دومین همایش ملی علوم و صنایع غذایی
دانشگاه آزاد اسلامی واحد قوچان
باشگاه پژوهشگران جوان واحد قوچان
April , 29 - 30 , 2013
۱۰ - ۹ اردیبهشت ماه ۱۳۹۲
آدرس وب سایت همایش:
http://forum.bpj.ir/ghochan-fic2

روش های شناسایی و تعیین خصوصیات نانوامولسیونها

محمدحسین نشاسته‌گیر[۱]، محمدحسین حدادخداپرست[۲]

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد

۲- استاد گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد

چکیده

در حال حاضر کاربرد نانوامولسیونها در صنایع غذایی، داروسازی و پزشکی روبه گسترش است. استفاده از این سیستم های کلوئیدی به عنوان حامل‌ها و سیستم های تحویل برای ترکیبات عملکردی یکی از مهممترین کاربردهایی می‌باشد که می‌توان برای سیستم‌های مذکور ذکر کرد. عوامل فراوانی از جمله اندازه ذرات و نسبت سطح به حجم هستند که می‌توانند قابلیت دسترسی زیستی این ترکیبات را در سیستم های تحویل بهبود بخشند. بنابراین کشف، شناسایی و تشخیص ویژگی‌های سیستم‌های تحویل در مقیاس نانو، برای درک فواید و همچنین خطرات بالقوه این سیستم‌ها لازم و ضروری می‌باشد. در این تحقیق روش‌های تجزیه و تحلیل ویژگی‌های سیستم های تحویل بر پایه نانوامولسیونها معرفی می‌شوند.

کلید واژه : ***نانوامولسیون[۳]، روش های تحلیلی[۴]، تکنیک های بررسی خصوصیات[۵]، سیستم های تحویل[۶]***

مقدمه

در حال حاضر کاربرد نانوفناوری در صنایع غذایی، پزشکی و داروسازی در جهان روبه توسعه و گسترش است. استفاده از این فناوری در مواد غذایی می‌تواند امکان اصلاح تعداد زیادی از خصوصیات آنها را فراهم کند و به تولید

[۱] دانشجوی دانشگاه فردوسی مشهد، تلفن: ۰۹۱۳۹۶۳۷۴۲۲، mu.neshastehgir@stu.um.ac.ir

[۲] عضو هیئت علمی گروه علوم و صنایع غذایی دانشگاه فردوسی مشهد، تلفن: ۰۵۱۱-۸۷۸۷۴۳۰، khodaparast@um.ac.ir

[3] Nanoemulsion
[4] Analytical methods
[5] Characterization techniques
[6] Delivery systems

محصولات جدید و متنوعی منجر شود. یکی از جالب‌ترین زمینه‌های کاربردی این فناوری استفاده از نانوامولسیونها به عنوان حامل‌ها و سیستم های تحویل برای ترکیبات عملکردی می‌باشد (۱). این سیستم های تحویل بـه خـاطر انـدازه ذرات کوچک و نسبت سطح به حجم بالا می‌توانند قابلیت دسترسی زیستی این ترکیبات را بهبود بخشند (۳). بنابراین کشف، شناسایی و تشخیص ویژگی‌های سیستم‌های تحویل در مقیاس نانو، برای درک فواید و همچنین خطرات بالقوه این سیستم‌ها لازم و ضروری می‌باشد.

در این تحقیق روش‌های تجزیه و تحلیل ویژگی‌های سیستم های تحویل بر پایه نانوامولسـیونها در سـه گـروه شـامل روش‌های جداسازی[۷] ، روش‌های تعیین ویژگی‌های فیزیکی[۸] ، روش‌های تصویربرداری[۹] معرفی می‌شوند.

روش‌های تجزیه و تحلیل

روش‌های جداسازی

تعیین خصوصیات نانوامولسیونها در ماتریکس‌های غذایی با استفاده از روش های موجود در بیشـتر مـوارد غیـرممکن می‌باشد، به همین جهت استفاده از روش‌های جداسازی این سیستم ها از ماده غذایی اولیه لازم و ضروری است (۳).

۱) کروماتوگرافی[۱۰] : از آنجا که اندازه و یا بار الکتریکی ویژگـی‌هـای ویـژه و خـاص نانوامولسـیونها هسـتند، کروماتوگرافی اندازه محدود[۱۱] و کروماتوگرافی تبادل یـونی[۱۲] مناسـبترین انـواع کروماـتوگرافی مـایع بـرای جداسازی این سیستم ها از ماتریکس غذایی هستند. در مورد SEC، ترکیبات بر اساس اندازه جدا می‌شـوند، مولکول‌های بزرگتر سریعتر از مولکول‌های کوچکتر شسته می‌شوند. با این حال شستن می‌تواند توسط شکل ترکیبات تحت تأثیر قرار بگیرد. در مورد IEC، ترکیبات بر اساس بار الکتریکی جدا می‌شوند، ترکیبات با بار الکتریکی کم سریعتر از ترکیبات با ابر الکتریکی بالاتر شسته می‌شوند.

HPLC یک شکل از کروماتوگرافی مایع به منظور جدا کردن، آنالیز و اندازه‌گیری ترکیباتی که در محلول حل شده‌انـد است. ترکیبات توسط تزریق مخلوط نمونه (توسط فاز متحرک حمل می‌شود) به داخل ستون جدا می‌شوند. بسـته بـه نوع فاز ثابت، ترکیبات بر اساس نوع بار الکتریکی (کروماتوگرافی تبادل آنیـونی یـا کـاتیونی ضـعیف یـا قـوی)، وزن مولکولی (کروماتوگرافی اندازه محدود)، آبگریزی/قطبیـت (HPLC فـاز معکـوس، کروماـتوگرافی تعامـل آبگریـز) و ویژگی‌های خاص (کروماتوگرافی میل ترکیبی) می‌توانند جدا شوند.

رایج‌ترین آشکارسازها برای HPLC جذب اشعه ماوراءبنفش و نور مرئی، آشکارسازهای فلورسانس، الکتروشیمیایی و انکسار هستند. HPLC در آنالیز مواد غذایی برای اندازه‌گیری ترکیبات متعدد برای مثال کربوهیـدرات‌هـا، ویتـامین‌هـا، افزودنی‌ها، مایکوتوکسین‌ها، آمینواسیدها، پروتئین‌ها، تری‌گلیسریدهای روغنها و چربیها، لیپیـدها، ترکیبـات کـایرال و

---

[7] Sepration techniques
[8] Physical techniques
۹ Imaging techniques
۱۰ Chromatography
۱۱ size-exclusion chromatography (SEC)
۱۲ ion exchange chromatography (IEC)

رنگدانه‌ها استفاده شده است. HPLC یک روش آسان، قوی و تجدیدپذیر است. آشکارسازهای حساس انتخابی برای HPLC در دسترس هستند و انتخابی بودنشان بسته به ترکیبی که آنالیز می‌شود دارد. همچنین HPLC به منظور اندازه-گیری ترکیبات عملکردی انکپسوله شده در نانوامولسیونها مثل بتاکاروتن، α-توکوفرول و تالیدومید[۱۳] می‌تواند استفاده شود.

۲) جزءبه جزء[۱٤] : روشی کمک جریان برای جداسازی آنالیت‌ها از ماکرومولکول‌هایی مثل پروتئین (محدوده متر-نانو) تا ذرات با اندازه میکرو مثل سلول‌های سالم است. در مرحله اول محدوده‌ی بسیار گسترده‌ای از اندازه‌های مولکولی می‌توانند از هم جدا شوند. همچنین این روش می‌تواند ذرات را توسط شعاع استوکس[۱۵] از هم جدا کند. در این روش اگر از جریان سهموی استفاده شود ذرات کوچکتر سریعتر انتقال داده می‌شوند و زودتر شسته می‌شوند، اگر یک جریان متقابل استفاده شود با ذرات حجم یکسان و شکل متفاوت، ذرات ایزومتریک زودتر از ذرات نامتقارن شسته خواهند شد. این روش دارای مزیت‌هایی نسبت به دیگر روش های جداسازی است مثل سازگارسنجی بالاتر، کاهش حمل بیش از حد نمونه ها، مسائلی مربوط به استریلیتی ساده.

زمان جداسازی به طور معمول از یک دقیقه تا ۳ دقیقه طول می‌کشد. علاوه بر این مزایا، عیبی که این روش دارد این است که به راحتی توسط غلظت‌های بالای مواد اورلود[۱٦] می‌شود. به منظور غلبه بر این موضوع، رقت باید ساخته شود. با این وجود، تشخیص ترکیبات در مقادیر کم به حساسیت یک سیستم آشکارساز مناسب منحصر می‌شود.

روشهای تعیین ویژگیهای فیزیکی

در این بخش روش‌هایی مورد استفاده برای شناسایی خصوصیات نانوامولسیونها از دیدگاه فیزیکی (به طور مثال اندازه، توزیع اندازه، پتانسیل زتا و تبلور نانوامولسیونها) شرح داده می‌شود (۳).

۱) تفرق نور پویا[۱۷] : روش تفرق نور پویا به عنوان طیف سنجی همبستگی فوتون و یا پراکندگی شبه الاستیک نور نیز شناخته می‌شود. این روش برای شناسایی سریع مشخصات پراکندگی اندازه ذرات کوچک در سوسپانسیونها یا پلیمرها استفاده می‌شود. در این روش حرکت براونی اندازه‌گیری می‌شود و آن را از طریق معادلعه استوکس-انیشتین به اندازه ذرات ربط می‌دهند. این روش از طریق روشن‌سازی ذرات توسط لیزر و آنالیز شدت تجمع در نور پراکنده، محاسبه اندازه ذرات را امکان پذیر می‌کند. این روش ارزیابی سریع و کافی اندازه نانوامولسیونها را فراهم می‌کند و اغلب به منظور ارزیابی توزیع اندازه نانوامولسیونها و همچنین پایداری اندازه‌ی آنها در طی ذخیره‌سازی استفاده می‌شود.

۲) پتانسیل زتا[۱۸] : پتانسیل زتا یک اصطلاح علمی برای پتانسیل الکتروکینتیک در سیستم‌های کلوئیدی است. در شیمی کلوئیدها، پتانسیل زتا اختلاف پتانسیل بین محیط پراکندگی و لایه ثابت متصل به ذرات پراکنده است.

---

۱۳ Thalidomide

۱٤ Flow field fractionation (FFF)

۱۵ Stokes radius

۱٦ overload

۱۷ Dynamic light scattering (DLS)

۱۸ Zeta Potential

مقدار ۳۰ میلی ولت (مثبت یا منفی) می‌تواند به عنوان مقدار قراردادی که سطوح کم‌بار را از سطوح بـا بـار بـالا جـدا می‌کند قرار گیرد. مقدار این پتانسیل را می‌توان مربوط به پایداری دیسپرسیونهای کلوئیدی که نشان دهنده‌ی درجـه‌ای از دافعه بین ذرات باردار مشابه و مجاور هم در دیسپرسیون است دانست. برای مولکولها و ذراتی که بـه انـدازه کـافی کوچک هستند، پتانسیل زتا بالا پایداری را امکان‌پذیر می‌سازد. به عنوان مثال محلول یا دیسپرسـیون در مقابـل تجمـع ذرات مقاومت خواهد کرد. وقتی این پتانسیل پائین باشد، جاذبه بیش از دافعه است و دیسپرسیون خواهـد شکسـت و لخته خواهد شد. بنابراین کلوئیدها با پتانسیل زتا بالا (مثبت یا منفی) به صورت الکتریکی پایدار می‌شوند در حالی کـه کلوئیدها با پتانسیل‌های زتا پائین تمایل به تجمع و یا لخته شدن دارند. به طور مختصر، پتانسیل‌هـای زتـا از صـفر تـا ۳۰± میلی ولت ناپایداری را نشان می‌دهد، در حالی که پتانسیل‌های زتا بالاتر از ۳۰± میلی ولت پایداری را نشان می‌دهد. پتانسیل ذرات در مقیاس نانو توسـط فاکتورهـای زیـادی تحـت تـأثیر قـرار مـی‌گیـرد مثـل ذرات و تیمارهـای سورفاکتانت های مختلف، غلظت الکترولیـت (قـدرت یـونی)، مورفولـوژی ذرات و انـدازه، pH محلـول و وضـعیت هیدراسیون.

۳) کالریمتری پویشی تفاضلی[۱۹] : DSC روشی ترموآنالیتیکی است که در آن تفاضل مقـدار گرمـای مـورد نیـاز برای افزایش دمای نمونه و شاهد به عنوان تابعی از دما اندازه گیری می‌شود. هم نمونه و هم شاهد در حـین آزمایش حدودا در دمای یکسان نگه داشته می‌شوند. به طور معمول، برنامه دما برای آنالیز در ایـن روش بـه گونه ای طراحی می‌شود که نمونه نگهدارنده دما به طور خطی به عنوان تابعی از زمان افزایش یابد.

نمونه شاهد باید یک ظرفیت گرمایی به خوبی تعریف شده بر روی طیف وسیعی از درجه حرارت داشـته باشـد. ایـن روش می‌تواند به منظور شناسایی انتقال فاز شامل ذوب مناطق بلورین و آنالیز مقدار چربی جامد یـا مقـدار کریسـتال های یخ در امولسیون استفاده شود.

٤) مادون قرمز تبدیل فوریه[۲۰] : طیف بینی FTIR بر اساس عبور پرتو مادون قرمـز از درون نمونـه اسـت کـه قسـمت بیشتر آن جذب نمونه می‌شود و قسمتی اندکی از آن می‌گذرد.

نتایج طیف سنجی جذب و انتقال مولکولی با ایجاد یک شناسنامه[۲۱] مشخص مولکولی از نمونه نمایش داده مـی‌شـود. هر شناسه نمونه پیک های جذب آن نمونه که مربوط به فرکانس ارتعاشات بین پیوند اتم های مواد است را نشان می‌دهد. از آنجا که ترکیب اتم‌های هر یک از مواد مختلف منحصر به فرد است، هیچ دو ترکیبی طیف مادون قرمـز دقیقـا یکسان تولید نمی‌کنند. بنابراین طیف بینی مادون قرمز می‌تواند به شناسایی مواد متفاوت منجر شـود. عـلاوه بـر ایـن، اندازه پیک ها در طیف سنجی به طور مستقیم نشان دهنده‌ی مقدار مواد موجود در نمونه است.

این روش دارای مزایای زیادی است از قبیل اینکه می‌تواند مقدار اجزاء در مخلوط را مشخص کند، می‌تواند کیفیت یا قوام نمونه را مشخص کند، کمترین زمان مورد نیاز برای آنالیز را دارد (چرا که همه فرکانسها به طـور همزمـان انـدازه گیری می‌شوند)، و اینکه یک روش خیلی حساس، نسبتا ساده برای کار و به صورت داخلی کالیبره می‌شود. این مزایـا اندازه گیری‌های انجام شده توسط این روش را بسیار دقیق و تجدیدپذیر می‌کند.

---

۱۹ Differential Scanning Calorimetry (DSC)

۲۰ Fourier Transform Infrared (FTI)

۲۱ finger print

۵) رزونانس مغناطیسی هسته[۲۲] : این روش یک ابزار آنالیز پیچیده و قوی است که امکان مطالعه ترکیبات در حالت مایع یا جامد را فراهم می‌کند و به همان اندازه به عنوان آنالیز ساختاری به کار می‌رود. این روش در جهت جمع آوری اطلاعات ساختاری در مورد ترکیبات مولکولی خیلی کارآمد است. این روش می‌تواند مکمل روش‌های طیف سنجی نوری و طیف سنجی جرمی به منظور دستیابی به اطلاعات دقیق در مورد فرمول ساختاری، شیمی فضایی و اطلاعاتی در مورد نمونه باشد. همچنین می‌تواند برای شناسایی ترکیبات نمونه مورد مطالعه استفاده شود. استفاده از این روش برای توصیف خصوصیات نانوامولسیونها تنها اندکی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

٦) پراش X-ray[۲۳] : این روش از خانواده روش های آنالیز غیرمخرب است که اطلاعاتی در مورد ساختار کریستالی ترکیبات شیمیایی و خصوصیات فیزیکی مواد آشکار می‌سازد. XRD بر اساس مشاهده شدت پراکندگی پرتو ایکس تابیده شده به نمونه که تابعی از زوایای پراکنده، قطبش و طول موج یا انرژی است. این روش اکثرا برای شناسایی ترکیبات کریستالی توسط الگوهای پراش آنها استفاده می‌شود. با این وجود XRD استفاده های خاص زیادی را پوشش می‌دهد : شناسایی مواد تک فاز، تعیین ساختار کریستال، شناسایی و آنالیز ساختاری نمونه، شناخت مواد آمورف در مخلوط تا حدودی کریستاله شده، تعیین اندازه کریستالی از آنالیز اوج گسترش، تعیین شکل کریستالی از مطالعه تقارن اوج و مطالعه انبساط حرارتی در ساختارهای کریستالی با استفاده از حرارت درجا تجهیزات مرحله.

۷) پراکنش زاویه کوچک اشعه ایکس[۲٤] : روشی است برای مطالعه ویژگی‌های ساختاری ذرات کلوئیدی در جایی که پراکنش الاستیک اشعه ایکس توسط نمونه ای که در محدوده نانومتری ناهمگونی دارد، در زوایای خیلی کم (معمولا ۱۰-۰/۱ درجه) به ثبت می‌رسد.

این محدوده‌ی زاویه حاوی اطلاعاتی درباره اندازه و شکل ماکرومولکول‌ها، فاصله مشخصه تاحدی که برای مواد تنظیم شده، اندازه منافذ و غیره است. SAXS قادر به ارائه اطلاعات ساختاری در مولکولهای بین ۲۵-۵ نانومتر و گزارش فاصله‌ها تا حدی که سیستم دستور بدهد تا ۱۵۰ نانومتر است. از طریق الگوهای پراکنش اطلاعاتی درباره‌ی ساختار، شکل و اندازه ماکرومولکولها می‌تواند بدست بیاید. این روش غیرمخرب است و به کمترین آماده سازی نمونه نیاز دارد. یکی از معایب این روش آنالیز اطلاعات است که فقط می‌توان الگوهای پراکنش تک بعدی بدست آورد.

روشهای تصویربرداری

روش های میکروسکوپی می‌تواند به عنوان روش های پردازش تصویر مستقیم برای نانوامولسیونها استفاده شود. با این وجود انتخاب روش میکروسکوپی بستگی به نوع ماتریکسی که آنالیز می‌شود دارد (۳).

۱) میکروسکوپ الکترونی گذرا[۲۵] : روشی است که قادر به تفکیک پذیری تا ۰/۲ mm می‌باشد. این روش به طور گسترده‌ای در مطالعه مواد در علم متالوژی و علوم زیستی استفاده می‌شود. در هر دو مورد نمونه ها باید

---

۲۲ Nuclear Magnetic Resonance (NMR)

۲۳ X-Ray Diffraction (XRD)

۲٤ Small-Angle X-ray Scattering (SAXS)

۲۵ Transmission Electron Microscopy (TEM)

خیلی رقیق باشد و بتواند خلا بالای موجود در داخل دستگاه را تحمل کنند. با این وجود، این روش اشکالاتی نیز دارد. بعضی از مواد نیاز به آماده سازی گسترده‌ای جهت تهیه نمونه‌ی به اندازه کافی رقیق دارند تا الکترونها از آن عبور کند، که باعث می‌شود آنالیز TEM یک روش نسبتا وقت گیر با توان پائین از نمونه‌ها باشد. ساختار نمونه ممکن است در طی فرآیند آماده سازی تغییر کند؛ میدان دید نسبتا کوچک و نمونه ممکن است توسط پرتو الکترونی آسیب ببیند.

۲) میکروسکوپ الکترونی روبشی[۲۶] : این روش قادر به تولید تصاویری با تفکیک‌پذیری بالا از سطح نمونه است. عکس های این روش ظاهری سه بعدی دارند و برای قضاوت در مورد ساختار سطح مفید هستند. به طور کلی تفکیک‌پذیری SEM حدود یک مرتبه بالاتر از تفکیک‌پذیری TEM است، با این وجود، به دلیل اینکه تصویر SEM متکی بر فرآیندهای سطح به جای انتقال است، قادر به تصویربرداری از نمونه‌های بزرگ می‌باشد و عمق بسیار بیشتری دارد و بنابراین تصاویری که نمایش خوبی از ساختار سه بعدی نمونه بدهد برای ما به همراه دارد. به طور خاص، عمق به طور قابل توجه زیاد زمینه در دسترس در SEM، امکان تمرکز بر روی مقدار زیادی نمونه را در هر دفعه فراهم می‌کند. همچنین این روش قادر به تولید تصاویری با وضوح بالا در بزرگنمایی بالاتر است. ترکیبی از بزرگنمایی بالاتر، عمق میدان بزرگتر، رزولوشن بیشتر و سهولت مشاهده نمونه این روش را یکی از روش‌های به شدت مورد استفاده در حوزه های تحقیقاتی امروز می‌کند. با تمام این مزایا، SEM یک روش گران است و به خلا بالا و رسانایی نسبتا بالای نمونه نیاز دارد. وجود سورفاکتانت ها در طی تهیه نانوامولسیونها گاهی اوقات می‌تواند از بیان ویژگی‌های نانوامولسیونها توسط این روش به خاطر تشکیل یک پوشش نازک پنهان بر روی سطوح ذرات جلوگیری کند.

۳) میکروسکوپ نیروی اتمی[۲۷] : روش میکروسکوپی است که به تازگی توسعه یافته است. دستیابی به رزولوشن بالا (±۰/۱ nm) توسط AFM به طور مستقیم برای مشاهده اتم ها یا مولکول‌های تنها که ابعادی در حد چند نانومتر دارند استفاده شده است. این روش متکی بر اسکن شطرنجی به وسیله یک پروب نوک تیز در اندازه نانو بیش از یک نمونه است. نمونه ها بر روی یک سطح از جنس میکا یا شیشه تثبیت شده‌اند. این روش نمایش مشخصات سطح نمونه را به صورت سه بعدی و با وضوح بالا را امکان پذیر می‌نماید.

این روش دارای مزیت تصویربرداری از تقریبا هر نوع سطحی از جمله پیلمرها، سرامیک ها، کامپوزیت ها، شیشه و نمونه های بیولوژیکی است. این روش امکان تصویربرداری از مولکول‌های زیستی نه تنها تحت شرایط فیزیولوژیکی بلکه همچنین در طول فرآیندهای بیولوژیکی را نیز فراهم می‌کند. مزیت مشاهده مستقیم سیستم‌های بیومولکولی در محیط بومی خود امکان آنالیز ویژگی‌های ساختار عملکردی را در سطح زیر مولکولی[۲۸] فراهم می‌کند. بی‌نظمی سطحی مشاهده شده توسط SEM در بازرسی AFM وجود ندارد. از معایب این روش می‌توان به عدم توانایی در تصویربرداری از سطوح نرم، چسبنده یا دارای ذرات شناور به خاطر تماس مستقیم نوک پروب با سطح ماده غذایی اشاره کرد. با این وجود، این روش با بیشتر مواد کار می‌کند و کاربرد گسترده‌ای از بیولوژی و شیمی تا الکترونیک دارد. تصاویر AFM مکمل سایر روش‌های مورد استفاده است. این روش می‌تواند برای توصیف خصوصیات ساختاری پروتئین‌ها، پلی ساکاریدها و لیپوزوم‌ها استفاده شود.

---

۲۶ Scanning Electron Microscopy (SEM)

۲۷ Atomic Force Microscopy (AFM)

[28] submolecular

مراجع

1- David Julian McClements (2011). Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance- Tutorial Review. Soft Matter, 7, 2297–2316

2- M. Yu. Koroleva and E. V. Yurtov (2012). Nanoemulsions: the properties, methods of preparation and promising applications- Review. Russian Chemical Reviews, 81 (1) 21-43

3- Silva, H. Daniel., Miguel Ângelo Cerqueira and António A. Vicente (2012). Nanoemulsions for Food Applications: Development and Characterization- Review Paper. Journal of Food Bioprocess Technology, 5, 854–867