مجله علوم و صنایع غذایی ایران

سایت مجله: www.fsct.modares.ac.ir

مقاله علمی_پژوهشی

تهیه امولسیون دوگانه پیکرینگ پایدار شده توسط نانوذرات کیتوزان و ارزیابی متغیرهای فرمولاسیون بر پایداری فیزیکی امولسیون‌های حاصل

فاطمه حیدری دلفارد[۱]، سید مهدی جعفری[۲*]، امان محمد ضیایی‌فر[۳*]، نیکلاس آنتون[٤]

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

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

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

٤- دانشیار، گروه نانوپزشکی، دانشکده داروسازی، دانشگاه استراسبورگ، استراسبورگ، فرانسه.

اطلاعات مقاله

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱٤۰۱ /۰۲/۲۰

تاریخ پذیرش: ۱٤۰۱/۰۷/۰٦

کلمات کلیدی:

نانوذره کیتوزان،

امولسیون دوگانه پیکرینگ،

پایداری فیزیکی.

DOI: 10.22034/FSCT.19.130.85

DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.130.8.7

* مسئول مکاتبات:

smjafari@gau.ac.ir

amziziifar@gau.ac.ir

چکیده

امولسیون‌های تثبیت شده توسط نانوذرات خوراکی طی ده سال اخیر توجه محققین زیادی را به خود جلب کرده است. تثبیت حداقل یک سطح مشترک از امولسیون دوگانه با یک لایه از نانوذرات خوراکی در تحقیقات بسیار کمی بررسی شده است. در این پژوهش امولسیون‌های دوگانه پیکرینگ آب در روغن در آب (W/O/W) با استفاده از نانوذرات کیتوزان به عنوان ثبیت کننده فاز آبی خارجی تهیه شدند. طراحی آزمایش‌ها به روش تاگوچی انجام گرفت. تاثیر پارامترهای فرمولاسیون شامل نسبت محتوای فاز آبی داخلی به فاز روغنی، محتوای امولسیون اولیه به فاز آبی خارجی و غلظت نانوذرات کیتوزان بر اندازه قطرات و پایداری امولسیون‌های دوگانه بررسی شد. نتایج نشان داد که غلظت نانوذره با دارا بودن سهم ۳٤/۹۱ درصدی، بیشترین تاثیر را بر اندازه قطرات امولسیون‌هاداشت. تیمار ۵ با داشتن نسبت‌های ۸:۲ فاز آبی داخلی به فاز پیوسته داخلی، ۹:۱ امولسیون اولیه به فاز پیوسته خارجی و غلظت ۰/٦۵ درصد نانوذره کمترین، اندازه قطرات را نسبت به سایر تیمارها داشت. بر اساس نتایج بررسی پایداری، نسبت محتوای امولسیون اولیه به فاز آبی خارجی بیشترین تاثیر را بر پایداری امولسیون‌ها داشت. شاخص خامه‌ای شدن و کوالسنس در تیمارهای ۵ و ۷ بسیار ناچیز بود.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.130.8.7]

[DOI: 10.22034/FSCT.19.130.85]

۱- مقدمه

امولسیون‌های دوگانه[1] یا چندگانه نوعی از سیستم‌های کلوئیدی می‌باشند که در آن یک امولسیون اولیه به صورت قطرات ریز در یک فاز پیوسته پراکنده شده است. به عبارت دیگر، قطرات فاز پراکنده سیستم امولسیونی، خود یک امولسیون هستند [۱]. این نوع امولسیون‌ها معمولاً به شکل آب در روغن در آب (W/O/W) یا روغن در آب در روغن (O/W/O) بوده و دارای دو سطح مشترک می‌باشند. وجود هم‌زمان دو سطح مشترک به این معنی است که دو سورفکتانت با ماهیت متفاوت آب‌دوستی و آب‌گریزی برای پایداری آن‌ها مورد نیاز است [۲].

امولسیون‌های دو یا چندگانه به دلیل کاربردهای بالقوه در زمینه‌های مختلف از جمله صنایع غذایی، آرایشی و دارویی توجه زیادی را به خود جلب کرده و سیستمی ایده‌آل برای محصور کردن ترکیبات زیست فعال آب‌دوست و آب‌گریز با قطبیت‌های مختلف می‌باشند[۱]. هم‌چنین این نوع امولسیون‌ها در صنعت غذا به عنوان ابزاری مناسب برای کاهش محتوای چربی محصولات غذایی بر پایه امولسیونو ریزپوشانی و حفاظت از ترکیبات محلول در آب (مانند مواد مغذی، طعم‌ها، رنگ‌های طبیعی و پروبیوتیک‌ها) که به شدت به شرایط محیطی (دما، نور و غیره) حساس هستند، به‌کار گرفته می‌شوند[۳]. با این حال، دستیابی به فرمولاسیون امولسیون دوگانه با پایداری فیزیکی بلند مدت به دلیل به هم پیوستن قطرات آب در امولسیون اولیه (W/O) و گلبول‌های چربی با یکدیگر (O/W)، انتشار مواد از فاز آبی داخلی به فاز آبی خارجی و همچنین تورم و چروکیدگی قطرات، دشوار است. محدودیت‌های اشاره شده، مدت زمان ماندگاری محصول نهایی را کاهش داده و باعث از بین رفتن ترکیباتزیست فعالریزپوشانی شده می‌گردند [۱،٤].

برای غلبه بر پایداری پایین امولسیون‌های دوگانه تهیه شده با سورفکتانت، امولسیون‌های دوگانه پیکرینگ پایدار شده با ذرات کلوئیدی توجه زیادی را به خود جلب کرده‌اند. ذرات کلوئیدی در امولسیون دوگانه پیکرینگ حداقل جایگزین یک نوع مولکول سورفکتانت می‌شوند تا سطح مشترک یک یا هر دو لایه امولسیون دوگانه را پایدار کنند. از نظر تئوری تجمع ذرات کلوئیدی در سطح مشترک با تشکیل یک فیلم سخت اطراف قطرات، به میزان قابل‌توجهی مانع به هم پیوستن آن‌ها، رسیدگی اوستوالد و در نتیجه پایداری طولانی مدت امولسیون می‌شود[۵]. خصوصیات فیزیکوشیمیایی نانوذرات مانند شکل، اندازه، خاصیت ترشوندگی و بار سطحی نقش مهمی بر پایداری امولسیون دارند [۱]. تحقیقات بسیار محدودی در زمینه پایدارسازی امولسیون‌های دوگانه با ذرات کلوئیدی انجام شده است که در این زمینه می‌توان به تحقیقات انجام شده توسط شیائو و همکاران(۲۰۱۷)، چن و همکاران (۲۰۱۸)، لین و همکاران (۲۰۱۹) که به ترتیب از نانوذرات کفیران، گلیادین گندم و نشاسته کینوا برای پایداری فاز آبی بیرونی و از سورفکتانت‌های مختلف برای پایداری فاز آبی داخلی امولسیون استفاده کردند، اشاره کرد. بررسی نتایج بدست آمده از این مطالعات تاثیر استفاده از نانوذرات به عنوان پایدارکننده در افزایش پایداری پیکرینگ امولسیون‌های تشکیل شده را تایید می‌کند.

کیتوزان، تنها پلی ساکارید کاتیونی در طبیعت، از دی استیله شدن قلیایی کیتین بدست آمده و بعد از سلولز دومین بیوپلیمر فراوان در طبیعتاست. متمایزترین ویژگی‌های کیتوزان زیست تخریب‌پذیری، زیست سازگاری و عدم سمی بودن آن است که آن را به یک پلیمر سبز و مناسب برای استفاده در فرمولاسیون‌های غذایی، دارویی و پزشکی تبدیل می‌کند[٦]. این پلی‌ساکارید کاتیونی دارای گروه‌های آمین و هیدروکسیل آزاد است و در محلول‌های اسیدی حل می‌شود. لازم به ذکر است که خواص فیزیکوشیمیایی محلول‌های کیتوزان را می‌توان با تغییر شرایط محلول، برای مثال pH و غلظت کیتوزان کنترل کرد. استفاده از کیتوزان برای پایدار کردن یا تولید امولسیون توجه زیادی را به خود جلب کرده است. در بیشتر موارد کیتوزان به عنوان پایدارکننده از طریق تشکیل یک کمپلکس بین سطحی با عوامل فعال سطحی جذب شده (مانند سورفکتانت‌های آنیونی یا پروتئین‌ها) یا از طریق افزایش ویسکوزیته عمل می‌کند. تنها تعداد کمی از مقالات ویژگی‌های امولسیون‌کنندگی کیتوزان را به تنهایی بدون اصلاح عوامل

1. Double emulsion

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.130.8.7]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.130.85]

آب‌گریز یا بدون ترکیب با دیگر عوامل فعال سطحی توصیف می‌کنند[۷].

پس از برخی اصلاحات در ساختار کیتوزان، می‌توان آن را به ماده موثری برای تولید نانوذرات با مزایای تکنولوژیکی تبدیل کرد. میکرو و نانوذرات کیتوزان به روش‌های مختلفی تولید می‌شوند.دو روش پروتون‌زدایی و ژل شدن یونی به دلیل پیچیدگی کم و عدم نیاز به استفاده از نیروهای برشی بالا تکنیک‌های سودمندی برای تولید آن به شمار می‌روند. در روش پروتون‌زدایی[۲]، هنگامی که بارهای کاتیونی کیتوزان توسط عوامل آنیونی مانند سدیم هیدروکسید، تحت اثر هم زدن، خنثی می‌شوند، نانو ذرات با خودآرایی تشکیل می‌شوند[۸]. مطالعات زیادی استفاده از ذرات کیتوزان را برای پایدارسازی سیستم‌های غذایی حاوی لیپیدها یا ترکیبات چربی‌دوستاز جمله کورکومین، توکوتری‌انول، روغن ذرت، روغن نخل و غیره گزارش کرده اند. با این وجود اطلاعات کمی در مورد عملکرد نانوذرات کیتوزان در ساختار امولسیون‌های دوگانه پیکرینگ وجود دارد. بنابراین این مطالعه با هدف آماده‌سازی نانوذرات کیتوزان با روش پروتون‌زدایی و سپس استفاده از این نانوذرات برای پایدارسازی امولسیون W/O/W با استفاده از مکانیسم پیکرینگ انجام شد. همچنین در پژوهش حاضر، تاثیر شرایط عملیاتی مختلف بر پایداری امولسیون‌های تشکیل شده مورد مطالعه قرار گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

در این پژوهش کیتوزان با وزن مولکولی پایین (درجه داستیلاسیون بین ۷۵ تا ۸۵٪) از شرکت سیگما آلدریچ، پلی گلیسرول پلی رسینولئات از شرکت دنیسکو دانمارک، اسید استیک و سدیم هیدروکسید از شرکت مرک آلمان خریداری شدند. روغن آفتابگردان نیز از فروشگاه محلی تهیه شد. برای حذف رسوبات و مواد حل نشده از فیلتر سرنگی ۰/۴۵ میکرومتر استفاده شد.

2. Deprotonation

۲-۲- تولید نانوذرات کیتوزان

نانوذرات با استفاده از روش پروتون‌زدایی گروه‌های آمین در واحدهای گلوکزآمین، مطابق با روش ارائه شده توسط وی و همکاران (۲۰۱۲) با اندکی تغییرات تهیه شدند. ابتدا محلول‌های کیتوزان در غلظت‌های مختلف با افزودن پودر کیتوزان به محلول اسیداستیک ۱ درصد حجمی/حجمی تحت شرایط همزدن ملایم توسط همزن مغناطیسی (مدل MS-11C ساخت کشور آلمان) به مدت ۲۴ ساعت در دمای اتاق، برای انحلال کامل، تهیه شدند. محلول‌های حاصل از فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر به منظور حذف ناخالصی‌ها عبور داده شدند. به منظور تشکیل نانوذرات، pH محلول کیتوزان با افزودن سدیم هیدروکسید ۰/۵ مولار به صورت قطره قطره تا زمان تشکیل سوسپانسیون شیری رنگ، افزایش یافت. در این شرایط، مقدار pH ۶/۴ ثبت شد. نانوذرات حاصل، قبل از استفاده برای تهیه امولسیون، در دمای اتاق نگه داری شدند.

۲-۳- تعیین مورفولوژی و اندازه ذرات

مورفولوژی و اندازه نانوذرات با استفاده از میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FESEM) تعیین شد.

۲-۴- پتانسیل زتا

از زتاسایزر (شرکت Malvern Instruments، مدل MAL1001767، ساخت انگلیس)برای بررسی پتانسیل زتای سوسپانسیون نانوذرات کیتوزان استفاده شد.

۲-۵-تهیه امولسیون‌های دوگانه پیکرینگ

امولسیون‌های دوگانه پیکرینگ به شکل W/O/W و به روش دو مرحله‌ای مطاب در مرحله اول امولسیون آب در روغن با پراکنده کردن محلول آبی در فاز روغن حاوی PGPR[۳]، با استفاده از هموژنایزر اولتراتراکس (مدل Heiodolfh ساخت کشورآلمان) در ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۵ دقیقه تشکیل شد.در مرحله دوم، امولسیون اولیه تولیدی به فاز آبی خارجی حاوی نانوذرات کیتوزان افزوده و سپس توسط هموژنایزر با سرعت۱۰۰۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه هموژن گردید تا امولسیون دوگانه پیکرینگ تشکیل شود.طبق جدول ۱ تشکیل شدند.

3 .Poly Glycerol Poly Ricinoleate

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.130.8.7]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.130.85]

Table 1 Experiment design performed by Taguchi.

Treatment \ Variable	Water/oil	Water/oil to external aqueous phase	Nanoparticle concentration (%)
1	1:9	1:9	0.5
2	1:9	2:8	0.65
3	1:9	3:7	0.8
4	1:9	4:6	0.95
5	2:8	1:9	0.65
6	2:8	2:8	0.5
7	2:8	3:7	0.95
8	2:8	4:6	0.8
9	3:7	1:9	0.8
10	3:7	2:8	0.95
11	3:7	3:7	0.5
12	3:7	4:6	0.65
13	4:6	1:9	0.95
14	4:6	2:8	0.8
15	4:6	3:7	0.65
16	4:6	4:6	0.5

۲-٦- بررسی اندازه قطرات امولسیون دوگانه پیکرینگ

به منظور بررسی اندازه قطرات امولسیون‌های تهیه شده از دستگاه پراش نور دینامیک (مدل Malvern Instruments Worcestershire،ساخت کشور انگلیس) و تصاویر گرفته شده توسط میکروسکوپ نوری استفاده شد.

۲-۷-اندازه‌گیری پایداری امولسیون

پایداری امولسیون‌ها در برابر دوفاز شدن و کوالسنس[4] به ترتیب توسط اندازه‌گیری شاخص خامه‌ای شدن (معادله ۱) و اندازه قطرات در طول سه هفته نگه‌داری در دمای محیط، بررسی شد.

$$CI\%=Hc/\ Ht \times 100\%$$

CI، H_c و H_t به ترتیب شاخص خامه‌ای شدن، ارتفاع خامه‌ای شدن و ارتفاع کل امولسیون می‌باشند[۱۰].

۲-۸-مشاهده مورفولوژی امولسیون

جهت بررسی ساختار قطرات امولسیون از میکروسکوپ نوری استفاده شد. تصویرها در بزرگ‌نمایی ×٤٠ گرفته شدند.

۲-۹- آنالیز آماری

در این پژوهش تأثیر متغیرهای مستقل شامل درصد غلظت نانوذره، نسبت محتوای آب به روغن در امولسیون اولیه و نسبت امولسیون اولیه به فاز آبی خارجی بر اندازه قطرات و پایداری فیزیکی امولسیون‌ها بررسی گردید. آزمایش‌ها بهکمک روش تاگوچی و با نرم افزار Minitab 16طراحی شدند. تجزیه و تحلیل داده‌های بدست آمده به وسیله نرم افزار Qualitek 4 انجام گرفت.

۳- نتایج و بحث

۳-۱-خصوصیات نانوذرات

در مطالعه حاضر نانوذرات کیتوزان تولید شده با روش پروتون‌زدایی به عنوان پایدارکننده در دومین سطح مشترک امولسیون دوگانه بکار گرفته شدند. مطالعات قبلی در مورد نانوذرات تولید شده با این روش نشان دادند که حضور گروه‌های آمین در ساختار کیتوزان، کیتوزان را به یک پلیمر پاسخگو به pH تبدیل کرده است[٦]. کیتوزان در محلول اسیداستیک با pH تقریبی ۳ حل شده و آمین‌های کیتوزان پروتونه شدند؛ سپس مقدار pH با افزودن سدیم

[4] coalescence

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.130.8.7]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.130.85]

هیدروکسیدتا ٦/٤ افزایش پیدا کرد و گروه‌های آمین پروتون از دست دادند؛ در نتیجه نانوذرات کیتوزان تشکیل شدند. نتایج FESEM نانوذرات، بیانگر یک ساختار هموژن و تقریباً کروی می‌باشد. همچنین نتایج اندازه ذرات، متوسط اندازه ۲۷ نانومتر را نشان داد. اندازه نانوذرات در مطالعه حاضر کوچکتر از چیزی بود که توسط وی و همکاران (۲۰۱۲) و داماک و همکاران (۲۰۱۸) گزارش شد که به ترتیب حدود ۵۰ و ۳۸ نانومتر بودند. قابل ذکر است که پایداری سوسپانسیون ذرات، علاوه بر اندازه، به بار سطحی ذرات معلق نیز بستگی دارد. هنگامی که دافعه الکتروستاتیک در مقادیر بالاتر پتانسیل زتا اتفاق می افتد، سوسپانسیون پایدارتر است [۱۱]. بار سطحی اندازه‌گیری شده توسط زتاسایزر برای نانوذرات کیتوزان حاصل، ۲۰/٤ میلی‌ولت ثبت شد که تقریبا مشابه با نتایج گزارش شده توسط ریبریو و همکاران (۲۰۲۰) بود (۱۸ میلی‌ولت).

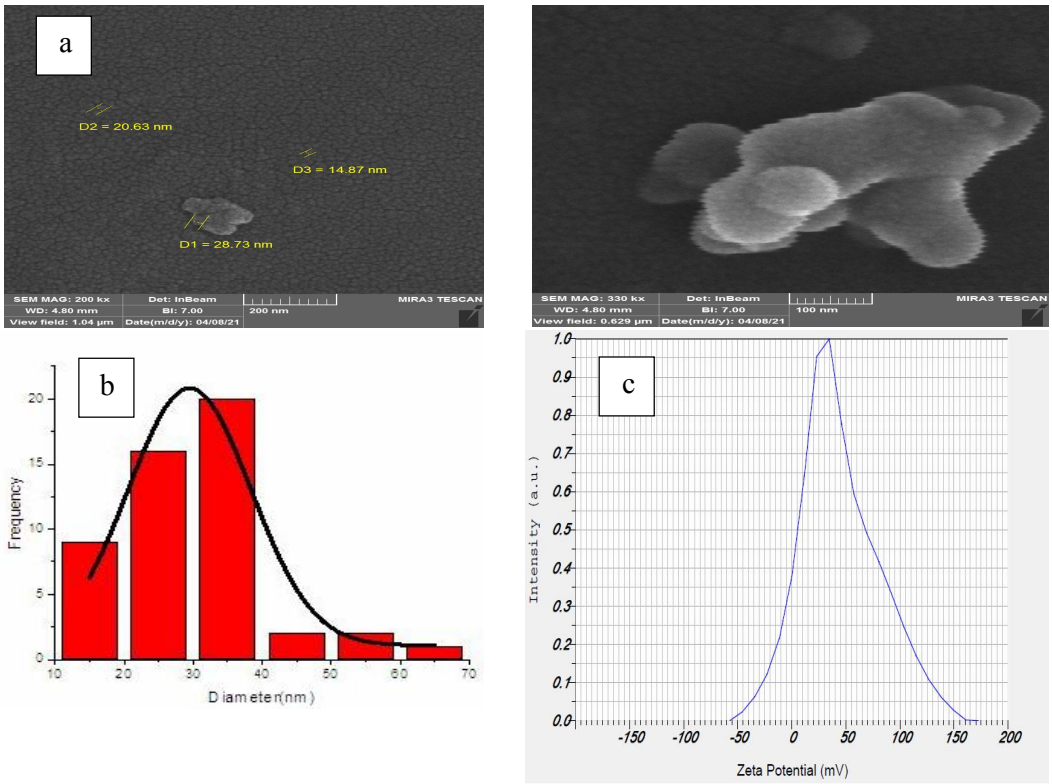

Fig 1 Properties of chitosan NPs. a. FESEM image. b. Chitosan NPs size distribution analysis (nm). c. ZP (mV).

۳-۲-بررسی خصوصیات امولسیون‌های دوگانه

در این پژوهش تأثیر نسبت فاز آبی داخلی به فاز پیوسته داخلی، امولسیون اولیه به فاز پیوسته خارجی و غلظت نانوذرات بر خصوصیات فیزیکی (اندازه قطرات، پایداری و مورفولوژی) امولسیون‌های دوگانه پیکرینگ مورد بررسی قرار گرفت.

۳-۲-۱- اندازه قطرات امولسیون دوگانه

اندازه قطرات امولسیون‌ها در محدوده ۲ تا ۱۲٤ میکرومتر اندازه‌گیری شد (شکل ۲).

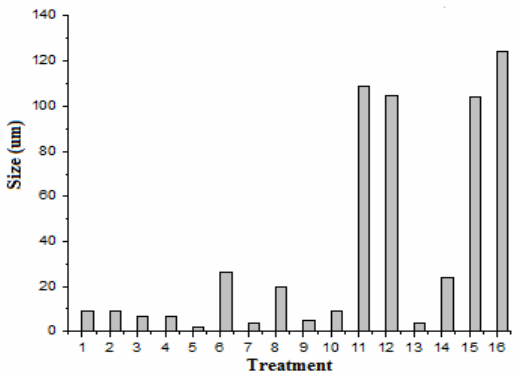

Fig 2 Mean droplet size of emulsions for different treatments.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.130.8.7]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.130.85]

تیمار شماره ۵ با داشتن نسبت‌های۸:۲ فاز آبی داخلی به فاز پیوسته داخلی، ۹:۱ امولسیون اولیه به فاز پیوسته خارجی و غلظت ۰/٦٥ درصد نانوذره دارای کمترین اندازه قطرات بود و تیمار شماره ١٦ با نسبت‌های ٦:٤ فاز آبی داخلی به فاز پیوسته داخلی، ٦:٤ امولسیون اولیه به فاز پیوسته خارجی و غلظت ۰/۵ درصد نانوذره بیشترین اندازه قطرات را نشان داد.

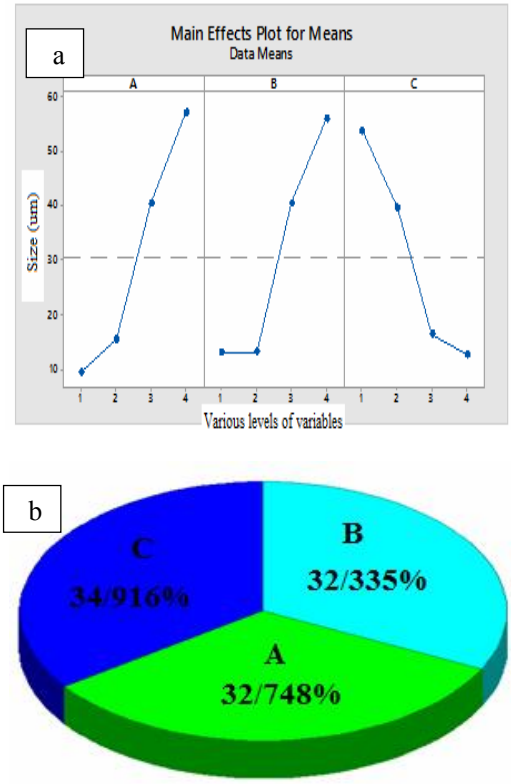

Fig 3 Mean droplet size. a. Effects of different variables and their levels on Mean droplet size. b. Severity index of independent factors on Mean droplet size of Pickering double emulsion (the ratio of internal aqueous phase content to the oil phase (A), initial emulsion content to external aqueous phase (B), and chitosan nanoparticle concentration(%) (C)).

شکل ۳a، تاثیر سطوح مختلف متغیرهای مستقل را در روند تغییر اندازه قطرات امولسیون‌های دوگانه پیکرینگ نشان می‌دهد. همان‌طور که مشاهده می‌شود، با افزایش نسبت فاز آبی داخلی به فاز پیوسته بیرونی اندازه قطرات افزایش پیدا کرد. افزایش اندازه قطرات در سطوح ۷:۳ و ٦:٤ چشمگیرتر بود. خادم و همکاران (۲۰۱۹) نیز گزارش کردند با افزایش نسبت فاز آبی داخلی، اندازه قطرات امولسیون‌های دوگانه افزایش می‌یابد. همچنینبا افزایش نسبت امولسیون اولیه به فاز پیوسته بیرونی اندازه قطرات افزایش یافت. این افزایش با تغییر نسبت از ۸:۲به ۷:۳بیشتر بود. درحالی‌که، افزایش غلظت نانوذره موجب کاهش اندازه قطرات شد. با افزایش غلظت نانوذره، سطح بیشتری از قطرات توسط نانوذرات احاطه شده و با کاهش کشش سطحی ذرات، کوالسنس قطرات اتفاق نمی‌افتد و در نتیجه اندازه قطرات امولسیون کاهش پیدا می‌کند[۱۰].

لیل و همکاران (۲۰۱۸) نیز نشان دادند افزایش غلظت نانوذره نشاسته باعث کاهش اندازه قطرات امولسیون می‌شود. نتایج حاصل از اندازه‌گیری‌های فوق نشان داد که تمام متغیرهای مستقل بر اندازه قطرات امولسیون موثر هستند (شکل ۳b). با توجه به شکل ۳b مشخص می‌شود که غلظت نانوذره کیتوزان و نسبت محتوای آب داخلی به فاز پیوسته داخلی به ترتیب بیشترین و کمترین اثر را در اندازه قطرات دارند.

۳-۲-۲- پایداری امولسیون دوگانه

بعد از تشکیل امولسیون پیکرینگ، بررسی پایداری بسیار مهم است؛ زیرا تاییدکننده عملکرد نانوذرات کیتوزان به عنوان پایدارکننده می‌باشد. این پارامتر را می‌توان بر اساس میزان کوالسنس قطرات و یا خامه‌ای شدن امولسیون ارزیابی کرد [۱۱]. با توجه به اینکه پدیده خامه‌ای شدن عمدتاً قبل از کوالسنس اتفاق می‌افتد؛ پایداری امولسیون در درجه اول با اندازه‌گیری شاخص خامه‌ای شدن در حین نگهداری، برای بدست آوردن پایدارترین امولسیون در برابر خامه‌ای شدن، به صورت بصری ارزیابی شد. شاخص خامه‌ای شدن امولسیون‌ها در محدوده‌ی ۰ تا ٤۰/۵ درصد بعد از سه هفته نگهداری بدست آمد (شکل ٤).

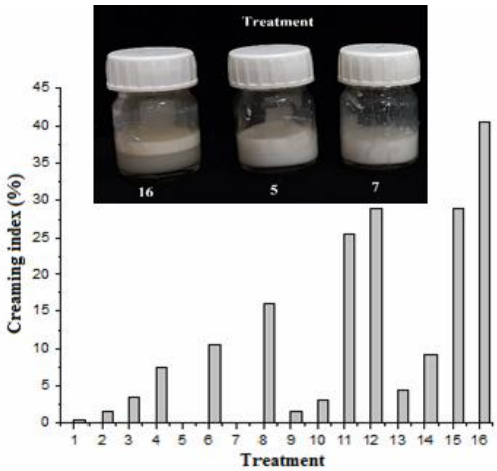

Fig 4 Creaming index of Pickering double emulsion(after 21 days).

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.130.8.7]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.130.85]

تیمارهای ۵ و ۷ (به ترتیب نسبت‌های ۸:۲ فاز آبی داخلی به فاز پیوسته داخلی، ۹:۱ امولسیون اولیه به فاز پیوسته خارجی و غلظت ۰/۶۵ درصد نانوذرهو نسبت‌های ۸:۲ فاز آبی داخلی به فاز پیوسته داخلی، ۷:۳ امولسیون اولیه به فاز پیوسته خارجی و غلظت ۰/۹۵ درصد نانوذره)کمترین وتیمار ۱۶ (نسبت‌های ۶:۴ فاز آبی داخلی به فاز پیوسته داخلی، ۶:۴ امولسیون اولیه به فاز پیوسته خارجی و غلظت ۰/۵ درصد نانوذره) بیشترین شاخص خامه‌ای شدن را داشتند.

بررسی نتایج نشان می‌دهد که تمامی متغیرها بر شاخص خامه‌ای شدن امولسیون‌ها مؤثر می‌باشند (شکل ۵b).

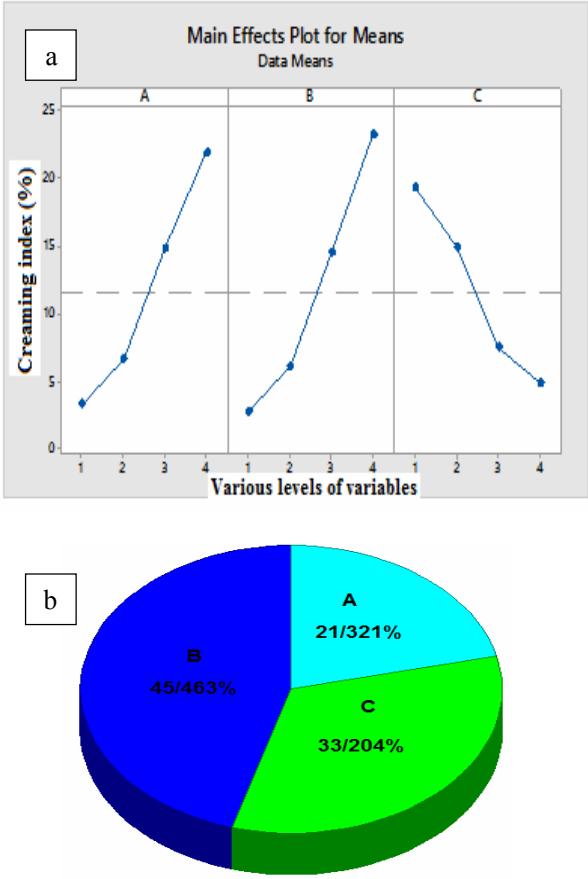

Fig 5 Creaming index. a. Effects of different variables and their levels on Creaming index. b. Severity index of independent factors on Creaming index of Pickering double emulsion (the ratio of internal aqueous phase content to the oil phase (A), initial emulsion content to external aqueous phase (B), and chitosan nanoparticle concentration (%) (C)).

نسبت امولسیون اولیه به فاز آبی خارجی نسبت به سایر متغیرها تاثیر بیشتری (۴۵٪/۴۶٪) در تعیین شاخص خامه‌ای شدن دارد. همان‌طور که در شکل ۵a نشان داده شده است، با افزایش نسبت فاز پراکنده داخلی به فاز پیوسته داخلی میزان خامه‌ای شدن به طور پیوسته افزایش می‌یابد. هنگامی که نسبت حجمی امولسیون اولیه به فاز پیوسته خارجی برابر با ۷:۳ باشد، شاخص خامه‌ای شدن به شدت افزایش می‌یابد. نانوذرات در فاز آبی خارجی نمی‌توانند پوشش کافی بر روی قطرات ایجاد کنند، بنابراین اکثر قطرات امولسیون پس از تشکیل شدن از بین می‌روند[۱۲]. با افزایش غلظت نانوذره، شاخص خامه‌ای شدن کاهش می‌یابد و در امولسیون‌های تشکیل شده با غلظت ۰/۸ درصد نانوذره، شاخص خامه‌ای شدن با شیب تندتری کاهش یافت. تیمار ۱۳ نسبت به تیمارهای ۴، ۷ و ۱۰ با وجود داشتن غلظت نانوذره یکسان، شاخص خامه‌ای شدن بالاتری را نشان داد که می‌تواند ناشی از نسبت پایین امولسیون اولیه به فاز پیوسته خارجی باشد که منجر به افزایش پوشش بین سطحی با افزایش غلظت نانوذره کیتوزان می‌شود. علاوه بر این جذب سطحی ذرات بر روی سطح قطرات، چگالی موثر قطرات را افزایش داده و در نتیجه اختلاف چگالی بین قطرات و فاز پیوسته را به حداقل می‌رساند [۱۳و۱۴]. این نتایج با یافته‌های حاصل از تحقیقات لین و همکاران (۲۰۲۰) مطابقت داشت. آن‌ها بیان کردند با افزایش غلظت نانوذره نشاسته کینوا از ۱ به ۶ درصد شاخص خامه‌ای شدن افزایش می‌یابد.

شکل ۶ توزیع اندازه قطرات امولسیون را بعد از یک ماه نگهداری نشان می‌دهد.

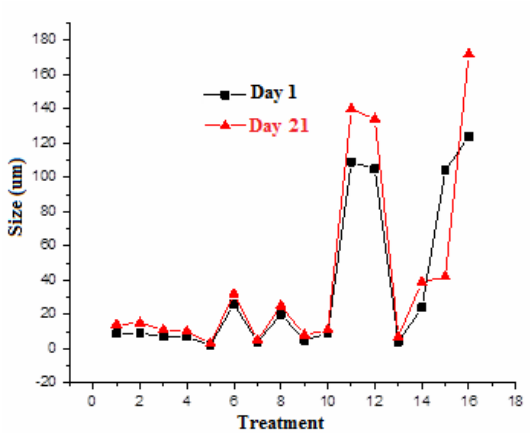

Fig 6 average droplet size of Pickering double emulsion after 3 weeks at room temperature.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.130.8.7]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.130.85]

در راستای نتایج شاخص خامه‌ای شدن، تیمارهای۵و ۷ کمترین و تیمار ۱۶ بیشترین میزان کوالسنس را در طول سه هفته نگهداری داشتند. نتایج حاصل از پژوهش‌های لین و همکاران (۲۰۲۰)، شیائو و همکاران (۲۰۱۷) و جیا و همکاران (۲۰۱۵) نشان داد اختلاف فشار اسمزی بین دو فاز آبی داخلی و خارجی منجر به انتشار آب از فاز آبی خارجی به فاز آبی داخلیدر طول نگهداری می‌شود. اما اندازه قطرات در تیمار ۱۵ کاهش پیدا کرد. کاهش اندازه قطرات می‌تواند ناشی از کوالسنس شدید و در نهایت ترکیدن قطرات و تشکیل قطرات کوچکتر باشد. به‌طور مشابه، خادم و همکاران (۲۰۱۹) بیان کردند اندازه قطرات بین یک تا دو هفته به حداکثر خود رسیده، سپس شروع به کاهش کرد.

۳-۲-۳-ساختار و مورفولوژی امولسیون‌های دوگانه پیکرینگ

تصاویر میکروسکوپ نوری تیمارهای ۱، ۹، ۱۱ و ۱۵ در روزهای اول و بیست و یکم نگهداری، برای بررسی تغییرات ساختار و مورفولوژی امولسیون‌ها، در شکل ۷ نشان داده شده است.

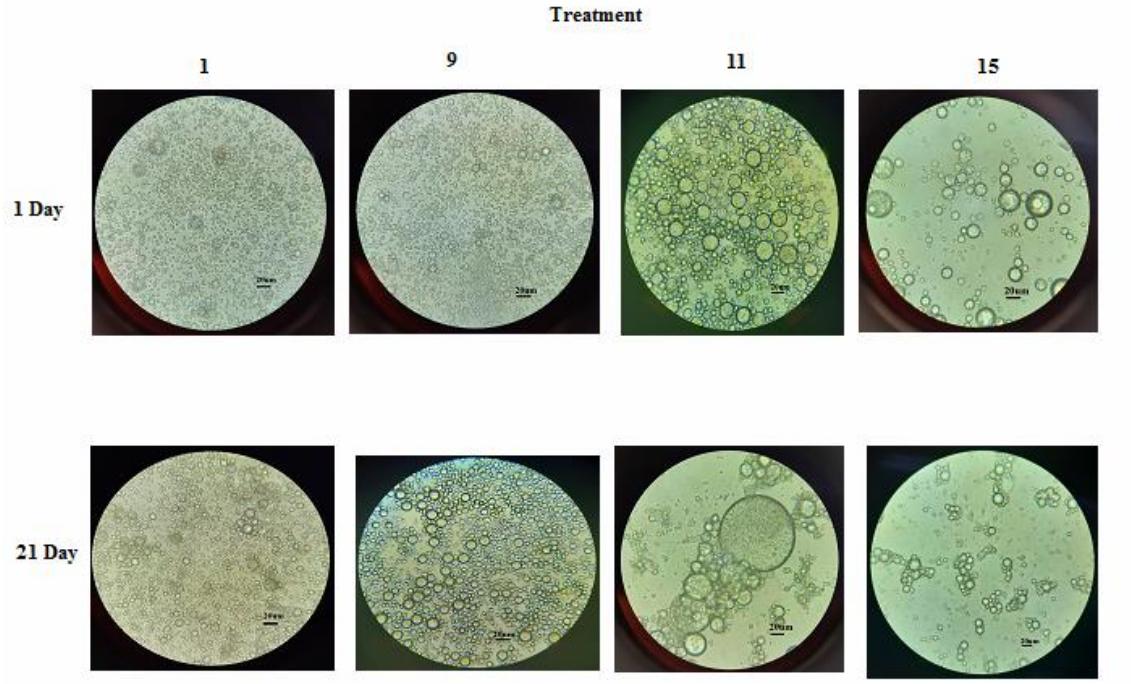

Fig 7 Optical microscope images of Pickering double emulsionsfor different treatments (Scale bars of 20 µm).

در روز اول، دقیقاً بعد از تهیه امولسیون‌ها، هم قطرات داخلی و هم قطرات خارجی به وضوح دیده می‌شوند و شکل قطرات کروی است.قطرات تیمار ۱، در روز بیست و یکم نسبت به روز اول از نظر مورفولوژی و اندازه تغییر محسوسی نداشتند. در تیمارهای ۹ و ۱۱ مشاهده می‌شود که قطرات داخلی و خارجی به طور محسوسی متورم و غیر یکنواخت شده‌اند. در تیمار شماره ۹، تورم ناشی از کوالسنس قطرات داخلی است. افزایش نسبت فاز آبی داخلی به فاز روغن منجر به تشکیل قطرات داخلی با اندازه بزرگتر می‌شود. در نتیجه مقدار PGPR برای پوشاندن قطرات داخلی ناکافی بوده و کوالسنس بین قطرات داخلی اتفاق می‌افتد و متعاقباًاندزه قطرات بیرونی افزایش می‌یابد[۱۵].همانطور که مشاهده می‌شود، تعداد قطرات بیرونی در تیمار ۱۱ کاهش پیدا کرده است.به نظر می‌رسد غلظت نانوذره برای پوشاندن قطرات خارجی کافی نبوده است و سطح قطرات خارجی به طور کامل توسط نانوذرات پوشش داده نمی‌شود؛ بنابراین قطرات خارجی با هم ادغام شده و قطرات بزرگتری تشکیل می‌شود. علاوه بر این در این تیمار کوالسنس قطرات داخلی نیز به دلیل عدم پوشش کافی قطرات داخلی توسط PGPR اتفاق می‌افتد. پیامد کوالسنس قطرات داخلی و خارجی در این تیمار، ناپایداری امولسیون دوگانه است[۱۶-۱۷]. اما در تیمار ۱۵، قطرات شکسته شده و اندازه آن‌ها به میزان قابل توجهی کاهش یافته است. قطرات خارجی

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.130.8.7]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.130.85]

به دلیل کوالسنس قطرات داخلی به حداکثر ظرفیت تورم رسیده، در نتیجه شکسته و به قطرات کوچکتری تبدیل می-شوند. همچنین در اثر شکستن قطرات خارجی، قطرات داخلی به فاز آب خارجی انتشار پیدا می‌کنند.در نتیجه، قطرات خارجی حاصل فاقد قطرات داخلی بوده و در کنار یکدیگر تجمع می‌یابند. شیائو و همکاران (۲۰۱۷) به نتایج مشابهی در امولسیون‌های دوگانه پیکرینگ پایدار شده با نانوذرات کفیران دست یافتند. آن‌ها بیان کردند که تغییر نسبت فاز آبی داخلی به فاز روغنی از ۷:۳ به٦:٤ منجر به تورم و در نهایت فروپاشی امولسیون‌ها می‌گردد.

٤- نتیجه‌گیری

استراتژی تولید امولسیون‌های دوگانه پیکرینگ پایدار شده توسط نانوذرات با گرید خوراکی موضوعی جالب در زمینه ساخت امولسیون بدون استفاده از سورفکتانت سنتزی و ریزپوشانی ترکیبات زیست فعال است. این استراتژی به طور گسترده در صنعت غذا و دارو توجه محققین را به خود جلب کرده است. در این مطالعه، نانوذرات کیتوزان سنتز شده و کاربرد آن‌ها به عنوان پایدارکننده فاز آبی بیرونی امولسیون‌های دو گانه پیکرینگ مورد بررسی قرار گرفت. هم‌چنین تاثیر نسبت فاز آب داخلی به فاز روغنی، غلظت نانوذره و نسبت امولسیون اولیه به فاز آبی خارجی بر پایداری امولسیون‌های تهیه شده بررسی شد. نتایج بدست آمده، امکان تولید امولسیون دوگانه پیکرینگ پایدار را با استفاده از نانوذرات کیتوزان نشان داد. افزایش نسبت فاز آبی داخلی به روغن و نسبت امولسیون اولیه به فاز پیوسته خارجی منجر به افزایش اندازه قطرات و کاهش پایداری امولسیون می‌شود. در حالی‌که با افزایش غلظت نانوذرات، اندازه قطرات کاهش یافته و پایداری امولسیون افزایش می‌یابد. غلظت نانوذره نسبت امولسیون اولیه به فاز آبی بیرونی به ترتیب بیشترین تاثیر را در اندازه قطرات امولسیون و شاخص خامه‌ای شدن امولسیون‌ها در طول نگهداری داشتند.

٥- تشکر و قدردانی

بر خود لازم می‌دانیم از صندوق حمایت از پژوهشگران و فناوران کشور (INSF) به جهت حمایت‌های مادی تشکر وقدردانی نماییم (این اثر تحت حمایت مادی صندوق حمایتاز پژوهشگران و فناوران کشور برگرفته شده از طرح شماره ٤٠٠١٠٠٤ انجام شده است).

٦- منابع

[1] Heidari, F., Jafari, S. M., Ziaiifar, A. M., &Malekjani, N. (2022). Stability and release mechanisms of double emulsions loaded with bioactive compounds; a critical review. *Advances in Colloid and Interface Science*, *299*, 102567.

[2] Schuch, A., Wrenger, J., &Schuchmann, H. P. (2014). Production of W/O/W double emulsions. Part II: Influence of emulsification device on release of water by coalescence. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *461*, 344-351.

[3] Lin, X., Li, S., Yin, J., Chang, F., Wang, C., He, X., ... & Zhang, B. (2020). Anthocyanin-loaded double Pickering emulsion stabilized by octenylsuccinate quinoa starch: Preparation, stability and in vitro gastrointestinal digestion. *International Journal of Biological Macromolecules*, *152*, 1233-1241.

[4] Khadem, B., Khellaf, M., &Sheibat-Othman, N. (2020). Investigating swelling-breakdown in double emulsions. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, *585*, 124181.

[5] Heidari, F., Jafari, S. M., Ziaiifar, A. M., & Anton, N. (2022). Preparation of Pickering Emulsions Stabilized by Modified Silica Nanoparticles via the Taguchi Approach. *Pharmaceutics*, *14*(8), 1561.

[6] Dammak, I., & do Amaral Sobral, P. J. (2018). Formulation optimization of lecithin-enhanced pickering emulsions stabilized by chitosan nanoparticles for hesperidin encapsulation. *Journal of Food Engineering*, *229*, 2-11. [9]

[7] Wang, X. Y., &Heuzey, M. C. (2016). Chitosan-based conventional and Pickering emulsions with long-term stability. *Langmuir*, *32*(4), 929-936.

[8]Ribeiro, E. F., de Barros-Alexandrino, T. T., Assis, O. B. G., Junior, A. C., Quiles, A., Hernando, I., & Nicoletti, V. R. (2020). Chitosan and crosslinked chitosan nanoparticles: Synthesis, characterization and their role as Pickering emulsifiers. *Carbohydrate Polymers*, *250*, 116878.

[9] Wei, Z., Wang, C., Zou, S., Liu, H., & Tong, Z. (2012). Chitosan nanoparticles as

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]

[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.130.8.7]

[DOI: 10.22034/FSCT.19.130.85]

particular emulsifier for preparation of novel pH-responsive Pickering emulsions and PLGA microcapsules. *Polymer*, *53*(6), 1229-1235.

[10] heidaridalfard, F., Ziaiifar, A., Jafari, S., Anton, N. (2021). Investigating the effect of nanoparticle concentration and oil content on the physical stability of Pickering emulsion stabilized by chitosan nanoparticles. *Innovative Food Technologies*, 9(2), 167-179.

[11] Hu, Y. Q., Yin, S. W., Zhu, J. H., Qi, J. R., Guo, J., Wu, L. Y., ... & Yang, X. Q. (2016). Fabrication and characterization of novel Pickering emulsions and Pickering high internal emulsions stabilized by gliadin colloidal particles. *Food Hydrocolloids*, *61*, 300-310.

[12] Xiao, J., Lu, X., & Huang, Q. (2017). Double emulsion derived from kafirin nanoparticles stabilized Pickering emulsion: Fabrication, microstructure, stability and in vitro digestion profile. *Food Hydrocolloids*, *62*, 230-238.

[13] Song, X., Pei, Y., Qiao, M., Ma, F., Ren, H., & Zhao, Q. (2015). Preparation and characterizations of Pickering emulsions stabilized by hydrophobic starch particles. *Food Hydrocolloids*, *45*, 256-263.

[14] Jia, X., Xu, R., Shen, W., Xie, M., Abid, M., Jabbar, S., ... & Wu, T. (2015). Stabilizing oil-in-water emulsion with amorphous cellulose. *Food Hydrocolloids*, *43*, 275-282.

[15] Ma, L., Wan, Z., & Yang, X. (2017). Multiple water-in-oil-in-water emulsion gels based on self-assembled saponin fibrillar network for photosensitive cargo protection. *Journal of agricultural and food chemistry*, *65*(44), 9735-9743.

[16] Mwangi, W. W., Ho, K. W., Ooi, C. W., Tey, B. T., & Chan, E. S. (2016). Facile method for forming ionically cross-linked chitosan microcapsules from Pickسering emulsion templates. *Food Hydrocolloids.*, *55*, 26-33.

[17] Chen, X., McClements, D. J., Wang, J., Zou, L., Deng, S., Liu, W., ... & Liu, C. (2018). Coencapsulation of (−)-Epigallocatechin-3-gallate and quercetin in particle-stabilized W/O/W emulsion gels: Controlled release and bioaccessibility. *Journal of agricultural and food chemistry*, *66*(14), 3691-3699.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.130.8.7]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.130.85]

Journal of Food Science and Technology (Iran)

Homepage:www.fsct.modares.ir

Scientific Research

Preparation of Pickering double emulsion stabilized by chitosan nanoparticles and evaluation of the effects of formulation parameters on the physical stability of formed emulsions

HeidariDalfard, F. [1], Jafari, S. M. [1*], Ziaiifar, A. M. [1*], Anton, N. [2]

1. Faculty of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran.
2. INSERM (French National Institute of Health and Medical Research), UMR 1260, Regenerative Nanomedicine (RNM), FMTS, University of Strasbourg, F-67000 Strasbourg, France.

ARTICLE INFO

Article History:

Received 2022/ 05/ 10
Accepted 2022/ 06/ 21

Keywords:

Chitosan nanoparticles,
Pickering double emulsion,
Physical stability.

DOI: 10.22034/FSCT.19.130.85
DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.130.8.7

*Corresponding Author E-Mail:
smjafari@gau.ac.ir
amziziifar@gau.ac.ir

ABSTRACT

Emulsions stabilized by edible nanoparticles have attracted the attention of many researchers during the past ten years. However, very few studies have investigated the stabilization at least one interface of a double emulsion with a layer of edible nanoparticles. In this study, water-in-oil-in-water (W / O / W) Pickering double emulsions were prepared using chitosan nanoparticles as external aqueous phase stabilizers.Experiments were performed with Taguchi design.The effects of formulation parameters, including the ratio of internal aqueous phase content to the oil phase, initial emulsion content to external aqueous phase, and chitosan nanoparticle concentration on droplet size and stability of double emulsions were investigated. The results showed that the nanoparticle concentration had the highest effect (34.91%) on the droplet size of emulsions. Treatment No. 5, with 2: 8 of internal aqueous phase to continuous internal phase, 1: 9 of primary emulsion to continuous external phase, and a concentration of 0.65% nanoparticles, had the smallest droplet size compared to other treatments. Based on the results of the stability study, the ratio of the initial emulsion content to the external aqueous phase was more effective on the stability of the emulsions. The creaming index and coalescence were insignificant in treatments No. 5 and 7.

[Downloaded from fsct.modares.ac.ir on 2024-10-12]
[DOR: 20.1001.1.20088787.1401.19.130.8.7]
[DOI: 10.22034/FSCT.19.130.85]