



بررسی خصوصیات فیزیکوشیمیایی و رهایش نانوامولسیون حاوی کروسین و کاربرد آن در سیستم مدل

غذایی (شکلات)

زهرا نظری^{۱*}، جواد اصیلی^۲

۱-دکتری سازمان مرکزی جهاد دانشگاهی، پژوهشکده علوم و فناوری مواد غذایی، گروه کیفیت و ایمنی مواد غذایی.

۲-دکتری دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد.

اطلاعات مقاله

چکیده

تاریخ های مقاله :

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۷/۲۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۱/۱۲/۲۲

کلمات کلیدی:

رهایش،

نانوامولسیون،

ضدافسردگی،

کروسین،

شکلات.

DOI: 10.22034/FSCT.19.135.1

DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.135.1.7

* مسئول مکاتبات:

Nazari@jdm.ac.ir

در کشور ما نیز شیوع افسردگی به طور متوسط ۷/۷ درصد جمعیت ۱۵ ساله و بالاتر را در بر می گیرد. تقریباً همه بیمارانا فرسوده به دلیل کم شدن انرژی، نمی توانند وظایف خود را به راحتی انجام دهند. یکی از انواع گیاهان دارویی، برای درمان افسردگی زعفران است که در طب سنتی از آن به عنوان نشاط آور و برطرف کننده غم و اندوه یاد شده است. کروسین به عنوان یک ترکیب زیست فعال مؤثر بر افسردگی، نسبت به دما، PH و اکسیژن، حساس بوده و کارایی آن کاهش می یابد. نانوریزپوشانی کروسین با استفاده از امولسیون های دولایه روشی برای افزایش پایداری این ترکیب است. نسبت سورفاکتانت (۵۰ تا ۲۰۰ درصد) و دور همزن (۵۰۰ و ۱۰۰۰ rpm) و زمان هم زدن (۱، ۲ و ۳ ساعت) به عنوان متغیرهای تولید امولسیون اولیه مورد استفاده قرار گرفت. نسبت بهینه سورفاکتانت به فاز آبی ۱۰۰ درصد بود و در تمامی میکروامولسیون ها با افزایش نسبت سورفاکتانت، ویسکوزیته افزایش یافت. برای ساخت امولسیون نانویه از روش پرانرژی هموژنیزاسیون در فشار بالا و برای مقایسه و افزایش پایداری از بیوپلیمرهای کنستانتره پروتئین سویا، صمغ عربی و پکتین در دو سطح ۵ و ۱۰ درصد استفاده شد. سپس نانوامولسیون به شکلات افزوده شد. همه تیمارها با استفاده از آزمون دانکن در سطح معنی داری ۵ درصد مورد ارزیابی قرار گرفتند. نتایج نشان داد که هر دو سورفاکتانت قادر به تشکیل نانوامولسیون بودند. امولسیون های پایدار شده با پکتین بیشترین ویسکوزیته و کمترین رهایش کروسین در شرایط شبیه سازی شده معده و روده را نشان دادند. همچنین شکلات حاوی نانوامولسیون از نظر خواص حسی با نمونه شاهد مقایسه شد و امتیاز بالاتری نسبت به نمونه شاهد داشت.

۱- مقدمه

در حال حاضر افسردگی، ۲۰ درصد از جمعیت جهانی را تحت تأثیر قرار داده و یکی از ده عامل اصلی مرگ‌ومیر به شمار می‌رود [۱]. امروزه نمک‌های لیتیم، داروهای محرک، ضدافسردگی‌های سه حلقه‌ای، مهارکننده‌های انتخابی سروتونین، مهارکننده‌های مونوآمینوآکسیداز و غیره جهت درمان افسردگی استفاده می‌شوند [۲]. این داروها پس از چندین هفته تا چندین ماه مصرف اثرات خود را نشان می‌دهند و علائم و نشانه‌های افسردگی فقط در یک‌سوم افراد مصرف‌کننده به‌طور کامل برطرف می‌شود و خطر عود مجدد بیماری همچنان وجود دارد. اخیراً ضدافسردگی‌های آتپیک نظیر بوپروپیون، نفازدون و میرتازاپین برای درمان افسردگی در دسترس می‌باشند. با این حال میزان بهبودی پایین و ریسک برگشت بیماری یا عود همچنان بالا باقی می‌ماند، بنابراین به عوامل با اثربخشی بیشتر و سمیت کمتری نیاز است [۳].

عصاره برخی گیاهان منابع مؤثری از داروهای جدید و نویدبخش در درمان افسردگی به شمار می‌روند. گیاهان دارویی در این زمینه توجه محققان را به خود جلب کرده‌اند زیرا از دیرباز برای درمان بیماری‌های مختلف شامل بیماری‌های روحی- روانی استفاده می‌شده‌اند و نسبت به داروهای سنتتیک و شیمیایی دارای عوارض جانبی کمتری هستند [۳]. مطالعات قبلی نشان می‌دهد که عصاره‌های الکلی و آبی کلاله و گلبرگ زعفران دارای اثرات ضدافسردگی در موش می‌باشند [۴]. طی بررسی‌های انجام‌شده مشخص گردیده است که از کل میزان کروسین موجود در زعفران ۹۴ درصد آن به‌صورت ترکیب گلیکوزیده در کروسین و مقدار ۶ درصد آن به‌صورت کروسین آزاد وجود دارد. مواد مؤثره‌ی زعفران (ترکیبات ضدافسردگی) در برابر تغییرات pH، دما و نور حساس می‌باشد و کیفیت آن کاهش می‌یابد [۵]. رهایی و همکاران (۲۰۱۵) برای افزایش پایداری کروسین از روش ریزپوشانی به‌وسیله کیتوزان و سدیم آلژینات استفاده کردند و فرمول بهینه را به روش سطح پاسخ تعیین نمودند [۶]. رجبی و همکاران (۲۰۱۵) از ترکیب مالتودکسترین، صمغ عربی و ژلاتین در دو سطح ۳۰ و ۴۰ درصد برای ریزپوشانی ترکیبات زیست

فعال زعفران به روش خشک‌کردن پاششی استفاده نمودند. نتایج نشان داد که نگهداری کروسین در پودر حاصل به‌شدت تحت تأثیر میزان ماده خشک بوده و بیشترین میزان ماندگاری مربوط به ماده خشک ۴۰ درصد بوده و با افزایش مالتودکسترین حفظ کروسین در درون کپسول‌ها افزایش یافت [۷]. مهرنیا و همکاران (۲۰۱۷) از زیست پلیمرهای پودر آب‌پنیر، صمغ عربی و صمغ فارسی برای نانوریزپوشانی کروسین استفاده کردند و نشان دادند که امولسیون‌های دوگانه پایدارشده با صمغ فارسی دارای بیشترین ویسکوزیته و کمترین رهایش کروسین بود [۸]. برتراند و همکاران (۲۰۰۷) از مفهوم اتومات سلولی برای مدل‌سازی رهایش دارو از میکروکره‌های قابل فرسایش استفاده کردند. در این تحقیق اتومات سلولی در شرایط سه‌بعدی و همسایگی مور تعریف شد. بر اساس نتایج به‌دست‌آمده همبستگی خوبی بین داده‌های آزمایشگاهی به‌دست‌آمده از رهایش دارو در دو حالتی که فرسایش پلیمر به‌سرعت و به‌آرامی صورت می‌گیرد به دست آمد [۹]. هرچند نوع استخراج کروسین تا حد زیادی می‌تواند بر روی زیست دسترسی ترکیبات اثر گذارد [۱۰]. در سال‌های اخیر تکنولوژی‌هایی ظهور یافته است که منجر به ایجاد محصولات باکیفیت و عمر نگهداری بالا می‌شود. در سال‌های اخیر با مطرح‌شدن غذاهای فراسودمند و افزایش آگاهی مصرف‌کنندگان تقاضا برای غذاها عملگرا افزایش یافته است. شکلات به‌عنوان یکی از پرمصرف‌ترین تغذات سبذ غذایی، فرآورده مناسبی برای غنی‌سازی است. امروزه مصرف‌کنندگان به‌دنبال شکلاتی هستند که حافظ سلامت باشد و از بیماری‌ها جلوگیری کند. هدف از این پژوهش نانوریزپوشانی کروسین با استفاده از امولسیون دولایه با قابلیت استفاده در سامانه‌های غذایی بود. برای تولید امولسیون اولیه از روش کم انرژی امولسیون سازی خودبه‌خودی استفاده شد. برای تولید امولسیون دولایه از پلیمرهای زیستی کنستاتر پروتئین سویا، صمغ عربی و پکتین استفاده شد و ویژگی‌های نانوامولسیون و میزان رهایش کروسین ارزیابی گردید. سپس ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی، رئولوژیکی و حسی شکلات حاوی نانوامولسیون مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

کروسین (استردی جتیویوزکروستین) و کیسه دیالیز (D0655) از شرکت سیگما، پلی گلیسرول پلی رسینولات از شرکت پالسگارد دانمارک، صمغ عربی، پکتین و کنستانتره پروتئین سویا از شرکت آذران لوتوس تهیه شد.

۲-۲- روش‌ها

۲-۲-۱- آماده‌سازی میکرومولسیون آب در روغن

جهت تهیه میکرومولسیون آب در روغن، سورفاکتانت چربی‌دوست پلی گلیسرول رسینولات با HLB¹ ۱/۵ مورد استفاده قرار گرفت. محلول کروسین ۱۰ درصد وزنی-وزنی به همراه سورفاکتانت PGPR² روی همزن مغناطیسی (RET basic, IKA) مخلوط شد. فاز آبی حاوی سورفاکتانت به فاز روغنی ۸۰ درصد وزنی-وزنی به صورت قطره‌قطره اضافه شد. سپس امولسیون حاصل با دور ثابت مخلوط شد. نسبت سورفاکتانت (۵۰ تا ۲۰۰ درصد) و دور همزن (Ultra-Turrax, IKA) (۵۰۰ و ۱۰۰۰ rpm) و زمان هم زدن (۱، ۲ و ۳ ساعت) به‌عنوان متغیرهای تولید امولسیون‌ها مورد استفاده قرار گرفت.

۲-۲-۲- آماده‌سازی امولسیون دولایه

محلول‌های ۱۰ درصد پکتین، صمغ عربی و کنستانتره پروتئین سویا با حل کردن نمونه‌ها در آب مقطر آماده شدند و جهت آب‌گیری کامل به مدت یک‌شب در یخچال نگهداری شدند. میکرومولسیون آب در روغن ۱۰ درصد وزنی-وزنی به محلول آبی ۹۰ درصد وزنی-وزنی حاوی بیوپلیمرها اضافه شد و به مدت ۵ دقیقه با دور rpm ۱۰۰۰ به وسیله اولتراتوراکس مخلوط شدند و سپس با هم‌زنایزر فشار بالا (۲۰۰۰-۳۵ بار Emulsifex) تحت فرایند قرار گرفتند [۸].

۲-۳- آزمون‌ها

آزمون‌های نانوامولسیون شامل اندازه‌گیری قطرات به روش پراکنش نور دینامیکی (Dynamic light Scattering method)، اندازه‌گیری ویسکوزیته، ویژگی‌های رئومتر و

اندازه‌گیری رهائش در شرایط معده و روده با استفاده از کیسه دیالیز در دمای ۳۷ و دور rpm ۱۰۰۰ انجام شد [۱۱]. آزمون‌های شکلات شامل رطوبت، فعالیت آبی، اندازه ذرات، بافت سنجی، رنگ، ویسکوزیته و ارزیابی حسی شکلات غنی‌شده با نانوامولسیون کروسین (عصاره حاوی ۱۵ میلی‌گرم نانوامولسیون کروسین در هر ۱۰ گرم شکلات) مورد ارزیابی قرار گرفت.

۲-۴- ارزیابی آماری

اثر متغیرهای مختلف شامل نسبت سورفاکتانت به فاز آبی (در سطوح ۵۰ تا ۲۰۰ درصد)، نوع زیست پلیمر (کنستانتره پروتئین سویا، صمغ عربی، پکتین)، غلظت بیوپلیمرها در سطوح ۵ و ۱۰ درصد در تولید نانوامولسیون کروسین و همچنین اثر افزودن نانوامولسیون کروسین در شکلات ضدافسردگی بر روی متغیرهای وابسته در سه تکرار اندازه‌گیری شد و با آزمون چند دامنه‌ای دانکن و نرم‌افزار SPSS 22، مورد مقایسه و ارزیابی قرار گرفت. جهت رسم نمودارها از اکسل ۲۰۰۷ استفاده شد. جهت مدل‌سازی داده‌های تجربی رفتار جریان و رهائش کروسین از نرم‌افزار Curve Expert Professional (2.6.5) استفاده شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- تولید میکرومولسیون

۳-۱-۱- بررسی اثر غلظت PGPR

برای بررسی تأثیر غلظت PGPR بر روی قابلیت تولید میکرومولسیون به روش کواسرواسیون، نسبت‌های SWR^۳ از ۵۰ تا ۲۰۰ مورد بررسی قرار گرفت. سایر شرایط ثابت در نظر گرفته شد. نتایج نشان داد (جدول ۱) که کمترین قطر مربوط به نسبت سورفاکتانت به فاز آبی ۱۰۰ درصد بود و با افزایش نسبت سورفاکتانت به فاز آبی اندازه قطرات افزایش یافت و در نسبت‌های ۱۵۰ و ۲۰۰ به ترتیب به ۶۶ و ۱۲۰ نانومتر رسید.

۳-۱-۲- بررسی اثر سرعت هم زدن

برای بررسی سرعت هم زدن بر تشکیل میکرومولسیون‌ها در شرایط استاندارد یعنی نسبت سورفاکتانت به فاز آبی ۱۰۰ درصد و

1. HydrophileLypophile balance
2. Polyglycerolpolyricinoleate

3. Surfactant to water ratio

۳-۱-۳- بررسی اثر زمان هم زدن

برای بررسی اثر زمان هم زدن بر روی ویژگی‌های میکروامولسیون به روش خودبه‌خودی در شرایط استاندارد یعنی نسبت سوفاکتانت به فاز آبی ۱۰۰ درصد و سرعت ۱۰۰۰ rpm تحت زمان‌های ۱، ۲ و ۳ ساعت قرار گرفتند. نتایج نشان داد که (جدول ۱) که با افزایش زمان، میانگین اندازه قطرات از ۱۰/۷ به ۵۰ و ۶۵ نانومتر افزایش یافت.

زمان ۲ ساعت، سرعت‌های ۵۰۰ و ۱۰۰۰ rpm موردبررسی قرار گرفتند. نتایج نشان داد (جدول ۱) که در سرعت پایین، نانوامولسیون تشکیل نمی‌شود در واقع انرژی لازم برای جدا شدن فاز پراکنده به همراه سوفاکتانت وجود ندارد. در سرعت ۵۰۰ rpm میانگین اندازه ذرات حدود ۱۲/۵۰ نانومتر بود و با افزایش سرعت به ۱۰۰۰ rpm اندازه قطرات ۲۴/۴ نانومتر بود. در واقع بالا رفتن انرژی موجب یکی شدن مجدد قطرات پیش از حرکت سوفاکتانت در فاز پیوسته و قرار گرفتن آن بر روی سطح قطرات تازه تشکیل شده است [۱۲].

Table 1 Effect of SWR, stirring time and particle size of micro-emulsions at standard conditions.

particle size (nm)	SWR				Stirring speed (rpm)		Stirring time (h)		
	50	100	150	200	500	1000	1	2	3
	11.38±0.01 ^a	24.4±0.02 ^b	66.04±0.23 ^c	120.07±0.54 ^d	12.52±0.51 ^a	24.4±0.02 ^b	10.73±0.14 ^a	24.4±0.02 ^b	65.04±0.02 ^c

*Different letters in the same column indicate significant differences between treatments (P<0.05)

۳-۲- تولید امولسیون دولایه

۳-۲-۱- اندازه قطرات و پایداری امولسیون‌های دولایه همان‌طور که در جدول ۲ مشاهده می‌شود، با افزایش غلظت کنستاتره پروتئین سویا و صمغ عربی اندازه قطرات کاهش یافته اما با افزایش غلظت پکتین، اندازه قطرات افزایش یافته است. کمترین قطر امولسیون‌های دولایه مربوط به کنستاتره پروتئین سویا بوده که با افزایش غلظت از ۵ درصد به ۱۰ درصد اندازه قطرات از ۴۳۰ به ۳۵۰ نانومتر کاهش یافت. در مورد صمغ عربی با افزایش غلظت اندازه قطرات کاهش یافت اما برای پکتین با افزایش غلظت، اندازه ذرات افزایش یافت. بررسی اندازه قطرات امولسیون‌ها بعد از دوره نگهداری نشان داد که با افزایش زمان ماندگاری، قطر تمام امولسیون‌ها افزایش یافت. بیشترین اندازه افزایش اندازه قطرات مربوط به صمغ عربی با غلظت ۵ درصد و کمترین آن مربوط به پکتین ۵ درصد بود. پایداری امولسیون و عدم رشد گلبول‌ها با گذشت زمان، تابع پوشش کامل سطح و جلوگیری از نزدیک شدن قطرات به یکدیگر است. همچنین مطالعات نشان داده است که استفاده از ترکیبات پلیمر با وزن مولکولی بالاتر باعث تشکیل امولسیون‌های دولایه پایدارتر می‌گردد [۱۴]. ممانعت فضایی سوفاکتانت نیز می‌تواند به جلوگیری از نزدیک شدن قطرات منجر شود.

۳-۱-۴- اثر غلظت سوفاکتانت بر ویسکوزیته

میکروامولسیون‌ها

ویسکوزیته امولسیون‌ها نقش مؤثری در پایداری امولسیون‌ها داشته و افزایش ویسکوزیته باعث کاهش حرکت قطرات فاز پراکنده به سوی یکدیگر و جلوگیری از تجمع قطرات می‌شود. نتایج نشان داد (شکل ۱) که در تمامی میکروامولسیون‌ها با افزایش نسبت سوفاکتانت، ویسکوزیته افزایش یافت. این افزایش ویسکوزیته می‌تواند ناشی از افزایش میزان سوفاکتانت آزاد در فاز پیوسته باشد که منجر به افزایش ویسکوزیته توده امولسیون می‌شود [۱۳].

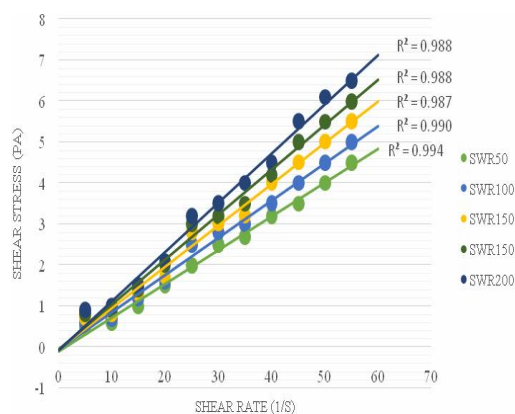


Fig 1 Flow chart of microemulsions.

Table 2 Droplet size average and dispersion of two-layer emulsions prepared from biopolymers.

	SPC5	SPC10	AG5	AG10	P5	P10
Fresh emulsion	430±2.53 ^a	350±3.21 ^b	700±7.53 ^c	574±5.25 ^d	1147±10.02 ^e	2010±12.34 ^f
1th month	541±7.61 ^a	429±4.32 ^b	898±6.74 ^c	680±11.23 ^d	1310±19.84 ^e	2156±24.45 ^f

*Different letters in the same column indicate significant differences between treatments (P<0.05)

پایداری بیشتر امولسیون‌های دولایه در هر دو غلظت گردید (جدول ۳). بالا بودن ویسکوزیته پکتین از نزدیک‌تر شدن قطرات به یکدیگر در طی زمان نگهداری، جلوگیری کرده و موجب پایداری بیشتر امولسیون‌های پایدار شده با پکتین، در مقایسه با دو زیست‌پلیمر دیگر گردید.

۳-۲-۲- رفتار جریان

بررسی ویسکوزیته بیوپلیمرها در سطوح ۵ و ۱۰ درصد نشان داد که در دامنه نرخ برش موردبررسی، همه بیوپلیمرها در تمام سطوح، رفتار رقیق شونده از خود نشان دادند. در همه زیست‌پلیمرها با افزایش غلظت از ۵ به ۱۰ درصد، ویسکوزیته افزایش یافت. ویسکوزیته بالاتر پکتین منجر به تشکیل قطرات بزرگ‌تر و

Table 3 Biopolymers viscosity changes at 5 and 10% levels.

	Shear rate (1/s)						
	10	20	30	40	50	60	70
SPC5%	8.24±0.21 ^a	9.53±0.05 ^b	9.61±0.14 ^b	11.15±0.22 ^c	11.32±0.25 ^c	10.47±0.03 ^c	9.45±0.32 ^b
SPC10%	8.23±0.42 ^a	8.33±0.33 ^a	8.45±0.22 ^a	7.51±0.24 ^d	7.14±0.54 ^a	6.75±0.32 ^a	6.31±0.23 ^a
GA5%	10.31±0.02 ^c	10.23±0.41 ^c	10.45±0.04 ^c	9.35±0.32 ^b	9.43±0.13 ^b	9.07±0.34 ^b	9.41±0.22 ^b
GA10%	10.12±0.42 ^b	11.21±0.45 ^d	11.45±0.01 ^d	12.11±0.14 ^d	12.15±0.23 ^c	12.22±0.21 ^d	11.34±0.15 ^c
P5%	10.92±2.11 ^c	10.73±4.01 ^f	10.53±2.11 ^f	10.42±1.32 ^f	12.14±0.54 ^c	10.44±3.21 ^f	10.43±2.14 ^c
P10%	8.54±3.13 ^d	8.63±2.01 ^c	8.64±0.41 ^c	8.63±1.05 ^c	11.51±0.36 ^d	8.52±0.74 ^c	8.54±0.76 ^d

*Different letters in the same column indicate significant differences between treatments (P<0.05)

بررسی رفتار جریان (جدول ۴) بر اساس مدل‌های توان، بیوپلیمرها بیشترین انطباق با مدل هرشل بالکلی و سپس رابطه هرشل- بالکلی، بینگهام و کیسون نشان می‌دهد که همه توان داشته‌اند.

Table 4 Flow behavior of two-layer emulsion stabilized with biopolymers at the levels of 5 and 10%.

Emulsion	SPC		AG		P	
	5%	10%	5%	10%	5%	10%
Power law						
K(Paⁿ)	0.0032 ^d	0.016 ^c	0.009 ^{cd}	0.013 ^{cd}	0.059 ^b	0.181 ^a
n	0.991 ^a	0.852 ^b	0.923 ^{ab}	0.859 ^{ab}	0.901 ^{ab}	0.915 ^{ab}
R²	99.8	98.6	99.8	99.2	99.6	97.9
Herschel bulkley						
K(Pasⁿ)	0.002 ^c	0.014 ^c	0.006 ^c	0.025 ^c	0.065 ^b	0.213 ^a
n	0.985 ^a	0.856 ^d	0.956 ^{ab}	0.881 ^{cd}	0.936 ^{abc}	0.871 ^{bcd}
τ₀ (Pa)	0.005 ^b	0.231 ^a	0.007 ^b	0.012 ^b	0.231 ^a	0.321 ^a
R²	99.9	98.2	99.9	99.2	0.251	98.1
Bingham						
K(Pasⁿ)	0.002 ^c	0.003 ^c	0.005 ^c	0.007 ^b	0.041 ^b	0.123 ^a
τ₀ (Pa)	0.004 ^a	0.251 ^a	0.026 ^b	0.026 ^b	0.098 ^b	0.125 ^{bc}
R²	99.9	98.1	99.6	99.1	99.5	78.8
Casson						
K(Pasⁿ)	0.004 ^d	0.058 ^{dc}	0.004 ^c	0.095 ^c	0.394 ^b	1.213 ^a
τ₀ (Pa)	0.011 ^b	0.015 ^b	0.001 ^b	0.012 ^b	0.016 ^b	0.117 ^a
R²	92.1	98.1	93.2	99.7	99.9	97.9

*The components of the model for each biopolymer are compared with each other in columns at a significance level of 0.05

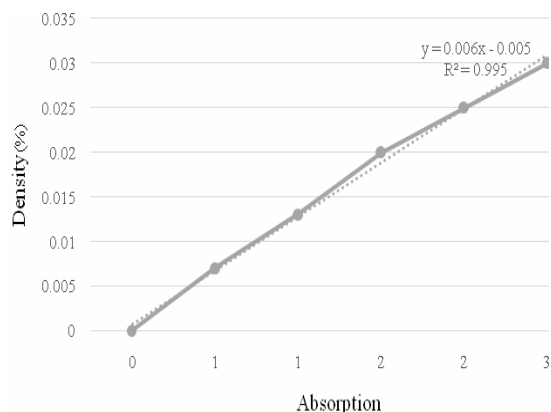


Fig 2 Crocin standard curve.

ضریب تشخیص به دست آمده (۹۹/۵۶ درصد) نشان داد بین غلظت کروسین و میزان جذب به دست آمده ارتباط بالایی وجود دارد.

همانطور که مشاهده می شود با افزایش غلظت، ضریب قوام (k) افزایش یافته و اندیس (n) کاهش می یابد که نشان دهنده افزایش ویسکوزیته و نزدیک شدن به حالت رقیق شونده ($n < 1$) با افزایش غلظت بیوپلیمر است. بیشترین ضریب قوام و کمترین اندیس جریان به ترتیب مربوط به پکتین، صمغ عربی و کنستاتره پروتئین سویا بوده است.

۳-۳- رهائش کروسین

برای بررسی میزان رهائش کروسین در طی زمان نگهداری، ابتدا منحنی استاندارد کروسین بر اساس میزان جذب در طول موج ۴۴۰ نانومتر و در غلظت های وزنی/وزنی کروسین تعیین شد (شکل ۲). میزان رهائش کروسین در جدول ۵ نشان داده شده است. همانطور که مشاهده می شود بیشترین میزان خروج کروسین، مربوط به کنستاتره پروتئین سویا و کمترین میزان مربوط به پکتین بود. به نظر می رسد درشت مولکول بودن پکتین عاملی برای ممانعت از رهائش باشد [۱۵].

Table 5 Percentage of crocin release from double-layer emulsion stabilized with biopolymers at 5 and 10% levels

	Time(h)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	
Crocin release	SPC 5%	20.21±0.13 ^c	40.23±0.33 ^f	48.15±0.45 ^f	65.07±0.14 ^f	71.23±0.23 ^f	77.21±0.22 ^f	78.32±0.54 ^f	80.22±0.55 ^f
	SPC 10%	6.44±0.45 ^c	16.21±0.14 ^d	23.11±0.12 ^d	30.33±0.55 ^d	35.22±0.16 ^d	44.27±0.47 ^d	47.28±0.41 ^d	49.54±0.22 ^d
	GA 5%	8.74±0.34 ^d	21.01±0.02 ^e	28.23±0.32 ^e	40.22±0.35 ^e	47.36±0.41 ^e	53.65±0.23 ^e	56.24±0.25 ^e	59.32±0.31 ^e
	GA 10%	4.21±0.54 ^b	11.54±0.07 ^e	16.33±0.46 ^e	22.31±0.24 ^e	27.24±0.37 ^e	35.65±0.08 ^e	39.86±0.38 ^e	41.28±0.19 ^e
	P 5%	4.03±0.01 ^b	10.32±0.08 ^b	15.37±0.47 ^b	22.25±0.08 ^b	26.54±0.41 ^b	29.63±0.38 ^b	31.36±0.44 ^b	34.26±0.17 ^b
	P 10%	3.31±0.21 ^a	8.34±0.08 ^a	10.87±0.37 ^a	13.24±0.17 ^a	20.25±0.09 ^a	22.71±0.51 ^a	27.33±0.07 ^a	29.81±0.25 ^a

*Different letters in the same column indicate significant differences between treatments ($P < 0.05$).

نانوامولسیون، اندازه ذرات نیز افزایش معنی داری پیدا نکرد. ویژگی های رئولوژیکی و کیفیت نهایی شکلات به میزان قابل توجهی تحت تأثیر توزیع اندازه ذرات و ترکیبات اولیه شکلات قرار می گیرد که در نهایت نقش بسزایی بر درک حسی این محصول در دهان دارد. ذرات درشت به دلیل شنی بودن در احساس دهانی بسیار مؤثرند اما ذرات ریز به دلیل تأثیر بر ویژگی های جریان شکلات مهم تر هستند [۱۷]. کاهش اندازه ذرات سبب افزایش گرانیروی و تنش تسلیم می شود. توزیع اندازه ذرات از آن جهت حائز اهمیت است که می توان با بهینه سازی آن و بدون تغییر کلی در فرمولاسیون شکلات به ویژگی های مطلوب رئولوژیکی رسید. چنانچه بیشینه اندازه ذرات D_{90} بین ۲۰-۳۳ میکرومتر و کمینه اندازه ذرات D_{10} از ۶ میکرومتر کمتر باشد،

۳-۴- آزمون های شکلات

۳-۴-۱- خصوصیات فیزیکوشیمیایی

نتایج آنالیز واریانس نشان داد که بین نمونه های شکلات حاوی نانوامولسیون، از نظر رطوبت و فعالیت آبی اختلاف معناداری وجود دارد. همانطور که ملاحظه می شود با افزودن نانوامولسیون به شکلات، این فاکتورها نیز افزایش پیدا می کند. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که بین نمونه های شکلات، از نظر شاخص اندازه ذرات D_{90} (به این معنا که ۹۰ درصد ذرات، کوچکتر از مقدار این شاخص هستند) و D_{10} (به این معنا که ۱۰ درصد ذرات، کوچکتر از این شاخص هستند) [۱۶]. اختلاف معناداری وجود ندارد (جدول ۶). همانطور که ملاحظه می شود با افزودن

آکروا و همکاران بیان کردند که عوامل مختلفی مثل ساختار، شرایط تولید به ویژه تمپرینگ شکلات و پلی مورفیسیم بلورهای چربی نیز سختی شکلات را تحت تأثیر قرار می دهند [۱۹]. نتایج آنالیز واریانس نشان داد که بین نمونه های شکلات، از نظر L ، b ، a فاکتور اختلاف معناداری وجود دارد ($p < 0.05$). همان طور که ملاحظه می شود با افزودن نانوامولسیون به شکلات، شاهد کاهش فاکتور L و همچنین افزایش فاکتور a و b هستیم.

ویژگی های مطلوب رئولوژیکی با بهترین حالت حسی در دهان حاصل خواهد شد. D_{90} بزرگ تر از ۳۵ میکرومتر، در دهان احساس شنی ایجاد می کند که کاهش پذیرش کلی توسط مصرف کننده را به دنبال دارد. همان طور که در جدول ۳ نشان داده شده، بیشترین ویسکوزیته، سختی در حالت جامد (۱) و ذوب شده (۲) مربوط به تیمار غنی شده می باشد که از دلایل این امر، می توان به بالا رفتن رطوبت اشاره کرد. اسکلیمان و بکت (۲۰۰۰) بیان کردند که رطوبت (حتی در مقادیر بسیار پایین) سبب افزایش سختی شکلات می شود [۱۸]. در همین ارتباط

Table 6 Comparison of mean physicochemical properties of Crocin fortified chocolate

Fortified	Control	
0.36±0.01 ^b	0.32±0.04 ^a	Water activity
0.73±0.05 ^b	0.27±0.01 ^a	Moisture (%)
1133.41±10.15 ^a	1125.04±11.21 ^a	Viscosity (mpa)
23.81±0.12 ^b	19.14±0.34 ^a	Hardness1 (N)
13.07±0.23 ^b	11.61±0.08 ^a	Hardness2 (N)
20.47±0.17 ^a	19.12±0.12 ^a	D90 (20-33)
1.23±0.12 ^a	1.12±0.07 ^a	D10 < 6
20.11±0.71 ^b	21.31±0.21 ^a	L
12.61±0.18 ^b	11.71±0.41 ^a	a
18.11±0.09 ^b	16.91±0.08 ^a	b
		Particle size (μ)
		color

*Different letters in the same column indicate significant differences between treatments ($P < 0.05$)

داوران از نظر عطر و طعم بالاترین امتیاز را به تیمار غنی شده دادند و از نظر ذوب دهانی بین تیمارها اختلاف معناداری وجود نداشت از نظر شدت رنگ بالاترین امتیاز به تیمار غنی شده تعلق داشت.

۴- نتیجه گیری

کروسین از جمله ترکیبات با حلالیت بالا در آب بوده و اثرات ضدافسردگی آن به خوبی ثابت شده است. نتایج نشان داد که تمام امولسیون های دولایه تهیه شده با زیست پلیمرها، با گذشت زمان یک ماه، همچنان پایدار بوده و دو فاز نشدند. بررسی رهایش امولسیون های دولایه در محیط شبیه سازی معده و روده نشان داد که کمترین میزان رهایش مربوط به نمونه های پایدار شده با زیست پلیمر پکتین و بیشترین آن مربوط به کنستاتره پروتئین سویا است. ارزیابی رطوبت، a_w و سختی نمونه های شکلات نشان داد که نمونه های غنی شده سختی، فعالیت آبی و رطوبت بالاتری نسبت به نمونه شاهد داشت. ارزیابی رنگ نشان داد که

۳-۴-۲- ارزیابی حسی شکلات حاوی نانوامولسیون

ده نفر ارزیاب پس از آموزش های مقدماتی مربوطه برای انجام ارزیابی حسی انتخاب شدند و با استفاده از روش هدونیک (۹ نقطه ای) نمونه های شکلات تولید شده را به لحاظ عطر و طعم، شدت رنگ و ذوب دهانی ارزیابی نمودند (شکل ۳).

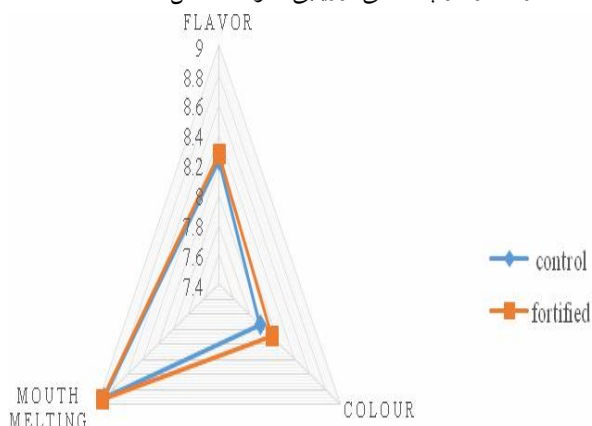


Fig 3 Effect of crocin nanoemulsion addition on sensory properties of chocolate.

- [7] Rajabi, H., M. Ghorbani, S. M. Jafari, A. S. Mahoonak and G. Rajabzadeh (2015). "Retention of saffron bioactive components by spray drying encapsulation using maltodextrin, gum Arabic and gelatin as wall materials." *Food hydrocolloids*, 51: 327-337.
- [8] Mehrnia, M.-A., S.-M. Jafari, B. S. Makhmal-Zadeh and Y. Maghsoudlou (2017). "Rheological and release properties of double nano-emulsions containing crocin prepared with Angum gum, Arabic gum and whey protein." *Food Hydrocolloids*, 66: 259-267.
- [9] Bertrand, N., G. Leclair and P. Hildgen (2007). "Modeling drug release from bioerodible microspheres using a cellular automaton." *Int J Pharm*, 343(1-2): 196-207.
- [10] Bakshi, R. A., N. S. Sodhi, I. A. Wani, Z. S. Khan, B. Dhillon and A. Gani (2022). "Bioactive constituents of saffron plant: Extraction, encapsulation and their food and pharmaceutical applications." *Applied Food Research*, 2(1): 100076.
- [11] Fathi, M., Varshosaz, J., Mohebbi, M., & Shahidi, F. (2013). Hesperetin-Loaded Solid Lipid Nanoparticles and Nanostructure Lipid Carriers for Food Fortification: Preparation, Characterization, and Modeling. *Food and Bioprocess Technology*, 6(6), 1464-1475. doi:10.1007/s11947-012-0845-2.
- [12] Jafari, Seid Mahdi, Elham Assadpoor, Yinghe He, and Bheshe Bhandari. 2008. 'Re-coalescence of emulsion droplets during high-energy emulsification', *Food Hydrocolloids*, 22: 191-202.
- [13] An, Yaping, Xiangxing Yan, Bin Li, and Yan Li. 2014. 'Microencapsulation of capsanthin by self-emulsifying nanoemulsions and stability evaluation', *European Food Research and Technology*, 239: 1077-85.
- [14] Li, Changjun, Qian Huang, Shufeng Ma, and Chuling Ji. 2016. 'An Experimental Study on the Viscosity of Water-in-Oil Emulsions', *Journal of Dispersion Science and Technology*, 37: 305-16.
- [15] Benichou, A., A. Aserin, and N. Garti. 2004. 'Double emulsions stabilized with hybrids of natural polymers for entrapment and slow release of active matters', *Advances in Colloid and Interface Science*, 108-109: 29-41.
- [16] Bonnet, M., M. Cansell, A. Berkaoui, M. H. Ropers, M. Anton, and F. Leal-Calderon.

نمونه غنی شده فاکتور L کمتر و a و b بیشتری نسبت به نمونه شاهد داشت. مقایسه اندازه ذرات و ویسکوزیته نمونه‌های شاهد و غنی شده اختلاف معنی داری نشان ندادند. ارزیابی حسی نمونه‌ها، نشان داد که نمونه غنی شده به طور معنی داری امتیاز بالاتری کسب نمود.

۵- منابع

- [1] Zhang, Feng, Xinying Zhu, Ping Yu, Tingna Sheng, Yuqing Wang, and Yilu Ye. 2022. 'Crocine ameliorates depressive-like behaviors induced by chronic restraint stress via the NAMPT-NAD⁺-SIRT1 pathway in mice', *Neurochemistry International*, 157: 105343.
- [2] Tao, Weiwei, Jie Ruan, Ruyan Wu, Min Zhao, Tong Zhao, Mingming Qi, Sonata S. Y. Yau, Guangda Yao, Hongru Zhang, Yue Hu, and Gang Chen. 2022. 'A natural carotenoid crocin exerts antidepressant action by promoting adult hippocampal neurogenesis through Wnt/ β -catenin signaling', *Journal of Advanced Research*.
- [3] Xiao, Qingfeng, Ruonan Shu, Chenlu Wu, Yingpeng Tong, Ze Xiong, Jiafeng Zhou, Chunan Yu, Xiaoxian Xie, and Zhengwei Fu. 2020. 'Crocine-I alleviates the depression-like behaviors probably via modulating "microbiota-gut-brain" axis in mice exposed to chronic restraint stress', *Journal of Affective Disorders*, 276: 476-86.
- [4] Xie, Yupeng, Qiuxiang He, Hong Chen, Zijiang Lin, Yi Xu, and Chuang Yang. 2019. 'Crocine ameliorates chronic obstructive pulmonary disease-induced depression via PI3K/Akt mediated suppression of inflammation', *European Journal of Pharmacology*, 862: 172640.
- [5] Mir, Tahir ul Gani, Atif Khurshid Wani, Jaskaran Singh, and Saurabh Shukla. 2022. 'Therapeutic application and toxicity associated with Crocus sativus (saffron) and its phytochemicals', *Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine*, 4: 100136.
- [6] Rahaiee, S., S. A. Shojaosadati, M. Hashemi, S. Moini and S. H. Razavi (2015). "Improvement of crocin stability by biodegradable nanoparticles of chitosan-alginate." *Int J Biol Macromol*, 79: 423-432.

- Texture Studies, 31(5), pp.541-576.
- [19] Afoakwa, E.O., Paterson, A., Fowler, M. and Vieira, J., 2008. Particle size distribution and compositional effects on textural properties and appearance of dark chocolates. *Journal of Food Engineering*, 87(2), pp.181-190.
2009. 'Release rate profiles of magnesium from multiple W/O/W emulsions', *Food Hydrocolloids*, 23: 92-101.
- [17] Beckett, S.T., Fowler, M.S. and Ziegler, G.R. eds., 2017. *Beckett's Industrial Chocolate Manufacture and Use*. John Wiley & Sons
- [18] Aeschlimann, J.M. and Beckett, S.T., 2000. International inter-laboratory trials to determine the factors affecting the measurement of chocolate viscosity. *Journal of*



Scientific Research

Evaluation of physicochemical properties and release of nanoemulsion containing crocin and its application in food model system (chocolate)

Nazari, Z. ^{1*}, Asili, J. ²

1. Phd, Food quality and Safety Research Group, Food Science and Technology Research Institute ACECR Mashhad, Iran.
2. Phd, Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Mashhad University of Medical Sciences, Mashhad, Iran.

ABSTRACT

The prevalence of depression in our country is an average of 7% of people aged 15 and older. Almost all depressed patients cannot do their tasks easily due to lack of energy. One of the types of medicinal plants for treating depression is saffron, which is used in traditional medicine as an uplifting and reducing sadness. One of the types of medicinal plants for treating depression is saffron, which is used in traditional medicine as a happy and reducing sadness. Crocin, as a bioactive compound effective on depression, is sensitive to temperature, pH and oxygen, and its efficiency decreases. Surfactant ratio (50% to 200%), stirring speed (500 and 1000 rpm) and stirring time (1, 2 and 3 hours) were used as the variables of primary emulsion production. The optimal ratio of surfactant to the aqueous phase was 100% and the viscosity increased with increasing surfactant ratio in all microemulsions. High energy homogenization at high pressure was used to make the secondary emulsion and to compare and increase the stability of biopolymers including Soy protein concentrate, Arabic gum and Pectin at two levels of 5 and 10%. Then the nanoemulsion was added to the chocolate. All treatments were evaluated using Duncan's test at a significance level of 5%. The results showed that both surfactants were able to form nanoemulsions. Emulsions stabilized with pectin showed the highest viscosity and the lowest crocin release in simulated stomach and intestine conditions. Also, the physicochemical and sensory properties of chocolate containing nanoemulsion were compared with the control and it had a higher score than the control.

ARTICLE INFO

Article History:

Received 2022/ 10/ 19
Accepted 2023/ 03/ 13

Keywords:

Release,
Nanoemulsion,
Antidepressant,
Crocin,
Chocolate.

DOI: 10.22034/FSCT.19.135.1

DOR: 20.1001.1.20088787.1402.20.135.1.7

*Corresponding Author E-Mail:
Nazari@jdm.ac.ir