



## تولید نانودی‌سپرسیون کورکومین با استفاده از دو روش آب مادون بحرانی و روش جایگزینی حلال و ارزیابی ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی، رئولوژیکی، آنتی‌اکسیدانی و ضدباکتریایی آنها

زهرا سیار<sup>۱</sup> و هدا جعفریزاده مالگیری<sup>۲\*</sup>

تاریخ دریافت: ۹۷/۳/۲۱ تاریخ پذیرش: ۹۷/۵/۲۴

<sup>۱</sup> دانشجوی دکتری، گروه مهندسی شیمی-صنایع غذایی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی سهند تبریز

<sup>۲</sup> دانشیار، گروه مهندسی شیمی-صنایع غذایی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی سهند تبریز

\*مسئول مکاتبه: Email: h\_jafarizadeh@sut.ac.ir

### چکیده

**زمینه مطالعاتی:** کورکومین به عنوان رنگدانه طبیعی موجود در زردچوبه دارای خواص منحصر به فردی می‌باشد که قابلیت استفاده از آن در فرمولاسیون‌های غذایی و دارویی را افزایش داده است. حلالیت پایین این ماده در سیستم‌های آبی از محدودیت‌های اصلی کاربرد کورکومین می‌باشد. **هدف:** هدف از تحقیق حاضر تولید نانودی‌سپرسیون کورکومین در آب برای افزایش حلالیت آن می‌باشد. **روش کار:** نانودی‌سپرسیون کورکومین توسط روش نوین آب مادون بحرانی و روش متداول جایگزینی حلال بر پایه اتیل‌استات و با استفاده از امولسیفایر تویین ۲۰ تولید و ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی، رئولوژیکی، پایداری فیزیکی، ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی نانودی‌سپرسیون‌های تولیدی با هم مقایسه گردید. **نتایج:** نتایج آنالیز پراکندگی نور دینامیکی نشان داد که نانودی‌سپرسیون کورکومین تولیدی توسط روش نوین استفاده از آب مادون بحرانی دارای کمترین اندازه ذره (۱۰/۸ nm) و شاخص پراکندگی (۰/۰۶) و بیشترین قابلیت هدایت (ms/cm) (۰/۴۰۱) و مقدار پتانسیل زتا (۱۵/۸ mV-) در مقایسه با روش جایگزینی حلال می‌باشد. نتایج حاصل همچنین نشان داد که نانودی‌سپرسیون کورکومین حاصل با روش نوین آب مادون بحرانی رنگ زرد روشن (b=۲/۵۵) با کدورت کمتر (۰/۰۶۳ NTU) و ویسکوزیته پایین در مقایسه با خواص مذکور نانودی‌سپرسیون کورکومین تولیدی با روش جایگزینی حلال است. **نتیجه‌گیری نهایی:** نانودی‌سپرسیون تولید شده با روش آب مادون بحرانی دارای بالاترین خاصیت آنتی‌اکسیدانی در مقایسه با محلول کورکومین در آب و خاصیت ضدباکتریایی در برابر باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی می‌باشد. علاوه بر این نانودی‌سپرسیون تولیدی با روش نوین یعنی آب مادون بحرانی، دارای پایداری فیزیکی در ظرف مدت زمان سه ماه می‌باشد.

**واژگان کلیدی:** نانودی‌سپرسیون، کورکومین، آب مادون بحرانی، جایگزینی حلال، پایداری

مقدمه دانشمندان را به خود جلب کرده است (عبدالاو و

همکاران ۲۰۰۴؛ سمرقندیان و همکاران ۲۰۱۴).

امروزه استفاده از داروهای طبیعی و گیاهی از طریق دهانی برای درمان بسیاری از بیماری‌ها توجه

نانو توانسته است اقداماتی برای حل مشکلات ذکر شده مربوط به این‌گونه ترکیبات فعال زیستی انجام دهد (آنتون و همکاران ۲۰۰۷). نانودیسپرسیون‌های روغن در آب سیستم‌هایی هستند که مواد آلی به صورت ذرات بسیار ریز (۲۰-۱۰۰۰ نانومتر) در یک فاز پیوسته (فاز آبی) پراکنده شده‌اند (شارما و همکاران ۲۰۱۳؛ انرجان و همکاران ۲۰۱۲). نانودیسپرسیون‌ها به دلیل اندازه ذرات خود، شفاف بوده و مقاومت بالایی در مقابل عوامل ناپایدار کننده دارند (حسن‌فامیان و پزشکی ۱۳۹۶؛ انرجان و همکاران ۲۰۱۴). از جمله روش‌های متداول برای تولید نانودیسپرسیون، روش جایگزینی حلال می‌باشد همچنین امروزه از روش نوینی که کمتر برای تولید نانودیسپرسیون به کار برده شده است می‌توان به استفاده آب در شرایط مادون بحرانی اشاره کرد (انرجان و همکاران ۲۰۱۴؛ تکستر و همکاران ۲۰۰۱). روش‌های معمول تولید نانودیسپرسیون بر پایه حلال‌های آلی، ممکن است اثرات نامطلوبی داشته باشد. از این رو، اخیراً تکنولوژی سبز مورد توجه قرار گرفته است. در روش آب مادون بحرانی<sup>۶</sup> به دلیل اینکه خصوصیات فیزیکی-شیمیایی آب تغییر می‌کند می‌تواند به عنوان حلال استفاده شود. آب مادون بحرانی، مایعی تحت فشار با دمایی حدود ۱۰۰ تا ۳۷۴ درجه سانتی-گراد می‌باشد. در این شرایط آب ویژگی منحصر به فرد دارد یعنی مشابه حلال‌های غیر قطبی یا نیمه قطبی مانند متانول، اتانول و استون رفتار می‌نماید (راوبر و همکاران ۲۰۱۵). در این روش به دلیل عدم استفاده از حلال آلی و همچنین کاهش مصرف مقدار امولسیفایرها نانودیسپرسیون تهیه شده غیر سمی بوده و قابلیت کاربرد صنعت دارویی و غذایی را دارد. از اینرو یافتن روش جایگزین مناسب، بدون استفاده از حلال که منجر به تشکیل ذرات کوچکتر با مورفولوژی یکنواخت و پایداری بیشتر گردد، حائز اهمیت می‌باشد. هدف از این

زردچوبه<sup>۱</sup> یکی از این گیاهان طبیعی، که دارای ماده فعال زیستی<sup>۲</sup> به نام کورکومین بوده که به دلیل برخی خواص بیولوژیکی کاربردهای فراوان دارویی و غذایی دارد. کورکومین رنگدانه زرد یک پلی‌فنل از گروه دی‌آریل هپتانوئیدها است (آنوچاپریدا و همکاران ۲۰۱۱؛ پراساد و همکاران ۲۰۱۴). ساختار کریستالی کورکومین توسط وگل<sup>۳</sup> و همکارانش در سال ۱۸۴۲ و ساختار شیمیایی آن (C<sub>21</sub>H<sub>20</sub>O<sub>6</sub>) برای اولین بار در سال ۱۹۱۰ توسط میلوبدزکا<sup>۴</sup> و همکارانش به دست آمد (پراساد و همکاران ۲۰۱۴). از جمله مهمترین اثرات بیولوژیکی و دارویی کورکومین می‌توان خواص ضد میکروبی، ضدباکتری، ضدقارچی، ضدویروسی، آنتی‌اکسیدانی و ضدسرطانی آن را برشمرد. خاصیت آنتی‌اکسیدانی کورکومین در غیرفعال کردن رادیکال‌های آزاد در مطالعات و تحقیقات متعدد به اثبات رسیده است (پراساد و همکاران ۲۰۱۴؛ یالاپو و همکاران ۲۰۱۳). کورکومین یک ماده پلی‌فنل چربی‌دوست است که تقریباً نامحلول در آب می‌باشد، نامحلول بودن این ماده در آب باعث کاهش چشمگیر جذب سلولی و اصطلاحاً زیست‌فراهمی<sup>۵</sup> این ماده می‌گردد. علاوه بر این، باعث ایجاد مشکلات زیادی در افزودن این ماده غذایی پر ارزش در فرمولاسیون‌های غذایی و دارویی بر پایه آب می‌گردد (پان و همکاران ۲۰۱۳). داروهای محلول در چربی مانند کورکومین با فرمولاسیون مناسب اگر بتوانند از راه خوراکی و دهان وارد بدن گردند می‌توانند سریع و به‌خوبی جذب بدن شوند. مسیر دهانی راحت‌ترین و در دسترس‌ترین مسیر برای تزریق غیر تهاجمی دارو است. این مسیر برای مولکول‌های دارویی که انحلال بیشتری در آب دارند مورد استفاده قرار می‌گیرد (فاتوروس و همکاران ۲۰۰۷). در دهه‌های اخیر، فناوری

<sup>1</sup> Turmeric

<sup>2</sup> Bioactive

<sup>3</sup> Vogel

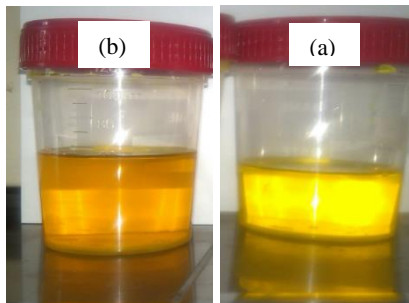
<sup>4</sup> Milobedzka

<sup>5</sup> Bioavailability

<sup>6</sup> Solvent displacement

<sup>7</sup> Subcritical Water

خوردگی قرار گرفت. سپس این محفظه به داخل اتوکلاو هیدروترمال (جنس فولاد ضد زنگ ۳۱۴) انتقال داده شد. نهایتاً محفظه مذکور داخل کوره با دمای  $120^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲ ساعت قرار داده شد و عملیات حرارت‌دهی صورت گرفت تا نانودیسپرسیون تشکیل گردد (شکل ۱-الف).



شکل ۱- نانودیسپرسیون تهیه شده با روش الف) استفاده از آب مادون بحرانی و ب) جایگزینی حلال

Figure 1- Prepared nanodispersion using a) subcritical water and b) solvent displacement

در روش جایگزینی حلال، فاز آلی متشکل از مخلوط ۲۰ میلی‌گرم کورکومین و ۱۰ میلی‌لیتر اتیل استات و فاز آبی حاوی مخلوط ۱/۵ گرم توپین ۲۰ و ۹۸/۵ گرم آب مقطر تشکیل گردید. فاز آلی تحت شرایط هم‌زدن مداوم، به صورت قطره قطره به فاز آبی اضافه شد. در نهایت برای تولید نانودیسپرسیون حلال اتیل استات از سیستم حذف گردید (شکل ۱-ب). برای حذف اتیل استات به عنوان حلال از روتاری در دمای  $50^{\circ}\text{C}$  درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۰ دقیقه استفاده گردید. سرعت اضافه شدن فاز آلی به آبی در تهیه فرمولاسیون‌های کورکومین ثابت بود.

#### ارزیابی ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی

##### پراکندگی نور دینامیکی (DLS)

آنالیز پراکندگی نور دینامیکی، روشی فیزیکی برای تعیین اندازه و توزیع ذرات در محلول‌ها و نانودیسپرسیون‌ها، شاخص پراکندگی ذرات (PDI) و قابلیت هدایت نانودیسپرسیون‌ها می‌باشد. همچنین از

تحقیق، تولید نانودیسپرسیون کورکومین با اندازه ذرات بسیار ریز و خاصیت ضد میکروبی بالا توسط دو روش استفاده از آب در شرایط مادون بحرانی، برای اولین بار، و روش جایگزینی حلال می‌باشد در نهایت خواص فیزیکی و شیمیایی نانودیسپرسیون تشکیل شده نظیر شکل ذرات، پتانسیل زتا و شاخص پراکندگی ذرات (PDI) مقایسه گردید. همچنین خاصیت آنتی‌اکسیدانی و اثرات ضد میکروبی نانودیسپرسیون کورکومین تولیدی در این دو روش مورد بررسی قرار گرفت.

#### مواد و روش‌ها

کورکومین با خلوص ۹۷٪ و توپین ۲۰ مورد استفاده در این تحقیق از شرکت مرک<sup>۲</sup> خریداری گردید. اتیل استات (۹۹٫۷٪) به عنوان حلال نیز از شرکت مواد شیمیایی سام چان<sup>۳</sup> کره خریداری شد. در فرمولاسیون‌ها از آب دوبار تقطیر استفاده شد. اشرشیا کلی (PTCC 1270) و استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC 1112) به صورت لیوفلیزه و از مرکز کلکسیون میکروارگانیزم‌های صنعتی ایران و نوتریونت آگار از شرکت Oxoid LTD. Basingstoke Hampshire انگلستان تهیه شد.

#### تولید نانودیسپرسیون‌ها

نانودیسپرسیون کورکومین با استفاده از آب در شرایط مادون بحرانی (دمای بالاتر از  $100^{\circ}\text{C}$  و فشار بیشتر از یک بار) و روش جایگزینی حلال تهیه گردید. در روش اول یعنی با استفاده از آب در شرایط مادون بحرانی که برای اولین بار برای تولید نانودیسپرسیون استفاده شده است، ۲۰ میلی‌گرم کورکومین با ۱/۵ میلی‌گرم توپین ۲۰ به مدت ۱۵ دقیقه با سرعت ثابت هم‌زده شد. سپس فاز آلی، قطره قطره داخل ۹۸/۵ میلی‌گرم فاز آبی (آب مقطر) ریخته شد. پس از آماده‌سازی فاز آلی و آبی و مخلوط کردن دو فاز با هم، محلول حاصل در داخل محفظه‌ای از جنس تفلون و مقاوم به

<sup>1</sup> Poly disperse index

<sup>2</sup> Merck Company (Darmstadt, Germany)

<sup>3</sup> Samchun

<sup>4</sup> Dynamic Light Scattering

<sup>۲۱</sup>-۱۰۰ انجام شد. داده‌های آزمایشگاهی با مدل قانون توانی زیر برازش داده شد و پارامترها تعیین گردید.

$$\tau = \mu \dot{\gamma}^n$$

که  $\tau$ : تنش برشی (Pa)،  $\mu$ : ویسکوزیته (Pa.s<sup>n</sup>) و  $\dot{\gamma}$ : نرخ برشی (s<sup>-1</sup>) و  $n$ : شاخص جریان و پارامتر بی بعد قانون توانی می‌باشند. مقدار ویسکوزیته ( $\mu$ ) و شاخص جریانی ( $n$ ) را با رسم نمودار لگاریتمی تنش برشی در برابر لگاریتم نرخ برشی می‌توان پیدا کرد (برند و همکاران ۱۹۹۵).

#### بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی با روش DPPH

روش ساده برای اندازه‌گیری خاصیت آنتی‌اکسیدانی مواد بیولوژیکی، استفاده از روش DPPH می‌باشد. در این روش ۱۰۰ میکرولیتر از نانودی‌سپرسیون با ۵ میلی-لیتر از محلول متانول ۵۰٪ شامل رادیکال‌های DPPH (1 mM) مخلوط گردید. سپس در محیط تاریک و دمای ۲۷ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳۰ دقیقه قرار گرفت. در نهایت، جذب در طول موج ۵۱۷ نانومتر اندازه‌گیری شد. مقدار آنتی‌اکسیدانی با استفاده از معادله زیر محاسبه گردید:

$$I\% = (A_{Control} - A_{Sample}) / A_{Control} \times 100$$

که در آن  $I\%$ ،  $A_{control}$  و  $A_{sample}$  به ترتیب خاصیت آنتی‌اکسیدان، مقدار جذب نمونه کنترل و مقدار جذب نمونه تولیدی می‌باشد (عطایی صالحی و سلیمانپور ۱۳۹۸).

#### بررسی خاصیت ضد میکروبی

خاصیت ضد میکروبی نانودی‌سپرسیون‌های کورکومین تولید شده، با استفاده از روش نفوذ چاهک مورد ارزیابی قرار گرفت. در این روش دو نوع باکتری استافیلوکوکوس اورئوس و اشرشیا کلی به عنوان شاخص باکتریهای گرم مثبت و گرم منفی، بر روی محیط کشت نوترینت آگار کشت داده شد و چاهک‌هایی بر روی آن ایجاد گردیده و نمونه‌ها به صورت جداگانه

این روش برای اندازه‌گیری پتانسیل زتا می‌توان استفاده نمود. در واقع پتانسیل زتا یک پارامتر برای ثبات بالقوه سیستم کلوئیدی می‌باشد. به طور کلی مرز پایداری و ناپایداری نانودی‌سپرسیون‌ها را می‌توان با پتانسیل زتا تعیین نمود (انرجان و همکاران ۲۰۱۲). برای انجام این آنالیز از دستگاه *DLS* (Nanotracc Wave, Microtracc, USA) استفاده شد.

#### تعیین رنگ و کدورت نانودی‌سپرسیون

رنگ یکی از مهمترین پارامترهای ظاهری در انتخاب نوشیدنی‌ها و مواد غذایی در صنایع غذایی می‌باشد. در میان روش‌های مختلف موجود برای اندازه‌گیری رنگ مواد، یکی از معمول‌ترین روش‌ها، استفاده از سیستم هانتربل بر مبنای سه پارامتر  $L^*$ ،  $a^*$  و  $b^*$  می‌باشد.  $C_{ab}^*$  و  $TCD$  که به ترتیب شدت رنگ و تفاوت کل رنگ را نشان می‌دهند، از روابط زیر به دست می‌آیند (انرجان و همکاران ۲۰۱۲):

$$C_{ab}^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2} \quad TCD = (L^{*2} + a^{*2} + b^{*2})^{1/2}$$

همچنین شاخص سفیدی (WI) نیز از رابطه زیر به دست می‌آید:

$$WI = 100 - \sqrt{(100 - L^*)^2 + (a^{*2} + b^{*2})}$$

نانودی‌سپرسیون را در صورتی می‌توان شفاف در نظر گرفت که کدورت آن خیلی پایین (کمتر از ۰/۱) باشد (ژانگ و همکاران ۲۰۱۶). برای مشخص کردن رنگ و کدورت نانودی‌سپرسیون‌های تولید شده از اسپکتوفوتومتر *ColorFlex EZ* (Hunter Lab. Inc., USA) استفاده شد. همچنین کدورت نانودی‌سپرسیون‌ها از دستگاه کدورت سنج *Turb 555 IR* (WTW Co., Weilheim, Germany) تعیین گردید.

#### اندازه‌گیری ویسکوزیته ظاهری و نوسانی

دستگاه رئومتر مورد استفاده در این تحقیق برای سنجیدن میزان ویسکوزیته رئومتر Anton Paar (MCR 92, Austria) مجهز به استوانه‌های هم مرکز، که آنالیزها در دمای ۲۵ °C و در محدوده تنش برشی s<sup>-1</sup>

<sup>1</sup>Radical scavenging of 2, 2-diphenyl L-1-picrylhydrazyl (DPPH)

همانطور که از نتایج مشخص است اندازه ذرات نانودیسپرسیون تولید شده با استفاده از آب در شرایط مادون بحرانی بسیار کمتر از ذرات تولید شده به روش جایگزینی حلال است ولی با این وجود اندازه ذرات تولید شده در هر دو روش زیر ۱۰۰ نانومتر می‌باشد. ذرات در نانودیسپرسیون تولید شده با استفاده از آب مادون بحرانی، پتانسیل زتای بالاتری (۱۵/۷- میلی ولت) داشت. ساری و همکارانش در سال ۲۰۱۴ پتانسیل زتای ۶/۹- میلی‌ولت را برای نانودیسپرسیون کورکومین بدست آوردند. همچنین برای اینکه در این روش اندازه نانوذرات و ویسکوزیته کمتر بود در نتیجه سرعت حرکت و قابلیت رسانایی بالاتری داشتند. نانودیسپرسیون با اندازه کوچکتر و شاخص پراکندگی (PDI) پایین‌تر مرغوبتر می‌باشند، برای اینکه این نانودیسپرسیون‌ها دارای پایداری بالاتر به دلیل همگونی پراکندگی ذرات خواهند بود. عامل اصلی ناپایداری سیستم‌های نانودیسپرسیون پدیده استوالد می‌باشد. کشش سطحی زیاد، ناهمگونی پراکندگی ذرات و وجود حلال در سیستم باعث تشدید این پدیده می‌شود. همچنین تجمع ذرات، هنگامی که که پتانسیل زتا یا بارالکتریکی بالاتر است، کمتر رخ می‌دهد. بنابراین در روش جایگزینی حلال، احتمال باقی ماندن مقداری از حلال در داخل نانودیسپرسیون در مرحله تبخیر دلیل بر تجمع و بزرگتر شدن اندازه ذرات تولید شده توسط این روش است.

داخل چاهک‌ها ریخته شد. محیط کشت در داخل انکوباتور در دمای ۳۶ درجه سانتی‌گراد به مدت ۲۴ ساعت قرار داده شد. خاصیت ضد میکروبی نمونه‌های تولید شده به صورت دایره‌ای شفاف اطراف چاهک‌ها می‌باشد. ایجاد هاله عدم رشد اطراف چاهک، بیانگر ویژگی ضدمیکروبی است. هرچقدر هاله عدم رشد اطراف چاهک‌ها بزرگتر باشد، خاصیت ضد باکتریایی نمونه بیشتر می‌باشد. از آمپی‌سیلین (دیسک با قطر ۵ میلی متر و غلظت ۲۰ میکرو گرم) به عنوان کنترل مثبت استفاده گردید.

### بررسی پایداری در طول مدت نگهداری

پایدار بودن یک فرمولاسیون در دراز مدت از عوامل مهم در کاربرد آن در صنایع غذایی و نوشیدنی و همچنین صنایع دارویی می‌باشد. به منظور بررسی پایداری نسبت به پدیده‌های ناپایدار کننده نانودیسپرسیون، اندازه ذرات نمونه‌ها یک، دو و سه ماه (با توجه با محدودیت زمان) پس از تولید و نگهداری در دمای محیط اندازه گرفته شد.

### نتایج و بحث

#### اندازه ذره و توزیع اندازه ذره و پتانسیل زتای

اندازه ذرات، پتانسیل زتا، PDI و قابلیت هدایت نانودیسپرسیون‌های تهیه شده به دو روش در جدول ۱ آورده شده است. روش تولید نانودیسپرسیون بر روی اندازه، شاخص پراکندگی، بار سطحی، تحرک الکتروفوریتیک و پتانسیل زتای ذرات تاثیر می‌گذارد.

جدول ۱- ویژگی‌های فیزیکی نانودیسپرسیون‌های تولیدی با استفاده از آب مادون بحرانی و روش جایگزینی حلال

Table 1- Physical properties of prepared nanodispersions using subcritical water and solvent displacement method

Method	Particle size (nm)	Zeta-potential	PDI	Conductivity (mS/cm)
subcritical water	10.12	-15.7	0.06	0.401
solvent displacement	91.41	2.62	0.423	0.175

قبول آن ماده می‌باشند. به همین دلیل اندازه‌گیری پارامترهای رنگ و کدورت ضروری می‌باشد. در جدول ۲ پارامترهای مربوط به رنگ و مقدار کدورت آورده شده است. همانطور که از نتایج مشخص می‌باشد هر

### تعیین رنگ و کدورت

رنگ، کدورت و ویژگی ظاهری سطح یک ماده غذایی یا دارویی به عنوان اولین پارامترهایی هستند که توسط مصرف کننده مورد قضاوت قرار گرفته و مبنای رد یا

دیده می‌شود، ویسکوزیته نمونه با ذرات کوچکتر، کمتر از نمونه با ذرات بزرگتر است که معمولاً در یک سیستم مشابه از نظر ترکیب با کاهش اندازه ذرات، ویسکوزیته سیستم افزایش می‌یابد که به افزایش نسبت سطح به حجم نسبت داده می‌شود. اما لخته شدن ذرات در نانودیسیپرسیون می‌تواند علاوه بر افزایش اندازه ذرات، موجب افزایش ویسکوزیته در کسر حجمی ثابت گردد. چون، مقادیری از فاز پیوسته در بین ذرات گیر می‌افتد. که این نتایج با یافته‌های انرجان و همکاران در سال ۲۰۱۳ مطابقت دارد. آنها نشان دادند که هرچقدر اندازه ذرات بزرگتر شود ویسکوزیته هم بیشتر خواهد شد.

از طرف دیگر، ضخامت و ساختار فیلم تشکیل شده توسط امولسیفایرها، در لایه سطحی نیز می‌تواند در مقادیر ویسکوزیته نانودیسیپرسیون مؤثر باشد. نتایج این تحقیق نشان می‌دهد که نوع روش تولید نانودیسیپرسیون، تأثیر زیادی در ویسکوزیته آن‌ها دارد. در جدول ۳ شاخص جریان ( $n$ ) و ویسکوزیته و نیز خطای رگرسیون ( $R^2$ ) برای نمونه‌ها در دمای  $^{\circ}\text{C}$  ۲۵ آورده شده است.

جدول ۳- پارامترهای محاسبه شده برای با استفاده از آب مادون بحرانی و روش جایگزینی حلال

Table 3- Obtained parameters using subcritical water and solvent displacement methods

Method	flow behavior index ( $n$ )	Consistency index ( $\mu$ )	apparent viscosity at $100 \text{ s}^{-1}$ ( $\eta$ )	$R^2$
Subcritical water	1.090	0.834	1.22	0.994
solvent displacement	1.081	1.084	1.57	0.995

در مورد نانودیسیپرسیون‌های تهیه شده با استفاده از آب در شرایط مادون بحرانی و جایگزینی حلال، ویسکوزیته نمونه‌ها به ترتیب ۰/۸۳۴ و ۱/۰۸۴ می‌باشند، خطای رگرسیون برای نمونه‌ها، بالاتر از ۹۹٪ می‌باشد که نشان دهنده مناسب بودن مدل قانون توان

دو نمونه نانودیسیپرسیون دارای مقدار مثبت  $b^*$  می‌باشد که این نشان‌دهنده زرد بودن نمونه است همچنین بالا بودن پارامتر  $L$  و  $WI$  روش جایگزینی حلال (به ترتیب ۳/۸۳ و ۳/۶۰) نشان از رنگ سفید نمونه تهیه شده با این روش نسبت به استفاده از آب مادون بحرانی می‌باشد. اما کدورت در نمونه تهیه شده با آب مادون بحرانی برابر با ۰/۰۶۳ NTU و کمتر از روش جایگزینی حلال است که می‌توان به کوچک بودن اندازه ذرات این نانودیسیپرسیون نسبت داد. اختلاف رنگ برابر با ۴/۵۶ و ۷/۵۷ برای نانودیسیپرسیون تولید شده به ترتیب با روش آب مادون بحرانی و جایگزینی حلال بود.

جدول ۲- پارامترهای مربوط به رنگ و مقدار کدورت

Table 2- Colour and turbidity parameters

Method	$b^*$	$L^*$	$C^*_{ab}$	TCD	WI	Turbidity (NTU)
Sub critical water	2.55	2.80	3.60	4.56	2.73	0.063
solvent displacement	4.36	3.83	6.50	7.57	3.60	0.074

### ویژگی رئولوژیکی نوسانی

در مورد نانودیسیپرسیون حاوی کورکومین تهیه شده با هر دو روش، با استفاده از آب در شرایط مادون بحرانی و جایگزینی حلال، بین تنش برشی و نرخ برشی رابطه نسبتاً خطی وجود داشت که این رفتار تاکید بر رفتار نزدیک به رفتار نیوتنی نانودیسیپرسیون-های تهیه شده می‌باشد (شکل ۲-الف). همان طور که در شکل ۲-ب دیده می‌شود، در این نوع نانودیسیپرسیون-ها، در نرخ‌های برشی پایین، ویسکوزیته به صورت ناگهانی افزایش یافت که به تغییر شکل ذرات و تفکیک ذرات به هم چسبیده شده نسبت داده شد. در نرخ‌های برشی بالاتر، ویسکوزیته به نرخ برشی وابسته نیست و با افزایش نرخ برشی، ویسکوزیته در تمام نرخ‌های اعمال شده، ثابت می‌ماند. همان طور که در شکل ۲-ب

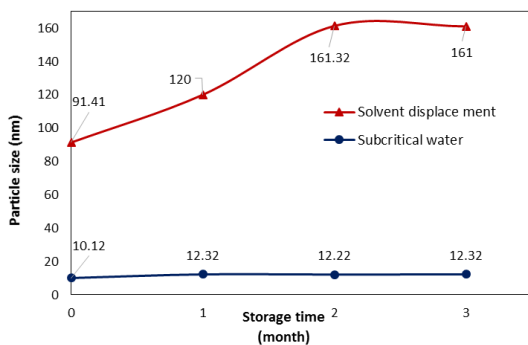
بروز می‌دهد (جدول ۴). نانودیسپرسیون تولید شده با استفاده از آب مادون بحرانی به دلیل ذرات ریزتر، خاصیت آنتی‌اکسیدانی بیشتری (۵۷/۶٪) نسبت به نانودیسپرسیون تهیه شده با روش جایگزینی حلال (۲۳٪/۸) حاوی ذرات بزرگتر و در مقایسه با محلول کورکومین در آب (۳٪) دارد. از این رو استفاده از آب مادون بحرانی با حذف حلال و خاصیت آنتی‌اکسیدانی بیشتر برای تولید نانودیسپرسیون مزیت زیادی نسبت به روش جایگزینی حلال دارد.

جدول ۴- خاصیت آنتی‌اکسیدانی و ضد باکتریایی (میلیمتر) با استفاده از آب مادون بحرانی و روش

جایگزینی حلال

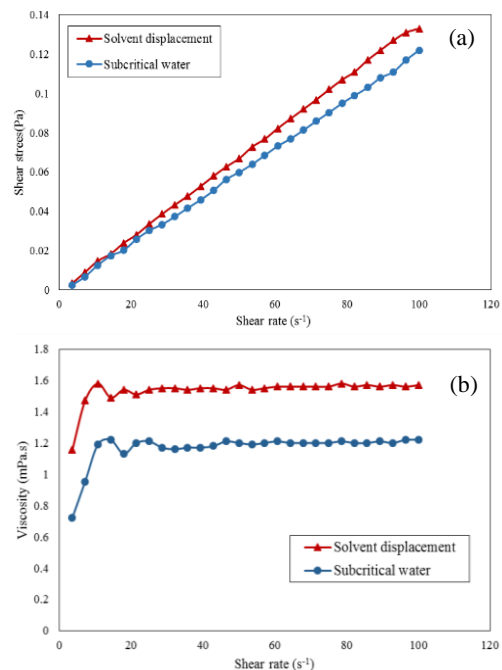
Table 4- Antioxidant and antibacterial activity (mm) using subcritical water and solvent displacement

Method	Scavenging %	Clear zone S. aureus	Clear zone E. coli
Subcritical water	57/6	30	27
solvent displacement	23.8	19	18



شکل ۳- پایداری و تغییر توزیع اندازه ذرات با استفاده از آب مادون بحرانی و روش جایگزینی حلال با گذشت زمان  
Figure 3- Stability and changing the particle size distribution using subcritical water and solvent displacement at storage time

برای توصیف خصوصیات جریان‌ها می‌باشد. در این رابطه هرچقدر  $\eta$  به ۱ نزدیکتر باشد، نشان دهنده تمایل سیال به رفتار نیوتنی و هرچقدر به صفر نزدیکتر باشد، نشان دهنده تمایل به رفتار سودوپلاستیک است. همان طور که در جدول ۳ مشاهده می‌شود، مقادیر شاخص رفتار جریان برای نانودیسپرسیون‌های تولید شده با هر دو روش نزدیک به یک می‌باشد که دلالت بر رفتار نیوتنی دارد. رفتار نیوتنی سیستم‌ها به علت توانایی میسل‌ها در تشکیل ساختارهای کروی می‌باشد که این ساختارهای کروی، رئولوژی نانودیسپرسیون را به صورت جزئی تحت تأثیر قرار می‌دهند.



شکل ۲- نمودار الف) تنش برشی - نرخ برشی و ب) نمودار ویسکوزیته - نرخ برشی با استفاده از آب مادون بحرانی و روش جایگزینی حلال

Figure 2- Flow profiles a) shear stress versus shear rate and b) viscosity versus shear rate using subcritical water and solvent displacement

تعیین خاصیت آنتی‌اکسیدانی

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی نانودیسپرسیون‌ها نشان می‌دهد که نانودیسپرسیون کورکومین فعالیت فوق‌العاده‌ای در به دام انداختن رادیکال‌های آزاد از خود

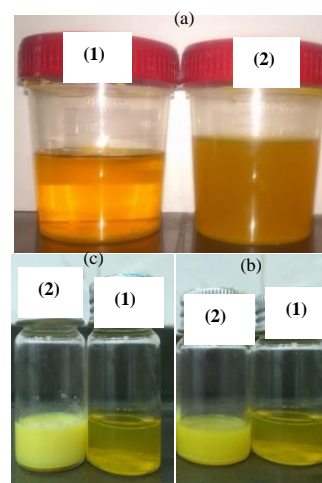
نگهداری، اندازه متوسط ذرات مربوط به نانودیسپرسیون تولید شده با آب مادون بحرانی حدود ۱۲/۳۲ نانومتر خیلی کمتر از روش جایگزینی حلال (۱۶۱ نانومتر) بود. در نانودیسپرسیون تولید شده با آب مادون بحرانی، با گذشت زمان و در طول مدت نگهداری اندازه ذرات تغییرات قابل ملاحظه‌ای از خود نشان ندادند و مشاهدات چشمی حاکی از وقوع پایداری در سیستم آن‌ها بود (شکل ۴). ناپایداری در نانودیسپرسیون تهیه شده به روش جایگزینی حلال به مقدار بیشتری مشاهده گردید. و اندازه ذرات پس از گذشت چهار ماه از ۹۱/۴ به ۱۶۱ نانومتر افزایش یافت. بزرگتر شدن اندازه ذرات در روش جایگزینی حلال را می‌توان به باقی‌ماندن مقداری حلال یا ناهمگونی اندازه ذرات در نانودیسپرسیون مربوط دانست. بعد از گذشت سه ماه، اندازه ذرات تقریباً ثابت مانده بود که پس از این زمان به دلیل اینکه ذرات تقریباً همگون شده‌اند تغییری در اندازه آن‌ها ایجاد نشده است. ناپایداری نانودیسپرسیون تولید شده به روش جایگزینی حلال نیز به چشم در شکل ۴ قابل مشاهده است.

### نتیجه گیری

نانودیسپرسیون کورکومین با دو روش استفاده از آب مادون بحرانی و روش جایگزینی حلال تهیه گردید و نتایج حاصل از مقایسه دو روش مذکور نشان از پایداری، خواص آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی بالاتر نانودیسپرسیون کورکومین تولیدی با استفاده از روش نوین آب مادون بحرانی می‌باشد. همچنین در این روش علاوه بر حذف حلال آلی، مقدار امولسیفایرهای مورد استفاده کمتر بوده که باعث افزایش توجیه اقتصادی فرایند تولید نانودیسپرسیون کورکومین گردیده و در ادامه کمترین نگرانی در خصوص جنبه‌های سلامتی و زیست محیطی مصرف محصول تولیدی را دارد.

### تعیین خاصیت ضد باکتریایی

خاصیت ضد باکتریایی نانودیسپرسیون‌های کورکومین تولید شده با استفاده از آب مادون بحرانی و جایگزینی حلال بر روی باکتری گرم مثبت و گرم منفی با روش چاهک مورد ارزیابی قرار گرفت. هاله تشکیل شده اطراف چاهک توسط نانودیسپرسیون تولید شده با استفاده از آب مادون بحرانی در برابر باکتری گرم مثبت (۱۵ میلی‌متر) و باکتری گرم منفی (۸ میلی‌متر) بزرگتر از نانودیسپرسیون تولید شده با روش جایگزینی حلال بوده، بنابراین خاصیت ضد باکتریایی بیشتری دارد. همچنین نتایج نشان داد خاصیت ضد باکتریایی نمونه‌ها بر روی باکتری گرم مثبت بیشتر از باکتری گرم منفی بود (جدول ۴).



شکل ۴- مشخصات ظاهری نمونه‌ها (۱) با استفاده از آب مادون بحرانی و (۲) روش جایگزینی حلال الف) پس از یک ماه، ب) پس از دو ماه و ج) پس از سه ماه نگهداری

Figure 4- Appearance of samples using subcritical water and solvent displacement after a) One month, b) Two month and c) three month

### بررسی پایداری در طول مدت نگهداری

با بررسی اندازه ذرات و تغییر توزیع اندازه آنها، پایداری نانودیسپرسیون‌ها مورد ارزیابی قرار گرفت. اندازه ذرات نانودیسپرسیون‌های تولید شده در طول زمان نگهداری در شکل ۳ ارائه شده‌اند. در طول زمان



## منابع مورد استفاده

- حسن‌فامیان ف و پزشکی نجف‌آبادی الف، ۱۳۹۶. تولید نانوامولسیون حاوی لینولئیک اسیدکونژوگه (CLA) به روش تشکیل خود به خودی و غنی‌سازی شیر کم چرب پاستوریزه با آن. نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی ۲۷ (۴) ۱۳۵-۱۴۵.
- عطای صالحی الف و سلیمانپور تمام ن، ۱۳۹۸. بررسی اثر آنتی‌اکسیدانی اسانس پونه کوهی بر پایداری اکسایشی روغن سرخ کردنی، نشریه پژوهش‌های صنایع غذایی ۲۹ (۳) ۱-۱۱.
- Abdullaev F, and Espinosa-Aguirre J, 2004. Biomedical properties of saffron and its potential use in cancer therapy and chemoprevention trials. *Cancer Detection and prevention* 28: 426-432.
- Anarjan N, Jaber N, Yeganeh-Zare S, Banafshehchin E, Rahimirad A and Jafarizadeh-Malmiri H, 2014. Optimization of mixing parameters for  $\alpha$ -Tocopherol nanodispersions prepared using solvent displacement method. *Journal of the American Oil Chemists' Society* 91: 1397-1405.
- Anarjan N and Tan C P, 2013. Physico-chemical stability of astaxanthin nanodispersions prepared with polysaccharides as stabilizing agents. *International Journal of Food Science Nutrient*, 64: 744-748.
- Anarjan N, Tan C P, Nehdi I A and Ling, T C, 2012. Colloidal astaxanthin: Preparation, characterisation and bioavailability evaluation. *Food Chemistry*, 135: 1303-1309.
- Anton N, Gayet P, Benoit J P, and Saulnier P, 2007. Nano-emulsions and nanocapsules by the PIT method: an investigation on the role of the temperature cycling on the emulsion phase inversion *International Journal of Pharmaceutics* 344: 44-52.
- Anuchapreeda S, Fukumori Y, Okonogi S, and Ichikawa H, 2011. Preparation of lipid nanoemulsions incorporating curcumin for cancer therapy. *Journal of Nanotechnology* 20: 1-12.
- Brand-Williams W, Cuvelier M-E, and Berset C, 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology* 28: 25-30.
- Fatouros D G, Deen G R, Arleth L, Bergenstahl B, Nielsen F S, Pedersen J S, and Mullertz A, 2007. Structural development of self nano emulsifying drug delivery systems (SNEDDS) during in vitro lipid digestion monitored by small-angle X-ray scattering. *Pharmaceutical Research* 24: 1844-1853.
- Pan K, Zhong Q, and Baek S J, 2013. Enhanced dispersibility and bioactivity of curcumin by encapsulation in casein nanocapsules. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61: 6036-6043.
- Prasad S, Tyagi A K, and Aggarwal B, 2014. Recent developments in delivery, bioavailability, absorption and metabolism of curcumin. *Cancer Research and Treatment* 46: 2-18.
- Ravber M, Knez Z, and Skerget M, 2015. Simultaneous extraction of oil-and water-soluble phase from sunflower seeds with subcritical water. *Food Chemistry* 166: 316-323.
- Samarghandian S and A. Borji 2014. Anticarcinogenic effect of saffron (*Crocus sativus* L.) and its ingredients." *Pharmacognosy Research* 6: 99-105.
- Sari T P, Mann B, Kumar R, Singh R R B, Sharma R, Bhardwaj M and Athira S, 2014. Preparation and characterization of nanoemulsion encapsulating curcumin. *Food Hydrocolloids* 26: 1-7.
- Sharma N, Deshpande R D, and Sharma R K, 2013. Preparation and optimization of nanoemulsions for targeting drug delivery. *International Journal of Drug Development and Research*.
- Yallapu MM, Jaggi M and Chauhan S, 2013. Curcumin nanomedicine: a road to cancer therapeutics. *Current Pharmaceutical Design* 19: 1994-2010.
- Zhang J, Bing L and Reineccius G A, 2016. Comparison of modified starch and Quillaja saponins in the formation and stabilization of flavor nanoemulsions. *Food Chemistry* 192: 53-59.

## Curcumin nanodispersion preparation using subcritical water and solvent displacement methods and evaluation of their physical-chemical, rheological, antioxidant and anti-bacterial properties

Z Sayya<sup>1</sup> and H Jafarizadeh-Malmiri<sup>2\*</sup>

Received: June 11, 2018 Accepted: August 15, 2018

<sup>1</sup>PhD Student, Chemical Engineering-Food Technology, Faculty of Chemical Engineering, Sahand University of Technology, Tabriz, Iran

<sup>2</sup>Associate Professor, Chemical Engineering-Food Technology, Faculty of Chemical Engineering, Sahand University of Technology, Tabriz, Iran

\* Corresponding Author Email: [h\\_jafarizadeh@sut.ac.ir](mailto:h_jafarizadeh@sut.ac.ir); [h\\_jafarizadeh@yahoo.com](mailto:h_jafarizadeh@yahoo.com)

**Introduction:** Nowadays, the use of herbal medicines for the treatment of many diseases has attracted the attention of scientists (Abdullaev et al., 2004; Samarghandian and Borji 2014). Turmeric is one natural plant, which has a bioactive ingredient called curcumin. It has many medicinal and food applications due to its biological properties. Yellow pigment curcumin is a polyphenol from the diaryl heptanoids group (Anuchapreeda et al., 2011). Curcumin has different application in industry as cosmetic creams, wound glues, capsules, herbal toothpaste, and soaps. It is also used in the food industry for the preparation of soups, drinks and even pastels (Prasad et al., 2014; yallapu et al., 2013). Curcumin metabolism indicated that it has low poor solubility in the aqueous media, dramatically reduces cellular uptake and so-called bioavailability. In addition, it causes many problems in adding this valuable bioactive ingredient to water-based food and drug formulations (Sreekanth et al., 2011; Pan et al., 2011). In recent decades, nanotechnology has been able to solve this problem with bioactive compounds. Prepared nanodispersions of bioactive compounds are suggested ways to overcome this problem with low water solubility and low bioavailability bioactive (Anton et al., 2007; Mora-Huertas et al., 2011). Conventional methods of preparing nanodispersions using organic solvents may have undesirable effects. Therefore, green technology has recently been developed. Nowadays, using novel methods has advantages to prepare nanodispersions of bio-friendly bioactive materials such as subcritical water. In this method, water are used as a solvent because of its unique physico-chemical properties (Ravber et al., 2015). The aim of this study is to prepare curcumin nanodispersions with very fine particle size and high antimicrobial properties using water in subcritical conditions, for the first time, and a solvent replacement method. Finally, Zeta potential and particle distribution index (PDI) were compared. Also, the antioxidant and antimicrobial effects of prepared curcumin nanodispersions using these two methods were investigated.

**Material and methods:** Curcumin (97% purity), poly ethylene glycol (PEG, 4000 Dalton) and Tween 20 were provided from Merck Company (Darmstadt, Germany). Ethyl acetate (99.7%) as solvent was prepared from Samchun Pure Chemical Company (Seoul, Korea). Escherichia coli (PTCC 1270) and Staphylococcus aureus (PTCC 1112) were purchased from microbial Persian type culture collection (PTCC, Tehran, Iran). Nutrient Agar (NA) was provided from Biolife Company (Milan, Italy). Double distilled water was used to prepare all nanodispersions. Curcumin nanodispersions were prepared using solvent displacement and subcritical water. In subcritical water method, 1.5 mg of Tween 20 was mixed with 20 mg of curcumin then was added into the water, placed in a sealed teflon autoclave and heated at 120 °C for 2 h in an oven (Behdad Medical

Production Co., SP88, Tehran, Iran). The internal pressure of the autoclave was 1.5 bar. The Teflon autoclave with capacity of 100 mL, was designed and manufactured in our research laboratory. In solvent displacement method, 20 mg of curcumin was added into the ethyl acetate (10 mL) as solvent to produce the organic phase. On the other hand, 1.5 g Tween 20 was mixed into the distilled water (98.5 g) under a constant stirring (300 rpm) for 15 min to prepare aqueous solution. Organic phase was then slowly added into the aqueous solution and mixed using a conventional homogenizer at 300 rpm for 15 min. finally, the organic solvent was removed using a rotary evaporator (Eyela NE-1001, Tokya Rikakikai Co. Ltd, Tokyo, Japan) which it was adjusted at temperature, pressure and rotation speed of the 50 °C, 25 KPa and 100 rpm, respectively.

**Results and discussion:** Therefore, in the present study Curcumin nanodispersions using a novel subcritical water method and a traditional solvent displacement method using ethylacetate and utilizing Tween 20, as emulsifier, were prepared and the physico-chemical, rheological, stability, antioxidant and antimicrobial properties of the prepared Curcumin nanodispersions were evaluated. Dynamic Light Scattering analysis indicated that the produced nanodispersions using novel technique had minimum particle size (10.1 nm) and poly disperses index (0.06) and maximum conductivity (0.401 mS/cm) and zeta potential (-15.8 mV) values as compared to those of obtained by the solvent displacement method. The obtained results also indicated that the prepared pale yellow Curcumin nanodispersions ( $b=2.55$ ) using subcritical water method had minimum turbidity (0.063 NTU) and viscosity. Furthermore, more stable (during three month) produced Curcumin nanodispersion using subcritical water method shown the highest antioxidant (57.6%) comparison to Curcumin in water (3%) and antibacterial activity against to the both studied Gram-positive and Gram-negative bacteria strains.

**Conclusion:** Curcumin nanodispersions were prepared using two methods as subcritical water and solvent displacement. The results showed a higher stability, lower viscosity, higher antioxidant and antimicrobial properties of curcumin nanodispersion prepared by the novel method as subcritical water. In addition to, organic solvents were eliminated in subcritical water method, also the amount of used emulsifier has decreased. Therefore, this method increases the economic justification of the process of production of curcumin nanodispersions then it decreases the concern about the health and environmental aspects of product consumption. Therefore, the use of this new method for preparing curcumin nanodispersions can be easily generalized and can be applied to prepare for other food and pharmaceutical nanodispersions.

**Key words:** Nanodispersion, Curcumin, Subcritical water, Solvent displacement, Stability