

MACIEJ JARZĘBSKI, SHALOME NIYOBUHUNGIRO, WOJCIECH SMULEK,
GRZEGORZ FIUTAK, MAGDA FILIPCZAK-FIUTAK, MAREK SADY

ANALIZA UKŁADÓW EMULSYJNYCH Z OLEJEM Z KONOPI JAKO SUPLEMENTÓW WITAMINY K

Streszczenie

Wprowadzenie. Witamina K odgrywa ważną rolę w procesie krzepnięcia krwi, poprawy stanu kości, zmniejszaniu zwapnień naczyń i ryzyka sercowo-naczyniowego oraz wykazuje właściwości przeciwzapalne. Słaba rozpuszczalność witaminy K w wodzie stanowić może ograniczenie we wprowadzeniu jej do żywności specjalnego przeznaczenia. Rodzi to konieczność opracowywania innowacyjnych postaci suplementów diety zawierających witaminę K, które będą oparte na układach emulsyjnych. Emulsje, których krople fazy rozproszonej mają rozmiar submikronowy, wykazują większą stabilność w porównaniu z emulsjami makroskopowymi. Kolejnym wyzwaniem w technologii żywności jest poszukiwanie alternatyw dla sztucznych surfaktantów. Alternatywą mogą być preparaty roślinne zawierające w swojej strukturze saponiny, takie jak zastosowany w niniejszej pracy ekstrakt z orzechów piorących.

Wyniki i wnioski. W badaniach skupiono się na 3 optymalnych składach emulsji bazujących na oleju z konopi siewnej (*Cannabis sativa* L.), stabilizowanych ekstraktem z orzecha piorącego w ilości 0,025, 0,250 i 0,500 cm³ na 25 cm³ całej kompozycji. Jako składnik prozdrowotny zastosowano witaminę K w ilości 0,2 mg. Po wytworzeniu przebadano układy w kontekście rozmiarów cząstek/kropeł techniką dynamicznego rozpraszania światła oraz oceniono ich homogeniczność przy użyciu mikroskopu optycznego. Przy użyciu reometru rotacyjnego wyznaczono lepkość dynamiczną emulsji. Przeprowadzono również analizy spektrofotometryczne FTIR z ATR oraz analizę koloru i pH emulsji. Wszystkie trzy badane emulsje wykazały się dużym stopniem stabilności po upływie miesiąca. Emulsje na bazie oleju z konopi, których rozmiar kropeł jest poniżej 1 mikrometra mogą stanowić alternatywę dla obecnie stosowanych nośników witamin. Natomiast ekstrakt z orzechów piorących może stać się skutecznym stabilizatorem/surfaktantem stosowanym w technologii żywności.

Słowa kluczowe: nanoemulsja, olej z konopi, witamina K, stabilność, orzechy piorące

Dr hab. inż. M. Jarzębski ORCID: 0000-0001-9832-9274, Katedra Fizyki i Biofizyki, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 38/42, 60-637 Poznań; mgr S. Niyobuhungiro, Wydział Nauk o Żywności i Żywieniu, Uniwersytet Przyrodniczy w Poznaniu, ul. Wojska Polskiego 28, 60-637 Poznań; dr inż. W. Smulek ORCID: 0000-0001-5377-9933, Zakład Chemii Organicznej Instytut Technologii i Inżynierii Chemicznej, Wydział Technologii Chemicznej, Politechnika Poznańska, Berdychowo 4, 60-965 Poznań; dr inż. G. Fiutak ORCID: 0000-0001-7781-7922, Katedra Biotechnologii i Ogólnej Technologii Żywności; dr inż. M. Filipczak-Fiutak ORCID: 0000-0001-5355-8022; dr hab. inż. Marek Sady ORCID: 0000-0002-2702-1181, Katedra Przetwórstwa Produktów Zwierzęcych, Wydział Technologii Żywności, Uniwersytet Rolniczy w Krakowie, ul. Balicka 122, 30-149 Kraków. Kontakt: e-mail: maciej.jarzepski@up.poznan.pl

Wprowadzenie

System emulsji stabilizowany naturalnymi środkami powierzchniowo czynnymi to innowacyjne podejście do rosnącego zapotrzebowania na naturalne produkty spożywcze. W związku z tym opracowanie nowych kompozycji emulsyjnych może stanowić odpowiedź świata nauki na zwiększony popyt na tego rodzaju produkty [1]. Dzięki zastosowaniu układów emulsyjnych z olejów konopi siewnej (*Cannabis sativa* L.) i witaminy K możliwe będzie połączenie i wykorzystanie ich cennych właściwości.

Nasiona konopi charakteryzują się wysoką zawartością nienasyconych kwasów tłuszczowych i białek, przy czym jako produkt roślinny nie zawierają cholesterolu. Dlatego cieszą się coraz większym zainteresowaniem jako produkty o charakterze potencjalnie prozdrowotnym. Jednym z produktów spożywczych pozyskiwanych z nasion konopi siewnej jest olej (HSO), będący doskonałym źródłem tłuszczu w diecie człowieka. Zawiera on m.in. tetrahydrokanabinol i wiele związków fenolowych o cechach przeciwutleniających. Ze względu na korzystne właściwości olej z nasion konopi traktowany jest jak potencjalny składnik żywności funkcjonalnej, a także wspomagający w leczeniu wielu chorób. Tłoczony na zimno olej z nasion konopi zawiera większe stężenia tokoferoli, flawonoidów i fenoli w porównaniu do tłoczonego na zimno oleju lnianego czy rzepakowego [2]. Ponadto w stosunku do olejów: sojowego, słonecznikowego, kukurydzianego oraz z pestek winogron charakteryzuje go silniejsze działanie wychwytyjące rodniki DPPH [3]. Olej z nasion konopi jest bogaty w niezbędne nienasycone kwasy tłuszczowe [2]. Jest szczególnie bogatym źródłem kwasu linolowego (18:2, omega-6, około 57 %) i kwasu α -linolenowego (18:3, omega-3, około 19 %), a ponadto stosunek kwasów tłuszczowych n-6 do n-3 w oleju z nasion konopi wynoszący 3:1 sprawia, że jego regularne spożywanie prowadzi do wielu korzyści zdrowotnych [4-6]. Prozdrowotne właściwości oleju z nasion konopi wynikają także z zawartości egzogennych aminokwasów [7], a także istotny jest brak fitynianów, które mogą hamować wchłanianie niezbędnych minerałów, takich jak wapń, żelazo, mangan i cynk. Olej z nasion konopi może stanowić odpowiedni składnik mieszanin emulsyjnych, gdyż oprócz licznych zalet odżywczych stwierdzono jego lepszą zdolność do emulgacji w wodzie w porównaniu do innych olejów roślinnych [8].

Z kolei orzechy piorące (*Sapindus mukorossi*) to naturalne źródło środków powierzchniowo czynnych, które można stosować jako alternatywę dla syntetycznych związków tego typu powszechnie wykorzystywanych w emulsjach. Zewnętrzna otoczka tych orzechów zawiera saponiny [9], które charakteryzuje zdolność obniżania napięcia powierzchniowego wody i oleju oraz właściwości emulgujące. Orzechy piorące są również biodegradowalne i nietoksyczne, co czyni je przyjazną dla środowiska alternatywą dla syntetycznych środków powierzchniowo czynnych. Oprócz właściwości emulgujących saponiny z orzechów piorących mają również działanie antybakteryjne

i hipoalergiczne, dzięki czemu są popularnym składnikiem naturalnych i organicznych produktów do higieny osobistej. W związku z powyższym orzechy piorące mogą mieć zastosowanie jako emulgatory w żywności [10].

Emulgatory mają kluczowe znaczenie dla skutecznego tworzenia kropelek lipidów podczas homogenizacji, jak również w istotny sposób poprawiają stabilność emulsji. Zapobiegają rozdzieleniu faz poprzez kontrolowanie skupienia kuleczek, co sprzyja stabilności układów heterogenicznych i może prowadzić do wydłużenia okresu przydatności produktu do spożycia. W odpowiedzi na rosnące zapotrzebowanie na minimalnie przetworzoną żywność badacze działający w obrębie branży spożywczej szukają naturalnej alternatywy dla składników syntetycznych stosowanych obecnie w recepturach wielu produktów. Dzięki zastosowaniu emulsji możliwe jest lepsze połączenie oleju z konopi siewnej np. z witaminą K, dzięki czemu można wykorzystać prozdrowotne właściwości zarówno oleju jak i witaminy K.

Wśród licznych badań naukowych dotyczących oddziaływania witamin na organizm człowieka ważne miejsce zajmują doniesienia o potencjalnych korzyściach zdrowotnych wynikających z zażywania witaminy K. Dowodzą one, że poza regulacją krzepliwości krwi witamina ta wpływa pozytywnie na stan kości [11] oraz zmniejsza zwapnienie naczyń oraz ogranicza ryzyko chorób układu sercowo-naczyniowego [12,13]. Witamina K jest witaminą rozpuszczalną w tłuszczach, występującą w dwóch formach: K1 (filochinon), główna postać obecna w roślinach oraz K2 (menachinon), która jest syntetyzowana przez bakterie. Naturalnym źródłem witaminy K1 są zielone warzywa liściaste, oliwa z oliwek i olej sojowy [14], a witaminy K2 – produkty mleczne, takie jak sery i masło a także jaja oraz fermentowana soja (natto) [15]. Witamina K1 i witamina K2 są niezbędne do karboksylacji γ -glutamylu wszystkich białek zależnych od witaminy K. Chociaż mikrobiota jelitowa ssaków zdolna jest do produkcji witaminy K2, uważa się, że wytwarzana ilość jest znikoma [16]. Zalecane spożycie witaminy K waha się od 55 do 90 $\mu\text{g}/\text{dzień}$ w przypadku kobiet i 65 ÷ 120 $\mu\text{g}/\text{dzień}$ w przypadku mężczyzn [12], jednak DiNicolantonio i wsp. [17] podają, że nawet ilość 120 $\mu\text{g}/\text{dzień}$ może nie być wystarczająca do wywołania całkowitej karboksylacji wszystkich białek zależnych od witaminy K. W związku z powyższym istotne jest poszukiwanie źródeł i metod suplementacji diety witaminą K. Postanowiono zatem zbadać właściwości układów emulsyjnych wzbogaconych w witaminę K, wytworzonych z użyciem oleju z nasion konopi oraz środków powierzchniowo czynnych pochodzących z orzechów piorących

Material i metody

Material

Witaminę K w postaci stałej zakupiono od firmy P.P.H. „STANLAB” Sp. z o.o. (Polska). Olej z konopi siewnej (*Cannabis sativa* L.) firmy „So Well” kupiono w lokalnym sklepie w Poznaniu. Orzechy piorące, stanowiące czynnik stabilizujący układ emulsyjny zakupiono z firmy Mohani (Psary, Polska). Roztwór wodny ekstraktu z orzechów piorących o stężeniu 10 g/dm³ (surfaktant) przygotowano zgodnie z metodą opracowaną przez Smulka i wsp. [18].

Tabela 1. Kompozycja wytworzonych układów emulsyjnych
Table 1. Composition of the prepared emulsion systems

Nazwa układu / Name of the system	Olej z konopi / Hemp oil (HSO) [ml]	Surfaktant (OP) / Surfactant (OP) [ml]	Woda / Water [ml]	Witamina K / Vitamin K [mg]
HSK7	0,250	0,025	24,725	0,200
HSK2	0,250	0,250	24,500	0,200
HSK4	0,250	0,500	24,250	0,200

Przygotowanie układów emulsyjnych

Układy emulsyjne przygotowano w procesie dwustopniowej homogenizacji. Procedurę przygotowania oparto na poprzednich wynikach badań przedstawionych przez Pratapa-Singha i wsp. [19], a szczegółowo opisaną przez Niyobuhungiro [20]. W tabeli 1 zestawiono kompozycję układów emulsyjnych.

Metody badawcze

Wizualna ocen stabilności układów emulsyjnych

Ocenę stabilności emulsji przeprowadzono w teście obserwacji wizualnej, gdzie przez tydzień obserwowano zachodzenie zjawiska separacji faz. Dodatkowo przeprowadzono analizę mikroskopową wytworzonych układów emulsyjnych. W tym celu wykorzystano odwrócony mikroskop świetlny ZEISS Axio Vert.A1 (Zeiss, Shanghai, Chiny), wyposażony w kolorową kamerę rejestrującą AxioCam 208 (Zeiss, Chiny). Obrazowanie wykonano przy użyciu obiektywów powietrznych o powiększeniu 20×, 40×. Badane układy emulsyjne umieszczono w kuetach pomiarowych μ -Slide VI 0.4 cuvette (Ibidi GmbH, Gräfelfing, Niemcy) i po umieszczeniu na stoliku mikroskopowym odczekano aż nastąpi silna redukcja prędkości przepływu płynu w mikrokanale. Uzyskane obrazy analizowano przy użyciu oprogramowania ZEN3.1 blue edition (Zeiss, Jena, Niemcy).

Wyznaczanie rozmiaru cząstek

Do wyznaczania rozmiaru cząstek/kropki emulsji wykorzystano technikę dynamicznego rozpraszania światła - DLS (z ang. *dynamic light scattering*). Badania przeprowadzono przy użyciu urządzenia Zetasizer Pro (Malvern Panalytical) wraz z dedykowanym oprogramowaniem analizującym ZS XPLOER 1.0. Zaznaczyć należy, że badania przeprowadzono bez dodatkowych rozcieńczeń w celu oceny zachowania układu emulsyjnego [10]. Funkcje autokorelacji rejestrowano w trybie rozpraszania wstecznego przy kącie 173° . Układy emulsyjne przed badaniem były stabilizowane w temperaturze 25°C przez 5 min. w komorze pomiarowej. Pomiarów wykonano wykorzystując ustawienie automatyczne programu, dedykowane dla standardów lateksowych. Rejestrację sygnałów wykonano w minimum 10 powtórzeniach, a zaprezentowano przykładowe wyniki odzwierciedlające wartości średnie z pomiarów.

Spektrofotometria FTIR

Widma w zakresie podczerwieni rejestrowano przy użyciu spektrofotometru FTIR wyposażonym w przystawkę ATR (PerkinElmer, Waltham, MA, USA). Widma próbek były zbierane w zakresie $4000\text{-}500\text{ cm}^{-1}$.

Badania reologiczne

Lepkość układów emulsyjnych wyznaczono przy użyciu wiskozymetru rotacyjnego ViscoQC 300 (Anton Paar GmbH, Graz, Austria). Do badań wykorzystano dedykowane naczynie pomiarowe tzw. "double gap" DG26 oraz wrzeciono B-DG 26. Badania prowadzono w trybie skanowania prędkości obrotowej w zakresie od 2 do 250 obr./min. Analizy prowadzono w temperaturze otoczenia (23°C).

Pomiar pH

Do pomiarów pH wykorzystano pH-metr przenośny S2-Food-Kit Seven2Go pH (Mettler Toledo, Szwajcaria) wyposażony w sondę pomiarową InLab Solids Go-ISM. W pracy przedstawiono uśrednione wyniki z 5 pomiarów.

Analiza barwy

Do wyznaczania koloru próbek emulsji użyto kolorymetru NH310 (Shenzhen ThreeNH Technology Co., Ltd., Shiyang, Chiny) wyposażonego w zintegrowane dedykowane oprogramowanie. Pomiarów wykonano poprzez umieszczenie ok. 2 ml cieczy w kuwecie polistyrenowej, którą zamknięto w zaciemnionej komorze pomiarowej. Wykonano 10 powtórzeń dla każdej z próbek. Następnie obliczono indeks WI

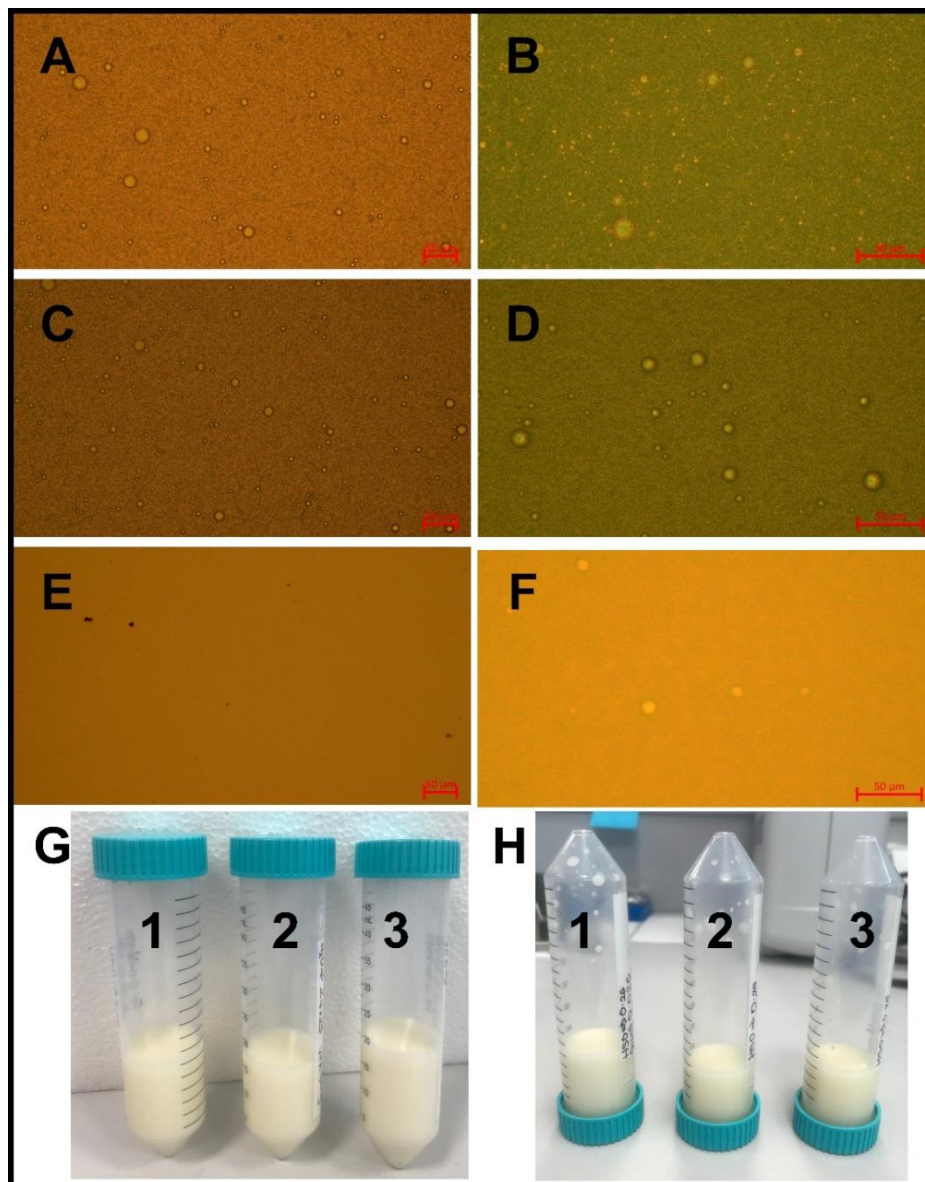
Analiza statystyczna

Wszystkie pomiary powtórzono minimum trzykrotnie, o ile w opisanej metodyce nie wskazano inaczej. Do opracowania statystycznego wykorzystano ANOVA, poziom P, test istotności różnic między średnimi oraz program Excel 2019, a także dedykowane oprogramowanie producentów wykorzystanych urządzeń pomiarowych.

Wyniki badań i dyskusja

Ocena stabilności układów emulsyjnych

Rozmiar kropli fazy rozproszonej w dyspersjach i układach emulsyjnych jest jednym z krytycznych elementów wpływających na ich stabilność. Zmniejszenie rozmiaru kropli do tzw. mikroemulsji czy nanoemulsji korzystnie wpływa na ich stabilność [21]. Brak rozwarstwienia fazy olejowej i wodnej oraz homogeniczność układu jest też jednym z czynników decydujących o wyborze danego produktu spożywczego. Badania, które przeprowadzili Pratap-Singh i wsp. [19] oraz Fathordoobady i wsp. [22] na układach bazujących na oleju z nasion z konopi wykazały, że odpowiednia długość procesu homogenizacji przeprowadzonego dwustopniowo wpływa istotnie na stabilność emulsji oraz umożliwia znaczne zredukowanie rozmiaru kropli fazy rozproszonej. Bazując na ich badaniach oraz wynikach przedstawionych przez Smulka i Jarzębskiego [10] zdecydowano się na wykorzystanie optymalnych kompozycji emulsji wyznaczonych przy użyciu zmodyfikowanej metody projektowania eksperymentu Boxa–Behnkena, gdzie fazą rozproszoną był olej z konopi stabilizowany ekstraktem z orzechów piorących do zaimplementowania jako potencjalnych nośników witaminy K. Jak przedstawiono w tabeli 1, wybrano trzy kompozycje różniące się zawartością surfaktantu celem weryfikacji ich stabilności przy dodatku witaminy K. Na rys. 1 przedstawiono obraz mikroskopowy wytworzonych emulsji. W przypadku układów z zawartością 0,250 i 0,500 cm³ surfaktantu, stwierdzono brak zauważalnych różnic w morfologii emulsji. Natomiast w przypadku bardzo niskiej zawartości ekstraktu z orzechów piorących (Rys.1 E i F) widać jedynie niewielkie aglomeraty przy powiększeniu 20-krotnym (małe czarne punkty widoczne na rys. 1E). Pozostała część fazy rozproszonej przy tym powiększeniu jest ciągła. Przy powiększeniu x40 widać wyraźniej krople emulsji (rys. 1F). Z kolei na rys. 1G przedstawiono wygląd emulsji po wytworzeniu. Wszystkie próbki są homogeniczne i mętne. Rys. 1H obrazuje emulsje po 1 miesiącu przechowywania. Tu również zauważyć można brak wydzielenia fazy niewodnej, świadczący o stabilności układu. Po 3 miesiącach przechowywania w temperaturze 4 - 8°C zaobserwowano powstawanie czarnego osadu, który po upływie kolejnych miesięcy wyraźnie wskazywał na namnożenie się w emulsjach drobnoustrojów (na tym etapie nie przeprowadzono szczegółowych badań identyfikujących rodzaj drobnoustrojów). Podobny efekt obserwowano wcześniej w układach z białkiem grochu [23]. Podkreślić



Rys. 1. Fotografie emulsji wykonane mikroskopem optycznym: emulsja HSK2 w powiększeniu x 20 (A), x40 (B); emulsja HSK4 w powiększeniu x20 (C), x40 (D); emulsja HSK7 w powiększeniu x20 (E), x40 (F). Zdjęcia emulsji 1 – HSK2, 2 – HSK4, 3 – HSK7 po wytworzeniu (G) i po miesiącu przechowywania (H) w temperaturze 4-8°C

Fig. 1. Optical microscopy images of the emulsions: HSK2 magnification x 20 (A), x40 (B); HSK4 magnification x20 (C), x40 (D); HSK7 magnification x20 (E), x40 (F). Images of the emulsions 1 – HSK2, 2 – HSK4, 3 – HSK7 directly after preparation (G) after 1 month storage (H) at 4-8 °C

należy, że do kompozycji nie wprowadzono żadnych dodatkowych środków konserwujących przeznaczonych do produktów spożywczych czy też często używanego w badaniach emulsji azydku sodu. Badania mikroskopowe i obserwacje wizualne potwierdziły, że nawet niewielki udział dodatku ekstraktu z orzechów piorących w ilości $0,025 \text{ cm}^3$ (przy objętości całej próbki 25 cm^3) korzystnie wpływa na stabilność opracowanych kompozycji emulsji. Brak rozwarstwienia i duża homogeniczność badanych emulsji, stanowiły przesłankę do bardziej szczegółowej analizy rozmiaru ich kropeł/cząstek. Celowe jest tu użycie wyrażenia „cząstek” z uwagi na możliwość wystąpienia zawiesiny nierozpuszczonej witaminy K. Jednakże badania wizualne nie potwierdziły występowania wyraźnej frakcji substancji nierozpuszczonych.

W tabeli 2 zestawiono parametry badanych układów emulsyjnych wyznaczone za pomocą techniki dynamicznego rozpraszania światła. Parametr z-ave (wyznaczany na podstawie otrzymanych krzywych autokorelacji metodą Cumulant), który dość często jest poddawany dyskusji w kontekście porównania wielkości cząstek wyznaczonych techniką DLS dla wszystkich 3 badanych układów był bardzo zbliżony i jego wartość wyniosła między 480 a 492 nm. Dopiero szczegółowa analiza rozkładów wielkości cząstek (względem intensywności oraz względem liczności cząstek) wykazała, że najmniejsze cząstki zarejestrowano dla układu zawierającego $0,250 \text{ cm}^3$ surfaktantu. Zwiększenie stężenia orzechów piorących do $0,500 \text{ cm}^3$ skutkowało zwiększeniem rozmiaru cząstek do ok. 529 nm (780 nm względem intensywności). Natomiast interesujące wyniki uzyskano dla zawartości stabilizatora w ilości $0,025 \text{ cm}^3$, gdzie rozmiar cząstek względem liczności wyniósł 657 nm. Ten układ charakteryzował się również

Tabela 2. Zestawienie parametrów uzyskanych w pomiarach techniką DLS: z-ave (nm), indeks polidispersyjności (PDI), Średnie maksimum piku rozkładu wielkości cząstek względem intensywności (nm), Średnie maksimum piku rozkładu wielkości cząstek względem ich liczby (nm)

Table 2. DLS measurement results: z-ave (nm), polydispersity index (PDI), mean particle size distribution by intensity (nm), mean particle size distribution by number (nm)

Nazwa układu / Name of the system	Z-ave / Z-ave (nm)	Indeks polidispersyjności / Polydispersity index (PDI)	Maksimum piku rozkładu wielkości cząstek względem intensywności / The average maximum peak of the particle size distribution versus intensity (nm)	Maksimum piku rozkładu wielkości cząstek względem ich liczby / The average maximum peak of the particle size distribution relative to particle number (nm)
HSK2	$480^a \pm 7$	$0.348^a \pm 0.055$	$709^a \pm 68$	$372^a \pm 194$
HSK4	$478^a \pm 14$	$0.390^a \pm 0.043$	$780^a \pm 16$	$529^a \pm 39$
HSK7	$492^a \pm 4$	$0.500^b \pm 0.005$	$905^b \pm 28$	$657^a \pm 58$

Objaśnienia / Explanatory notes:

^{a, b} – wartości oznaczone różnymi literami w kolumnach różnią się istotnie statystycznie istotnie / ^{a, b} – values marked with different letters in columns differ statistically significantly

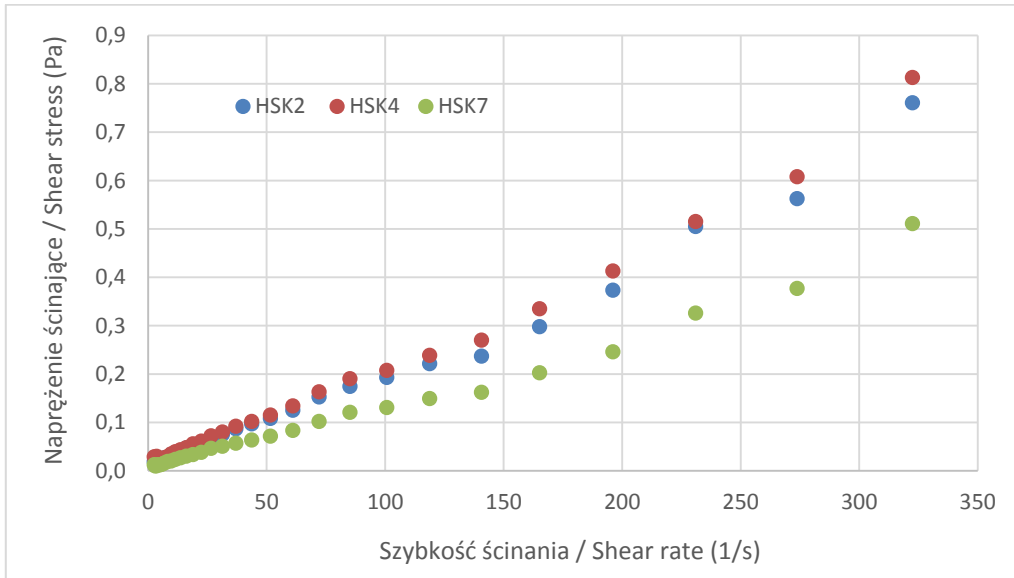
największym współczynnikiem polidispersyjności (PDI) wynoszącym 0,5. Otrzymane wyniki wskazują, że nie jest w pełni uzasadnione zwiększanie stężenia stabilizatora i bardziej właściwe jest poszukiwanie optymalnej kompozycji, wykorzystujące np. metody randomizowane (tak jak w tym przypadku, bazując na wcześniejszych doniesieniach literaturowych i badaniach własnych).

Właściwości reologiczne emulsji

Jednym z wyzwań w technologii żywności jest opracowanie kompozycji umożliwiających przyjmowanie pokarmów i substancji odżywczych przez osoby wymagające żywienia specjalistycznego. Posiłek w postaci substancji stałej bardzo często jest trudno przyswajalny przez osoby cierpiące zarówno na przewlekłe choroby układu pokarmowego, jak i przykładowo pacjentów po różnych zabiegach inwazyjnych (chirurgicznych). Szczególnie istotne jest w tych przypadkach suplementowanie witaminą K, która wykazuje właściwości przeciwzapalne [24]. Znaczna część dostępnych suplementów diety zawierających witaminy ma postać kapsulek, głównie żelatynowych. Z kolei witaminy z rodziny K rozpuszczają się głównie w tłuszczach, co znacząco utrudnia kompozycję suplementu diety i jego atrakcyjność sensoryczną. Alternatywą może być zaproponowany układ emulsyjny, stąd też przeprowadzono badania właściwości reologicznych przygotowanych emulsji. Zależność ich naprężenia ścinającego od szybkości ścinania prezentuje rys. 2. Analizowane układy przy wartościach szybkości ścinania poniżej 140 1/s zachowywały się jak płyn nienewtonowski rozrzedzany ścinaniem, jednak przy wyższych szybkościach ścinania emulsje zaczynały wykazywać cechy płynu zagęszczanego ścinaniem. Zmiany te są jeszcze bardziej uwypuklone wynikami przedstawionymi na rys. 3, gdzie pokazano zależności lepkości dynamicznej od szybkości ścinania. Warto podkreślić, że wzrost stężenia surfaktantu wpływał na zwiększenie lepkości dynamicznej, co można także powiązać ze zmniejszeniem rozmiaru kropeł emulsji, podobne zjawisko zaobserwował Barnes [25]. Jednocześnie stężenie surfaktantu nie miało wpływu na wartość szybkości ścinania, przy której obserwowano zmianę właściwości płynu nienewtonowskiego. Może to wskazywać, że jest to parametr zależny od stężenia fazy rozproszonej [26] i interakcji zachodzących między jej kroplami, jak np. koalescencji [27]. Aczkolwiek Pal [28] wykazał, że zależność lepkości dynamicznej od udziału objętościowego fazy rozproszonej nie musi być zależnością liniową.

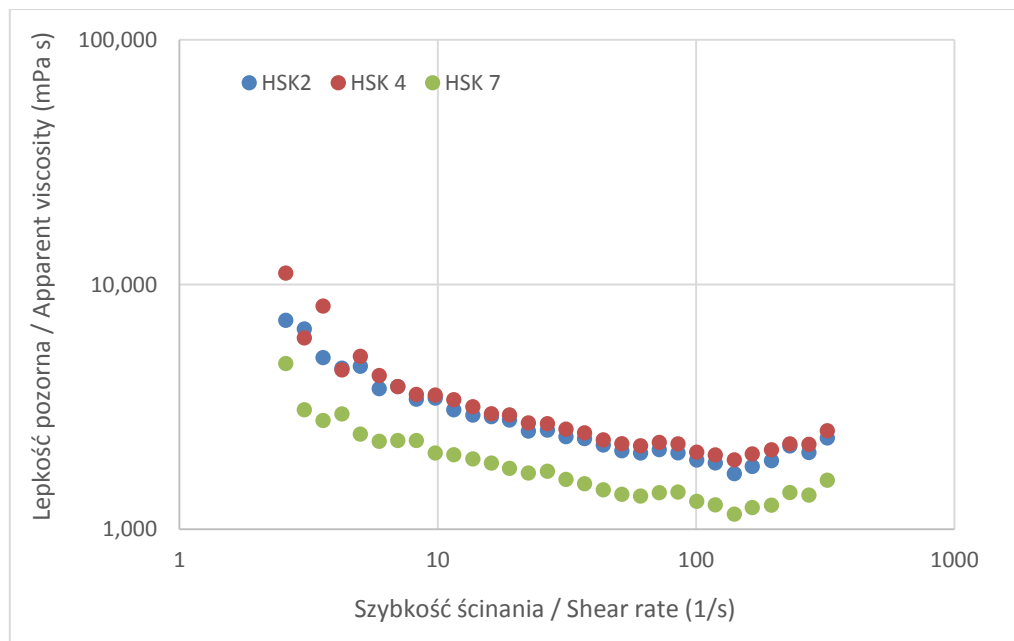
Analizy spektrofotometryczne układów emulsyjnych

Dla układów emulsyjnych zawierających witaminę K wykonano także widma w podczerwieni, które zaprezentowano na rys. 4. W przypadku oleju z nasion konopi widoczne są wyraźnie sygnały drgań rozciągających wiązań C-H ($2800\text{-}3050\text{ cm}^{-1}$).



Rys. 2. Wykres zależności zmiany naprężenia ścinającego względem szybkości ścinania

Fig. 2. Representative curves of shear stress vs. shear rate relation

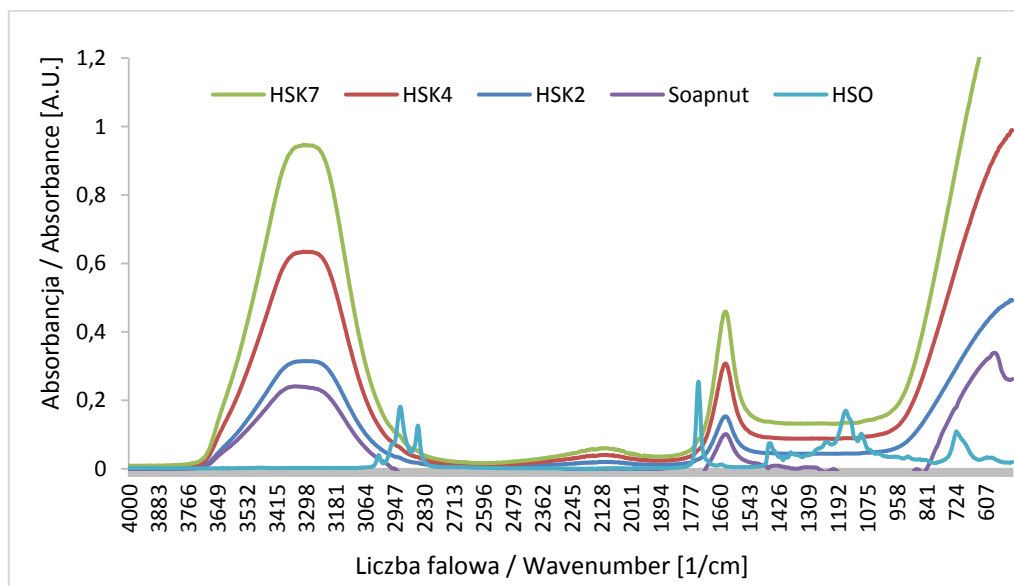


Rys. 3. Wykres zależności zmiany lepkości dynamicznej względem szybkości ścinania

Fig. 3. Representative curves of dynamic viscosity vs. shear rate relation

Wysoka względna intensywność pasma 1745 cm^{-1} (charakterystycznego dla grupy karbonylowej w sąsiedztwie wiązań nienasyconych) potwierdza bardzo wysoką zawartość nienasyconych kwasów tłuszczowych [8,29]. Podobne sygnały są widoczne w widmie surfaktantu roślinnego. Odpowiada on również grupom C=O, ale jest obecny w innych typach cząsteczek, takich jak steroidy, które są składnikami saponin. Z kolei emulsje zawierają przede wszystkim sygnały od grup O-H cząsteczek wody, a brak jest widocznych sygnałów od surfaktantu roślinnego oraz od oleju konopnego.

Dodatkowych informacji dostarcza analiza barwy w przestrzeni barw $L^*a^*b^*$ (Tabela 3). Wraz ze wzrostem zawartości surfaktantu roślinnego próbki emulsji stają się ciemniejsze (maleje wartość parametru L^*), a odcień zostaje przesunięty w kierunku żółto-zielonego (malejące a^* i rosnące b^*), przy czym zmiany te mają charakter statystycznie istotny. Różnice te wynikają ze zmiany stężenia surfaktantu, choć należy je wiązać z większym rozpraszaniem i pochłanianiem światła przez próbki, a nie barwą samego surfaktantu. Jak zauważyli Kowalska i wsp. [30], zmiany koloru w układach emulsyjnych wynikają ze zmian wielkości kropeł w czasie przechowywania, w szczególności parametr L^* rośnie wraz ze zwiększaniem stężenia kropeł i zmniejszaniem się ich rozmiarów.



Rys. 4. Widma FTIR układów emulsyjnych HSK2, HSK4, HSK7 oraz oleju z konopi (HSO) i roztworu wodnego ekstraktu z orzechów piorących (oznaczone jako „Soapnut”)

Fig. 4. FTIR spectra of HSK2, HSK4, HSK7 emulsions, hemp seed (HSO) oil and soapnuts water solution

Tabela 3. Wyniki analizy koloru w skali L*a*b*

Table 3. Color analysis results in L*a*b*

Nazwa układu / Name of the system	L^*	a^*	b^*
HSK2	$60.37^b \pm 0.03$	$-2.21^a \pm 0.03$	$2.45^a \pm 0.02$
HSK4	$51.66^c \pm 0.01$	$-1.76^c \pm 0.05$	$2.49^a \pm 0.03$
HSK7	$73.18^a \pm 0.01$	$-2.10^b \pm 0.02$	$4.07^b \pm 0.02$

Objaśnienia / Explanatory notes:

^{a, b, c} – wartości oznaczone różnymi literami w kolumnach różnią się istotnie statystycznie istotnie / ^{a, b, c} – values marked with different letters in columns differ statistically significantly

Odczyn kwasowo-zasadowy emulsji

Zbadano także odczyn pH emulsji, uzyskując wartości $5,15 \pm 0,06$; $5,16 \pm 0,03$ i $5,12 \pm 0,05$, odpowiednio dla HSK7, HSK2 i HSK4. Różnice między tymi pomiarami nie wykazują statystycznie istotnych różnic, co pozwala stwierdzić, że wzrost stężenia surfaktantu nie wpływa na odczyn kwasowo-zasadowy emulsji.

Wnioski

1. Przeprowadzone badania wskazują, że ekstrakt z orzechów piorących zawierający saponiny może być skutecznie stosowany jako surfaktant w emulsjach typu olej w wodzie na bazie oleju z nasion konopi siewnej, wzbogaconych w witaminę K.
2. Pożądane efekty stabilizujące przynosi już relatywnie niewielki dodatek ekstraktu z orzechów piorących, wynoszący $0,025 \text{ cm}^3$ ekstraktu o stężeniu 10 g/L na 25 cm^3 całej objętości próbki. Emulsja o takim składzie posiadała cząstki o średnim rozmiarze $z\text{-ave}$ bliskim 500 nm i indeksie polidispersyjności równym $0,5$. Emulsja zachowywała wysoką stabilność zarówno bezpośrednio po przygotowaniu, jak i po miesiącu przechowywania.
3. Badania reologiczne emulsji wskazują, że ma ona cechy płynu nienewtonowskiego, przy czym przy szybkości ścinania poniżej 140 1/s zachowywały się jak płyn rozrzedzany ścinaniem, a przy wyższych szybkościach ścinania – jak płynu zagęszczany ścinaniem.
4. Opracowane układy emulsyjne są bazą odniesienia do opracowania w przyszłości suplementów diety, przeznaczonych w szczególności dla osób wymagających wprowadzenia do posiłków płynnych preparatów witamin nierozpuszczalnych w wodzie.

Literatura

- [1] Zhang J., Reineccius G.A.: Factors controlling the turbidity of submicron emulsions stabilized by food biopolymers and natural surfactant. *LWT - Food Sci. Technol.* 2016, 71, 162-168.
- [2] Teh S.-S., Birch J. Physicochemical and quality characteristics of cold-pressed hemp, flax and canola seed oils. *J. Food Compos. Anal.* 2013, 30, 26-31.
- [3] Siger A., Nogala-Kalucka M., Lampart-Szczapa E.: The Content And Antioxidant Activity Of Phenolic Compounds In Cold-Pressed Plant Oils. *J. Food Lipids* 2008, 15, 137-149.
- [4] Hwang H., Kim S., Winkler- Moser J.K., Lee S., Liu S.X.: Feasibility of hemp seed oil oleogels structured with natural wax as solid fat replacement in margarine. *J. Am. Oil Chem. Soc.* 2022, 99, 1055-1070.
- [5] Leizer C., Ribnicky D., Poulev A., Dushenkov S., Raskin I.: The Composition of Hemp Seed Oil and Its Potential as an Important Source of Nutrition. *J. Nutraceuticals, Funct. Med. Foods*, 2000, 2, 35-53.
- [6] Vitorović J., Joković N., Radulović N., Mihajilov-Krstević T., Cvetković V.J., Jovanović N., Mitrović T., Aleksić A., Stanković N., Bernstein N.: Antioxidant Activity of Hemp (*Cannabis sativa* L.) Seed Oil in *Drosophila melanogaster* Larvae under Non-Stress and H₂O₂-Induced Oxidative Stress Conditions. *Antioxidants*, 2021, 10, 830.
- [7] Burton R.A., Andres M., Cole M., Cowley J.M., Augustin M.A.: Industrial hemp seed: from the field to value-added food ingredients. *J. Cannabis Res.* 2022, 4, 45.
- [8] Jarzębski M., Smulek W., Siejak P., Rezler R., Pawlicz J., Trzeciak T., Jarzębska M., Majchrzak O., Kaczorek E., Kazemian P.: *Aesculus hippocastanum* L. as a Stabilizer in Hemp Seed Oil Nanoemulsions for Potential Biomedical and Food Applications. *Int. J. Mol. Sci.* 2021, 22, 887.
- [9] Mondal M.H., Malik S., Garain A., Mandal S., Saha B.: Extraction of Natural Surfactant Saponin from Soapnut (*Sapindus mukorossi*) and its Utilization in the Remediation of Hexavalent Chromium from Contaminated Water. *Tenside Surfactants Deterg.* 2017, 54, 519-529.
- [10] Smulek W., Jarzębski M.: Hemp seed oil nanoemulsion with *Sapindus* saponins as a potential carrier for iron supplement and vitamin D. *Rev. Adv. Mater. Sci.* 2023, 62, 20220317.
- [11] Cockayne S., Adamson J., Lanham-New S., Shearer M.J., Gilbody S., Torgerson D.J.: Vitamin K and the Prevention of Fractures. *Arch. Intern. Med.* 2006, 166, 1256.
- [12] Beulens J.W.J., Booth S.L., van den Heuvel E.G.H.M., Stoecklin E., Baka A., Vermeer C.: The role of menaquinones (vitamin K₂) in human health. *Br. J. Nutr.* 2013, 110, 1357-1368.
- [13] Geleijnse J.M., Vermeer C., Grobbee D.E., Schurgers L.J., Knapen M.H.J., van der Meer I.M., Hofman A., Witteman J.C.M.: Dietary Intake of Menaquinone Is Associated with a Reduced Risk of Coronary Heart Disease: The Rotterdam Study. *J. Nutr.* 2004, 134, 3100-3105.
- [14] Shearer M.J., Bach A., Kohlmeier M.: Chemistry, Nutritional Sources, Tissue Distribution and Metabolism of Vitamin K with Special Reference to Bone Health. *J. Nutr.* 1996, 126, 1181S-1186S.
- [15] Schurgers L.J., Geleijnse J.M., Grobbee D.E., Pols H.A.P., Hofman A., Witteman J.C.M., Vermeer C.: Nutritional Intake of Vitamins K₁ (Phylloquinone) and K₂ (Menaquinone) in The Netherlands. *J. Nutr. Environ. Med.* 1999, 9, 115-122.
- [16] Weber, P. Vitamin K and bone health. *Nutrition* 2001, 17, 880-887.
- [17] DiNicolantonio, J.J.; Bhutani, J.; O'Keefe, J.H. The health benefits of vitamin K. *Open Hear*, 2015, 2, e000300.
- [18] Smulek W., Zdzarta A., Łuczak M., Krawczyk P., Jesionowski T., Kaczorek E.: *Sapindus* saponins' impact on hydrocarbon biodegradation by bacteria strains after short- and long-term contact with pollutant. *Coll. Surf. B Biointerface.* 2016, 142, 207-213.

- [19] Pratap-Singh A., Guo Y., Lara Ochoa S., Fathordoobady F., Singh A.: Optimal ultrasonication process time remains constant for a specific nanoemulsion size reduction system. *Sci. Rep.* 2021, 11, 1-13.
- [20] Niyobuhungiro S.: Emulsion based on hemp seed oil stabilized by soap nuts as a possible vitamin K food supplement, Poznań University of Life Sciences, 2023.
- [21] McClements D.J.: Nanoemulsions versus microemulsions: Terminology, differences, and similarities. *Soft Matter*, 2012, 8, 1719-1729.
- [22] Fathordoobady F., Sannikova N., Guo Y., Singh A., Kitts D.D., Pratap-Singh A.: Comparing microfluidics and ultrasonication as formulation methods for developing hempseed oil nanoemulsions for oral delivery applications. *Sci. Rep.* 2021, 11, 72.
- [23] Jarzębski M., Fathordoobady F., Guo Y., Xu M., Singh A., Kitts D.D., Kowalczewski P.L., Jeżowski P., Pratap Singh A.: Pea Protein for Hempseed Oil Nanoemulsion Stabilization. *Molecules* 2019, 24.
- [24] Kieronska-Rudek A., Kij A., Kaczara P., Tworzydło A., Napiorkowski M., Sidoryk K., Chłopicki S.: Exogenous Vitamins K Exert Anti-Inflammatory Effects Dissociated from Their Role as Substrates for Synthesis of Endogenous MK-4 in Murine Macrophages Cell Line. *Cells*, 2021, 10, 1571.
- [25] Barnes H.A. Rheology of emulsions — a review. *Coll. Surf. A Physicochem. Eng. Asp.* 1994, 91, 89-95.
- [26] Akhtar M., Murray B.S., Dickinson E.: Perception of creaminess of model oil-in-water dairy emulsions: Influence of the shear-thinning nature of a viscosity-controlling hydrocolloid. *Food Hydrocoll.* 2006, 20, 839-847.
- [27] Rosti, M.E.; Takagi, S. Shear-thinning and shear-thickening emulsions in shear flows. *Phys. Fluids* 2021, 33.
- [28] Pal R. Rheology of simple and multiple emulsions. *Curr. Opin. Colloid Interface Sci.* 2011, 16, 41-60.
- [29] Jović O., Jović A.: FTIR- ATR adulteration study of hempseed oil of different geographic origins. *J. Chemom.* 2017, 31.
- [30] Kowalska M., Turek P., Żbikowska A., Babut M., Szakiel J.: The Quality of Emulsions with New Synthetized Lipids Stabilized by Xanthan Gum. *Biomolecules* 2021, 11, 213.

ANALYSIS OF EMULSION SYSTEMS WITH HEMP OIL AS VITAMIN K SUPPLEMENTS

S u m m a r y

Introduction. Vitamin K plays an important role in the blood clotting process, improving bone health, reducing vascular calcification and cardiovascular risk, and has anti-inflammatory properties. The poor water solubility of vitamin K is a barrier to its introduction into functional foods. This makes it necessary to develop innovative forms of vitamin K supplements based on emulsion systems. Emulsions with sub-micron-sized droplets shows greater stability compared to macroscopic emulsions. Another challenge for the food technology is the need for alternatives to artificial surfactants. Plant extracts containing saponins in their structure, such as the soap nut extract used in this work, can be considered an alternative.

Results and conclusions. This study shows three optimal compositions of emulsions based on hemp oil (from *Cannabis sativa* L. seeds), stabilized with a soap nut extract in the amount of 0.025, 0.250 and 0.500 cm³ per 25 cm³ of the entire composition. Vitamin K was used as a health-promoting ingredient in an amount of 0.2 mg. After the emulsion systems were produced, they were examined in terms of particle/droplet sizes using dynamic light scattering. Their homogeneity was evaluated using an optical micro-

scope. The dynamic viscosity was determined with a rotational rheometer. An ATR-FTIR analysis, as well color and pH measurements, of the emulsion were also carried out. All three emulsions tested were characterized by a high degree of stability after one month. The emulsions based on hemp oil whose droplet size is below 1 micrometer can provide an alternative to vitamin carriers. Whereas the soap nut extract may become an effective stabilizer/surfactant used in the food technology.

Key words: nanoemulsion; hemp oil; vitamin K; stability; soap nuts ☒