

ارزیابی ویژگی‌های فیزیکی و پایداری نانوامولسیون آب در روغن حاوی عصاره زعفران

Evaluation of physical properties and stability of water-in-oil-nanoemulsions containing saffron extract

مسعود نجفی^{۱*}، سارا نعمتی^۲، علی محمدی ثانی^۳، رسول کدخدایی^۴

۱. دانشیار، علوم و صنایع غذایی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی استان خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران. (نگارنده مسئول)
۲. دانش آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران
۳. دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران
۴. دانشیار، گروه نانو فناوری مواد غذایی، مؤسسه پژوهشی علوم و صنایع غذایی، مشهد، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۸/۷/۱۷

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۲/۳۰

چکیده

نجف نجفی، م. نعمتی، س. محمدی ثانی، ع. کدخدایی، ر. ارزیابی ویژگی‌های فیزیکی و پایداری نانوامولسیون آب در روغن حاوی عصاره زعفران نشریه علمی ترویجی فناوری گیاهان دارویی ایران، دوره ۰۲ - شماره ۰۲ - پاییز و زمستان ۱۳۹۸: صفحه ۲۴-۱۲.

زعفران به دلیل برخورداری از رنگ، عطر و ترکیبات شناخته شده سودمند، در صنایع غذایی و دارویی مصارف زیادی دارد اما بسیار حساس است و ترکیبات فعالش را در معرض شرایط محیطی از دست می‌دهد. در این تحقیق، تهیه نانوامولسیون آب در روغن حاوی عصاره زعفران به عنوان یک روش مؤثر برای حفظ ترکیبات فعال زعفران مورد مطالعه قرار گرفت. بدین منظور، نانوامولسیون‌های آب در روغن با استفاده از مخلوط اسپان ۸۰ و توئین ۸۰ به عنوان امولسیفایر در سه سطح ۱۰، ۱۲/۵ و ۱۵ درصد و با کمک امواج فراصوت تولید شدند. مقدار فاز آبی (عصاره زعفران حاوی ۱۲ درصد ماده خشک) در تمام فرمولاسیون‌ها ۱۵ درصد در نظر گرفته شد و از آن دکان در سه سطح ۷۰، ۷۲/۵ و ۷۵ درصد به عنوان فاز روغنی استفاده گردید. اندازه قطرات، شاخص پراکندگی و درصد پایداری هر کدام از نمونه‌ها در مقابل نور و در طی ۲۸ روز پس از تولید بررسی شد. نتایج نشان داد که امولسیون حاوی ۱۵ درصد امولسیفایر در مقایسه با سایر امولسیون‌ها همواره اندازه قطرات و شاخص پراکندگی کمتری داشت و به لحاظ درصد پایداری فیزیکی نیز در طول مدت نگهداری تغییری از خود نشان نداد.

واژه‌های کلیدی: امولسیون آب در روغن، عصاره زعفران، پایداری، نانوامولسیون.

* آدرس پست الکترونیکی نگارنده مسئول: mnajafi.mhd@gmail.com

مقدمه

عصاره در شرایط محیطی، تجارت این محصول به شکل رشته‌ای یا پودر انجام می‌شود. لذا در سال‌های اخیر مطالعات زیادی در خصوص یافتن روش‌هایی جهت نگهداری عصاره زعفران انجام شده است. در همین زمینه، تولید نانوامولسیون به‌منظور کنترل رهایش ترکیبات فراسودمند یکی از روش‌های مؤثر می‌باشد. سامانه‌های نانوامولسیونی با درون‌پوشانی کردن ترکیبات فراسودمند مانند کوآنزیم Q10، لیکوپن، لوتین، بتاکاروتن، اسیدهای چرب امگا۳، ویتامین‌های A، D3 و E، فیتواسترول‌ها و ایزوفلاون‌ها نقش مهمی در فرمولاسیون مواد غذایی و نوشیدنی‌ها داشته‌اند (McClements, 2010). امروزه مشخص گردیده است که از این ساختار برای حفاظت از ترکیبات فراسودمند و مواد فعال زیستی که پایه روغنی دارند نیز می‌توان استفاده کرد و نه تنها سبب به‌تعویق افتادن تجزیه شیمیایی این ترکیبات می‌شوند بلکه حلالیت مواد لیپیدی مانند کاروتنوئیدها، فیتواسترول‌ها، اسیدهای چرب امگا۳، آنتی‌اکسیدان‌های طبیعی و غیره را نیز افزایش می‌دهند (McClements, 2010). به‌طور کلی، تولید نانوامولسیون‌ها به دو روش ممکن است: امولسیون‌سازی با انرژی پایین و امولسیون‌سازی با انرژی بالا. در روش اول، نانوامولسیون‌ها در نتیجه

زعفران، کلاله و خامه‌های خشک‌شده گل‌های بنفش رنگ گیاه کروکوس ساتیووس^۱ و عضوی از خانواده زنبقیان^۲ است (Esmaeili et al., 2010). ایران بزرگترین تولیدکننده زعفران در جهان است و بیش از ۹۰٪ زعفران جهان در ایران تولید می‌شود (Melynk et al., 2010). علیرغم افزایش قیمت زعفران در سال‌های اخیر، مصرف آن به دلیل افزایش تمایل مصرف‌کنندگان به محصولات طبیعی همواره رو به رشد بوده است. یکی از دلایل عمده مصرف زعفران، به‌ویژه در مواد غذایی خاصیت رنگ‌دهی آن می‌باشد. از بین رنگدانه‌های مختلف موجود در زعفران، کروسین به‌عنوان شاخص رنگ زعفران معرفی شده است (Sánchez-Vioque et al., 2012). این رنگدانه حساسیت زیادی به اکسیژن دارد و در مجاورت آن به سرعت اکسایش می‌یابد. افزایش دما نیز باعث اکسایش خودبه‌خودی کروسین می‌شود (Alonso et al., 1997). در طول فرآوری و نگهداری زعفران، به‌تدریج از میزان کروسین کاسته شده و شدت رنگ نیز کاهش می‌یابد (Morimoto et al., 1994). به‌دلیل همین مشکلات و ناپایداری زعفران مخصوصاً به شکل

1- *Crocus sativus* L.
2-Iridaceae

امولسیون، وجود نیروی کشش بین سطحی و اختلاف دانسیته بین دو فاز تماسی آب و روغن نامطلوب بوده و سامانه امولسیون به راحتی و با گذر زمان شکسته شده و دو فاز می‌شود (McClements, 2005). معمولاً با انتخاب مناسب نوع سورفاکتانت و تعیین مقدار بهینه آن، کاربرد نسبت‌های مناسب از فاز آبی و روغن با سورفاکتانت و همچنین استفاده از روش امولسیون‌سازی مناسب می‌توان امولسیون‌های پایدار تولید کرد (McClements, 2005; Najaf Najafi et al., 2016). بر اساس مطالعات انجام شده ما، تاکنون تحقیقات محدودی بر روی تولید امولسیون آب در روغن زعفران انجام گرفته است لذا این پژوهش، با هدف امکان تولید نانوامولسیون آب در روغن حاوی عصاره زعفران با استفاده از امواج فراصوت به منظور حفاظت و پایداری بیشتر ترکیبات مؤثره زعفران انجام گرفت.

مواد و روش‌ها

زعفران مورد نیاز جهت عصاره‌گیری از شرکت زعفرانچی توس تأمین شد. اسپان ۸۰ (سوربیتان مونو اولئات) و توئین ۸۰ (سوربیتان مونو-۹-اکتا دکنوئات) از کمپانی سیگما آلدریج کشور آلمان و ان دکان و اتانول ۹۶ درجه از کمپانی مرک

انتقال‌های فازی ایجاد شده در طی فرایند امولسیون‌سازی که عموماً در دمای ثابت و تغییر ساختار یا در ساختار ثابت و تغییر دما اتفاق می‌افتند، به دست می‌آیند. دارای محدودیت‌هایی از جمله نیاز به مقدار زیاد مواد فعال سطحی (سورفاکتانت) و لزوم انتخاب دقیق مواد فعال سطحی و کوسورفاکتانت هستند. اما روش دوم، به دلیل کنترل توزیع اندازه قطرات امولسیون و قابلیت تولید امولسیون‌هایی مناسب و با تنوع زیاد، قابلیت کاربرد صنعتی بیشتری دارد و تهیه نانوامولسیون‌ها به روش امولسیون‌سازی با انرژی بالا با استفاده از تجهیزات مکانیکی از جمله آسیاب‌های کلوئیدی، همگن‌سازهای با سرعت یا فشار بالا و همگن‌سازهای فراصوت ممکن است. در این میان، با استفاده از همگن‌سازهای فراصوت، میزان مصرف انرژی و امولسیفایر کاهش یافته و امولسیون‌های حاصل پایداری بیشتری دارند. همچنین، همگن‌سازهای فراصوت کارایی بالایی برای کاهش اندازه قطرات و دستیابی به حداقل پراکندگی توزیع ذرات و در نتیجه پایداری بیشتر امولسیون دارند (Najaf Najafi, 2016).

یکی از مهم‌ترین محدودیت‌های سامانه‌های امولسیونی، ناپایداری ترمودینامیکی آنها می‌باشد. در واقع به علت مثبت بودن انرژی آزاد گیبس تشکیل

زعفران) در تمام فرمولاسیون‌ها ۱۵٪ و ثابت در نظر گرفته شد. در ابتدا میزان امولسیفایر و آن دکان مورد نیاز برای هر فرمولاسیون توزین و درون یک بشر ریخته شد و به مدت ۵ دقیقه با همزن مغناطیسی با سرعت ۲۰۰ دور در دقیقه مخلوط شدند. بشر حاوی مخلوط حاصل توسط گیره در داخل محفظه‌ای که به شکل یک استوانه دوجداره از جنس فولاد زنگ‌نزن و مجهز به سیرکولاتور آب ثابت گردید. به این ترتیب دمای مخلوط در حین اعمال صوت با چرخش مداوم آب سرد بین دو جداره در ۱۰ درجه سانتی‌گراد حفظ گردید. برای خنثی نمودن سریع حرارت ایجاد شده در مخلوط در اثر اعمال صوت و اثر مخرب احتمالی آن بر ترکیبات زعفران، درون محفظه با مخلوط آب و یخ پر شد. برای امولسیون‌سازی از دستگاه مولد امواج فراصوت (مدل ۷۵۰VCX، ساخت شرکت Sonics & Materials، آمریکا) استفاده شد. انتقال امواج از مبدل پیزوالکتریک به مخلوط داخل بشر توسط یک سونوترود از جنس تیتانیوم به قطر ۱۹ میلی‌متر که تا عمق ۲ سانتی‌متر زیر سطح مایع غوطه‌ور شده بود انجام گردید. مدت زمان اعمال امواج فراصوت با توجه به آزمایشات مقدماتی انجام شده ۳ دقیقه به صورت مداوم و در حداکثر توان اسمی دستگاه در نظر گرفته شد و در حین این عمل عصاره

خریداری شد. برای تهیه عصاره، کلیه امولسیون‌ها و محلول کنترل آنها از آب دیونیزه استفاده گردید.

تهیه عصاره زعفران

عصاره زعفران به روش Fernandez (2002) تهیه گردید و در ویال‌های شیشه‌ای در بسته تیره رنگ که اطراف آنها نیز با فویل آلومینیوم پوشانده شده بود ریخته شد و در یخچال قرار گرفت تا ظرف مدت حداکثر یک روز مورد استفاده قرار گیرد. عصاره بدست آمده به رنگ قرمز تیره و دارای طعم تلخ، بوی مخصوص زعفران و بریکس ۱۲٪ بود. این عصاره به منظور اندازه‌گیری مقدار کروستین در طول موج ۴۴۰ نانومتر به میزان ۱۰۰۰۰ بار رقیق شد. مقدار جذب کروستین به میزان ۱/۳۴۲ حاصل گردید. این عصاره به همین شکل در تهیه امولسیون‌ها مورد استفاده قرار گرفت. برای تهیه نمونه کنترل (عصاره آبی زعفران) جهت مقایسه با امولسیون‌های آب در روغن، عصاره ۱۵٪ وزنی / وزنی از عصاره اولیه تهیه گردید.

تهیه امولسیون آب در روغن (w/o)

برای پایداری امولسیون w/o اولیه از مخلوط امولسیفایرهای توئین ۸۰ و اسپان ۸۰ در سه سطح ۱۰، ۱۲/۵ و ۱۵ درصد استفاده شد و از آن دکان در سه سطح ۷۰، ۷۲/۵ و ۷۵ درصد به عنوان فاز روغنی استفاده گردید. میزان فاز آبی (عصاره

نمونه مورد آزمایش و کنترل مربوطه (امولسیون آب در روغن فاقد عصاره زعفران) درون سل‌های کوارتز با قطر ۱ سانتی‌متر ریخته شد و جهت سنجش در دستگاه قرار گرفتند. رقیق‌سازی نمونه‌ها با استفاده از سامانه کلونیدی مربوطه انجام گرفت. تمامی امولسیون‌ها به غلظت ۰/۰۱ v/v رسیدند.

بررسی پایداری امولسیون‌ها

۱۰ میلی‌لیتر از نمونه‌های مختلف در شیشه‌های مک‌کارتی در پیچ‌دار ریخته شد و در حالت سکون قرار گرفت. این آزمون در روزهای ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ پس از تولید انجام شد و درصد پایداری از طریق معادله (۲) با تقسیم کردن ارتفاع لایه سرم (HS) به ارتفاع کل امولسیون اولیه (HE) به دست آمد (Sciarini et al., 2009).

$$CI = \frac{HS}{HE} \times 100 \quad \text{معادله (۲)}$$

کلید آزمون‌ها در دو تکرار و در دمای محیط انجام شد.

بررسی پایداری کروسین زعفران در امولسیون

آب در روغن در برابر نور

بدین منظور هر یک از امولسیون‌ها بلافاصله پس از تهیه در ویال‌های شیشه‌ای تیره رنگ در بسته ریخته شدند. ویال‌ها در محفظه‌ای که داخل آن سه لامپ فلورسنت با فاصله ۸ سانتی‌متر از هم

زعفران به صورت قطره‌قطره با سرعت یکنواخت به محتویات بشر اضافه گردید.

تعیین اندازه قطرات امولسیون و شاخص پراکندگی

متوسط قطر و توزیع اندازه قطرات امولسیون به کمک دستگاه انکسار نور لیزر (Malvern مدل Nano - Zeta sizer، انگلیس) اندازه‌گیری شد. قطر متوسط قطرات که با نماد $d_{3,4}$ (قطر حجم به طول) نمایش داده می‌شود با استفاده از معادله (۱) محاسبه گردید.

$$d_{43} = \frac{\sum z_i d_i^4}{\sum z_i d_i^3} \quad \text{معادله (۱)}$$

در معادله مذکور z_i تعداد ذرات با قطر d_i می‌باشد. همچنین شاخص پراکندگی با توجه به منحنی توزیع اندازه قطرات توسط نرم افزار دستگاه محاسبه گردید (Najaf Najafi, et al., 2016). تمامی اندازه‌گیری‌ها در دمای اتاق (۲۵ درجه سانتی‌گراد) و ظرف مدت ۲ ساعت بعد از تهیه امولسیون با سه تکرار انجام شد.

تعیین مقدار کروسین زعفران

تعیین مقدار کروسین بر اساس استاندارد ملی ایران به شماره ۲-۲۵۹ انجام شد. برای این منظور از دستگاه اسپکتروفتومتر UV-VIS (مدل UV-160A ساخت SHIMADZU ژاپن) استفاده شد.

تعبیه شده بودند قرار داده شدند. فاصله سطحی که نمونه‌ها روی آن قرار داشتند تا منبع نور حدود ۳۰ سانتی‌متر بود و در این فاصله شدت نور رسیده به نمونه‌ها ۱۴۴۰ لاکس (Lux) اندازه‌گیری شد. این میزان تقریباً مشابه با شدت نور متوسط آفتاب در نیمه روز می‌باشد. ضمناً از عصاره ۱۵٪ زعفران نیز به عنوان نمونه کنترل در این آزمایش استفاده شد. اندازه‌گیری جذب در روزهای ۰، ۷، ۱۴، ۲۱ و ۲۸ پس از تولید و در دو تکرار صورت گرفت (Anon, 2010).

تجزیه و تحلیل آماری

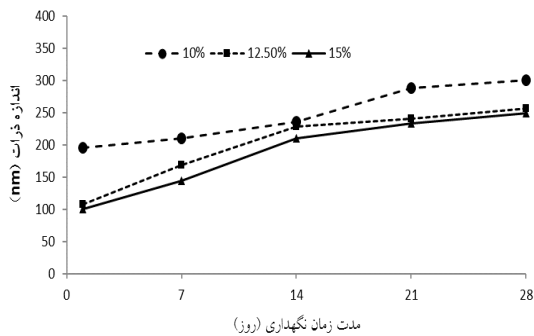
داده‌های بدست آمده از آزمایشات فوق‌الذکر در قالب طرح کاملاً تصادفی با استفاده از آزمایش فاکتوریل و نرم افزار Minitab16 تجزیه و تحلیل گردیدند. برای مقایسه میانگین‌ها از آزمون دانکن در سطح اطمینان ۹۵٪ استفاده شد.

نتایج و بحث

تأثیر غلظت امولسیفایر بر اندازه قطرات و شاخص پراکندگی امولسیون‌ها

نتایج آماری حاکی از این است که اثر مستقل غلظت امولسیفایر و زمان نگهداری بر اندازه قطرات و شاخص پراکندگی در امولسیون‌های آب در روغن معنی‌دار بوده است ($p < 0.05$) (شکل ۱ و جدول ۱). در شکل ۱ تغییرات اندازه قطرات

امولسیون در طول زمان نگهداری برای غلظت‌های مختلف امولسیفایر نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود در تمام امولسیون‌ها اندازه قطرات در طول زمان در حال افزایش است و این روند افزایشی در اندازه قطرات امولسیون حاوی ۱۵٪ سورفاکتانت در انتهای زمان نگهداری، روند کندتری پیدا کرده است که نشان‌دهنده پایداری ترمودینامیکی این امولسیون است. در مورد کاهش قطر قطرات تشکیل‌دهنده امولسیون با افزایش غلظت امولسیفایرهای به‌کار برده شده می‌توان این‌گونه توضیح داد که با افزایش غلظت امولسیفایرها، احتمال پوشش قطرات فاز پراکنده به وسیله امولسیفایرهای مورد استفاده (توئین ۸۰ و اسپان ۸۰) افزایش می‌یابد. در نتیجه قطراتی که در زمان همگن‌سازی با امواج فراصوت کوچک شده‌اند، در غلظت‌های بالاتر امولسیفایرها بهتر پوشش داده می‌شوند. در تأیید این مطلب، Najaf Najafi و همکاران (۲۰۱۶) نشان دادند که با افزایش غلظت امولسیفایر، مولکول‌های آن می‌توانند به میزان بیشتری سطح مشترک آب-روغن را در ذرات پوشش داده و در نتیجه مانع به‌هم پیوستن و افزایش اندازه ذرات شوند. به‌طور کلی، پایداری امولسیون عبارت است از توانایی یک امولسیون در جلوگیری از ایجاد هر گونه تغییر در خصوصیات



شکل ۱- تغییرات اندازه ذرات در غلظت‌های متفاوت امولسیفایر در مدت زمان نگهداری

شاخص پراکندگی معیاری برای تعیین میزان یکنواختی امولسیون می‌باشد و به توزیع اندازه قطرات یک امولسیون بستگی دارد. همان‌گونه که در جدول ۱ مشاهده می‌شود امولسیون حاوی ۱۵٪ سورفاکتانت همواره کمترین میزان شاخص پراکندگی را به نسبت امولسیون‌های دیگر داشته است لذا می‌توان چنین عنوان نمود که با استفاده از این غلظت امولسیفایر امولسیون‌هایی با توزیع اندازه قطرات یکنواخت‌تر تولید گردید. مقدار کمتر از ۰/۱ برای این شاخص نشان می‌دهد که ذرات همگن هستند و بیش از ۰/۳ نشان‌دهنده ناهمگنی ذرات است (Hasan et al., 2014). با توجه به مطالب عنوان شده می‌توان نتیجه گرفت که روش تولید مورد استفاده (امواج فراصوت) و امولسیفایر استفاده شده برای تولید امولسیون پایدار در مقیاس

فیزیکوشیمیایی آن در طول زمان. تهیه یک امولسیون پایدار در طی یک دوره زمانی (روز، هفته، ماه و...)، به وسیله افزودن امولسیفایرها به محیط امولسیون امکان‌پذیر است. در واقع امولسیفایری مؤثر است که کشش بین سطحی را بین سطح روغن و آب به سرعت کاهش داده و قطرات تازه شکل گرفته را در برابر فلوکوله شدن محافظت کند که این عمل محافظت، ابتدا از طریق اثر کشش سطحی دینامیکی (اثر گیس-مارانگونی^۳) و بعد از آن از طریق تعاملات دافعه کلوئیدی (مکانیسم‌های پایداری فضایی و الکترواستاتیک) انجام می‌شود (Dickinson, 2003). در صورتی که یک امولسیفایر مناسب با غلظت مطلوب، به امولسیون افزوده شود لایه قوی و پایداری بر روی سطح قطرات ریز تازه تشکیل شده فاز پراکنده ایجاد شده که این لایه از بروز بهم چسبیدن و یکی شدن قطرات در هنگام برخورد آنها با یکدیگر جلوگیری کرده و عدم ثبات امولسیون را به حداقل می‌رساند (Dickinson, 2009) (شکل ۱).

³ - Gibbs-Marangoni effect

با افزایش میزان امولسیفایر پایداری امولسیون بهبود یافت به طوری که امولسیون حاوی ۱۵٪ امولسیفایر در طول ۲۸ روز نگهداری کاملاً پایدار بود. با افزایش زمان نگهداری به جز در امولسیون حاوی ۱۵٪ امولسیفایر، در بقیه نمونه‌ها پایداری کاهش یافت. عصاره زعفران مورد استفاده در امولسیون‌ها با آب دیونیزه به میزان ۱۵٪ رقیق شد و به عنوان نمونه کنترل مورد استفاده قرار گرفت که پس از دو هفته ته نشین شدن در آن آغاز گردید و در روز بیست و هشتم پس از تولید بعد از امولسیون حاوی ۱۰٪ امولسیفایر کمترین پایداری را از خود نشان داد. اصولاً یکی از مؤلفه‌های مهم در ارزیابی امولسیون‌ها، پایداری است؛ میزان پایداری هر سامانه امولسیونی بستگی زیادی به نوع و مقدار عوامل امولسیون‌کننده، میزان نیروهای بینابینی عمل‌کننده در سطح قطرات فاز پراکنده، اندازه قطرات فاز پراکنده، ویسکوزیته فاز پیوسته و اختلاف چگالی فازهای پراکنده و پیوسته دارد (Dickinson, 2003). معمولاً پایداری امولسیون هنگامی ایجاد می‌شود که امولسیفایرها روی سطح قطرات امولسیون جذب می‌شوند، به طوری که یک بخش کوچک از امولسیفایر در قسمت سطحی قطره روغن و قسمت اعظم ساختمان هیدراته آن در فاز آبی باقی می‌ماند. به این ترتیب، با استقرار

نانو و توزیع اندازه یکنواخت مناسب بوده است. (جدول ۱)

جدول ۱- تأثیر غلظت امولسیفایر بر شاخص بس پاشیدگی امولسیون‌های w/o در مدت زمان نگهداری

زمان نگهداری (روز)	غلظت امولسیفایر (%)		
	۱۵	۱۲/۵	۱۰
۱	۰/۴۶ ± ۰/۰۳۴ ^a	۰/۳۹ ± ۰/۰۰۷ ^b	۰/۲۵ ± ۰/۰۱۴ ^c
۷	۰/۴۷ ± ۰/۰۰۷ ^a	۰/۴۲ ± ۰/۰۱۲ ^b	۰/۳۳ ± ۰/۰۱۵ ^c
۱۴	۰/۴۹ ± ۰/۰۰۷ ^a	^b ۰/۴۶ ± ۰/۰۰۷	۰/۳۶ ± ۰/۰۳۳ ^c
۲۱	۰/۵۳ ± ۰/۰۱۳ ^a	۰/۵۰ ± ۰/۰۰۴ ^b	۰/۴۱ ± ۰/۰۲۱ ^c
۲۸	۰/۵۶ ± ۰/۰۲۲ ^a	۰/۵۲ ± ۰/۰۰۵ ^b	۰/۳۶ ± ۰/۰۱۱ ^c

اعداد دارای حروف مشترک در هر ردیف از لحاظ آماری تفاوت معنی داری با هم ندارند ($p < 0.05$)

تأثیر غلظت امولسیفایر بر پایداری امولسیون‌ها

نتایج مشخص کرد که اثرات متقابل غلظت امولسیفایر و زمان نگهداری بر میزان جذب کروسین در امولسیون آب در روغن معنی دار بوده است (جدول ۲) ($p < 0.05$).

جدول ۲- تأثیر غلظت امولسیفایر بر درصد پایداری امولسیون‌های w/o در طول زمان

زمان نگهداری (روز)	غلظت امولسیفایر (%)			
	کنترل	۱۵	۱۲/۵	۱۰
۱	۱۰۰ ± ۰ ^a	۱۰۰ ± ۰ ^a	۱۰۰ ± ۰ ^a	۱۰۰ ± ۰ ^a
۷	۱۰۰ ± ۰ ^a	۱۰۰ ± ۰ ^a	۹۱/۰۷ ± ۴/۵۳ ^b	۷۸/۴۹ ± ۱۳/۷۷ ^c
۱۴	۹۷/۸۵ ± ۱/۰۱ ^a	۱۰۰ ± ۰ ^a	۸۸/۲۲ ± ۰/۴۹ ^b	۷۳/۸۹ ± ۱۶/۱۱ ^c
۲۱	۸۴/۲۸ ± ۲/۰۲ ^b	۱۰۰ ± ۰ ^a	۸۶/۷۰ ± ۲/۶۳ ^b	۶۶/۲۶ ± ۱۸/۵۸ ^c
۲۸	۷۷/۱۴ ± ۲/۰۲ ^b	۱۰۰ ± ۰ ^a	۸۳/۶۷ ± ۶/۹۲ ^b	۶۳/۲۶ ± ۱۶/۵۶ ^b

اعداد دارای حروف مشترک در هر ردیف از لحاظ آماری تفاوت معنی داری با هم ندارند ($p < 0.05$)

امولسیفایر در سطح مشترک فازها، بین ذرات روغن و فاز آبی اتصال برقرار می‌شود. در ضمن، جذب سطحی ذرات بسیار ریز در سطح مشترک فازهای پراکنده و پیوسته نیز قادر است از طریق ایجاد تعادل انرژی در سطح مشترک فازهای جامد - مایع و مایع - مایع سبب پایدارسازی امولسیون شود (Dickinson, 2009). خیلی ریز بودن اندازه قطرات نانوامولسیون‌ها دلیل دیگری است که موجب می‌شود در طی نگهداری پدیده‌های خامه‌ای شدن و تشکیل رسوب اتفاق نیفتند، زیرا ریز بودن قطرات مانع به هم پیوستگی و فلوکوله شدن سطحی می‌شود. همچنین، به واسطه خیلی ریز بودن قطرات، نانوامولسیون‌ها سطح ویژه زیادی دارند و به همین دلیل قابلیت نفوذ خیلی بالایی دارند که این ویژگی آن‌ها را به یک سامانه انتقالی مؤثر تبدیل کرده است (McClements, 2005) جدول (۲).

تغییرات میزان کروسین امولسیون‌ها در معرض نور

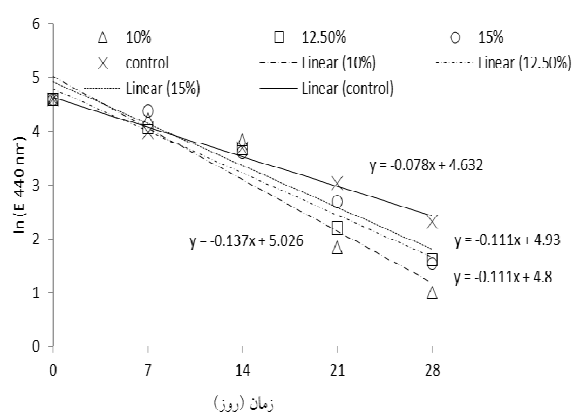
غلظت امولسیفایر و زمان نگهداری بر میزان جذب کروسین در امولسیون‌های زعفران در مقابل نور تأثیر معنی‌داری داشتند ($p < 0.05$) به طوری که نمونه حاوی ۱۵٪ امولسیفایر در طول ۷ روز ابتدایی بیشترین مقاومت را در برابر نور از خود نشان داد و مقدار کروسین در آن حتی از نمونه کنترل هم بالاتر بود (شکل ۲). در همین مدت، نمونه‌های

حاوی ۱۰٪ امولسیفایر، نمونه کنترل و امولسیون حاوی ۱۲/۵٪ امولسیفایر به لحاظ میزان کروسین در رده‌های بعدی قرار داشتند ($p < 0.05$). پس از گذشت یک هفته، سرعت تجزیه کروسین در امولسیون حاوی ۱۵٪ امولسیفایر افزایش یافت. این در حالی بود که کاهش کروسین در نمونه کنترل به استثناء ۷ روز اول، در بقیه مدت نگهداری تقریباً با سرعت و شیب یکنواختی کاهش پیدا کرد. در ۱۴ روز پس از تولید، میزان جذب کروسین در نمونه کنترل و امولسیون حاوی ۱۰٪ امولسیفایر بالاترین مقادیر را داشت که به لحاظ آماری نیز تفاوت معنی‌داری با یکدیگر نداشتند. امولسیون‌های حاوی ۱۲/۵ و ۱۵٪ امولسیفایر از میزان جذب کروسین پایین‌تری در مقایسه با نمونه‌های ذکر شده قبلی برخوردار بودند ($p < 0.05$). در فاصله روزهای ۱۴ تا ۲۱ پس از تولید، امولسیون با ۱۰٪ امولسیفایر بیشترین کاهش کروسین را در بین سایر نمونه‌ها از خود نشان داد به طوری که در پایین‌ترین سطح قرار گرفت. به نظر می‌رسد که تجزیه رنگدانه‌های زعفران در عصاره آبی عمدتاً به دلیل اکسایش باشد. کارتنوئیدهای زعفران مخصوصاً کروسین‌ها به دلیل ساختار غیراشباع به اکسیژن حساس هستند و نور نیز سبب تسریع تخریب اکسایشی آنها می‌شود (Orfanou and Tsimidou, 1995). به علاوه

یافته‌های ترویجی

امروزه تقاضای زیادی برای ترکیبات روغنی رنگی مانند کره، روغن‌های خوراکی و .. وجود دارد. در حال حاضر این امر با استفاده از رنگ‌های سنتزی نظیر کاروتن، بیكسین و تارترازین و .. انجام می‌شود. لذا استفاده از یک رنگ خوراکی طبیعی نظیر زعفران در این ترکیبات می‌تواند ارزشمند باشد به شرطی که بتوان امکان استفاده از آن را با توجه به حساسیت شدیدش نسبت به اکسایش مخصوصاً در مقابل نور فراهم نمود. ضمن اینکه زعفران، دارای اثرات سلامت بخشی است که افزودن آن به فرمولاسیون فرآورده‌های چرب کره و روغن‌های خوراکی و .. می‌تواند تولید فرآورده‌ای فراسودمند نماید. برای دستیابی به این اهداف، امولسیون آب در روغن حاوی عصاره آبی زعفران به شکل موفقیت آمیزی با استفاده از امواج فراصوت تهیه شد و بهترین پایداری را در غلظت ۱۵٪ امولسیفایر به دلیل افزایش پوشاندن قطرات فاز روغن در امولسیون و محدود کردن حرکت آنها طی ۲۸ روز نگهداری نشان داد. یافته‌های این تحقیق مشخص کرد که نور نقش مهمی در پایداری ترکیبات فعال زعفران ایفا می‌نماید و این اثر را معمولاً با تشدید فرآیند اکسایش اعمال می‌کند. با توجه به اینکه بخش اعظم امولسیون‌ها از روغن

گزارش شده است که در معرض نور سفید فلورسنت، D کروستین نوع ترانس در اثر ایزومریزاسیون به نوع سیس تبدیل می‌شود و در نتیجه شدت رنگ عصاره زعفران کاهش می‌یابد (Serrano-Diaz et al., 2011). به طور کلی به نظر می‌رسد که نور، نقش بحرانی در پایداری ترکیبات فعال زعفران ایفا کرده و این اثر را با تشدید اکسایش اعمال می‌کند و با توجه به اینکه بخش اعظم امولسیون‌ها از روغن تشکیل شده است این امر سبب شده تا اکسایش در امولسیون‌ها به نسبت نمونه کنترل شدیدتر بوده و حساسیت آنها به نور نسبت به نمونه کنترل بیشتر باشد. بنابراین جهت حفظ این ترکیبات در حد مطلوب باید از قرار گرفتن آنها در معرض نور جلوگیری کرد (شکل ۲).



شکل ۲- تاثیر غلظت‌های مختلف امولسیفایر بر میزان جذب کروستین (440 nm) در طول زمان در نور

تشکیل شده‌اند لذا امولسیون‌ها با شدت بیشتری اکسید شدند و از حساسیت بالاتری به نور نسبت به نمونه کنترل برخوردار بودند. بنابراین جهت حفظ این ترکیبات و دستیابی به نتیجه مطلوب باید از قرار گرفتن آنها در معرض نور جلوگیری و از پوشش یا بسته‌بندی‌های مناسب نیز استفاده کرد.

همچنین با توجه به خواص منحصر به فرد نانوامولسیون‌ها، ساختار نانوامولسیونی یکی از امیدبخش‌ترین ساختارها برای افزایش ارزش زیستی و عملکردی ترکیبات مؤثره زعفران، می‌تواند باشد. البته لازم به یادآوری است که به‌رغم مزایا و خواص منحصر به فرد نانوامولسیون‌ها، کاربرد آنها در سامانه‌های غذایی هنوز با چالش‌هایی از جمله فرایند تولید، به‌ویژه هزینه، توصیف نانوامولسیون‌های حاصل و نیز پذیرش و سلامت سامانه‌های غذایی که نانوامولسیون‌ها در آنها به‌کار می‌روند، روبه‌رو است. از این‌رو، انجام تحقیقات در زمینه بهینه‌سازی روش‌های تولید، ویژگی، پایدارسازی و امکان کاربرد سامانه‌های نانوامولسیونی در صنایع غذایی یک نیاز ضروری تلقی می‌شود.

Reference

- Alonso, G., Varon, R., Salinas, M., Navarro, F., 1993. Auto-oxidation of crocin and picrocrocin in saffron under different storage conditions. *Bollettino chimico farmaceutico*, 132(4): 116-120.
- Anon., 2010. Spices-Saffron (*Crocus sativus* L.). ISO 3632-2. Part2: Test Methods, International Standard.
- Cormier, F., Dufresene, C., and Dorion, S., 1995. Enhanced crocetinglucosylation by means of maltosyl- β -cyclodextrin encapsulation. *Biotechnology Techniques*, 8:553-556.
- Dickinson, E., 2009. Hydrocolloids as emulsifiers and emulsion stabilizers. *Food Hydrocolloids*, 23:1473-1482.
- Dickinson, E., Radford, S.J., and Golding, M., 2003. Stability and rheology of emulsions containing sodium caseinate: combined effects of ionic calcium and non-ionic surfactant. *Food Hydrocolloids*, 16: 153-160.
- Esmaeili, N., Ebrahimzadeh, H., Abdi, K., and Safarian, S., 2011. Determination of some phenolic compounds in *Crocus sativus* L. corms and its antioxidant activities study. *Pharmacognosy magazine*, 7:74-80.
- Fernandez, G., 2002. Process for obtaining an extract of saffron. US patent. patent no: US 6458399.
- Hasan, M., Belhaj, N., Benachour, H., Barberi-Heyob M., Kahn, C.J.F., Jabbari, E., Linder, M., and Arab-Tehrany, E., 2014. Liposome encapsulation of curcumin: physico-chemical characterizations and effects on MCF7 cancer cell proliferation. *International Journal of pharmaceutics*, 461: 519– 528.
- Herrera, M.L., 2012. Analytical techniques for studying the physical properties of lipid emulsions. Springer briefs in food, health and nutrition.
- Iran National Standard., 2012. Saffron- Test methods, ISIRI NUMBER: 259-2. Iran National Standard Organization. 5st. Revision.
- Kamali, A., Sharayei, P., Niazmand, R., and Eynafshar, S., 2014. Effect of different concentration of maltodextrin and polyvinylpyrrolidone on stability of saffron's effective compounds microencapsulated by spray drying. *Journal of Research and Innovation in Food Science and Technology*, 4(1): 241-254.
- Little, T.M., and Hills, F.J., 1978. Agricultural experimentation design and analysis. New York: John Wiley.
- McClements, D.J., Food emulsion, principles, practices , and techniques. Massachusetts, Amherst. 2 ed ed. CRC press; 2005.
- McClements D.J., 2010. Edible nanoemulsions: fabrication, properties, and functional performance. *The Royal Society of Chemistry* 7: 2297–2316.
- Melynk, J.P., Wang, S., and Marcone, M.F., 2010. Chemical and biological properties of the world's most expensive spice: Saffron. *Food research international*, 43:1981-1989.
- Morimoto, S., Umezaki, Y., Shoyama, Y., Saito, H., Nishi, K., and Irino, N., 1994. Postharvest degradation of carotenoid glucose esters in saffron. *Planta medica*, 60(5): 438- 440.

- Nair, S.C., Varghese, C.D., Panikkar, K.R., Kurumboor, S.K., and Parathod, R.K., 1994. Effect of saffron on the serum vitamin A levels in mice and its antitumor activity. *International Journal of Pharmacology*, 32:105.
- Najaf Najafi, M., 2016. Essential oils nanoemulsions. *Donyaye Nano*, 13: 61-65.
- Najaf Najafi, M., Hosaini, V., Mohammadi-Sani, A., and Koocheki, A., 2016. Physical stability, flow properties and droplets characteristics of Balangu (*Lallemantia royleana*) seed gum/whey protein stabilized submicron emulsions. *Food Hydrocolloids*, 59: 2-8.
- Najaf Najafi, M., Kadkhodae, R., and Mortazavi, S.A., 2011. Effect of Drying Process and Wall Material on the Properties of Encapsulated Cardamom Oil. *Food Biophysics*, 6: 68-76.
- Orfanou, O., and Tsimidou, M., 1995. Influence of selected additives on the stability of saffron pigments in aqueous extract. *Food flavors: Development in food science*. 37: 881.
- Raina, B.L., Agarwal, S.G., Bhatia, A.K., and Gaur, G.S., 1996. Changes in pigments and volatiles of saffron (*Crocus sativus* L.) during processing and storage. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 71(1): 27-32.
- Sánchez-Vioque, R., Rodríguez-Conde, M.F., Reina-Ureña, J.V., Escolano-Tercero, M.A., Herraiz-Peñalver, D., and Santana-Méridas, O., 2012. In vitro antioxidant and metal chelating properties of corm, tepal and leaf from saffron (*Crocus sativus* L.). *Industrial Crops and Products*, 39:149-153
- Sciarini, L.S., Moldonado, F., Ribotta, P.D., Perez, G.T., and Leon, A.E., 2009. Chemical composition and functional properties of Gleditsia triacanthos gum. *Food Hydrocolloids*, 23, 306-313.
- Selim, K., Tsimidou, M., and Biliaderis, C.G., 2000. Kinetic studies of degradation of saffron carotenoids encapsulated in amorphous polymer matrix. *Food Chemistry*, 71:199-206
- Serrano-Diaz, S., Sanchez, A., Maggi, L., Carmona, M.L., and Alonso, G., 2011. Synergic effect of water-soluble components on the coloring strength of saffron spice. *Journal of Food Composition and Analysis*, 24:873-879.
- Tsimidou, M., and Tsatsaroni, E., 1993. Stability of saffron pigments in aqueous extracts. *Journal of Food Science*, 58(5):1073-1075.

Evaluation of physical properties and stability of water-in-oil-nanoemulsions containing saffron extract

M. Najaf Najafi^{1*}, S. Nemati², A. Mohammadi sani³, R. Kadkhodae⁴

1. Associated Professor, Khorasan Razavi Agricultural and Resources Research and Education Center, AREEO, Mashhad, Iran. (Corresponding author)
2. Department of Food Science & Technology, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran
3. Associated Professor, Department of Food Science & Technology, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran
4. Associated Professor, Department of Food Nanotechnology, Research Institute of Food Science & Technology (RIFST), Mashhad, Iran

Received: May 2019

Accepted: October 2019

Abstract

Najaf Najafi, M., Nemati, S., Mohammadi sani, A., Kadkhodae, R. Evaluation of physical properties and stability of water-in-oil-nanoemulsions containing saffron extract.

Iranian Medicinal Plants Technology. Vol 02, No. 02, 2020. Page 02 :12-24(in Persian).

Due to its distinct color, flavor and beneficial compound, the Saffron plant is extensively used in pharmaceutical and food industries, but because of its sensitive nature, its active compounds are lost in adverse environmental conditions. In this research, the preparation of water-in-oil nanoemulsion containing saffron extract was studied as an effective method for maintaining active compounds of saffron. For this purpose, nanoemulsions were synthesized by using span 80 and tween 80 as emulsifiers in three levels of 10, 12.5 and 15 percent, using ultrasound. The amount of aqueous phase (saffron extract with 12% dry matter) was 15% (wt) in all formulations and n-decan used on three levels: 70, 72.5 and 75% as oil phase. Particle size, polydispersity index and stability of each formulation at light conditions during 28 days after production were evaluated. The results showed the particle size and polydispersity index in the emulsion containing 15% emulsifier was less than the other emulsions and did not change in terms of physical stability.

Keywords: Water-in-oil emulsion, Saffron extract, Stability, nanoemulsion.