

ریزپوشانی عصاره زعفران در نانوحامل‌های لیپوزومی و بررسی ویژگی‌های فیزیکی‌شیمیایی آنها

پریسا کرمانی^۱، سید مهدی جعفری^{۲،۳}، زهرا رفیعی^۴

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد علوم و صنایع غذایی، دانشکده صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران

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

پست الکترونیک: smjafari@gau.ac.ir

۳- مرکز تحقیقات حلال جمهوری اسلامی ایران، سازمان غذا و داروی ایران، وزارت بهداشت، درمان و آموزش پزشکی، تهران، ایران

۴- مدیر تحقیق و توسعه، شرکت افق دشت آریا، تبریز، ایران

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۳/۲/۴

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۱۰/۱۷

چکیده

سابقه و هدف: زعفران با دارا بودن ویژگی‌های متعدد سلامتی بخش، کاربرد گسترده‌ای در درمان بیماری‌ها دارد و علاوه بر این، قادر است رنگ، طعم و عطر فوق‌العاده‌ای به مواد غذایی ببخشد. با این وجود، استفاده از ترکیبات زیست فعال زعفران در مواد غذایی با محدودیت‌هایی همراه است. ریزپوشانی این ترکیبات با روش‌های مختلف از جمله نانولیپوزوم‌ها یکی از راهکارهای مناسب جهت رفع این مشکلات می‌باشد. هدف از این پژوهش، طراحی و تولید عصاره زعفران ریزپوشانی شده در نانولیپوزوم‌ها و بررسی ویژگی‌های فیزیکی‌شیمیایی نانوحامل‌های تولید شده بود.

مواد و روش‌ها: ریزپوشانی عصاره زعفران توسط نانولیپوزوم‌ها به روش هیدراسیون لایه نازک با غلظت لسیتین سوپا (۲۲/۵، ۴۵ و ۹۰ میلی‌گرم در ۱۰ میلی‌لیتر) و غلظت زعفران (۵ و ۲/۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر) انجام شد. ویژگی‌های فیزیکی‌شیمیایی و رهايش عصاره زعفران از نانولیپوزوم‌ها در محیط آبی در دو دمای ۷۲ و ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد ارزیابی گردید.

یافته‌ها: نمونه بهینه با ویژگی‌های فیزیکی‌شیمیایی مناسب (تیمار با غلظت لسیتین ۹۰ میلی‌گرم در ۱۰ میلی‌لیتر و ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره زعفران) دارای اندازه ذرات ۸۲ نانومتر، شاخص پراکندگی ذرات ۰/۴، پتانسیل زتا ۲۷/۶- میلی‌ولت و راندمان ریزپوشانی ۹۰/۱ درصد با پایداری ۹۹ درصد بود. همچنین، نانولیپوزوم‌های تولیدی در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد و پس از ۲۰ دقیقه قادر به حفظ ۴۰ درصد از عصاره در سطح $P < 0.05$ بودند.

نتیجه‌گیری: نانولیپوزوم‌ها حامل خوبی برای حفظ ترکیبات مؤثره زعفران هستند و همچنین از آن‌ها می‌توان جهت تولید محصولات با دمای فرآوری ملایم، بهره جست.

واژگان کلیدی: زعفران، نانولیپوزوم، ریزپوشانی، رهايش، مقاومت حرارتی

پیام‌های اصلی

- اندازه ذرات همه تیمارها زیر ۱۰۰ نانومتر و مناسب برای کاربردهای گسترده بود و تصویر حاصل از میکروسکوپ FESEM نتایج حاصل از دستگاه DLS را تایید کرد.
- پتانسیل زتا همه تیمارها در محدوده مناسبی قرار داشت و موجب پایداری بالا گردید.
- میزان مطلوب شاخص پراکندگی ذرات نانولیپوزوم‌ها نشان‌دهنده نانولیپوزوم‌های با اندازه یکدست و یکنواخت بود.
- راندمان ریزپوشانی در این پژوهش جزو بالاترین راندمان‌های ریزپوشانی در پژوهش‌های مشابه در زمینه نانولیپوزوم‌ها، اندازه‌گیری شد.
- بررسی رهايش کروسین در دو دمای آب ۷۲ درجه و ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد نشان داد که نانولیپوزوم‌های تولیدی توانایی تحمل در برابر دمای آب ملایم را دارند.

• مقدمه

در مورد ترکیبات فنولی می‌توان به پژوهش رفیعی و همکاران (۲۰۱۷) اشاره کرد که نانوریزپوشانی عصاره پوست سبز پسته توسط نانولیپوزوم‌ها موجب بهبود پایداری عصاره‌ها در طول دوره نگهداری شد (۹). در مورد رنگ‌های طبیعی، ریزپوشانی بتانین در نانولیپوزوم‌ها موجب افزایش دوبرابری حفظ این ترکیب نسبت به حالت آزاد در آب‌نات شد (۱۰). در پژوهشی دیگر ریزپوشانی بتاکاروتن در نانولیپوزوم‌ها موجب افزایش پایداری و مقاومت حرارتی آن گردید (۱۱). در پژوهش هادوی و همکاران، ریزپوشانی عصاره زعفران توسط نانولیپوزوم‌ها صورت گرفت که اندازه ذرات ۹۵ نانومتر اندازه‌گیری شد، راندمان ریزپوشانی، ۴۲ درصد گزارش گردید و پایداری ۶۵ درصد محاسبه شد (۱۲). همچنین نجفی و همکاران ریزپوشانی عصاره زعفران توسط نانولیپوزوم‌ها و کاربرد آن در پوشش پولولان را انجام دادند که نانولیپوزوم‌ها به روش فراصوت تهیه شدند و راندمان ریزپوشانی ۳۰ درصد گزارش گردید (۱۳). در پژوهشی دیگر ریزپوشانی عصاره زعفران توسط نانولیپوزوم‌ها به روش هموزناسیون فشار بالا انجام شد و راندمان ریزپوشانی حدود ۷۵ درصد و اندازه ذرات هم ۷۰ نانومتر گزارش شد (۱۴).

هدف از این پژوهش تولید نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره زعفران بود. علاوه بر این، رهائش عصاره زعفران از نانولیپوزوم‌ها در شرایط دمایی آب بالا بررسی گردید که تا به حال در هیچ پژوهشی بررسی نشده بود. لازم به ذکر است، شرایط پاستوریزاسیون و شرایط پخت برای تولید بسیاری از محصولات غذایی کاربرد دارد. بنابراین دمای آب ۷۲ و ۱۰۰ درجه سانتی-گراد، انتخاب شد که دمای ۷۲ درجه به عنوان شبیه‌سازی شرایط پاستوریزاسیون و دمای ۱۰۰ درجه، شبیه‌سازی شرایط پخت بود.

• مواد و روش‌ها

تهیه نانولیپوزوم‌های حاوی زعفران

تهیه نانولیپوزوم‌ها با استفاده از روش آبگیری هیدراسیون لایه نازک انجام شد. به این صورت که غلظت‌های مختلف لسیترین سویا سیگما (۲۲/۵، ۴۵ و ۹۰ میلی‌گرم در ۱۰ میلی-لیتر)، ۰/۱ گرم کلسترول مرک و یک قطره (۰/۰۲ گرم) از توپین ۸۰ مرک در اتانول خالص حل شد. محلول حاصل به یک فلاسک ته گرد منتقل گردید و فرآیند تبخیر حلال و تشکیل یک لایه نازک با سرعت گردش ۶۰ دور در دقیقه، در دمای ۶۰ درجه سانتی‌گراد و با استفاده از تبخیرکننده چرخشی (روتاری

میزان تولید زعفران در ایران در حدود ۲۳۰ تن است که ۹۳/۷ درصد زعفران تولیدی جهان را تشکیل می‌دهد. استفاده از گیاه زعفران بیشتر از قسمت کلاله‌های خشک آن است که رنگ زرد، طعم تلخ و عطر شدید دارد (۱). اصلی‌ترین ترکیبات کلاله زعفران، کروسین (مسئول اصلی رنگ)، پیکروکروسین (عامل طعم تلخ) و سافرانال (عامل عطر و بوی زعفران) می‌باشند (۲). کروسین رنگدانه‌ای با ساختار کاروتنوئیدی می‌باشد. علی-رغم فواید فراوان کاروتنوئیدها، این ترکیبات مستعد تخریب هستند (۳). بنابراین کاربرد مستقیم زعفران در مواد غذایی هم با محدودیت‌هایی از جمله تخریب تحت شرایط محیطی (حرارت، pH اسیدی، نور و اکسیژن)، شرایط فراوری (حرارت-دهی، اکستروژن و غیره) و نیز شرایط حاکم بر دستگاه گوارش (pH اسیدی و آنزیم‌ها)، واکنش با ترکیبات مواد غذایی و قابلیت دسترسی زیستی پایین همراه است (۴). ریزپوشانی یکی از راهکارهای مناسب و کارآمد جهت رفع موانع مربوط به استفاده مستقیم از ترکیبات زیست فعال در سامانه‌های غذایی است. ریزپوشانی فرآیندی است که مواد مؤثره که از آن به عنوان هسته و فاز داخلی یاد می‌شود، در داخل ماده پوشش‌دهنده مناسب (دیواره، کپسول، ماده حامل و فاز خارجی) قرار می‌گیرد (۵) و در نهایت فرآیند رهائش ترکیبات مؤثره به شکل‌های گوناگون از جمله تخریب، انتشار، انحلال ماده دیواره در اثر تغییرات pH، دما و غیره اتفاق می‌افتد (۶). ریزپوشانی مواد مؤثره معمولاً در مقیاس نانو انجام می‌گیرد که از مزایای آن افزایش کیفیت و دسترسی زیستی بالاتر و مؤثرتر ترکیب زیست فعال می‌باشد. ریزپوشانی به روش‌های مختلفی از جمله لیپوزوم‌ها انجام می‌شود (۷).

لیپوزوم‌ها از یک یا چند دولایه فسفولیپیدی تشکیل شده‌اند و شکل ظاهری آن‌ها به صورت وزیکول‌های کروی می‌باشد. لیپوزوم‌ها دارای فازهای چربی و آبی می‌باشند که این امر موجب می‌شود که برای به دام انداختن و آزادسازی طیف وسیعی از مواد به کار روند. لیپوزوم‌ها دارای نقش محافظتی در برابر موارد مختلف همچون اسیدیته، دما و آنزیم می‌باشند. همچنین از لحاظ زیستی، میزان جذب ترکیبات زیست فعال را در دستگاه گوارش افزایش می‌دهند (۸).

پژوهش‌های بسیاری در زمینه مزایای استفاده از نانولیپوزوم‌ها جهت ریزپوشانی ترکیبات زیست فعال و غنی‌سازی مواد غذایی با آن‌ها انجام شده است. به عنوان مثال،

داده شد. در نتیجه دیواره نانولیپوزومها تخریب و عصاره زعفران آزاد شد. سپس محلول حاصل توسط فیلتر میلیپور ۰/۴۵ فیلتر و رقیق سازی انجام شد. در نهایت میزان غلظت کل عصاره زعفران موجود در داخل نانولیپوزومها توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر اندازه گیری شد. Cfree غلظت عصاره آزاد (ریزپوشانی نشده) را نشان می دهد که در این بخش، مایع رویی (سوپرناتانت) برداشته شد و بعد از رقیق سازی ۱۰۰ برابری از طریق دستگاه اسپکتروفوتومتر میزان عصاره آزاد زعفران بر حسب کروسیین به دست آمد (۱۶).

تجزیه و تحلیل پایداری با تعیین شاخص خامه ای شدن

یک نمونه ۲۰ میلی لیتری نانولیپوزوم تازه تهیه و به لوله آزمایش منتقل شد و در دماهای ۴ درجه سانتی گراد بعد ۳۰ روز نگهداری، ارزیابی گردید. در طول ذخیره سازی برخی از نمونه ها به صورت یک لایه در بالا و یک لایه کمرنگ در پایین جدا شدند. شاخص خامه ای شدن (Creaming Index) CI به عنوان نسبت ارتفاع لایه سرمی (Height of the Serum) HS (layer) به ارتفاع کل نمونه (Height of the Emulsion) HE در لوله مطابق رابطه زیر بیان شد (۱۷، ۱۲):

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

ارزیابی مورفولوژی و ریز ساختار سطحی

جهت تعیین ویژگی های سطحی نانولیپوزومها ابتدا نانولیپوزوم های تولیدی ۱۰ برابر با آب رقیق تر شدند و سپس یک قطره از آن بر روی لام ریخته شد و توسط آون در دمای ۳۰ درجه سانتی گراد خشک گردید و در نهایت تصویربرداری توسط میکروسکوپ الکترونی روبشی گسیل میدانی (FESEM Field Emission Scanning Electron Microscope) انجام شد (۷).

رهایش عصاره زعفران از نانولیپوزومها

رهایش در آب داغ با استفاده از روش کیسه دیالیز مورد مطالعه قرار گرفت. نانولیپوزوم های تولیدی در داخل دوکیسه دیالیز (سیگما، آلمان، ۱۲ کیلو دالتون) محکم شد و سپس کیسه ها یکی در آب گرم ۷۲ درجه سانتی گراد و دیگری در آب جوش ۱۰۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. طیفسنجی در طول موج ۴۴۰ نانومتر در فواصل زمانی مناسب انجام گردید و انتشار عصاره زعفران مورد بررسی قرار گرفت. لازم به ذکر است بررسی امکان رهایش نانولیپوزوم های حاوی عصاره زعفران از کیسه دیالیز کاتاف ۱۲ کیلو دالتونی با توجه به نانولیپوزومها که اندازه خیلی کوچکی دارند مناسب می باشد و فرآیند اسمز و اندازه گیری رهایش به درستی انجام می گیرد. (۱۸).

اوپراتور (WISD، WEV-1001L، یونان) انجام شد. همچنین حذف کامل بقایای حلال آبی پس از ۱۶ ساعت نگهداری در دسیکاتور انجام گرفت. در ادامه، برای تهیه عصاره زعفران نخست ۱۰ گرم زعفران سرگل صادراتی شرکت آراگل (تهران، ایران)، در ۱۵۰ میلی لیتر آب دو بار تقطیر و در داخل بطری تیره رنگ به صورت محلول در آمد و به مدت ۲۴ ساعت در داخل شیکر (STM، 1300، چین) قرار گرفت. سپس برای استخراج حداکثری ترکیبات مؤثره زعفران، از هموزنایزر (HG-15D، WISD، یونان) به مدت ۱۰ دقیقه و با دور موتور ۱۰،۰۰۰ دور در دقیقه استفاده شد. سپس، عصاره در شرایط خلأ فیلتر و عصاره تولیدی به وسیله خشک کن انجمادی (۵۰۰۵، دنا، ایران) خشک و در دمای ۱۸- درجه سانتی گراد برای انجام آزمون ها نگهداری شد (۱۵). در ادامه، هیدراسیون لایه نازک لیپیدی به وسیله آب مقطر (محلول زعفران با غلظت های ۵ و ۲/۵ میلی گرم بر میلی لیتر) در دمای بالاتر از انتقال فاز آن انجام شد. در نهایت تولید لیپوزومها از طریق دستگاه اولتراسوند (UHP-200، Topsonics، ایران) به مدت ۷ دقیقه با توان ۱۰۰ وات به صورت ۳ ثانیه روشن و ۲ ثانیه خاموش انجام گردید (۷).

تعیین میانگین اندازه ذرات، پراکندگی ذرات و پتانسیل زتا

جهت اندازه گیری این شاخص ها از دستگاه زتاسایزر (SZ-100.iso، HORIBA، انگلستان) با تکنیک Dynamic Light Scattering (DLS) و مطابق با تنظیمات مربوط به نانولیپوزومها انجام شد. لازم به ذکر است دمای اندازه گیری این شاخص ها ۲۵ درجه سانتی گراد، pH=۷ و محلول های حاصل ۱۰۰ برابر رقیق گردید (۱۲).

کارایی ریزپوشانی زعفران (EE)

به منظور تعیین کارایی ریزپوشانی، ۲ میلی لیتر از نانولیپوزوم های آماده در ۳۹۰۰ دور در دقیقه به مدت ۱۰ دقیقه سانتریفیوژ (PECO، ایران) شدند. جذب با استفاده از اسپکتروفوتومتر (Alpha، 1900S Double Beam، کره) در طول موج ۴۴۰ نانومتر که مربوط به کروسیین می باشد، قرائت گردید و بازده ریزپوشانی با استفاده از معادله زیر به دست آمد:

$$EE\% = (C_{total} - C_{free}) / C_{total} \times 100 \text{ معادله ۱}$$

Ctotal غلظت کل عصاره زعفران موجود در داخل نانولیپوزومها را بر حسب کروسیین نشان می دهد. برای اندازه گیری این شاخص یک میلی لیتر از بخش زیرین (پلت) برداشته شد و ۵ میلی لیتر اتانول به آن اضافه گردید و این محلول به مدت ۱۵ دقیقه در داخل دستگاه انکوباتور شیکردار (نور صنعت فردوس، ایران) با دمای ۴۰ درجه سانتی گراد قرار

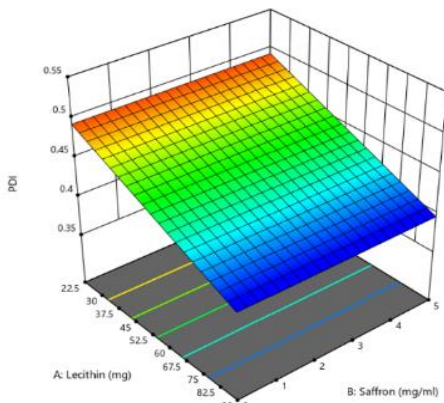
تجزیه و تحلیل آماری

تجزیه و تحلیل داده‌ها در فاز اول توسط نرم‌افزار دیزاین-اکسپرت با روش سطح پاسخ صورت گرفت. متغیرها غلظت زعفران در سطوح (۰، ۲/۵ و ۵ میلی‌گرم در میلی‌لیتر آب دو بار تقطیر) و غلظت‌های لسیتین سویا در سطوح لسیتین (۲۲/۲۵، ۴۵ و ۹۰ میلی‌گرم در ۱۰ میلی‌لیتر حلال اتانول)، با پاسخ‌های راندمان ریزپوشانی عصاره زعفران، اندازه ذرات، پتانسیل زتا، شاخص پراکندگی و پایداری ذرات بودند.

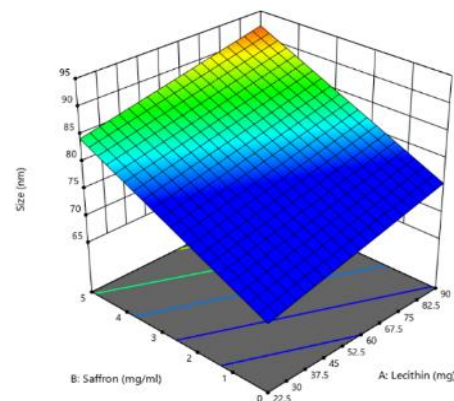
• یافته‌ها

اندازه ذرات

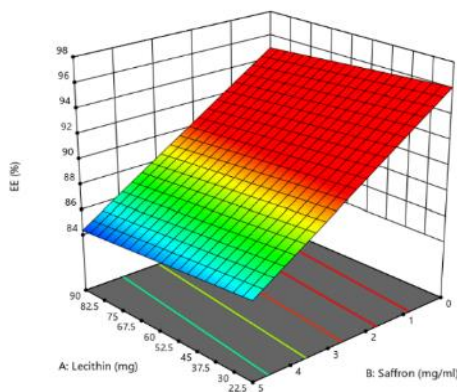
اندازه ذرات نانولیپوزوم‌های فاقد عصاره زعفران بین ۷۰/۱-۷۱/۸ نانومتر متغیر بود. در مورد نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره زعفران، اندازه ذرات به میزان کمی افزایش یافت و در بازه ۷۸/۲-۹۳/۵ قرار گرفت. غلظت لسیتین و عصاره زعفران دارای اثر معناداری بر اندازه ذرات نانولیپوزوم‌ها بود و اندازه نانولیپوزوم‌ها با افزایش غلظت لسیتین و عصاره زعفران افزایش یافت (شکل ۱- الف).



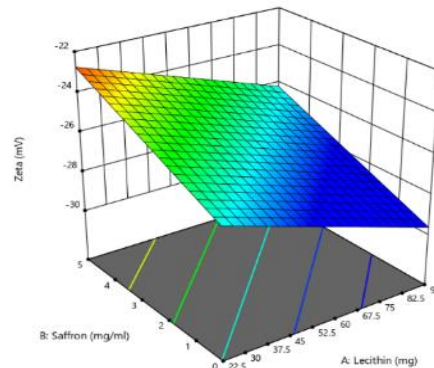
ب



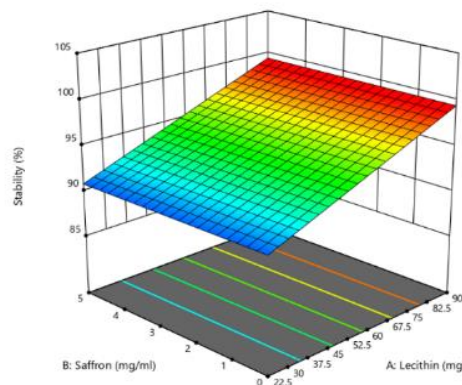
الف



د



ج



ه

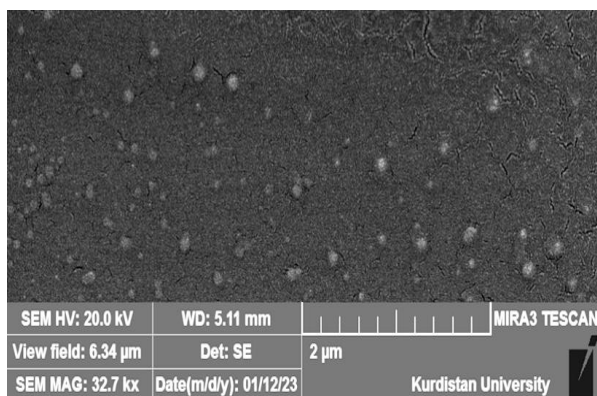
شکل ۱. نمودارهای سه بعدی اثر غلظت لسیتین و زعفران بر ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نانولیپوزوم‌ها

جدول ۱. داده‌های حاصل از آزمون‌های فیزیکوشیمیایی نانولیپوزوم‌ها

پایداری (درصد)	راندمان ریزپوشانی (درصد)	پتانسیل زتا (میلی‌ولت)	PDI	اندازه ذرات (نانومتر)	غلظت زعفران (میلی‌گرم بر میلی‌لیتر)	مقدار لسیتین (میلی‌گرم در ۱۰ میلی‌لیتر)
-	-	-21.1 ± 0.3^e	0.4 ± 0.003^c	71.8 ± 1.04^e	۰	۹۰
99 ± 0.5^a	84.0 ± 0.5^c	-26.1 ± 0.2^c	0.4 ± 0.005^c	93.5 ± 0.87^a	۵	۹۰
99 ± 0.4^a	90.1 ± 0.2^a	-27.6 ± 0.2^b	0.4 ± 0.002^c	82 ± 0.64^c	۲/۵	۹۰
-	-	-26.9 ± 0.4^{bc}	0.45 ± 0.004^b	70.1 ± 0.95^e	۰	۴۵
95 ± 0.3^b	85.0 ± 0.6^{bc}	-24.3 ± 0.5^d	0.45 ± 0.003^b	89.1 ± 0.45^b	۵	۴۵
95 ± 0.4^b	90.3 ± 0.3^a	-26.3 ± 0.3^c	0.45 ± 0.004^b	78.5 ± 1.02^d	۲/۵	۴۵
-	-	-30.4 ± 0.2^a	0.5 ± 0.001^a	71 ± 0.32^e	۰	۲۲/۵
90 ± 0.3^c	86.0 ± 0.7^b	-22.4 ± 0.6^e	0.5 ± 0.003^a	81 ± 0.50^c	۵	۲۲/۵
90 ± 0.3^c	90.5 ± 0.2^a	-24.1 ± 0.4^d	0.5 ± 0.002^a	78.2 ± 0.56^d	۲/۵	۲۲/۵

مورفولوژی و ریزساختار سطحی

تصویری که از نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره زعفران به دست آمد نشانگر اندازه ذرات مطلوب زیر ۱۰۰ نانومتر بود. همچنین ذرات نانولیپوزوم‌ها به شکل کروی با سطحی صاف مشاهده گردید (شکل ۲).



شکل ۲. تصویر حاصل از دستگاه FESEM

رهایش عصاره زعفران از نانولیپوزوم‌ها

استفاده از پوشش نانولیپوزومی (تیمار با غلظت لسیتین ۹۰ میلی‌گرم در ۱۰ میلی‌لیتر و ۲/۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر عصاره زعفران) جهت حفاظت از عصاره زعفران در محیط آبی با دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد، پس از ۲۰ دقیقه قادر به حفظ ۴۰ درصد از کروسین بودند و اما در دمای ۱۰۰ درجه به دلیل دمای ذوب پایین دیواره نانولیپوزوم‌ها، این ذرات به سرعت تخریب شدند لازم به ذکر است انتخاب تیمار ذکر شده به عنوان نمونه بهینه به دلیل ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی دلخواه بود (شکل ۳ الف و ب).

شاخص پراکندگی PDI (Poly Dispersity Index)

شاخص پراکندگی ذرات بین ۰/۴ تا ۰/۵ به دست آمد که پراکندگی خوب و اندازه ذرات یک‌دست نانولیپوزوم‌ها را تأیید می‌کند. بر این اساس، افزایش غلظت لسیتین موجب کاهش PDI شد. اما غلظت زعفران تغییر معنی داری در آن ایجاد نکرد (شکل ۱-ب).

پتانسیل زتا

پتانسیل زتا نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره زعفران در بازه ۲۲/۴- تا ۲۷/۶- میلی‌ولت متغیر بود که بیانگر پایداری بالای ذرات است. افزایش غلظت لسیتین تأثیر مثبتی بر افزایش بار منفی سطح ذرات داشت. در مورد غلظت زعفران روند متفاوتی مشاهده شد و افزایش غلظت زعفران موجب کاهش بار منفی سطح ذرات شد (شکل ۱-ج).

راندمان ریزپوشانی

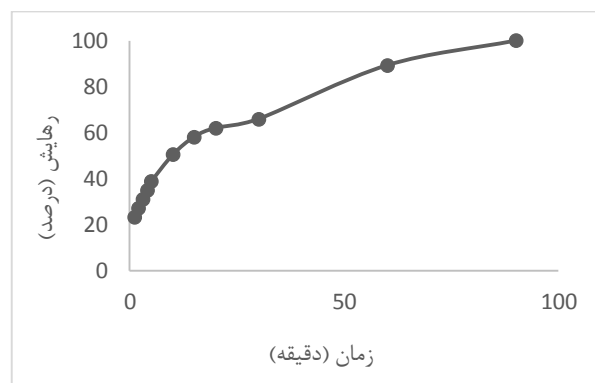
راندمان ریزپوشانی نانولیپوزوم‌های حاوی زعفران ۸۴/۰ - ۹۰/۵ درصد بود. با افزایش غلظت لسیتین راندمان ریزپوشانی کاهش یافت و افزایش غلظت زعفران نیز تأثیر منفی بر افزایش راندمان ریزپوشانی زعفران داشت (شکل ۱-د).

پایداری

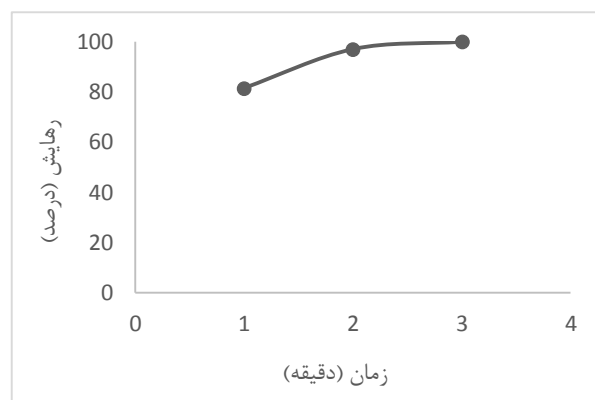
میزان پایداری نانولیپوزوم‌ها بین ۹۰-۹۹ درصد متغیر بود. تغییر غلظت لسیتین دارای تأثیر معنادار بر پایداری نانولیپوزوم‌ها بود و بالاترین پایداری مربوط به تیمارهای با غلظت لسیتین ۹۰ میلی‌گرم در ۱۰ میلی‌لیتر حلال و کمترین پایداری مربوط به تیمارهای با غلظت ۲۲/۵ میلی‌گرم در ۱۰ میلی‌لیتر حلال بود (شکل ۱-ه). همچنین داده‌های حاصل از ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی نانولیپوزوم‌ها به طور کامل در جدول ۱ آمده است.

شاخص پراکندگی: افزایش غلظت لسیتین موجب کاهش PDI گردید و تغییر غلظت عصاره زعفران بر آن بی‌تاثیر بود. این موضوع از طریق مفهوم غلظت بحرانی میسل قابل توضیح است. به این صورت که در غلظت‌های بالاتر از این غلظت، میسل‌ها تشکیل می‌شود و یک ویژگی مهم در ایجاد نانولیپوزوم‌ها می‌باشد. بنابراین، با کاهش غلظت لسیتین، مقدار لسیتین مورد نیاز برای تشکیل میسل‌ها کمتر شده و احتمال ایجاد ساختار-های با اندازه‌های گوناگون و غیر یکنواخت بیشتر می‌گردد. در واقع در غلظت‌های پایین لسیتین، سامانه‌های با اندازه ذرات یکنواخت و یکدست، تشکیل نمی‌گردد و پایداری هم کاهش می‌یابد. همچنین به دلیل اینکه مقدار زیادی از عصاره زعفران در داخل نانولیپوزوم‌ها ریزپوشانی شده است و شاخص PDI مربوط به اندازه ذرات یکدست و یکنواخت می‌باشد، این موضوع مربوط به ماده لسیتین می‌باشد که تشکیل دهنده دیواره میسل هاست و عصاره زعفران توسط آنها احاطه شده است. بنابراین عامل تعیین کننده شاخص پراکندگی ذرات، غلظت لسیتین بود که نانولیپوزوم‌های با اندازه یکدست و دلخواه تشکیل شده باشد و غلظت عصاره زعفران بی‌تاثیر بود (۲۱). در پژوهش عباس-زادگان و همکاران تغییرات مشابه در غلظت لسیتین، موجب کاهش PDI گردید (۲۲). در پژوهش راستگو و همکاران نیز افزایش غلظت لسیتین در محدوده تغییرات مشابه (غلظت لسیتین زیر یک درصد) موجب کاهش PDI گردید (۲۳). در پژوهش گرجیان و همکاران نیز با افزایش غلظت لسیتین، کاهش PDI مشاهده گردید (۲۴). اما معمولاً در پژوهش‌هایی که از غلظت بالاتر از یک درصد لسیتین استفاده کرده اند، افزایش غلظت لسیتین موجب افزایش تجمع وزیکول‌ها و در نهایت افزایش PDI شده است (۲۵). در پژوهش Colas و همکاران نیز افزایش غلظت لسیتین موجب افزایش PDI گردید و در بازه ۰/۱۸۲ تا ۰/۲۸۱ متغیر بود (۲۶). همچنین در پژوهش رفیعی و همکاران نیز با افزایش غلظت لسیتین مقدار PDI افزایش یافت (۹).

پتانسیل زتا: دلیل بار منفی روی نانولیپوزوم‌ها وجود فسفولیپیدهای آنیونی فسفاتیدیل اینوزیتول، فسفاتیدیل سرین، فسفاتیدیل گلیسرول و فسفاتیک اسیدی است که در لسیتین وجود دارد (۲۷). با افزایش غلظت لسیتین، بار سطحی ذرات افزایش یافت. در این صورت، اندازه و سطح نانولیپوزوم‌ها نیز بزرگ‌تر شده و خاصیت بار منفی بیشتری از خود نشان می‌دهد. در پژوهش رفیعی و همکاران نیز افزایش غلظت لسیتین را به عنوان عاملی جهت افزایش بار سطحی نانولیپوزوم‌ها و در نتیجه افزایش پتانسیل زتا گزارش کردند (۹). به‌علاوه در پژوهشی



شکل ۳ الف. رهایش عصاره زعفران از نانولیپوزوم‌ها در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد



شکل ۳ ب. رهایش عصاره زعفران از نانولیپوزوم‌ها در دمای ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد

• بحث

اندازه ذرات: با افزایش غلظت لسیتین، اندازه نانوذرات افزایش یافت. با توجه به این‌که از مقدار کم لسیتین در این پژوهش استفاده شده است، هر چه غلظت به سمت ۹۰ میلی‌گرم در ۱۰ میلی‌لیتر می‌رود، لسیتین لازم جهت تشکیل نانولیپوزوم‌های بزرگ‌تر و اندازه ذرات مناسب فراهم می‌گردد (۹). همچنین، به دلیل افزایش غلظت لسیتین، امکان ایجاد ساختارهای دولایه و چند لایه فراهم می‌باشد که خود عاملی جهت افزایش اندازه ذرات نانولیپوزوم‌ها می‌باشد (۱۹). از طرفی، غلظت‌های بالاتر لسیتین مقاومت بیشتری در برابر امواج فراصوت نسبت به ریز و کوچک شدن ساختار از خود نشان می‌دهند (۲۰). افزایش غلظت عصاره زعفران نیز رابطه مستقیمی با افزایش اندازه ذرات نانولیپوزوم‌ها داشت. دلیل این نتیجه، دسترسی به مقدار بیشتری از عصاره زعفران جهت ورود به نانولیپوزوم‌ها بود و موجب افزایش اندازه آن‌ها گردید (۷). به طور مشابهی، در پژوهش رفیعی و همکاران نیز با افزایش غلظت لسیتین و غلظت ترکیبات فنولی، اندازه ذرات نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره پوست سبز پسته افزایش یافت (۹).

اندازه ذرات حاصل از دستگاه زتاسایزر در مورد نمونه بهینه ۸۲ نانومتر و در مورد تصویر حاصل از میکروسکوپ FESEM هم در حدود ۸۰ نانومتر مشاهده شد (۷).

رهايش: بررسی رهايش کروسین از نانولیپوزومها در دمای ۷۲ درجه سانتی‌گراد موجب شد که مقاومت نانولیپوزومها در شرایط شبیه‌سازی پاستوریزاسیون بررسی گردد. اگر شرایط پاستوریزاسیون را به مدت ۲۰ دقیقه فرض کنیم، حدود ۴۰ درصد از کروسین حفظ شده و وارد بدن می‌گردد و ۶۰ درصد آن به عنوان رنگ دلپذیر محصول طی فرآیند ظاهر می‌گردد. اما در دمای ۱۰۰ درجه به دلیل دمای ذوب پایین دیواره نانولیپوزومها، این ذرات به سرعت تخریب شد. با توجه به مطالعات پیشین، در بخش نتیجه آزمون های DSC دمای ذوب نانولیپوزومها زیر ۱۰۰ درجه عنوان شده است، این نتیجه منطقی به نظر می‌رسد (۳۱). پیشنهاد می‌شود جهت حفاظت از ترکیبات مؤثره زعفران در دمای ۱۰۰ درجه از پوشش‌های ثانویه مقاوم به حرارت‌های بالا روی نانولیپوزوم استفاده گردد (۱۶).

نتیجه‌گیری کلی

از پژوهش حاضر می‌توان نتیجه گرفت که نانولیپوزومها حامل خوبی برای حفظ ترکیبات مؤثره زعفران هستند و نانولیپوزومهای تولیدی از نظر اندازه ذرات، PDI، پتانسیل زتا و راندمان ریزپوشانی دارای ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی دلخواه بودند. همچنین تصویر حاصل از میکروسکوپ FESEM نشان دهنده ذرات کروی نانولیپوزومها با سطوح صاف اندازه ذرات زیر ۱۰۰ نانومتر و تاییدی بر نتایج حاصل از دستگاه DLS بود. علاوه بر آن بررسی رهايش کروسین در دو دمای آب ۷۲ درجه و ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد نشان داد که نانولیپوزومهای تولیدی توانایی تحمل در برابر دمای آب ملایم را دارند. بنابراین از نانولیپوزومهای تولیدی می‌توان جهت تولید محصولات با دمای فرآیند ملایم همانند پاستوریزاسیون، استفاده و بهره جست. علاوه بر آن پوشش‌های ثانویه روی نانولیپوزومها می‌تواند گزینه مناسبی برای افزایش مقاومت آن‌ها در برابر حرارت‌های بالاتر باشد. همچنین از نانولیپوزومهای حاوی زعفران می‌توان جهت پژوهش در مورد درمان بیماری‌هایی از قبیل سرطان، دیابت و مشکلات افسردگی و متابولیسمی و غیره بهره جست.

دیگر افزایش غلظت لسیتین به عنوان عاملی مثبت در جهت افزایش بار سطحی نانولیپوزومها ذکر شد (۲۸). کاهش پتانسیل زتا با افزایش غلظت عصاره زعفران نیز مربوط به واکنش گروه‌های عاملی زعفران با گروه‌های فسفات و بار سطحی گروه‌های عاملی عصاره زعفران می‌باشد (۲۹). کاهش بارالکتریکی در سطح نانولیپوزومهای حاوی بتاکاروتن در پژوهش Hamadou و همکاران نیز مشاهده شد به این صورت که افزایش غلظت بتاکاروتن، موجب تغییر معنادار پتانسیل زتا گردید (۳۰).

راندمان ریزپوشانی: درصد بالای راندمان ریزپوشانی نشان‌دهنده نگهداری مقدار مطلوبی از عصاره زعفران توسط نانولیپوزومها بود که از جمله عوامل متمایز کننده پژوهش حاضر می‌باشد. با افزایش غلظت لسیتین راندمان ریزپوشانی کاهش یافت که با توجه به کاهش حرکت عصاره زعفران در محیط‌های غلیظ حاوی لسیتین قابل توجه می‌باشد. غلظت زعفران نیز تاثیر منفی بر افزایش راندمان ریزپوشانی زعفران داشت که نشانگر تکمیل ظرفیت نانولیپوزومها در مقدار بهینه می‌باشد. در واقع این موضوع به تناسب میزان لسیتین و توانایی حجم بارگیری عصاره زعفران نانولیپوزومها بر می‌گردد. بنابراین چون اندازه ذرات تیمارهای مختلف تقریباً مشابه می‌باشد، میزان افزایش غلظت عصاره زعفران تاثیر بیشتری از خود نشان داده است و راندمان با افزایش دوبرابری غلظت زعفران کاهش پیدا کرده است. ، در پژوهش عباس‌زادگان و همکاران نیز غلظت لسیتین اثر مشابهی بر راندمان ریزپوشانی داشت و تاییدی بر نتایج پژوهش حاضر می‌باشد (۲۲).

پایداری: بین پایداری نانولیپوزومها و غلظت لسیتین رابطه مستقیمی مشاهده شد که با توجه به افزایش بار سطحی ذرات در غلظت‌های بالاتر لسیتین قابل توجه است. دلیل دوم هم مربوط به موضوع غلظت بحرانی میسل می‌باشد که در تیمارهای با غلظت لسیتین ۹۰ میلی‌گرم در ۱۰ میلی‌لیتر ساختارهای میسلی بهتر تشکیل می‌شود. بنابراین، سامانه‌های نانولیپوزومی پایدارتری تشکیل شد (۲۱). در پژوهش هادوی و همکاران نیز نتیجه مشابهی در مورد پایداری ریزپوشانی عصاره زعفران توسط نانولیپوزومها عنوان شده است (۱۲).

تصویر حاصل از میکروسکوپ FESEM: این تصویربرداری تاییدی بر داده‌های حاصل از دستگاه زتاسایزر بود و تشکیل نانولیپوزومهای با ویژگی دلخواه را اثبات کرد به این صورت که

• References

1. Bagherzade G, Tavakoli MM, Namaei MH. Green synthesis of silver nanoparticles using aqueous extract of saffron (*Crocus sativus* L.) wastages and its antibacterial activity against six bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*. 2017;7(3):22.33-7.
2. Guijarro-Díez M, Castro-Puyana M, Crego AL, Marina ML. A novel method for the quality control of saffron through the simultaneous analysis of authenticity and adulteration markers by liquid chromatography-(quadrupole-time of flight)-mass spectrometry. *Food chemistry*. 2017;228:403-10.
3. Hojjati M, Razavi SH, Rezaei K, Gilani K. Stabilization of canthaxanthin produced by *Dietzia natronolimnaea* HS-1 with spray drying microencapsulation. *Journal of food science and technology*. 2014;51:2134-40.
4. Armellini R, Peinado I, Pittia P, Scampicchio M, Heredia A, Andres A. Effect of saffron (*Crocus sativus* L.) enrichment on antioxidant and sensorial properties of wheat flour pasta. *Food chemistry*. 2018;254:55-63.
5. Nedovic V, Kalusevic A, Manojlovic V, Levic S, Bugarski B. An overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*. 2011;1:1806-15.
6. Champagne CP, Fustier P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current opinion in biotechnology*. 2007;18(2):184-90.
7. Sarabandi K, Mahoonak AS, Hamishehkar H, Ghorbani M, Jafari SM. Protection of casein hydrolysates within nanoliposomes: Antioxidant and stability characterization. *Journal of Food Engineering*. 2019;251:19-28.
8. Mozafari MR, Khosravi-Darani K, Borazan GG, Cui J, Pardakhty A, Yurdugul S. Encapsulation of food ingredients using nanoliposome technology. *International Journal of Food Properties*. 2008;11(4):833-44.
9. Rafiee Z, Barzegar M, Sahari MA, Maherani B. Nanoliposomal carriers for improvement the bioavailability of high-valued phenolic compounds of pistachio green hull extract. *Food chemistry*. 2017;220:115-22.
10. Amjadi S, Ghorbani M, Hamishehkar H, Roufegarinejad L. Improvement in the stability of betanin by liposomal nanocarriers: Its application in gummy candy as a food model. *Food Chemistry*. 2018;256:156-62.
11. Tan C, Feng B, Zhang X, Xia W, Xia S. Biopolymer-coated liposomes by electrostatic adsorption of chitosan (chitosomes) as novel delivery systems for carotenoids. *Food hydrocolloids*. 2016;52:774-84.
12. Hadavi R, Jafari SM, Katouzian I. Nanoliposomal encapsulation of saffron bioactive compounds; characterization and optimization. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2020;164:4046-53.
13. Najafi Z, Kahn CJ, Bildik F, Arab-Tehrany E, Şahin-Yeşilçubuk N. Pullulan films loading saffron extract encapsulated in nanoliposomes; preparation and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021;188:62-71.
14. Saroglu O, Atalı B, Yıldırım RM, Karadag A. Characterization of nanoliposomes loaded with saffron extract: in vitro digestion and release of crocin. *Journal of Food Measurement and Characterization*. 2022;16(6):4402-15.
15. Esfanjani AF, Jafari SM, Assadpoor E, Mohammadi A. Nano-encapsulation of saffron extract through double-layered multiple emulsions of pectin and whey protein concentrate. *Journal of Food Engineering*. 2015;165:149-55.
16. Seyedabadi MM, Rostami H, Jafari SM, Fathi M. Development and characterization of chitosan-coated nanoliposomes for encapsulation of caffeine. *Food Bioscience*. 2021;40:100857.
17. Hosseini A, Jafari SM, Mirzaei H, Asghari A, Akhavan S. Application of image processing to assess emulsion stability and emulsification properties of Arabic gum. *Carbohydrate polymers*. 2015;126:1-8.
18. Dehcheshmeh MA, Fathi M. Production of core-shell nanofibers from zein and tragacanth for encapsulation of saffron extract. *International journal of biological macromolecules*. 2019;122:272-9.
19. Taylor TM, Weiss J, Davidson PM, Bruce BD. Liposomal nanocapsules in food science and agriculture. *Critical reviews in food science and nutrition*. 2005;45(7-8):587-605.
20. Thompson A, Singh H. Preparation of liposomes from milk fat globule membrane phospholipids using a microfluidizer. *Journal of Dairy Science*. 2006;89(2):410-9.
21. Prieu A, Zalipsky S, Cohen R, Barenholz Y. Determination of critical micelle concentration of lipopolymers and other amphiphiles: comparison of sound velocity and fluorescent measurements. *Langmuir*. 2002;18(3):612-7.
22. Abbaszadegan S, Hosseinzadeh H, Alavizadeh SH, Moghri M, Abbasi A, Jaafari MR. Anti-tumor activity of nanoliposomes containing crude extract of saffron in mice bearing C26 colon carcinoma. *Nanomedicine Journal*. 2021;8(4).
23. Rastgoo M, Hosseinzadeh H, Alavizadeh H, Abbasi A, Ayati Z, Jaafari MR. Antitumor activity of PEGylated nanoliposomes containing crocin in mice bearing C26 colon carcinoma. *Planta medica*. 2013;79(06):447-51.
24. Gorjian H, Amiri ZR, Milani JM, Khaligh NG. Preparation and characterization of the encapsulated myrtle extract nanoliposome and nanoniosome without using cholesterol and toxic organic solvents: A comparative study. *Food Chemistry*. 2021;342:128342.
25. Li Z, Paulson AT, Gill TA. Encapsulation of bioactive salmon protein hydrolysates with chitosan-coated liposomes. *Journal of Functional Foods*. 2015;19:733-43.
26. Colas J-C, Shi W, Rao VM, Omri A, Mozafari MR, Singh H. Microscopical investigations of nisin-loaded nanoliposomes prepared by Mozafari method and their bacterial targeting. *Micron*. 2007;38(8):841-7.
27. Caddeo C, Teskač K, Sinico C, Kristl J. Effect of resveratrol incorporated in liposomes on proliferation and UV-B protection of cells. *International Journal of Pharmaceutics*. 2008;363.

28. Siyar Z, Motamedzadegan A, Mohammadzadeh Milani J, Rashidinejad A. The effect of the liposomal encapsulated saffron extract on the physicochemical properties of a functional ricotta cheese. *Molecules*. 2021;27(1):120.
29. Rahaiee S, Moini S, Hashemi M, Shojaosadati SA. Evaluation of antioxidant activities of bioactive compounds and various extracts obtained from saffron (*Crocus sativus* L.): a review. *Journal of Food Science and Technology*. 2015;52:1881-8.
30. Hamadou AH, Huang W-C, Xue C, Mao X. Comparison of β -carotene loaded marine and egg phospholipids nanoliposomes. *Journal of Food Engineering*. 2020;283:110055.
31. Azari A, Ghaboos SHH, Moghadam VE, Jafari SM. Influence of chitosan coating on the physicochemical and antioxidant properties of phycocyanin-loaded nanoliposomes. *Algal Research*. 2023;72:103120.

Encapsulation of Saffron Extract in Liposomal Nanocarriers and Assessment of Their Physicochemical Characteristics

Kermani P¹, Jafari S.M^{*2,3}, Rafiee Z⁴

1- MSc graduate, Faculty of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran

2- *Corresponding author: Professor, Department of Food Materials and Process Design Engineering, Faculty of Food Science and Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources, Gorgan, Iran Email: smjafari@gau.ac.ir

4-Halal Research Center of IRI, Iran Food and Drug Administration, Ministry of Health and Medical Education, Tehran, Iran

5- Research and Development Manager, Ofogh Dasht Arya Co, Tabriz, Iran

Received 7 Jan, 2024

Accepted 23 Apr, 2024

Background and Objectives: Including several health-giving characteristics, saffron is widely used in treatment of diseases. Furthermore, it creates color, taste and aroma in foods. However, use of saffron bioactive compounds in foods is associated with limitations. Encapsulation of these compounds with various methods, including nanoliposomes, is one of the appropriate solutions to solve these problems. The aim of this study was to prepare saffron extract loaded in nanoliposomes and assess physicochemical characteristics of the produced particles.

Materials & Methods: Nanoencapsulation of saffron extract was carried out with nanoliposomes using thin layer hydration. Soy lecithin with various concentrations (22.5, 45 and 90 mg/10 ml) and saffron concentrations (2.5 and 2.5 mg/ml) was prepared. Release rate of saffron extract from nanoliposomes in aqueous media was assessed at 72 and 100 °C.

Results: The optimal sample (treatment with 90 mg/10 ml lecithin and 2.5 mg/ml saffron extract) included particle size of 82 nm, polydispersity index of 0.4, zeta potential of -27.6 mV and encapsulation efficiency of 90.1% with stability of 99%. After 20 min, produced nanoliposomes were able to preserve 40% of the saffron extract at 72 °C ($p < 0.05$).

Conclusion: Nanoliposomes are good carriers to preserve medicinal compounds of saffron and can be used to produce functional products with mild processing.

Keywords: Saffron, Nanoliposome, Encapsulation, Release, Thermal resistance