [۱۵] در تولید نانوحامل حاوی کنژوگه لینولئیک اسید، پزشکی و همکاران [۱۴] در تولید نانوحامل حاوی ویتامین A پالمیتات و محمدی و همکاران [۹] در تولید نانوحامل حاوی ویتامین D3 به نتایج مشابه دست یافتند. در تمامی تحقیقات اندازه ذرات با توزیع یکنواخت و تک مد در مقیاس نانو و زیر ۱۰۰ نانومتر بود. انتخاب مناسب ماتریکس لیپیدی و نوع سورفاکتانت، فاکتور کلیدی مهم در تهیه NLC مناسب و پایدار است. از انواع مختلف لیپیدهای جامد شامل لیپیدهای طبیعی، نیمه سنتتیک و سنتتیک با ساختارهای مختلف می‌توان به‌عنوان ماتریکس لیپیدی در تهیه انواع NLC استفاده کرد [۷].

### ۲.۳. مورفولوژی نانوذرات با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM)

تصویر مربوط به میکروسکوپ الکترونی روبشی، وجود ذرات تقریباً کروی با اندازه نانومتری را نشان داد که تأییدی بر نتایج به‌دست آمده از دستگاه اندازه‌گیری اندازه و توزیع ذرات بود (شکل ۲). نتایج SEM دارای اندازه کوچک‌تر نسبت به نتایج حاصل از دستگاه DLS می‌باشد، زیرا در طی خشک کردن فرایند آب‌اندازی، رخ داده که موجب کاهش اندازه ذرات کمپلکس شده است [۲۱]. هم‌چنین یکنواختی مشاهده شده در اندازه ذرات، توزیع مناسب اندازه ذرات را تأیید می‌کند. نتایج به‌دست آمده با نتایج محمدی و همکاران [۹] در تولید نانوحامل حاوی ویتامین D3 مطابقت داشت.

### ۳.۳. پایداری اندازه ذرات فرمولاسیون NLC

نتایج پایداری اندازه و توزیع ذرات فرمولاسیون بهینه NLC طی نگره‌داری به مدت ۶۰ روز نشان داد همواره اندازه ذرات در مقیاس نانو با توزیع یکنواخت است و افزایش اندازه در طی مدت زمان رخ نداد (شکل ۳).

کواسویک و همکاران [۲۲] بیان نمودند سطح فعال منو و دی-گلسیریدها و هم‌چنین مخلوطی از آن‌ها، امولسیفیکاسیون را تسهیل کرده و بنابراین فیلم‌های محکمی از سورفاکتانت در اطراف نانوذرات لیپیدی تشکیل می‌دهند و باعث بهبود و افزایش پایداری فیزیکی نانوحامل کلوییدی می‌گردد. سان و همکاران [۱۳] گزارش کردند با افزایش مدت‌زمان نگره‌داری در دمای

تنظیم‌شده برنامه‌ریزی گردیده بود. گاز نیتروژن با خلوص ۹۹/۸٪ و با جریان ۲ ml/min به‌عنوان گازحامل استفاده گردید.

### ۳.۲. آنالیز آماری

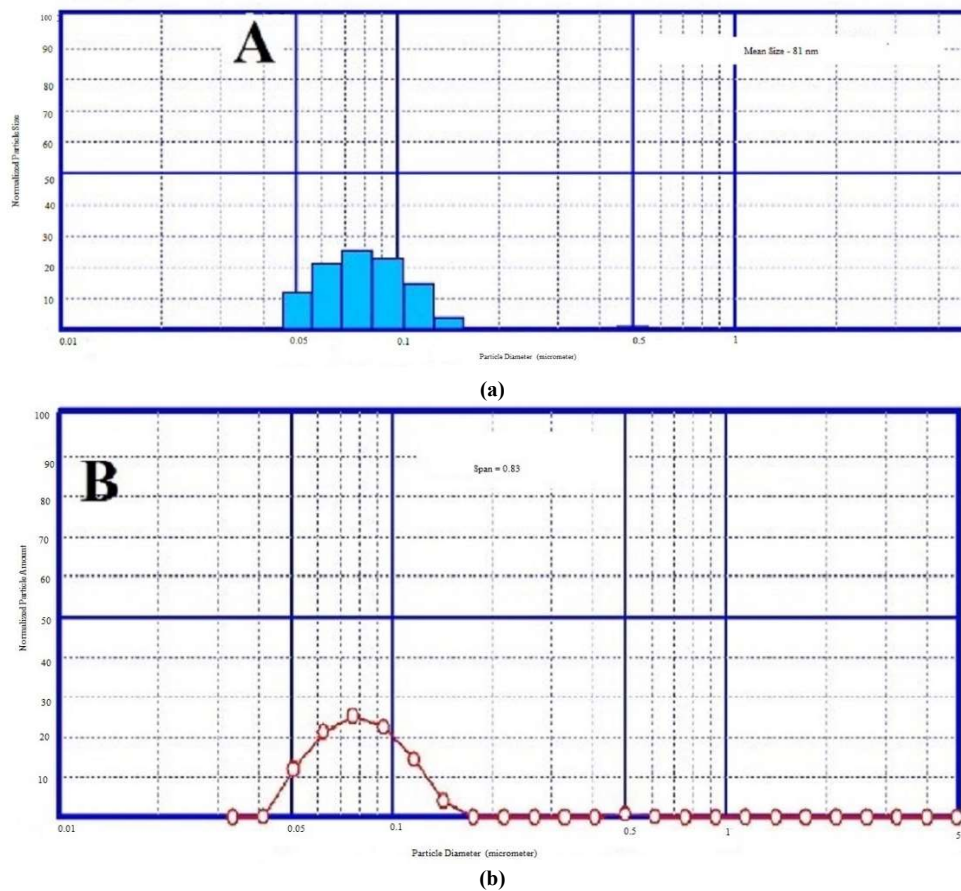
آزمون‌های فیزیکی و شیمیایی بر اساس طرح کاملاً تصادفی با ۳ تکرار انجام پذیرفت. در ابتدا تولید نانوحامل و بررسی ویژگی‌های آن در تولید (اندازه ذرات، ریخت‌شناسی و کدورت) و طی مدت نگره‌داری (پایداری اندازه ذرات، پتانسیل زتا و پایداری اکسیداتیو) و در ادامه غنی‌سازی شیر با نانوحامل تولیدی و بررسی میزان CLA آزاد شده در شیر پاستوریزه در طی یک هفته نگره‌داری انجام شد. برای تحلیل داده‌ها از آزمون آنالیز واریانس (ANOVA) و آزمون مقایسه میانگین‌های دانکن در سطح ۵٪ استفاده شد. محاسبات با استفاده از نرم افزار آماری SPSS ۱۹ انجام شده و نمودارها توسط نرم افزار Excell 2013 رسم شد.

### ۳. نتایج و بحث

#### ۱.۳. اندازه و توزیع اندازه ذرات NLC حاوی کنژوگه لینولئیک اسید

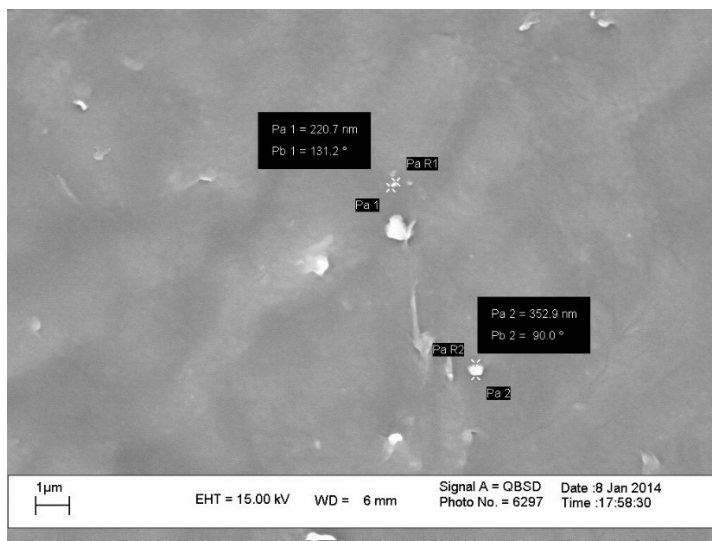
نقش اصلی لیپید جامد در تولید نانوذرات لیپیدی به روش هموژنیزاسیون گرم، در درجه اول، تولید نانوذرات لیپیدی که از نظر فیزیکی پایدار هستند، است. هم‌چنین انتخاب نسبت مناسب از لیپید و روغن در اندازه ذرات، ساختار کریستالی و پایداری سیستم نقش به‌سزایی دارد [۵، ۱۲] در غلظت پایین روغن مایع، مولکول‌های روغن بین ماتریکس لیپید جامد پخش شده و NLC دارای ساختار ناقصی متشکل از مخلوط لیپید و روغن می‌شود و در فرمولاسیون‌های حاوی غلظت بالاتر از روغن مایع، حین سرد کردن امتزاج‌پذیری روغن مایع در ساختار لیپید جامد کاهش یافته و جدایی فاز رخ می‌دهد و اندازه و توزیع ذرات افزایش می‌یابد [۹، ۲۰].

فرمولاسیون بر پایه نسبت ۱:۱۰ لیپید جامد ( کره کاکائو) به روغن مایع (CLA) با استفاده از غلظت (w/v) ۳٪ سورفاکتانت فاز آبی (پلوکسامر ۴۱۷) به‌عنوان فرمولاسیون بهینه جهت غنی‌سازی شیر شناخته شد. اندازه‌گیری ذرات با استفاده از دستگاه (یک روز پس از تولید) نشان داد میانگین قطر حجمی ذرات ۸۱ نانومتر و شاخص اسپن ۰/۸۳ بود که نشان‌دهنده اندازه ذرات در مقیاس نانو با توزیع مناسب و یکنواختی پراکندگی ذرات بود

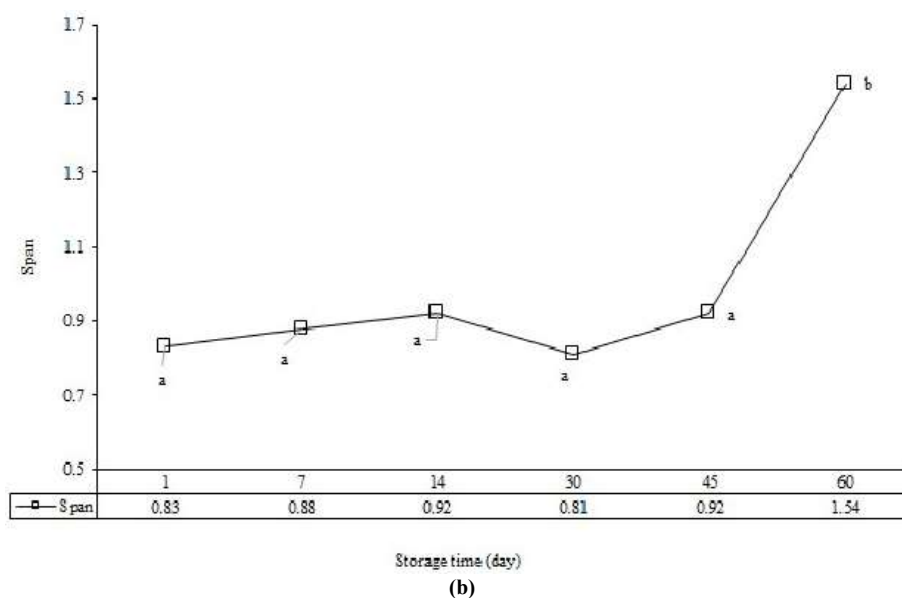
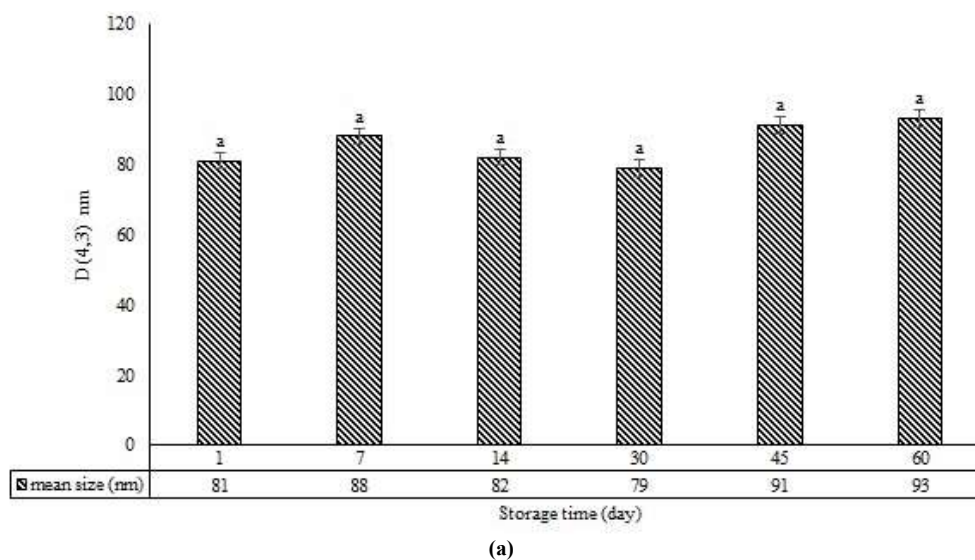


شکل (۱) (a) اندازه ذرات و (b) توزیع اندازه ذرات یک روز پس از تولید فرمولاسیون بر پایه نسبت ۱۰:۱ لیپید جامد (کره کاکائو) به روغن مایع (CLA) با استفاده از غلظت ۳٪ (w/v) سورفاکتانت فاز آبی (پلوکسامر).

**Fig. 1** a) particle size and b) particle size distribution one day after production of formulation based on ratio 1:10 solid liquid (cocoa butter) into liquid oil (CLA) using 3 % (w/v) aqueous surfactant NLC formulation (poloxamer417).



شکل (۲) تصویر میکروسکوپ الکترونی روبشی (SEM) از سیستم حامل لیپیدی نانوساختار حاوی CLA.  
**Fig. 2** SEM morphology of CLA loaded NLC.



شکل (۳) پایداری (a) اندازه و (b) توزیع اندازه ذرات در فرمولاسیون NLC بر پایه نسبت ۱:۱۰ لیپید جامد (کره کاکائو) به روغن مایع (CLA)، با استفاده از غلظت سورفاکتانت فاز آبی ۳٪ (w/v) طی بازه‌های زمانی ۱، ۷، ۱۴، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روز پس از تولید.

**Fig.3** size stability of NLC formulation based on 1:10 ratio of solid lipid (cacao butter) to CLA using 3%(w/v) aqueous surfactant phase, during storage days 1, 7, 14, 30, 45 & 60.

این بار سطحی به عواملی چون نوع ترکیب فعال سطحی مورد استفاده، غلظت سورفاکتانت بر روی سطح قطره‌ها و شرایط محیطی (pH، دما و قدرت یونی) بستگی دارد. اتمسفر یونی اطراف ذره باردار باعث ایجاد نیروی دافعه الکترواستاتیکی بین قطره‌ها می‌شود و زمانی که دو قطره با بار مشابه به یکدیگر نزدیک می‌شوند، یک هم‌پوشانی در اتمسفر یونی اطراف آن‌ها ایجاد شده و باعث ایجاد نیروی دافعه بین آن دو قطره می‌شود که این نیرو از تجمع ذرات جلوگیری می‌کند. بنابراین می‌توان با اندازه‌گیری

محیط، پتانسیل زتای نمونه‌ها کاهش می‌یابد که می‌تواند منجر به ناپایداری فیزیکی از جمله تجمع ذرات، آگلومریزاسیون و ژله-ای شدن آن‌ها شود. پایداری فیزیکی خوب را می‌توان نتیجه تاثیر ممانعت فضایی سورفاکتانت‌ها دانست.

#### ۴.۳ پتانسیل زتا

سطح ذرات و قطره‌ها در سیستم‌های کلوییدی، به دلیل ماهیت خود و یا جذب لایه سورفاکتانت یونی دارای بار الکتریکی است و

[۲۵] همان‌طور که در شکل (۴) نشان داده شده، سیستم نانوحامل کلوییدی دارای کدورت نبوده ولی با افزایش میزان درصد روغن و لیپید در فرمولاسیون NLC میزان کدورت نمونه بیش‌تر می‌شود. کدورت سیستم‌های کلوییدی (نانوامولسیون و SLN و NLC) در صورتی که قطر متوسط قطرات آن کم‌تر از ۸۰ نانومتر و توزیع اندازه قطرات در آن باریک باشد، زیر  $1 \text{ cm}^{-1} / 0.5$  خواهد بود که از لحاظ نوری شفاف و مناسب برای استفاده در نوشیدنی‌های شفاف خواهد بود [۶]. با کاهش اندازه ذرات در مقیاس نانو و هم‌چنین پایداری در طی مدت زمان دافعه بین ذرات زیاد شده که به تبع آن شکست و انعکاس نور کاهش یافته و منجر به کاهش کدورت می‌شود [۲۲]. نیکبخت نصرانی و همکاران [۲۶] در مطالعه خود به تولید نوشیدنی فراسودمند حاوی اسید لینولئیک مزدوج (CLA) به‌عنوان یک جزء فراسودمند پرداختند آن‌ها گزارش کردند درصد بالاتر روغن در سیستم میانگین قطر حجمی ( $D_{4,3}$ ) و کدورت را افزایش داد و باعث کاهش پایداری حرارتی گشت.

### ۶.۳. بررسی پایداری اکسیداتیو اسید لینولئیک کنژوگه

با وارد شدن کنژوگه لینولئیک اسید در سیستم‌های نانوحامل کلوییدی و محافظت این ترکیب در برابر عوامل محیطی، نور و اکسیژن، پایداری اکسیداتیو آن افزایش یافت. درون‌پوشانی CLA در سیستم نانوحامل لیپیدی باعث محافظت بیش‌تر این ترکیب در برابر اکسیداسیون و تولید کم‌تر محصولات ثانویه اکسیداسیون (مالون آلدیدها) شد (شکل ۵). این امر مطابق با نتایج فرید آقایی و همکاران [۱۶]، در درون‌پوشانی CLA در سیستم‌حامل لیپیدی (NLC) و نیکبخت نصرانی و همکاران [۲۶] در تهیه امولسیون حاوی CLA بود. مالون آلدید، آلدیدی است که به‌طور عمده در اتواکسیداسیون اسیدهای چرب با سه یا تعداد بیش‌تری پیوند دوگانه تشکیل می‌شود. این ترکیب فاقد بو بوده و قادر است با پروتئین‌ها اتصال پیدا کند.

### ۷.۳. غنی‌سازی شیر کم‌چرب پاستوریزه با نانوحامل

#### لیپیدی حاوی CLA و حفظ آن در طی مدت نگاه‌داری

نتایج نشان داد با توجه به مساحت پیک (۳/۷۳ درصد) با احتساب فاکتور تصحیح (۰/۹۱) درصد اسید لینولئیک کنژوگه

پتانسیل زتا، پایداری فیزیکی ساختارهای NLC را مورد بررسی و پیش‌بینی کرد [۶، ۱۳]. با توجه به غیر یونی بودن سورفاکتانت فاز آبی (پلوکسامر ۴۰۷) و هم‌چنین سایر ترکیبات تشکیل‌دهنده سیستم، مقدار پتانسیل نمونه‌ها خیلی جزئی و نزدیک صفر به- دست آمد و با توجه به ساختار حجیم و پلیمری بودن پلوکسامر ۴۰۷ می‌توان پایداری نانوذرات در طول مدت نگاه‌داری را به دافعه فضایی (استریک) ناشی از مولکول‌های سورفاکتانت نسبت داد و در این سیستم دافعه الکترواستاتیک نقش بسزایی را در پایداری ذرات ایفا نکرد (جدول ۲). پلی‌هیدروکسی سورفاکتانت‌ها پایدارکننده‌های غیر یونی ایجادکننده ممانعت فضایی هستند که با توجه به غیر یونی بودن آن‌ها، پتانسیل زتای محلول پایین و به‌طور تقریب صفر به‌دست می‌آید [۹، ۲۲].

جدول (۲) پتانسیل زتای حامل‌های لیپیدی نانوساختار حاوی CLA در طی مدت نگاه‌داری

Table 2 Zeta potential of CLA loaded NLC during storage time

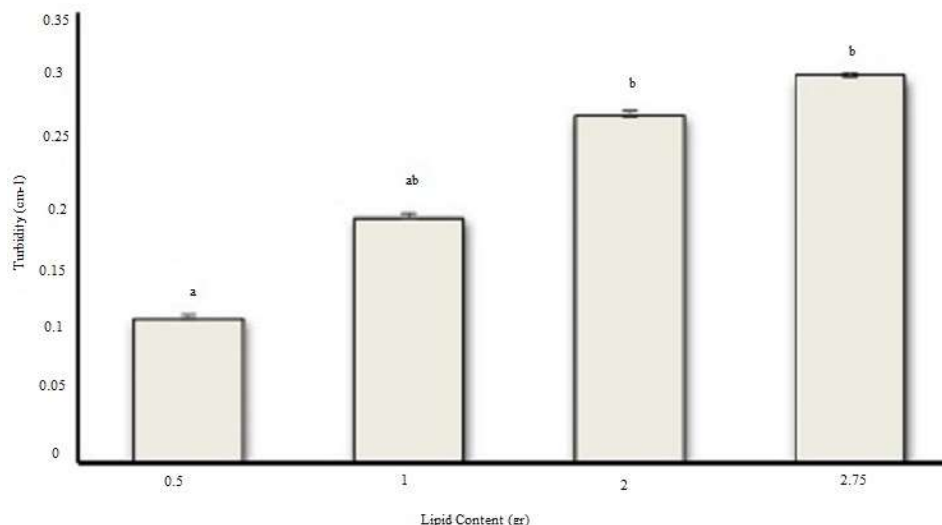
پتانسیل زتا Zeta Potential (mv.)	مدت نگاه‌داری Storage time (day)
0.367a	1
0.312 a	15
0.32 a	30
0.402 a	60

لیم و کیم [۲۴] در تولید نانوحامل‌های لیپیدی رتینویک اسید پوشش‌دار شده توسط پلی اتیلن گلیکول (PEG)، ذراتی با اندازه ۳۰۰-۱۵۰ نانومتر و پتانسیل زتای  $-38 \text{ mv}$  به‌دست آوردند. فتحی و ورشوساز [۱۱] در تحقیقی بر روی حامل‌های لیپیدی نانوساختار حاوی ترکیب فلاونوییدی هیسپرتین گزارش نمودند پتانسیل زتای NLC‌های تولیدی به مقدار کم و در محدوده  $-5/42$  میلی ولت قرار دارد. آنان جهت افزایش پتانسیل زتا و پایداری الکترواستاتیکی نانوحامل‌های لیپیدی، از پوشش‌دهی سطح ذرات با کیتوزان، آلژینات و پکتین استفاده کردند.

### ۵.۳. اندازه‌گیری میزان کدورت

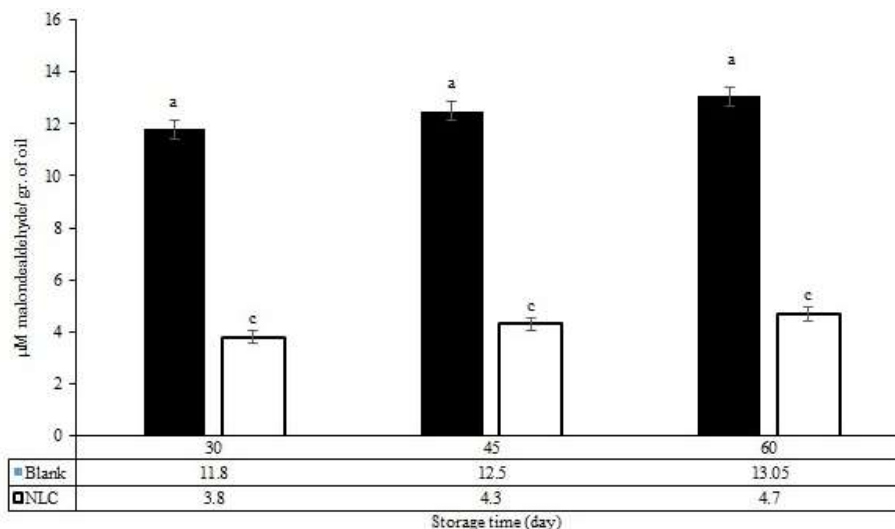
کدورت توسط مقادیر نور پخش شده توسط ذرات موجود در محیط سوسپانسیون تعیین می‌شود و به ماهیت، تعداد، اندازه کلوییدی ذرات موجود در فاز مایع و تفاوت در ضریب انعکاس ذرات و محیط سوسپانسیون و توزیع اندازه ذرات بستگی دارد





شکل (۴) میزان کدورت در فرمولاسیون NLC حاوی اسید لینولئیک کنژوگه در چهار سطح محتوی لیپید (۰/۵، ۱، ۲، و ۲/۷۵ گرم).

Fig. 4 Turbidity of CLA loaded NLC in 4 level of lipid (0.5, 1, 2, 2.75 gr)



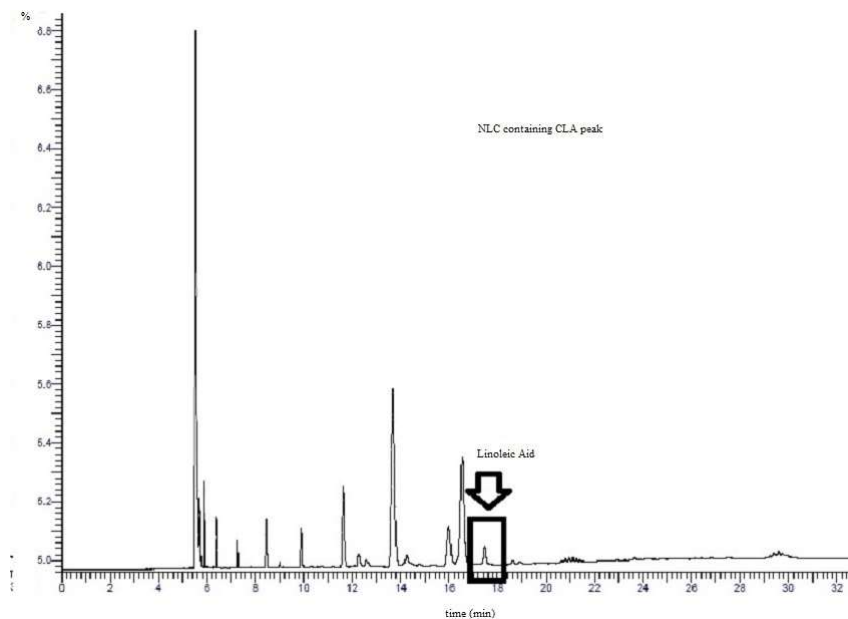
شکل (۵) نتایج حاصل از آزمون تیوباربیوتیک اسید بر روی نمونه‌های شاهد (امولسیون ساده از ۲۵۰ میکروگرم CLA در آب دوبار تقطیر) و نانوحامل لیپیدی حاوی CLA طی روزهای ۳۰، ۴۵ و ۶۰ روز نگهداری (حروف متفاوت نشان‌دهنده تفاوت معنی‌دار در سطح ۵٪ است).

Fig. 5 The result of thio barbituric acid on witness samples (simple emulsion from 250 μg CLA in double distilled water) and NLC containing CLA in days of 30, 45, and 60 of storage time (Different letters indicate meaningful differences at level of 5%).

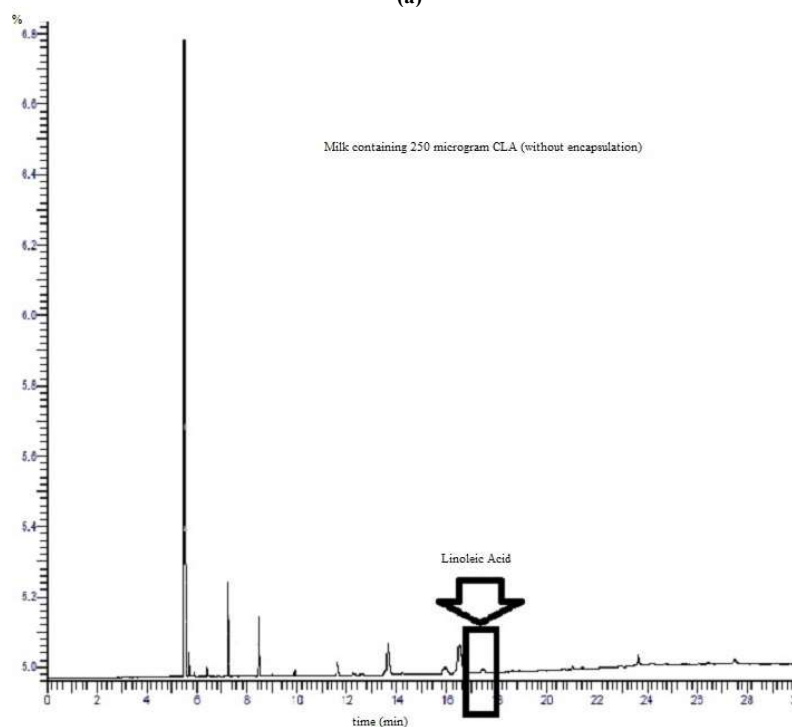
لیپید جامد استفاده می‌شود، با اضافه نمودن روغن مایع به ساختار نانوحامل (NLC)، میزان کریستالیته شدن مجدد لیپید و در نتیجه خروج ترکیبات فعال کمتر شده و در نتیجه کارایی بالاتری از درون پوشانی و محافظت ترکیب فعال حاصل می‌شود (شکل ۷) [۱].

پزشکی و همکاران [۲] در تحقیق خود به غنی‌سازی شیر کم-چرب با ویتامین A پالمیتات درون پوشانی شده در فرمولاسیون

موجود در شیر کم‌چرب غنی‌شده ۳/۹ درصد اسیدهای چرب شیر بود (شکل ۶). با توجه به ساختار جامد NLC در اثر به کار بردن لیپید جامد به همراه روغن مایع، در مقایسه با سیستم‌های نانوامولسیون که در آن‌ها تنها از روغن مایع استفاده می‌شود امکان رساندن ترکیب فعال به بافت هدف و حداقل اثرات سوء ترکیبات درون پوشانی شده حاصل می‌شود [۷، ۱۳]. هم‌چنین در مقایسه با ساختارهای لیپیدی جامد (SLN) که در آن‌ها تنها از



(a)

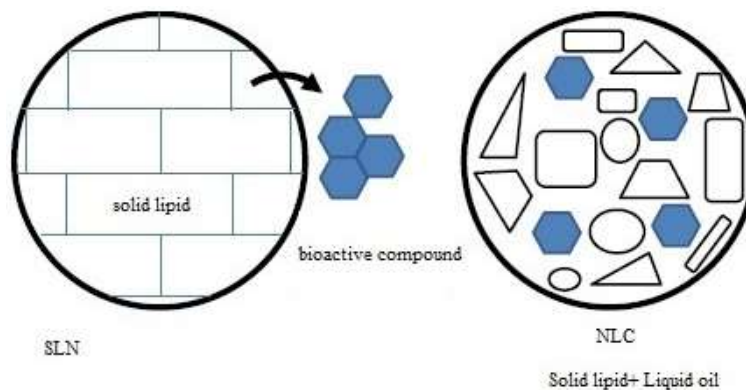


(b)

شکل (۶) نتایج کروماتوگرافی گازی دو نمونه (a) شیر غنی شده با NLC حاوی کونژوگه لینولئیک اسید و (b) شیر حاوی ۲۵۰ میکروگرم کونژوگه لینولئیک اسید خالص بدون درون پوشانی.

**Fig. 6** Chromatography results of two type of enriched a) milk with NLC and NE containing CLA and b) milk containing 250  $\mu\text{g}$  pure CLA without encapsulation.

بهینه NLC بر پایه ۶٪ (w/v) سورفاکتانت (پلوکسامر ۴۰۷)، ویتامین A پالمیتات و دارای اندازه ذرات (۷۸ نانومتر با پریسرول (لیپید جامد) و اکتیل اکتانیت (روغن مایع) حاوی ۳٪ / ضریب پراکنش ۰/۶۰۲)، کارایی درون پوشانی ۹۸/۵٪ پرداختند.



شکل (۷) تفاوت ساختارهای SLN و NLC (پزشکی و همکاران، ۱۳۹۳).

Fig. 7 SLN and NLC structures (Pezeshki et al., 2014).

اکسیداتیو نشان داد با درون پوشانی CLA در سیستم NLC، محافظت این ترکیب در برابر اکسیداسیون بیش‌تر و تولید محصولات ثانویه اکسیداسیون (مالون آلدئیدها) کم‌تر بود. استفاده از NLC بر روی پایداری و حفظ CLA در برابر فرایند حرارتی (پاستوریزاسیون) اثرگذار بود و مقدار ۳/۹ درصد از CLA در شیر طی مدت نگهداری حفظ شد و در نهایت با توجه به مقدار اندک CLA در شیر کم چرب که با حذف و کم کردن چربی از آن صورت می‌پذیرد، می‌توان با به‌کارگیری فناوری نانو و استفاده از نانوحامل‌ها ضمن محافظت از آن در برابر شرایط محیطی و اکسیداسیون، کمبود این ترکیبات مغذی را جبران کرد.

آن‌ها گزارش کردند درون‌پوشانی ویتامین A پالمیتات توسط سیستم NLC باعث محافظت بیش‌تر و معنی‌داری از ویتامین در برابر فرایند حرارتی شد.

#### ۴. نتیجه‌گیری

فرمولاسیون تولیدی NLC حاوی CLA به روش هموزنی‌اسیون داغ با نیروی برشی بالا با اندازه قطرات در مقیاس نانو، در طی مدت زمان نگهداری پایدار بوده و مکانیسم‌های ناپایداری در آن اتفاق نیفتاد. مقدار پتانسیل نمونه‌ها در طی مدت نگهداری خیلی جزئی و نزدیک صفر به‌دست آمد و نتایج حاصل از پایداری

#### منابع

- [5] Pezeshky Najafabadi, A. and mohammadi, M. (2017). Nano lipid carrier as target delivery systems for enrichment beverages by bioactive compounds. *Innova. Food Sci. Technol.*, 9(Ghochan issue), 9-27.
- [6] Yang, Y., Corona III A., Schubert, B., Reeder, R. and Henson, M.A. (2014). The effect of oil type on the aggregation stability of nanostructured lipid carriers. *J. Colloid Interface Sci.*, 418, 261-272.
- [7] Weiss, J., Decker, E.A., McClements, D.J., Kristbergsson, K., Helgason, T., and Awad, T. (2008). Solid lipid nanoparticles as Delivery Systems for Bioactive Food Components. *Food Biophys.*, 3, 146-154.
- [8] Fathi, M., Mozafari M.R. and Mohebbi M. (2012). Nanoencapsulation of food ingredients using lipid based delivery systems. *Trends Food Sci. Technol.*, 1-15.
- [9] Mohammadi, M., Pezeshki, A., Mesgari, M., Ghanbarzadeh, B., Hamishehkar, H. (2017). Vitamin D3-Loaded Nanostructured Lipid Carriers as a Potential Approach for Fortifying Food Beverages; in Vitro and in Vivo Evaluation. *Adv. Pharm. Bullet.*, 7(1), 61-71.
- [1] Gonnet, M., Lethuaut, L. and Boury, F. (2010). New trends in encapsulation of liposoluble vitamins. *J. Control. Release*, 146, 276-290.
- [2] Akram Pezeshky, A., Ghanbarzadeh, B., Hamishehkar, H., Moghadam, M. and Mohammadi, M. (2014). Vitamin A Palmitate Bearing Nano-structured Lipid Carrier (NLC): Factors affecting particle Size, encapsulation efficiency and stability. *Innova. Food Technol.* 2(1), 67-82.
- [3] Tamjidi, F., Shahedi, M., Varshosaz, J. and Nasirpour, A. (2013). Nanostructured lipid carriers (NLC): A potential delivery system for bioactive food molecules. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.*, 19, 29-43.
- [4] Das, S., Ng, W.K. and Tan, R.B.H. 2012. Are nanostructured lipid carriers (NLCs) better than solid lipid nanoparticles (SLNs): Development, characterizations and comparative evaluations of clotrimazole-loaded SLNs and NLCs? *Eur. J. Pharm. Sci.*, 47(1), 139-151.

- [23] Qian, CH., Decker, E.A., Xiao, H. and McClements, D.J. (2013). Impact of lipid nanoparticle physical state on particle aggregation and  $\beta$ -carotene degradation: Potential limitations of solid lipid nanoparticles. *Food Res. Int.*, 52, 342-349.
- [24] Lim, S.J. and Kim, C.K. (2002). Formulation parameters determining the physicochemical characteristics of solid lipid nanoparticles loaded with all-trans retinoic acid. *Int. J. Pharm.* 243(1-2), 135-146.
- [25] Saberi, A.H., Fang, Y. and McClements, D.J. (2013). Fabrication of vitamin E-enriched nanoemulsions: factors affecting particle size using spontaneous emulsification. *J. Colloid Inter. Sci.* 391, 95-102.
- [26] Nikbakht Nasrabadi, M., Goli, S.A.H., Nasirpour, A. (2016). Stability assessment of conjugated linoleic acid (CLA) oil-in-water beverage emulsion formulated with acacia and xanthan gums. *Food Chem.*, 199, 258-267.
- [10] Lacatusu, I., Badea, N., Ovidiu, O., Bojin, D. and Meghea, A. (2012). Highly antioxidant carotene-lipid nanocarriers: synthesis and antibacterial activity. *J. Nanopart. Res.*, 14,902-918.
- [11] Fathi, M. and Varshosaz, J. (2013). Novel hesperetin loaded nanocarriers for food fortification: Production and characterization. *J. Funct. Foods*, 5, 1382-1391.
- [12] Liu, C.H. and Wu, C.T. (2010). Optimization of nanostructured lipid carriers for lutein delivery. *Colloids and Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects*, 353, 149-156.
- [13] Sun, M., Nie, S., Pan, X., Zhang, R., Fan, Z. and Wang, S. (2014). Quercetin-nanostructured lipid carriers: Characteristics and anti-breast cancer activities in vitro. *Colloid Surf. B.*, 113, 15- 24.
- [14] Pezeshki, A., Ghanbarzadeh, B., Mohammadi, M., Fathollahi, I., Hamishehkar, H. (2014). Encapsulation of Vitamin A Palmitate in Nanostructured Lipid Carrier (NLC)-Effect of Surfactant Concentration on the Formulation Properties. *Adv. Pharm. Bullet.*, 4(Supp2), 563-568.
- [15] Farid Aghaie, S., Ghanbarzadeh, B. and Hamishehkar, H. (2016). Conjugated linoleic acid loaded nanostructured lipid carriers (NLC): optimization of particle size by response surface methodology. *J. Food Res.*, 25(3),441-456.
- [16] MacDonald, H. ( 2003). Conjugated Linoleic acid and its association with Disease Prevention. *Journal of the American College of Nutrition.* 19(2): 111-117.
- [17] Xia, S., and Xu, S. (2005). Ferrous sulfate liposomes: preparation, stability and application in fluid milk. *Food Research. Int.*, 38: 289-296.
- [18]. Fatouros, D.G. and Antimisiaris, S.G. (2002). Effect of amphiphilic drugs on the stability and zeta-potential of their liposome formulations: a study with prednisolone, diazepam, and griseofulvin. *J. Colloid Inter. Sci.* 251(2), 271-277.
- [19] Klang, V., et al. (2012). Electron microscopy of nanoemulsions: an essential tool for characterisation and stability assessment. *Micron.* 43(2), p. 85-103.
- [20] Müller, R.H., Radtke, M. and Wissing, S.A. (2002). Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *Int. J. Pharm.*, 242, 121-128.
- [21] Dai, Q., Zhu, X., Abbas, S., Karangwa, E., Zhang, X., Xia, S., (2015). Stable nanoparticles prepared by heating electrostatic complexes of whey protein isolate-dextran conjugate and chondroitin sulfate. *J. Agri. Food Chem.*, 63(16), 4179-4189.
- [22] Kovacevic, A.B., Muller, R.H., Savic, S.D., Vuleta, G.M. and Keck, C.M. (2014). Solid lipid nanoparticles (SLN) stabilized with polyhydroxy surfactants: Preparation, characterization and physical stability investigation. *Colloids Surf. A*, 444, 15- 25.