



مدل‌سازی رهایش ترکیبات موثره‌ی نانوریزپوشانی شده‌ی زعفران از فاز داخلی امولسیون دوگانه آب در روغن در آب

افشین فریدی اسفنجانی^۱، سید مهدی جعفری^{۲*}، الهام اسدپور^۳، حبیب‌الله میرزایی^۴

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۰۷/۰۵

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۱۲/۰۶

چکیده

هدف از این پژوهش بررسی سینتیک رهایش پیکروکروسین، کروسین و سافرانال نانوریزپوشانی شده در فاز آبی داخلی امولسیون دوگانه آب در روغن در آب (W/O/W) به فاز آبی بیرونی آن بود. ترکیبات موثره‌ی زعفران به روش غرقابی استخراج و وارد امولسیون دوگانه گردیدند. برای این منظور، ابتدا میکروامولسیون عصاره‌ی زعفران در روغن به روش میکروامولسیون تشکیل و سپس این سامانه در فاز آبی شامل پروتئین آب پنیر و مالتودکسترین به صورت تک لایه و پروتئین آب پنیر-پکتین و مالتودکسترین به صورت دولایه دوباره امولسیونه شد. به منظور بررسی سینتیک رهایش ترکیبات موثره‌ی زعفران به فاز آبی بیرونی امولسیون دوگانه، ابتدا مدل‌های تجربی درجه صفر، درجه اول، هیگچی و هیکسون-کراول در نظر گرفته شدند. با بررسی داده‌های آزمایشگاهی مشاهده شد که امولسیون دوگانه پایدار شده با کنسانتره پروتئین آب پنیر و پکتین دارای بیش‌ترین گرانروی و کم‌ترین درصد رهایش پیکروکروسین، کروسین و سافرانال در طی ۲۲ روز نگهداری بود. در مورد رهایش کروسین، بهترین مدل مربوط به مدل مرتبه اول و در مورد رهایش پیکروکروسین و سافرانال بهترین مدل مربوط به مدل مرتبه صفر بود. مبنای مقایسه مدل‌های بررسی شده، ضریب برازش (R^2)، مربعات خطا (SSE) و ریشه میانگین مربعات خطا (RMSE) بود.

واژه‌های کلیدی: امولسیون دوگانه، رهایش، نانوریزپوشانی، عصاره‌ی زعفران

همسان^۵ رهایش نسبت داده می‌شود و بنظر می‌رسد که این خاصیت کروسین به دلیل بخش قندی آن باشد (Zeng & Chen *et al*, 2008; Moraga *et al*, 2004; *et al*, 2003).

مقدمه

حفاظت و کنترل رهایش ترکیبات فعال همچون کروسین، پیکروکروسین و سافرانال منجر به افزایش کارایی آن‌ها می‌گردد. ریزپوشانی^۶ ترکیبات فعال غذایی و دارویی محلول در آب از کاربردهای مهم امولسیون دوگانه آب در روغن در آب می‌باشد که منجر به حفاظت و کنترل رهایش ترکیبات ریزپوشانی شده در شرایط محیطی مختلف می‌شود (Sapei *et al*, 2012). امولسیون دوگانه آب در روغن در آب شامل قطرات کوچک آب پخش شده در داخل قطرات روغن می‌باشد که خود این قطرات نیز بعنوان فاز پراکنده در فاز آبی پیوسته بیرونی قرار می‌گیرند. این سامانه‌ها (آب در روغن در آب) شامل سه فاز می‌باشد: دو فاز آبی (فاز آبی داخلی و خارجی که از لحاظ محتوا از هم متفاوت می‌باشند) و یک فاز روغنی که در بین آنها قرار گرفته است و به وسیله امولسیفایرهای آب‌دوست و آب‌گریز از دو فاز جدا شده است. پس برای تهیه امولسیون دوگانه آب در روغن در آب، ابتدا امولسیون آب در روغن به وسیله امولسیفایر آب‌گریز پایدار

زعفران به علت طعم و رنگ عالی کاربردهای فراوانی در تولید فراورده‌های غذایی، دارویی و شیمیایی دارد و با توجه به محدودیت کشت و تولید، از فراورده‌های گران‌قیمت به‌شمار می‌رود. زعفران همچنین در درمان برخی سرطان‌ها، بیماری‌های مغزی-عروقی و قلبی-عروقی، اسهال، سرخک، عفونت‌های دستگاه تناسلی، آسم و اختلالات دستگاه گوارش کاربرد دارد. این ادویه دارای خواص آرام‌بخشی، ضدتوموری، ضدکم‌خونی، ضدتخریب DNA، ضدافسردگی، ضددیابت و آنتی‌اکسیدانی می‌باشد. بخش اعظمی از خاصیت درمانی زعفران به کروسین و

۱ و ۳- به ترتیب دانش‌آموخته کارشناسی ارشد و دانش‌آموخته دکتری، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.
۲ و ۴- دانشجویان، گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه علوم کشاورزی و منابع طبیعی گرگان، گرگان، ایران.

* نویسنده مسئول: (Email: smjafari@gau.ac.ir)

5 Analogue

6 Microencapsulation

می‌توانند مورد بحث قرار گیرند:

۱- انتشار گونه‌های هیدروفیل به داخل روغن

۲- نفوذ از لایه نازک مایع غشا

۳- حل شدن مواد ریزپوشانی شده در میسل‌های معکوس و انتشار میسل‌ها به داخل روغن (Magdassi, 1986; Pays, 2002).

مدل‌سازی ریاضی رهایش ترکیبات فعال، بینش‌های مربوط به انتقال جرم و فرایندهای شیمیایی شامل در انتقال ترکیبات فعال را فراهم می‌کند و اثر پارامترهای دستگاهی همچون شکل و میزان ترکیبات فعال بارگذاری شده را بر رهایش داروها نشان می‌دهد.

بنابراین با استفاده از پیش‌بینی یک رویکرد سیستماتیک با حداقل داده‌های تجربی، می‌توان سامانه بهینه برای پروفایل رهایش ترکیبات دارویی و غذا داروها را طراحی نمود. مطالعات متعددی در زمینه سینتیک رهایش ترکیبات غذایی از حامل‌های آن‌ها صورت گرفته است. Fathi و همکاران (۲۰۱۳) رهایش هسپارین را از نانوحامل‌های لیپیدی در شرایط دستگاه گوارش انسان بررسی نمودند. آن‌ها مدل پیاس را بعنوان بهترین مدل برای بررسی سینتیک رهایش هسپارین معرفی نمودند Alvarado و همکاران (۲۰۰۹) آهن را وارد فاز آلی داخلی امولسیون دوگانه (W/O/W) پایدار شده با ترکیب پروتئین- پلی‌ساکارید نموده و سینتیک رهایش آن را از فاز آبی داخلی با مدل‌های هیگوجی، پیاس، هیکسون-کراول، درجه اول و درجه صفر بررسی نمودند.

مطالعه‌ای در زمینه رهایش ترکیبات موثره زعفران از حامل‌های آن‌ها صورت نگرفته است، در این مطالعه سینتیک رهایش کروسین، پیکرو کروسین و سافرانال نانوریزپوشانی شده از فاز داخلی به فاز بیرونی امولسیون دوگانه آب در روغن در آب بررسی شد و امولسیون دوگانه مناسب برای حفاظت و کنترل رهایش ترکیبات موثره زعفران (کروسین، پیکروکروسین و سافرانال) بررسی گردید.

مواد و روش

مواد

زعفران از مزارع تربت حیدریه، خراسان رضوی تهیه گردید. کنسالتره پروتئین آب پنیر (پروتئین بالای ۸۰٪) از شرکت Sapotocheese- آمریکا، پلی‌گلیسرول پلی‌ریسنولات از شرکت Danisco- دانمارک، سوربیتان مونوالات از شرکت Merck- آلمان، پکتین مرکبات (GA: >65%, DE: 71.1%) از شرکت MP biomedical- هلند و مالتو دکسترین (DE 16-20) از شرکت Qinhuangdao starch Co- چین، روغن آفتابگردان از شرکت FRICO- سیرجان، ایران تهیه شدند. سدیم آزاید از شرکت سیگما آلدیج خریداری شد.

شده سپس این امولسیون در فاز آبی شامل امولسیفایر آب‌دوست پراکنده می‌گردد (Lobato-Calleros, 2006; Raynal, 1993).

از عوامل مهمی که می‌توانند بر افزایش توانایی امولسیون برای حفاظت از ترکیبات ریزپوشانی شده اثر بگذارند می‌توان به استفاده از امولسیفایر مناسب اشاره نمود (Jager-lazer *et al*, 1997; chu *et al*, 2007). زیست بسپارهایی مانند پروتئین‌ها یک مثال خوب از امولسیفایرهای طبیعی می‌باشند که می‌توانند در صنعت غذا و امولسیون‌های دارویی مورد استفاده قرار گیرند. پروتئین‌ها به دلیل خاصیت جذب در سطح امولسیون روغن در آب باعث افزایش پایداری امولسیون‌ها می‌شوند. اغلب پلی‌ساکاریدها با ایجاد شبکه در فاز پیوسته به عنوان پایدارکننده^۱ عمل می‌کنند و باعث افزایش گرانروی فاز پیوسته می‌شوند (Dickinson, 2011).

ترکیب پروتئین- پلی‌ساکارید در شرایط مناسب (غلظت، نسبت پروتئین و پلی‌ساکارید، pH، نیروی یونی و دما) ممکن است باعث افزایش پایداری امولسیون‌ها شوند. در حقیقت ترکیب پروتئین و پلی‌ساکارید بصورت کووالانسی و یا الکترواستاتیکی انجام می‌گیرد.

علاوه بر این استفاده از زیست بسپارهایی همچون مالتو دکسترین می‌تواند با افزایش گرانروی فاز پراکنده امولسیون، برخورد قطرات با یکدیگر را کاهش داده و در نتیجه پایداری امولسیون را افزایش دهد (Boyer *et al*, 2012).

Lutz و همکاران (۲۰۰۹) از ترکیب پروتئین آب پنیر و پکتین برای پایداری امولسیون دوگانه آب در روغن در آب استفاده نمودند و نشان دادند که امولسیون پایدار شده با پروتئین آب پنیر دارای پایداری کم و رهایش بیشتر در مقایسه با امولسیون پایدار شده با ترکیب پروتئین آب پنیر و پکتین می‌باشد. Girux و همکاران (۲۰۱۳) از ویتامین B₁₂ ریزپوشانی شده در امولسیون دوگانه در فرمولاسیون پنیر استفاده نمودند و نشان دادند که ریزپوشانی ویتامین B₁₂ با امولسیون دوگانه باعث حفظ و کنترل رهایش آن در فرآیند تولید پنیر و شرایط معده می‌گردد.

رهایش^۲ ترکیبات فاز آبی داخلی به فاز آبی بیرونی از مشکلات اصلی امولسیون دوگانه آب در روغن در آب می‌باشد. در امولسیون دوگانه آب در روغن در آب، دو نوع رهایش کلی وجود دارد: رهایش از طریق درهم آمیختگی بین قطرات فاز آبی داخلی و گلبول‌های سطحی برای مثال پارگی غشای بین فاز آبی داخلی و گلبول سطحی. علاوه بر این، انواع مواد محلول به دام افتاده در فاز آبی داخلی بدون پارگی غشا و از طریق انتشار (به دلیل نیروی محرکه حاصله از تفاوت در غلظت و فشار لاپلاس قطرات) از فاز آبی داخلی به فاز آبی بیرونی رهایش می‌یابند. همچنین، انواع مختلفی از مکانیسم‌های انتشار

1 Stabilizer

2 Release

استخراج عصاره زعفران

گردید. اضافه نمودن عصاره زعفران تا جایی ادامه یافت تا سامانه غیرشفاف گردد و به محض غیر شفاف شدن، اضافه نمودن عصاره قطع و میزان عصاره اضافه شده یادداشت شد. این مراحل برای تمامی سامانه‌ها (درصدهای مختلف روغن و سوربیتان مونوالئات) انجام گرفت. در انتها و با سنجش ویژگی (شاخص) شفافیت سامانه و میزان عصاره اضافه شده بهترین سامانه با این ترکیبها مشخص شد: ۵٪ عصاره زعفران، ۶۲٪ روغن آفتابگردان، ۳۳٪ امولسیفایر سوربیتان مونوالئات و ۱۰٪ عصاره زعفران، ۶۰٪ روغن آفتابگردان، ۳۰٪ امولسیفایر سوربیتان مونوالئات. در واقع، غیر شفاف شدن سامانه نشان دهنده‌ی این است که اندازه قطرات امولسیون عصاره زعفران در روغن بیش از ۱۰۰ نانومتر می‌باشد که باعث ناپایداری می‌شود (Sadeghi et al, 2014).

ب- در مرحله دوم تولید امولسیون آب در روغن در آب، امولسیون اولیه (عصاره زعفران در روغن) به آرامی به محلول آبی دارای پروتئین آب پنیر ۸٪، مالتودکسترین ۲۵٪ و پکتین ۰/۲٪ اضافه شده و در دو مرحله همگن‌سازی انجام شد. ابتدا، همگن نمودن با اولتراتوکس (۵ دقیقه و ۱۲۰۰۰ دور در دقیقه، مدل Heidolph ساخت کشور آلمان) و سپس همگن‌سازی دوباره برای تولید امولسیون نهایی بود (۸ دقیقه و ۱۵۰۰۰ دور در دقیقه، مدل Heidolph ساخت کشور آلمان).

بررسی خصوصیات امولسیون آب در روغن در آب

بررسی رهایش کروسین، پیکروکروسین و سافرانال

رهایش کروسین، پیکروکروسین و سافرانال از فاز آبی داخلی به فاز آبی بیرونی امولسیون دوگانه به مدت ۲۲ روز و در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شدند. برای این منظور، امولسیون‌ها پس از تولید در داخل ظروف شیشه‌ای ریخته و راندمان ریزپوشانی آن‌ها در روز اول و روز ۲۲ نگهداری اندازه‌گیری شد. میزان اختلاف راندمان ریزپوشانی روز اول و روز ۲۲ نگهداری، بیانگر میزان رهایش بود. راندمان ریزپوشانی و رهایش ترکیبات نانوریزپوشانی شده در امولسیون آب در روغن در آب با روش Regan and Mulvihill (۲۰۰۹) تعیین شدند. بدین صورت که ۳ گرم از امولسیون دوگانه با ۳ گرم از بافر فسفات (pH=7) مخلوط شده و به مدت ۹۰ دقیقه در دمای اتاق با دور ۴۵۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ (مدل scientific centrifuge ساخت کشور امریکا) شد. سپس فاز پایینی به دقت جمع‌آوری شده و جذب کروسین، سافرانال و پیکروکروسین به ترتیب در طول موج ۴۴۰، ۳۳۰ و ۲۵۷ نانومتر خوانده شد و طبق استاندارد (ISO/TS 3632, 2003) درصد این ترکیبات در فاز پایینی تعیین شدند. با استفاده از فرمول زیر درصد ریزپوشانی و میزان رهایش ترکیبات نانوریزپوشانی شده را مشخص کردیم:

$$E (\%) = 100 - (C_2 \times 100 / C_1) \quad (1)$$

که در آن، C_2 درصد ترکیبات انکپسوله شده (کروسین،

برای استخراج عصاره زعفران از روش Kumpati و همکاران (۲۰۰۳) گردید. ابتدا ۱۰ گرم زعفران ساییده شده با هاون چینی به بطری تیره رنگ حاوی ۱۵۰ میلی‌لیتر آب اضافه شد و به مدت ۲۴ ساعت در داخل انکوباتور شیکر دار (مدل کاوش مگا، ساخت کشور ایران) قرار داده شد. سپس بمنظور حداکثر میزان استخراج از همگن‌ساز (به مدت ۱۰ دقیقه و ۱۰۰۰۰ دور در دقیقه، مدل Heidolph ساخت کشور آلمان) استفاده شد. محلول بدست آمده تحت خلا صاف گردید و تا زمان انجام آزمون‌ها در دمای ۱۸- درجه سانتی‌گراد نگهداری گردید. جذب و مقدار ترکیبات موثره عصاره زعفران طبق استاندارد (ISO/TS 3632, 2003)، میزان پیکروکروسین (حداقل تلخی محلول ۱ درصد در طول موج ۲۵۷ نانومتر بر اساس ماده‌ی خشک): ۱۵۰/۶، سافرانال (مقدار محلول ۱ درصد در طول موج ۳۳۰ نانومتر بر اساس ماده‌ی خشک): ۸۱/۵۳، کروسین (حداقل قدرت رنگی محلول ۱ درصد در طول موج ۴۴۰ نانومتر بر اساس ماده‌ی خشک): ۲۴۳/۸۳ بود.

آماده‌سازی محلول بیوپلیمرها

برای تهیه محلول مالتودکسترین و پکتین، پودر آنها بطور جداگانه در آب حل و به مدت ۱ ساعت در دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد هم‌زده شد (در دستگاه مگنت استایرر با دور ۵۰۰ rpm، مدل IKA ساخت کشور آلمان) و سپس جهت حل شدن کامل، این محلول‌ها به مدت یک شب در دمای اتاق نگهداری شدند. در مورد محلول پروتئین آب پنیر، بعد از حل شدن پودر این پروتئین در آب، محلول بدست آمده به مدت ۲۰ دقیقه و در دمای ۷۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت و بلافاصله خنک گردید و یک شب در دمای یخچال بمنظور حل شدن کامل، نگهداری شد. همچنین برای جلوگیری از فساد میکروبی به محلول‌ها ۰/۰۰۱ درصد سدیم آزیاید اضافه گردید. لازم به ذکر است که pH تمامی محلول‌ها با استفاده از بافر فسفات بر روی ۶ تنظیم گردید. بعد از انجام پیش آزمون و سنجش درصد مختلف ترکیبات، طبق جدول ۲، محلول ترکیبی نهایی شامل: ۲۵٪ مالتودکسترین، ۸٪ پروتئین آب پنیر و ۲ درصد پکتین بود.

تهیه امولسیون دوگانه

امولسیون دوگانه آب در روغن در آب در دو مرحله بصورت زیر تهیه شد (Raynal, 1993):

الف - تولید امولسیون اولیه عصاره زعفران در روغن (W/O): ابتدا مخلوط‌های مختلفی از روغن آفتابگردان و سوربیتان مونوالئات تهیه و سپس عصاره زعفران را به این مخلوط‌ها به آرامی (قطره قطره) و در حالی که سامانه (مخلوط روغن و سوربیتان مونو اولئات) روی دستگاه هم‌زن و با دور ۳۰۰ دور در دقیقه قرار داشت، اضافه

برای بررسی سینتیک رهایش کروسین، پیکروکروسین و سافرانال از فاز آبی داخلی امولسیون دوگانه (W/O/W) طبق جدول شماره ۱ از مدل‌های مرتبه صفر، مرتبه اول، هیگوجی و هیگسون-کراول استفاده شد.

جدول ۱- مدل‌های مورد استفاده

نام مدل	مدل	مرجع
مرتبه صفر	$Q_t \times t = Q_0 + K_0$	Siepmann <i>et al</i> , 2008
مرتبه اول	$Q = [1 - \exp(-kt)] \times 100$	Siepmann <i>et al</i> , 2008
هیگوجی	$Q_t = K_t \times t^{1/2}$	Siepmann <i>et al</i> , 2008
هیگسون-کراول	$(1 - (Q_t/Q_0))^{1/3} = -K_{HC}t + 1$	Siepmann <i>et al</i> , 2008

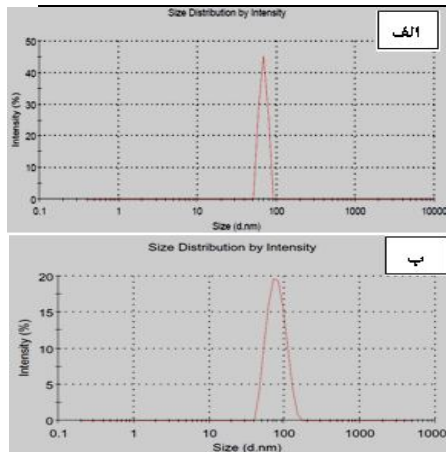
K ضریب مدل، t مدت زمان، Q_t درصد ترکیبات ریزپوشانی شده در فاز آبی بیرونی امولسیون آب در روغن در آب، Q_0 درصد ترکیبات ریزپوشانی شده در فاز آبی داخلی امولسیون آب در روغن در آب

تجزیه و تحلیل آماری داده‌ها

کلیه آزمون‌ها با آزمایش فاکتوریل در قالب طرح کاملاً تصادفی در سه تکرار انجام گرفت. میانگین داده‌ها بر اساس آزمون دانکن در سطح ۵٪ و با نرم افزار SPSS (version 21) مقایسه شدند.

جدول ۲- ترکیبات امولسیون دوگانه (W/O/W)

کد	امولسیون	فاز آبی داخلی	فاز آبی بیرونی
۱	پایدار شده با پروتئین آب پنیر	۵٪ عصاره زعفران	۸٪ پروتئین آب پنیر، ۲۵٪ مالتودکسترین
۲	پایدار شده با ترکیب پروتئین آب پنیر و پکتین	۵٪ عصاره زعفران	۸٪ پروتئین آب پنیر، ۰/۲٪ پکتین، ۲۵٪ مالتودکسترین
۳	پایدار شده با پروتئین آب پنیر	۱۰٪ عصاره زعفران	۸٪ پروتئین آب پنیر، ۲۵٪ مالتودکسترین
۴	پایدار شده با ترکیب پروتئین آب پنیر و پکتین	۱۰٪ عصاره زعفران	۸٪ پروتئین آب پنیر، ۰/۲٪ پکتین، ۲۵٪ مالتودکسترین



شکل ۱- توزیع اندازه ذرات میکروامولسیون اولیه آب در روغن حاوی بر اساس شدت شامل: الف- ۵٪ عصاره زعفران، ۶۲٪ روغن آفتابگردان، ۳۳٪ امولسیفایر سوربیتان مونوآلانات و ب- ۵٪ عصاره زعفران، ۶۰٪ روغن آفتابگردان، ۳۰٪ امولسیفایر سوربیتان مونوآلانات.

پیکروکروسین و سافرانال) در فاز آبی بیرونی و C_1 درصد این ترکیبات در فاز آبی داخلی می‌باشد.

بررسی اندازه ذرات

برای اندازه‌گیری اندازه و شاخص پلی دیسپرسیته قطرات امولسیون از دستگاه زتاسایزر (مدل Malvern Instruments Worcestershire ساخت کشور انگلیس) با آرگون لیزری ($\lambda = 488 \text{ nm}$) استفاده شد. اندازه گیری با زاویه پراکندگی ۹۰ درجه و در درجه حرارت ثابت ۲۵ درجه سانتی‌گراد انجام گرفت.

بررسی گرانی

گرانی امولسیون آب در روغن در آب با استفاده از گرانی سنج (مدل LVDV -II + Pro, Brookfield Engineering Laboratories ساخت کشور امریکا) بررسی گردید. بطوری که ۱۶ میلی‌لیتر از امولسیون در داخل سیلندر دستگاه ریخته و ویسکوزیته در تنش برشی 1 s^{-1} و دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد بررسی گردید (Jafari *et al*, 2012).

مدل‌سازی رهایش ترکیبات موثره زعفران

نتایج و بحث

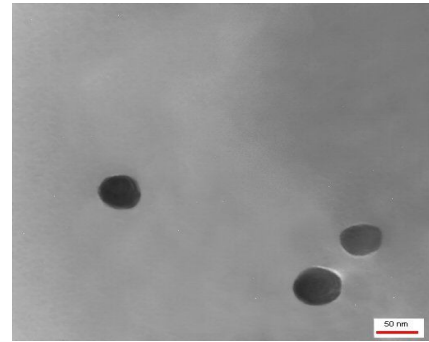
میزان ترکیبات موثره عصاره زعفران و اندازه نانوذرات تولیدی ارزیابی کیفیت زعفران با استفاده از مقادیر کروسین (ترکیبات رنگی)، سافرانال (ترکیبات عطر) و پیکروکروسین (ترکیبات طعم) انجام می‌گیرد. با حل شدن عصاره در میکروامولسیون (اندازه ذرات ۱۰۰-۵ نانومتر می‌باشد) خواص آن مانند خاصیت آنتی‌اکسیدانی، جذب و حل‌پذیری آن افزایش می‌یابد (Flanagan and Singh, 2006). نانوذرات تولید شده عصاره زعفران به وسیله میکروامولسیون آب در روغن دارای اندازه ذرات کمتر از ۱۰۰ نانومتر بودند (شکل ۱). همچنین عکس میکروسکوپی نانوذرات عصاره زعفران در شکل ۲ نشان دهنده وجود ذرات یکنواخت و پوشیده شده با امولسیفایر سوربیتان مونوآلانات می‌باشد.

سینتیک رهایش کروسین، پیکروکروسین و سافرانال به فاز آبی بیرونی امولسیون دوگانه با مدل‌های ذکر شده در جدول ۱ مورد بررسی قرار گرفتند که با توجه به پارامترهای ضریب برآزش (R^2)، مربعات خطا (SSE) و ریشه میانگین مربعات خطا (RMSE) (جدول ۵)، در مورد رهایش کروسین بهترین مدل مربوط به مدل مرتبه اول و در مورد رهایش پیکروکروسین و سافرانال بهترین مدل مربوط به مدل مرتبه صفر بود. با توجه به جدول ۵، در طی ۲۲ روز نگهداری سرعت رهایش (k) مدل مرتبه صفر کروسین با افزایش میزان فاز آبی داخلی امولسیون دوگانه (عصاره زعفران) افزایش یافت. این روند افزایش در مورد سرعت رهایش (k) مدل مرتبه اول پیکروکروسین و سافرانال نیز مشاهده گردید. میزان فاز آبی داخلی (۵ و ۱۰٪ عصاره زعفران) امولسیون دوگانه بر رهایش ترکیبات موثره زعفران از فاز داخلی دارای تاثیر معنی داری بود ($p < 0.05$). با افزایش میزان فاز آبی داخلی، اندازه قطرات آبی داخلی امولسیون دوگانه افزایش و در نتیجه رهایش ترکیبات فاز آبی داخلی به فاز آبی بیرونی نیز افزایش یافت که مشابه نتایج Schuch و همکاران (۲۰۱۳) بود. در واقع با افزایش میزان فاز آبی داخلی امولسیون دوگانه، کواسرواسیون^۲ بین قطرات داخلی افزایش یافته و همچنین قطرات بزرگ تشکیل می‌گردد که منجر به افزایش سرعت رهایش ترکیبات ریزپوشانی شده می‌گردد. علاوه بر این، افزایش میزان فاز آبی داخلی منجر به افزایش کواسرواسیون بین قطرات داخلی و گلبولهای سطحی روغن شده که منجر به کاهش ضخامت غشای روغن و مبادله آب بین دو فاز امولسیون دوگانه می‌گردد (Schuch et al, 2013).

در طی ۲۲ روز نگهداری، میزان سرعت رهایش (k) کروسین مدل مرتبه اول و (k) رهایش پیکروکروسین و سافرانال مدل مرتبه صفر امولسیون دوگانه دولایه نسبت به تک لایه کمتر می‌باشد (جدول ۵). که نشان‌دهنده رهایش کند کروسین، پیکروکروسین و سافرانال از فاز آبی داخلی امولسیون دوگانه دولایه (پایدار شده با پروتئین آب پنیر-پکتین) بود. پس نوع دیواره خارجی (تک لایه، دولایه) امولسیون دوگانه بر رهایش ترکیبات موثره زعفران از فاز داخلی دارای تاثیر معنی داری بود ($p < 0.05$).

Alvarado و همکاران (۲۰۰۹) با بررسی توانایی ریزپوشانی آهن با امولسیون دوگانه آب در روغن در آب نشان دادند که استحکام دیواره اطراف قطرات روغن امولسیون دوگانه (دیواره خارجی) تاثیر بارزی بر رهایش آهن محبوس شده در فاز آبی داخلی می‌گذارد.

وقتی فقط از پروتئین آب پنیر بعنوان دیواره خارجی در فرمولاسیون امولسیون دوگانه استفاده می‌شود مقاومت امولسیون در برابر رهایش ترکیبات فاز آبی داخلی کاهش می‌یابد ولی در مقابل استفاده از ترکیب پروتئین آب پنیر-پکتین باعث افزایش این مقاومت



شکل ۲- عکس میکروسکوپ الکترونی نانوذرات عصاره زعفران تولید شده با میکروامولسیون

همانطوریکه در جدول ۳ مشاهده می‌گردد با افزایش درصد عصاره زعفران در میکروامولسیون، اندازه قطرات میکروامولسیون از ۵۶/۸ نانومتر به ۶۸/۴ نانومتر افزایش یافت. شاخص پلی دیسپرسیته^۱ نشان‌دهنده یکنواختی ذرات امولسیون می‌باشد و مقادیر آن از صفر برای نمونه‌های یکنواخت و کیفیت بالا تا یک برای نمونه‌های غیر یکنواخت متفاوت می‌باشد. با توجه به نتایج بدست آمده، میکروامولسیون‌های تولید شده در این مطالعه دارای ذرات یکنواخت بوده و با افزایش درصد عصاره، شاخص پلی دیسپرسیته نیز افزایش یافت.

جدول ۳- ویژگی‌های ذرات میکروامولسیون

امولسیون	z-average (nm)	Polydispersity
میکروامولسیون حاوی ۵٪ عصاره زعفران	۵۶/۸	۰/۲۳۷
میکروامولسیون حاوی ۱۰٪ عصاره زعفران	۶۸/۴	۰/۲۲۴

بررسی سینتیک رهایش

نانوذرات عصاره زعفران با بیوپلیمرها به شکل امولسیون دوگانه (W/O/W) پوشش داده شد و رهایش کروسین، پیکروکروسین و سافرانال به فاز آبی بیرونی امولسیون دوگانه بررسی شد. برای امولسیون پایدار شده با پروتئین آب پنیر و حامل ۵٪ عصاره زعفران (فاز پراکنده امولسیون اولیه آب در روغن)، درصد رهایش کروسین، پیکروکروسین و سافرانال در طی ۲۲ روز نگهداری در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد به ترتیب برابر با ۱۴/۲۸٪، ۲۳/۲۸٪ و ۲۵/۰۸٪ بود (جدول ۴). این میزان برای امولسیون حامل ۱۰٪ عصاره زعفران برابر با ۲۸/۰۳٪ کروسین، ۳۸/۰۳٪ پیکروکروسین و ۳۷/۸۶٪ سافرانال بود. در مورد امولسیون پایدار شده با پروتئین آب پنیر و پکتین و حامل ۵٪ عصاره زعفران، میزان رهایش برابر ۱۰/۹٪ کروسین، ۱۳/۸۳٪ پیکروکروسین و ۱۳/۴۰٪ سافرانال و امولسیون حامل ۱۰٪ عصاره زعفران ۱۹/۱۳٪، ۲۶/۳۵٪ و ۲۳/۴۱٪ به ترتیب برای کروسین، سافرانال و پیکروکروسین گزارش گردید (جدول ۴).

می‌گردد (Lutz et al, 2009). در واقع امولسیون‌های پایدار شده با ترکیبات ریزپوشانی شده برخوردار می‌باشند. دو لایه به علت استحکام بالای دیواره از قابلیت بالایی در حفظ

جدول ۴- راندمان ریزپوشانی کروسیین، پیکروکروسیین و سافرانال در امولسیون دوگانه آب در روغن در آب

امولسیون	راندمان ریزپوشانی کروسیین (%)		راندمان ریزپوشانی پیکروکروسیین (%)		راندمان ریزپوشانی سافرانال (%)	
	روز ۱	روز ۲۲	روز ۱	روز ۲۲	روز ۱	روز ۲۲
۱	۹۷/۷۳ ^{Aa} ±۰/۲۳	۸۳/۴۵ ^{Ba} ±۰/۱۱	۹۶/۹۴ ^{Aa} ±۰/۲۸	۷۴/۳۷ ^{Ba} ±۰/۶۵	۹۵/۷۳ ^{Aa} ±۰/۷۶	۷۱/۷۳ ^{Ba} ±۰/۵
۲	۹۸/۷۳ ^{Ab} ±۰/۶۳	۸۳/۱۷ ^{Bb} ±۰/۴۸	۹۸/۲۶ ^{Ab} ±۰/۹۳	۸۷/۵۴ ^{Bb} ±۰/۲۵	۹۷/۵۵ ^{Ab} ±۰/۸۶	۸۴/۴۷ ^{Bb} ±۰/۳۹
۳	۹۲/۲۷ ^{Ac} ±۰/۸۵	۶۸/۸۵ ^{Bc} ±۰/۲۶	۹۶/۲۲ ^{Ac} ±۰/۶۱	۶۹/۲۴ ^{Bc} ±۰/۴۸	۹۴/۵۸ ^{Ac} ±۰/۳۷	۵۸/۷۷ ^{Bc} ±۰/۴۵
۴	۹۵/۸۲ ^{Ad} ±۰/۲۵	۷۳/۱۹ ^{Bd} ±۰/۳۹	۹۷/۲۸ ^{Ad} ±۰/۵۴	۷۸/۶۶ ^{Bd} ±۰/۳۴	۹۵/۳۳ ^{Ad} ±۰/۵۴	۷۳/۰۲ ^{Bd} ±۰/۲۹

*± اعداد انحراف استاندارد.

* اعداد دارای حروف بزرگ متفاوت در هر ردیف از لحاظ آماری تفاوت معنی‌داری با یکدیگر دارند (آزمون دانکن $p < 0.05$)

ترکیب کد	کروسیین				پیکرو کروسیین				سافرانال			
	۱	۲	۳	۴	۱	۲	۳	۴	۱	۲	۳	۴
مرتب‌ب صفر	۰/۶۸	۰/۵۱	۱/۲۸	۰/۸۸۶	۱/۲۲	۰/۶۴	۱/۷۲	۱/۲	۱/۱۴	۰/۹۶	۱/۷	۱/۰۶
	۰/۹۱	۰/۸۷	۰/۹۴	۰/۸۸۳	۰/۸۳۳	۰/۹۰۶	۰/۹۵۶	۰/۸۳	۰/۹۶	۰/۹۱	۰/۹۶۴	۰/۹۵۱
	۰/۰۳۳	۰/۰۲۵	۰/۰۶	۰/۰۷۲	۰/۰۹۷	۰/۰۲	۰/۰۴۹	۰/۰۸۷	۰/۰۴۵	۰/۰۲۵	۰/۰۶	۰/۰۳۸
	۰/۰۸	۰/۰۷۱	۰/۱۱	۰/۱۲	۰/۱۳۹	۰/۰۶۴	۰/۰۹۹	۰/۱۳۲	۰/۰۹۵	۰/۰۷۱	۰/۱۱	۰/۰۸۷
مرتب‌ب اول	۰/۰۹۴	۰/۰۹۳	۰/۰۹۹	۰/۰۹۷	۰/۰۹۴	۰/۱	۰/۰۱۴	۰/۰۱۷۲	۰/۰۹	۰/۰۸۷	۰/۰۹۶	۰/۰۹
	۰/۹۵۹	۰/۹۴۷	۰/۹۰۶	۰/۹۵۵	۰/۹	۰/۹۲	۰/۸	۰/۸۲	۰/۸	۰/۸۵	۰/۸۸	۰/۸۴
	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۰۳	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۱	۰/۰۵ - ۰/۴۹	۰/۰۰۰۵	۰/۰۰۰۴	۰/۰۰۱۳	۰/۰۰۰۶	۰/۰۰۰۲	۰/۰۰۰۴
	۰/۰۰۶۷	۰/۰۰۷۹	۰/۰۰۸۸	۰/۰۰۶۶	۰/۰۱۷	۰/۰۰۲۲	۰/۰۰۱۰	۰/۰۰۹۱	۰/۰۱۶	۰/۰۱۱	۰/۰۰۷	۰/۰۰۱
هیگوجی	۵/۹۵	۳/۶	۸/۵۶	۵/۲۳	۶/۲۴	۸/۳۲	۳/۲۳	۴/۷۵	۵/۹۵	۲/۶۱	۳/۶	۸/۵۶
	۰/۹۴	۰/۷۴	۰/۹۵	۰/۸۸	۰/۱۱۷	۰/۰۰۹	۰/۰۱۴	۰/۰۰۷	۰/۹۴	۰/۵۲	۰/۷۴	۰/۹۵
	۰/۱۶۸	۱/۰۴	۱/۴۷۶	۰/۸۸	۰/۰۰۳	۰/۰۰۲۹	۰/۰۰۲۸	۰/۰۰۳۲	۰/۱۶۸	۰/۸۴۲	۱/۰۴	۱/۴۷
	۰/۴۱۷	۰/۴۵۶	۰/۵۴۳	۰/۴۲	۰/۰۲۴۶	۰/۰۲۴۱	۰/۰۲۳۹	۰/۰۲۵۳	۰/۴۱۷	۰/۴۱	۰/۴۵	۰/۵۴
هیگوسون کراول	۰/۱۱۵	۰/۱۱۳	۰/۱۲۹	۰/۱۲۴	۶/۲۴	۰/۱۱	۰/۰۰۳	۰/۰۲۴۶	۰/۱۰۵	۰/۰۵	۰/۰۵	۰/۱۰۵
	۰/۰۴۸	۰/۰۲۲	۰/۱۰۲	۰/۰۷۳	۸/۳۲	۰/۰۰۹	۰/۰۰۲۹	۰/۰۲۴۱	۰/۰۸۷	۰/۰۵۶	۰/۰۵۶	۰/۰۸۷
	۰/۰۰۴۴	۰/۰۰۴۹	۰/۰۰۳۷	۰/۰۰۴۹	۳/۲۳	۰/۰۱۴	۰/۰۰۲۸	۰/۰۲۳۹	۰/۱	۰/۰۰۱	۰/۰۰۱	۰/۱
	۰/۴۱	۰/۴۵	۰/۵۴	۰/۴۲	۴/۷۵	۰/۰۰۷	۰/۰۰۳۲	۰/۰۲۵۳	۰/۱	۰/۰۸	۰/۱	۰/۱۲

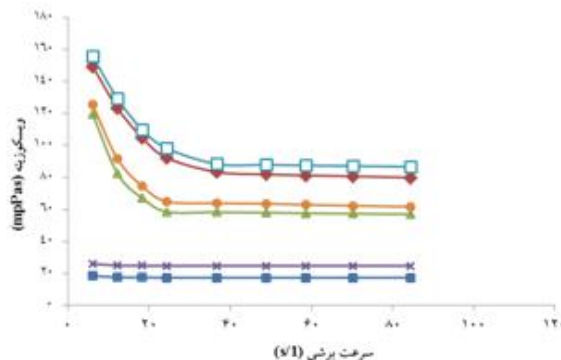
باعث افزایش ویسکوزیته امولسیون دوگانه می‌گردد. با افزایش فاز پراکنده امولسیون اولیه، اندازه قطرات امولسیون نهایی آب در روغن در آب افزایش یافته و در نتیجه افزایش میزان برخورد قطرات با یکدیگر، ویسکوزیته امولسیون نیز افزایش می‌یابد. با توجه به شکل ۳، امولسیون پایدار شده با دو دیواره پروتئین آب پنیر و پکتین رفتار غیر نیوتنی شبه‌پلاستیک و امولسیون پایدار شده با پروتئین آب پنیر رفتار نیوتنی از خود نشان دادند. در واقع ترکیب پکتین و پروتئین آب پنیر از سیالیت امولسیون کاسته و میزان ویسکوزیته آن را افزایش می‌دهد (Olivieri et al, 2003; Lutz et al, 2003).

بررسی گرانروی و رفتار جریانی امولسیون‌ها

یافته‌های ما نشان داد که ویسکوزیته امولسیون‌های پایدار شده با دو دیواره (پروتئین آب پنیر و پکتین) بیشتر از ویسکوزیته امولسیون‌های پایدار شده با پروتئین آب پنیر به تنهایی بود. این موضوع می‌تواند نشان‌دهنده پایداری بالای امولسیون‌های دارای دو دیواره باشد. ویسکوزیته امولسیون اکثراً به آزادی حرکت آب فاز پیوسته بستگی دارد. وقتی از محلول پکتین و پروتئین آب پنیر بعنوان فاز پیوسته استفاده شد، میزان آزادی حرکت آب کاهش یافته و در نتیجه ویسکوزیته امولسیون افزایش می‌یابد. افزایش میزان فاز پراکنده (عصاره زعفران) امولسیون اولیه آب در روغن از ۵٪ به ۱۰٪

نتیجه‌گیری

در این پژوهش، امولسیون دوگانه آب در روغن در آب به عنوان یک حامل مناسب برای انتقال و کنترل رهایش ترکیبات موثره زعفران طراحی گردید. در پایداری امولسیون از بیوپلیمرهای خوراکی استفاده گردید تا بتوان از آنها در فرمولاسیون مواد غذایی استفاده نمود. نتایج نشان داد که امولسیون دوگانه آب در روغن در آب پایدار شده با کمپلکس پروتئین آب پنیر و پکتین به علت کاربرد دو دیواره در فرمولاسیون آن، ترکیبات موثره زعفران را بهتر حفظ می‌نماید. همچنین مدل‌های مرتبه صفر، مرتبه اول به عنوان مدل‌های مناسب جهت بررسی سینتیک رهایش ترکیبات موثره زعفران از فاز آبی داخلی به فاز آبی بیرونی پیشنهاد گردیدند.



شکل ۳: تاثیر مواد دیواره و درصد فاز پراکنده (عصاره زعفران) امولسیون اولیه (آب در روغن) بر ویسکوزیته و رفتار رئولوژیکی امولسیون نهایی آب در روغن در آب. ■ پایدار شده با پروتئین آب پنیر (۵٪ عصاره زعفران)، × پایدار شده با ترکیب پروتئین آب پنیر و پکتین (۵٪ عصاره زعفران)، ● پایدار شده با پروتئین آب پنیر (۱۰٪ عصاره زعفران)، ▲ پایدار شده با ترکیب پروتئین آب پنیر و پکتین (۱۰٪ عصاره زعفران).

منابع

- Bouyer, E., G. Mekhloufi, et al. (2012). Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: Alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field, *International Journal of Pharmaceutics* 436(1-2): 359-378.
- Chen, Y., Zhang, H., Tian, X., Zhao, C., Cai, L., Liu, Y., Jia, L., Yin, H.X. Antioxidant potential of crocins and ethanol extracts of *gardenia jasminoides ellis* and *crocus sativus* L.: A relationship investigation between antioxidant activity and crocin contents. *Food Chemistry*. 109(3):484-492.
- Chu, L.Y., Utada, A.S., Shah, R.K., Kim, J.W., Weitz, D.A., 2007. Controllable monodisperse multiple emulsions. *Angewandte Chemie-International Edition* 46, 8970-8974.
- 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.
- Flanagan, J., Singh, H. (2006). Recent advances in the delivery using microemulsions of food-delivered bioactives and drugs. In M. R. Mozafari (Ed.), *Nanocarrier technologies* (pp. 95e111). *Netherlands*: Springer.
- Giroux, H. J., S. Constantineau, et al. (2013). Cheese fortification using water-in-oil-in-water double emulsions as carrier for water soluble nutrients. *International Dairy Journal* 29(2): 107-114.
- ISO/TS 3632-1,2 (2003). Saffron (*Crocus sativus* L.) Part 1: Specifications, Part 2: Test Methods; Geneva, Switzerland: ISO.
- Jafari SM, Beheshti P, Assadpoor E (2012) Rheological behavior and stability of D-limonene emulsions made by a novel hydrocolloid (Angum gum) compared with Arabic gum. *J Food Eng* 109(1):1-8.
- Jager-Lezer, N., I. Terrisse, et al. (1997). Influence of lipophilic surfactant on the release kinetics of water-soluble molecules entrapped in a W/O/W multiple emulsion. *Journal of Controlled Release* 45(1): 1-13.
- Jiménez-Alvarado R, Beristain CI, Medina-Torres L, Román-Guerrero A, Vernon-Carter EJ (2009). Ferrous bisglycinate content and release in W1/O/W2 multiple emulsions stabilized by proteipolysaccharide complexes. *Food Hydrocoll* 2009; 23: 2424-33.
- Kumapati, P., Suresh, K.A., Sathiyavedu, T.S and Arabandi, R. (2003). Inhibitory effects of aqueous crude extract of Saffron (*Crocus sativus* L.) on chemical-induced genotoxicity in mice. *Asia Pacific J Clin Nutr*, 12 (4): 474-476.
- Lobato-Calleros, C., Rodriguez, E., Sandoval-Castilla, O., Vernon-Carter, E.J., Alvarez-Ramirez, R., (2006). Reduced-fat white fresh cheese-like products obtained from W1/O/W2 multiple emulsions: Viscoelastic and high-resolution

- image analyses. *Food Research International* 39(6): 678-685.
- Lutz, R., Aserin, A., Wicker, Louise., Garti, Nissim., (2009). Release of electrolytes from W/O/W double emulsions stabilized by a soluble complex of modified pectin and whey protein isolate. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 74(1): 178-185.
- Magdassi, S. and N. Garti (1986). "A kinetic model for release of electrolytes from w/o/w multiple emulsions." *Journal of Controlled Release* 3(1-4): 273-277.
- Moraga, A.R., Nohales, P., Perez, J. and Gomez-Gomez, L. (2004). Glucosylation of the saffron apocarotenoid crocetin by a glucosyltransferase isolated from *Crocus sativus* stigmas. *Planta*.219(6):955-966.
- Olivieri, Laetitia., Seiller, Seiller., Bromberg, Lev., Besnard, Madeleine., Duong, Thi-Nhat-Lien., Grossiord, Jean-Louis. (2003). Optimization of a thermally reversible W/O/W multiple emulsion for shear-induced drug release. *Journal of Controlled Release* 88(3): 401-412.
- Pays, K., J. Giermanska-Kahn, et al. (2002). "Double emulsions: how does release occur?" *Journal of Controlled Release* 79(1-3): 193-205.
- Raynal, S., Grossiord, J. L., Seiller, M., Claussed, D. (1993). A topical W/O/W multiple emulsion containing several active substances: formulation, characterization and study of release. *Journal of Controlled Release*, 26(2): 129-140.
- Raynal, S., J. L. Grossiord, et al. (1993). "A topical W/O/W multiple emulsion containing several active substances: formulation, characterization and study of release." *Journal of Controlled Release* 26(2): 129-140.
- Regan, J. O. and D. M. Mulvihill (2009). Water soluble inner aqueous phase markers as indicators of the encapsulation properties of water-in-oil-in-water emulsions stabilized with sodium caseinate. *Food Hydrocolloids*, 23(8): 2339-2345.
- Sadeghi, S., Madadlou, A., Yarmand, Mohamadsaeed., (2014). Microemulsification–cold gelation of whey proteins for nanoencapsulation of date palm pit extract. *Food Hydrocolloids*, 35(0): 590-596.
- Sapei, L., M. A. Naqvi, et al. (2012). "Stability and release properties of double emulsions for food applications." *Food Hydrocolloids* 27(2): 316-323.
- Schuch, Anna. Deiters, Philipp. Henne, Julius. Kohler, P. Schuchmann, Karsten Heike. (2013). Production of W/O/W (water-in-oil-in-water) multiple emulsions: droplet breakup and release of water. *Journal of Colloid and Interface Science*, 402 (2013): 157–164.
- Siepmann, J. and F. Siepmann (2008). "Mathematical modeling of drug delivery." *International Journal of Pharmaceutics* 364(2): 328-343.
- Zeng, Y., Yan, F., Tang, L. and Chen, F. 2003. Increased crosin production and induction frequency of stigma-like-structure from floral organs of *Crocus sativus* L. By precursor feeding. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*.72(2): 185-191.



Release modeling of Nano-encapsulated bioactive compounds of saffron from inner phase of W/O/W double emulsions

A. Faridi Esfanjani¹, S. M. Jafari ^{*2}, E. Assadpour³, H. Mirzaei⁴

Received: 2014.09.27

Accepted: 2015.02.25

Introduction: Controlling and targeting release of bioactive compounds have a key role in improving their functional properties such as antioxidant and anti-disease activities. Encapsulation is one of the best methods for protection and controlling release of bioactive ingredients. Indeed, in this process, protection and controlling release of ingredients as core materials are performed by surrounding of them via variety of wall materials. Emulsions are most popular encapsulation systems that are classified in variety types such as single layer emulsion, multi-layer emulsion, doubleemulsion, and etc. Hydrophilic bioactive compounds can be loaded in inner aqueous phase of water in oil in water (W/O/W) double-emulsions. The stability of doubleemulsions is low due to presence of two interfaces in them. Applying a thermodynamically stable W/O emulsion (e.g., micro-emulsion) as a primary emulsion and using of complex biopolymers as emulsifier and stabilizer in outer phase of doubleemulsions can improve their stability (Dickinson, 2011; Boyer et al, 2012).

Saffron bioactive compounds include crocin, picrocrocin, and saffranal are widely used for a variety of functional and healthy goals in food and pharmaceutical industries. These compounds have many different functions, including anti-carcinogenic, anti-oxidant, anti-depressant, anti-apoptotic, anti-tussive, anti-nociceptive, anti-inflammatory and anti-thrombotic properties (Moraga et al, 2004).

In the present study, our main goal was kinetically evaluated release of crocin, picrocrocin and saffranal from inner phase to outer phase of doubleemulsion during 22 days storage by Zero order, First order, Higuchi, and Hixson-Crowell.

Materials and method: Saffron was provided from Torbatheydariyeh farms, Khorasan-e-razavi, Iran. Sunflower oil and sodium azide were purchased from FRICO (Sirjan, Iran) and Sigma-Aldrich (St. Louis, USA), respectively. Whey protein concentrate (80% protein) and sorbitanmonooleate (span 80) were obtained from Sapoto cheese (USA) and Merck (Germany), respectively. Maltodextrin was obtained from Qinhuangdao starch Co. (DE 16-20, China) and citrus pectin with a degree of methyl esterification of 71.1% and galacturonic acid >65% was purchased from MP biomedical (Netherland). All other chemicals used in this study were of analytical grade.

For extraction of crocin, picrocrocin and saffranal, a total of 10 grams of saffron sample was macerated in 150 mL of water in a glass bottle, covered with aluminum foil (to prevent direct exposure to light), and was placed in an incubator shaker (Kavooshmega, Iran) for 24 hours at 30°C. Then, this solution was homogenized (10000 rpm for 10 minutes, HeidolphSilentcrusher, Germany) for maximum extraction of saffron compounds. Finally, the extract was filtered under vacuum by using a Whatman No. 1 (11 mm) filter paper, and kept in the freezer at -18°C prior to any examination. ISO/TS 3632 procedure (2003) was used for the measurement of saffron compounds.

The doubleemulsions were prepared in two-step:

- First, primary W/O micro-emulsions were produced by two formulations: 60:30:10% and 62:33:5% of sunflower oil, span 80, and saffron extract, respectively.
- Then, the W/O micro-emulsions was gradually added into the outer aqueous phase contains whey protein concentrate (WPC)/maltodextrin or WPC/pectin/maltodextrin while blending by a homogenizer (12000 rpm for 5 minutes at 10°C, HeidolphSilentcrusher, Germany) and then these coarse emulsions were further emulsified using mentioned homogenizer (15000 rpm for 8 minutes at 10°C). All doubleemulsions were composed of 25% primary emulsion and 75% outer aqueous phase

Droplet size of doubleemulsions after one day and 22 days storage weremeasured using Zetasizer (Malvern

1 And 3- Former MSc and PhD students, Faculty of Food Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

2 and 4- Associate Professors, Faculty of Food Technology, Gorgan University of Agricultural Sciences and Natural Resources

(*-Corresponding Author Email: smjafari@gau.ac.ir)

Instruments, Worcestershire, UK).

The released components in the outer aqueous phase were measured by evaluation of encapsulation efficiency of the ratio of crocin, picrocrocin, and saffranal at a specific time:

$$E (\%) = 100 - (C_2 \times 100 / C_1) \quad (1)$$

Where C_2 is the percentage of crocin, picrocrocin and saffranal in outer aqueous phase and C_1 equals to the percentage of compounds in inner aqueous phase.

C_2 is a released into outer aqueous phase relative to the total amount present in the outer aqueous phase if all compounds were released (M_∞).

The viscosity of emulsions was measured using a programmable viscometer (model LVDV -II + Pro, Brookfield Engineering Laboratories, USA) and by a ULA spindle.

The released are kinetically evaluated by Zero order, First order, Higuchi, and Hixson-Crowell.

The experiments were all carried out in triplicate. The collected data were analyzed by one-way ANOVA; the means were compared by the Duncan's multiple range tests at the 5% level through SPSS version 21 (IBM, USA).

Results and Discussion: As shown in fig. 1, the droplet size of produced W/O micro-emulsions were lower than 200 nm. In fact, these droplets are water droplets containing bioactive compounds of saffron dispersed within oil phase that surrounded with Span 80 (Fig. 2). Also, it was found that by increase of saffron extract (from 5% to 10%) as dispersed phase in W/O micro-emulsions, droplet size and poly-dispersity index (PDI) were significantly ($P < 0.05$) affected (Table. 3).

As shown in table. 4, crocin, picrocrocin, and saffranal had a same release trend, but the release rate of crocin was lower than saffranal and picrocrocin. As regard to R^2 , SSE, and RMSE from kinetic modeling in table. 5, the first order was a best model for release of crocin, and zero order was a best model for release of picrocrocin and saffranal. Also, kinetic data of release showed that the high release of crocin, saffranal, and picrocrocin was observed by increasing the dispersed phase content of primary W/O micro-emulsion and also it was found that WPC/pectin delayed the release of encapsulated ingredients more than single WPC (Table. 5). Indeed, the using of complex biopolymers as the external binary film of double emulsions causes a resistance to release for inner compounds (Dickinson, 2011).

As shown in fig. 3, the viscosity of double emulsions stability with WPC/pectin complex was higher than double emulsions stabilized by only WPC. This can confirm the higher stability of stabilized double emulsions with complex biopolymers (Olivieri *et al*, 2003).

Keywords: Release, Nanoencapsulation, W/O/W double emulsion, saffron.