Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 24, No.6, Sep 2016
Pages: 468-478

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۴، شماره ۶، شهریور ۱۳۹۵
صفحه: ۴۷۸-۴۶۸

استراتژی بهبود در شاخص درمانی گیاهان دارویی بومی ایران: سنتز و تعیین خصوصیات وزیکول‌های فسفولیپیدی حاوی اسانس زنیان

بی‌بی فاطمه حقیرالسادات*[۱]، مریم اژدری[۲]، سید مهدی کلانتر[۳]، سمیرا نادری‌نژاد[۴]
کرامت تیموری‌زاده[۵]، مژگان یزدانی[۶]، محدثه هاشمی[۷]، فاطمه دانشمند[۸]

چکیده

مقدمه: گیاهان دارویی یکی از ارزشمندترین سرمایه‌های ملی ایران است. اسانس‌ها گیاهی دارای خواص ارزشمند درمانی هستند. اکسیدشدن و فراریت اسانس‌ها باعث محدودیت استفاده آن‌ها شده است. نانولیپوزوم‌ها کپسول‌های نانومتری کروی لیپیدی هستند، ازجمله کاربردهای شایان توجه لیپوزوم‌ها استفاده از آن‌ها به عنوان حامل‌های دارویی به منظور بهبود رسانش عوامل درمانی است. در سال‌های اخیر محققان بر بارگذاری داروهای گیاهی در سیستم‌های وزیکولی مطالعات فراوانی انجام داده‌اند. هدف از تحقیق حاضر ارتقای اثرگذاری اسانس زنیان از طریق بارگذاری این اسانس در نانولیپوزوم است.

روش بررسی: اسانس گیاه زنیان با استفاده از دستگاه کلونجر آماده سازی و سپس با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی گازی جرمی ترکیبات موجود در اسانس مورد ارزیابی قرار گرفتند. وزیکول‌های چربی تک‌لایه کوچک حاوی زنیان با روش آب‌پوشانی لایه نازک چربی تهیه شد. اجزای تشکیل دهنده فاز لیپیدی شامل فسفولیپید فسفاتیدیل کولین سویای ۸۰٪، کلسترول و اسانس زنیان بود. نانوذرات ساخته شده از نظر میزان راندمان بارگذاری، اندازه، پتانسیل زتا، الگوی رهایش و موفولوژی مورد ارزیابی قرار گرفتند.

نتایج: نتایج بررسی‌ها نشان داد، میزان بارگذاری اسانس زنیان در حامل‌های لیپوزومی در حدود ۷/۴ ± ۳۵/۶ و اندازه نانوذرات در حدود ۱۸۶/۱ نانومتر می‌باشد. نانو وزیکول‌های تهیه‌شده، رهایش اسانس زنیان را به صورت کنترل شده هدایت می‌کنند.

نتیجه‌گیری: در مطالعه حاضر، بارگذاری اسانس زنیان در داخل نانو لیپوزوم به منظور افزایش پایداری، افزایش حلالیت و در نتیجه عملکرد بهتر در صورت گرفته است. فرمولاسیون تهیه شده آهسته رهش است و می‌تواند پوشش مناسبی باشد و اسانس را در مقابل اکسیداسیون حفظ کند و پایداری آن را افزایش دهد.

واژه‌های کلیدی: وزیکول فسفولیپیدی، اسانس زنیان، محصورسازی، اسانس گیری، تیمول

۱- دانشجوی دکتری نانوبیوتکنولوژی، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم وفنون نوین، دانشگاه تهران
۲- کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد
۳- استاد، گروه ژنتیک، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد
۴- کارشناسی ارشد بیو تکنولوژی، گروه مهندسی بیوتکنولوژی و داروسازی، دانشکده مهندسی شیمی، پردیس دانشکده‌های فنی، دانشگاه تهران
۵- کارشناس ارشد گیاهان زینتی، سازمان جهاد کشاورزی یزد
۶- دانشجوی کارشناسی ارشد بیوشیمی، گروه بیوشیمی، دانشگاه پیام نور تفت، یزد
۷- دانشجوی دکتری مهندسی پزشکی، گروه مهندسی پزشکی، دانشکده علوم وفنون نوین، دانشگاه تهران
۸- استادیار، گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور، تهران، ایران
* (نویسنده مسئول)؛ تلفن:۹۱۳۲۵۰۷۱۵۸ ، پست الکترونیکی: fhaghirosadat@ut.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۶/۱۶ تاریخ پذیرش: ۱۳۹۵/۳/۱۳

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-01-21]

مقدمه

گیاهان دارویی منابع طبیعی ارزشمندی هستند که امروزه مورد توجه کشورهای پیشرفته جهان قرار گرفته و به عنوان مواد اولیه جهت تبدیل به داروهای بی‌خطر برای انسان تلقی می‌شوند. در این زمینه ایران یکی از غنی‌ترین منابع گیاهان دارویی جهان به شمار می‌رود که دارای تنوع بالای شرایط زیستگاهی برای انواع این گیاهان است که می‌تواند سهم مهمی در افزایش صادرات غیر نفتی ایران داشته باشد(۱).

گیاه زنیان(Trachyspermum copticum)، گیاهی است علفی، بدون کرک و معطر با ساقه افراشته به ارتفاع ۵۰-۲۰ سانتی‌متر، چتر با تعداد۸-۶ انشعاب است(۲،۳). میوه زنیان، کوچک و تخم مرغی شکل است و رنگ زرد تیره، معطر و بوی عطر تیمول دارد و میوه آن به صورت خشک و رسیده مصرف می‌شود. اندام دارویی این گیاه را میوه آن تشکیل می‌دهد(۲). دامنه انتشار، محل رویش این گیاه در ایران، استان‌های سیستان و بلوچستان، آذربایجان، اصفهان، خوزستان، یزد، فارس، کرمان، خراسان است. این گیاه در نواحی مختلف اروپای مرکزی، هندوستان و مصر نیز می‌روید(۴،۵).

از زنیان به صورت خوراکی به عنوان ضد درد، ضد آسم، ضد تهوع و خلط‌آور و به صورت موضعی در درمان دردهای روماتیسمی استفاده می‌شود. این ماده اثر درمانی بر بیماری‌های جلدی، عصبی و ادراری تناسلی دارد(۵).

وقتی اسانس به شکل آزاد استفاده شود نسبت به شرایط محیطی پایداری کمتری دارد و زود اکسید می‌شود به طوری که خاصیت ضد میکروبی خود را از دست می‌دهد. اسانس‌های روغنی ترکیباتی حساس و دارای خواص ضد میکروبی و آنتی‌اکسیدانی مفید هستند. به منظور افزایش پایداری این ترکیبات و کنترل آزادسازی آن‌ها می‌توان از فرایند انکپسوله کردن استفاده نمود. با توجه به کاربردهای گسترده اسانس زنیان، ساخت نانوحامل‌های اسانس زنیان می‌تواند اثرات مؤثر آن را از طریق افزایش میزان پایداری، افزایش میزان حلالیت در آب، پیوستگی رهایش اسانسی، جلوگیری از اکسیداسیون اسانس، جلوگیری از عدم تجمع در بافت‌های ناخواسته و افزایش میزان نفوذپذیری اسانس به اعماق پوست بهبود دهد(۶).

از میان نانوحامل‌های مختلف، جایگاه لیپوزوم‌ها هر روز بیش‌ازپیش افزایش می‌یابد. این‌گونه نانوذرات زیست سازگاری عالی داشته و توانایی بارگذاری رنج وسیعی از داروهای آب‌دوست و آب‌گریز را دارند. مزایای کاربرد لیپوزوم‌ها در دارورسانی شامل: ۱- محافظت: مواد فعال از مواد دیگر به کمک سدی از دولایه لیپیدی محافظت می‌شوند. ۲- رهایش آهسته: با کنترل ترکیباتی که در ساخت غشاء دولایه بکار می‌روند می‌توان خصوصیات نفوذپذیری مواد را تغییر داد و در نهایت آزادسازی را کند کرد. ۳- کنترل آزادسازی: با تغییر در ترنزیشن فاز لیپیدی به کمک دما یا pH می‌توان آزاد سازی را به صورت کنترل شده در آورد. ۴- هدف درمانی: با طراحی سایز یا شارژ سطحی لیپوزوم‌ها برای هدف درمانی غیرفعال و با ترکیب با آنتی‌بادی‌ها یا دیگر لیگاندها برای هدف درمانی فعال بکار می‌روند. ۵- برداشت سلولی: مکانیسم برداشت سلولی لیپوزوم‌ها با اندوسیتوز یا فوزیون انجام می‌شود. این پدیده برای رساندن مواد ژنتیکی به داخل سلول مناسب است(۷).

با توجه به اهمیت گیاهان دارویی، مخصوصاً گیاهان بومی کشورمان که ناشناخته باقی مانده‌اند، این تحقیق قصد دارد تا با بررسی ترکیبات موثره اسانس زنیان بومی استان یزد، هم به شناخته شدن این گیاه کمک کرده و هم راه را برای تحقیقات آینده داروسازی و کاربردی جهت درمان هموار سازد.

با توجه به کاربردهای گسترده درمانی گیاه زنیان و به خصوص عمده ترکیب تشکیل‌دهنده آن یعنی تیمول و محاسن شایان توجه ساخت نانولیپوزوم‌های زنیانی که پیش از این ذکر شد، هدف از پژوهش حاضر ساخت نانوذرات لیپوزومی حاوی اسانس زنیان استان یزد به روش آب‌پوشانی لایه نازک چربی است. بر اساس مطالعات انجام شده، در پروژه حاضر برای اولین بار در دنیا سامانه لیپوزومی زنیانی ساخته و مورد ارزیابی قرار گرفته است. سپس نانوذرات ساخته شده از نظر مقدار اسانس بارگذاری شده، اندازه ذرات، پتانسیل زتا و مورفولوژی مورد ارزیابی قرار گرفت(۸).

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-01-21]

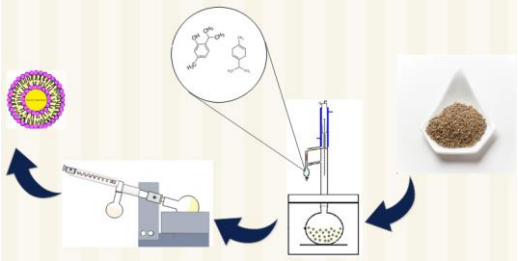
۱- مواد و روش‌ها

۲-۱- مواد

بذر گیاه زنیان بومی استان یزد از رشته‌کوه‌های خرانق استان یزد به دست آمد. فسفاتیدیل کولین سویای ٪۸۰ از Lipoid GmbH (Ludwigshafen, Germany) تهیه شد. کلسترول از شرکت Sigma Aldrich (St. Louis, MO, USA) خریداری گردید. تمامی مواد شیمیایی دیگر مورد استفاده در این مطالعه دارای گرید انالیتیکال(Analytic grade) بوده و خلوص آن‌ها مدنظر نیست.

۲-۲- روش‌ها

کلیه مراحل به صورت شماتیک در شکل۱ نمایش داده شده است و به تفصیل در ادامه توضیح داده شده است.



شکل ۱: شماتیک مراحل آزمایش

۲-۲-۱- استخراج اسانس زنیان

استخراج اسانس به روش تقطیر با آب و با استفاده از دستگاه کلونجر(میهن آزما، ایران) انجام گرفت. مقدار ۲۵ گرم از بذر زنیان به طور جداگانه در دستگاه مخلوط کن خرد شده تا به صورت پودر در آمدند. سپس به همراه ۲۵۰ میلی‌لیتر آب درون بالن تقطیر ریخته شد و به مدت ۱ ساعت برای هر نمونه، به کمک دستگاه اسانس‌گیری و با روش تقطیر با آب اسانس‌گیری انجام شد. بعد از استخراج اسانس، اسانس‌ها در یخچال در ویال‌های کوچک و دور از نور نگه داشته شدند.

۲-۲-۲- بررسی ترکیبات موجود در اسانس

برای آنالیز و شناسایی ترکیبات اسانس‌ها از دستگاه گاز کروماتوگراف کوپل شده با طیف سنج جرمی شرکت Thermoquest-Finnigan مدل Trace مجهز به ستون DB به طول ۶۰ متر و قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه نازک ۰/۲۵ میکرومتر استفاده شد. دمای آون در مرحله ابتدایی۶۰ درجه سانتی‌گراد بود که ۵ دقیقه در این دما نگاه داشته شد. پس از آن با سرعت ۱۰ درجه بر دقیقه به دمای۱۵۰ درجه سانتی‌گراد رسیده ۱۰ دقیقه در آن دما می‌ماند. سپس دما به ۲۵۰ درجه سانتی‌گراد می‌رسد و ۱۰ دقیقه در این دما ثابت نگاه داشته می‌شود. در این آزمایش، از گاز حامل هلیوم با سرعت ۱/۱ میلی‌لیتر بر دقیقه استفاده شد و از انرژی یونیزاسیون ۷۰ الکترون ولت استفاده گردید. دمای محفظه تزریق۲۵۰ درجه سانتی‌گراد بود و از نسبت Split ۱ به ۵۰ استفاده شد(در کل ۱ میکرو لیتر از محلول به دست آمده تزریق شد که ۱/۵۰ آن وارد ستون می‌شود). نرم‌افزار Wiley version 7.0 و NIST version 1.7 برای شناسایی ترکیبات و جستجوی کتابخانه‌های معتبر، مورد استفاده قرار گرفتند(۹،۱۰).

۲-۲-۳- ساخت لیپوزوم حاوی اسانس زنیان

به منظور تهیه لیپوزوم‌های حاوی اسانس زنیان به روش آب پوشانی لایه نازک چربی، پس از توزین دقیق فسفاتیدیل کولین سویا، کلسترول(با نسبت مولی ۷۰:۳۰) و اسانس، مواد مورد نظر در کلروفوم به خوبی حل شدند. نسبت فاز لیپیدی به اسانس ۶۰:۱ بوده است. سپس حلال آلی در دستگاه روتاری تحت شرایط خلأ در دمای$^{\circ}$C ۳۷ تبخیر شد و فیلم نازک لیپید تشکیل گردید. به منظور انجام عمل تنش‌زدایی لیپوزوم‌ها و همچنین حذف مابقی کلروفرم موجود در فیلم، به مدت یک ساعت در دمای محیط قرار گرفتند و سپس به مدت ۲۴ ساعت در داخل یخچال نگهداری شدند. آب پوشانی با آب مقطر استریل صورت گرفت و ذرات چندلایه ساخته شده با استفاده از دستگاه سونیکاتور حمامی ریز شدند. اسانس بارگذاری نشده به روش کیسه دیالیز در دمای $^{\circ}$C ۴ و به مدت دو ساعت جداسازی شد(۱۱). در انتهای فرایند اسانس زنیان درون وزیکول‌های فسفولیپیدی محصور گردید.

۲-۲-۴- مشخصه‌یابی لیپوزوم‌های ساخته شده

وزیکول‌های لیپیدی ساخته شده از نظر مقدار اسانس بارگذاری شده، اندازه و توزیع اندازه، پتانسیل زتا، مورفولوژی و رهایش دارو در محیط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار گرفتند.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-01-21]

۲-۲-۴-۱-تخمین مقدار اسانس بارگذاری شده

پس از جداسازی اسانس زنیان آزاد به روش کیسه دیالیز، لیپوزوم‌های ساخته شده به نسبت ۱ به ۲۰ با ایزو پروپانول مخلوط شده تا دیواره لیپیدی پوشش دهنده اسانس زنیان به طور کامل شکسته شوند و اسانس محصور شده خارج شود. مقدار اسانس محصور شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر فرابنفش(T80+ Model, PG Instruments, UK) و مقایسه آن با منحنی استاندار اسانس در ایزو پروپانول ارزیابی شد. رابطه (۱) برای تخمین درصد اسانس بارگذاری شده به کار رفته است:

رابطه (۱):

$$\text{درصد اسانس بار گذاری شده} = \frac{\text{مقدار میلی گرم اسانس محصور شده}}{\text{مقدار میلی گرم اسانس اولیه}} \times ۱۰۰$$

۲-۲-۴-۲- اندازه‌گیری اندازه و توزیع اندازه نانوذرات ساخته شده

تعیین میانگین و توزیع اندازه نانوذرات زنیانی با استفاده از دستگاه نانو سایزر(Zeta-Sizer instrument, DLS, Malvern Zatasizer Nano-ZS,) انجام شد. آنالیز نمونه‌ها در دمای ۲۵°C و با زاویه پراکنش ۹۰° صورت گرفت. همه اندازه‌گیری‌ها به صورت چهار بار تکرار انجام گرفت و رقیق‌سازی نمونه‌ها با آب دیونیزه صورت گرفت(۱۲).

۲-۲-۴-۳- اندازه‌گیری پتانسیل زتا نانو ذرات زنیانی

میزان بار سطحی و پتانسیل زتا نانو لیپوزوم‌ها حامل اسانس زنیان با استفاده از دستگاه زتا سایزر(Zeta-Sizer instrument, DLS, Malvern Zatasizer Nano-ZS,) در دمای ۲۵ °C اندازه‌گیری گردید.

۲-۲-۴-۴- بررسی الگوی رهایش اسانس زنیان از وزیکول‌های لیپوزومی

برای بررسی رهایش اسانس، حجم مشخصی از لیپوزوم‌های حاوی اسانس زنیان داخل کیسه دیالیز سلولزی ریخته شده و در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد و pH=۷/۴ متناسب با شرایط فیزیولوژیک در ۱۰ میلی‌لیتر آب قرار گرفت. نمونه‌گیری از آب در زمان به مدت ۴۸ ساعت انجام شد و تعیین میزان رهایش توسط دستگاه طیف‌سنج فرابنفش انجام شد.

۲-۲-۴-۵-مورفولوژی نانوذرات

شکل و موفولوژی سطحی نانوذرات ساخته شده با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی یا SEM (مدل S4160 Hitachi، ژاپن) مورد بررسی قرار گرفت. حدود ۱۰۰ میکرو لیتر از نمونه لیپوزومی روی لام خشک شد. نمونه‌ها به منظور رسانا شدن با طلا پوشش دار شدند. میزان توان روبشی دستگاه بر روی ۱۰ وات تنظیم گردید.

۲-۲-۴-۶- بررسی برهمکنش اسانس و لیپوزوم

گروه‌های عاملی نانولیپوزوم و اسانس زنیان توسط اسپکترومتر FTIR (Model 8300, Shimadzu Corporation, Tokyo, Japan) با وضوح ۴cm^{-1} و حالت عبور(Transmission Mode) بررسی شدند. به منظور آماده‌سازی، لیپوزوم‌ها با استفاده از سانتریفیوژ از سوسپانسیون لیپوزومی جدا شدند و محلول اضافی تبخیر گردید. نمونه‌ها با KBr مخلوط شده و فشرده شدند. طیف FTIR در محدوده طول موجی cm-1 ۴۰۰ -۴۰۰۰ اسکن شد.

۲-۲-۴-۷- روش آماری

نتایج به‌دست‌آمده به صورت میانگین سه بار تکرار گزارش شده‌اند. دوری از مقدار نرمال به وسیله تعیین انحراف معیار نتایج مشخص شد. نمودارهای استاندارد تهیه شده با استفاده از رگرسیون خطی برازش شدند و پارامتر ضریب رگرسیون به منظور تعیین کیفیت برازش استفاده گردید.

۳- بحث و بررسی

۳-۱-بررسی ترکیبات اسانس زنیان

نتایج حاصل از آنالیز کروماتوگرافی گازی/جرمی در جدول۱ و نمودار ۱ به صورت یک گراف نمایش داده‌شده است.

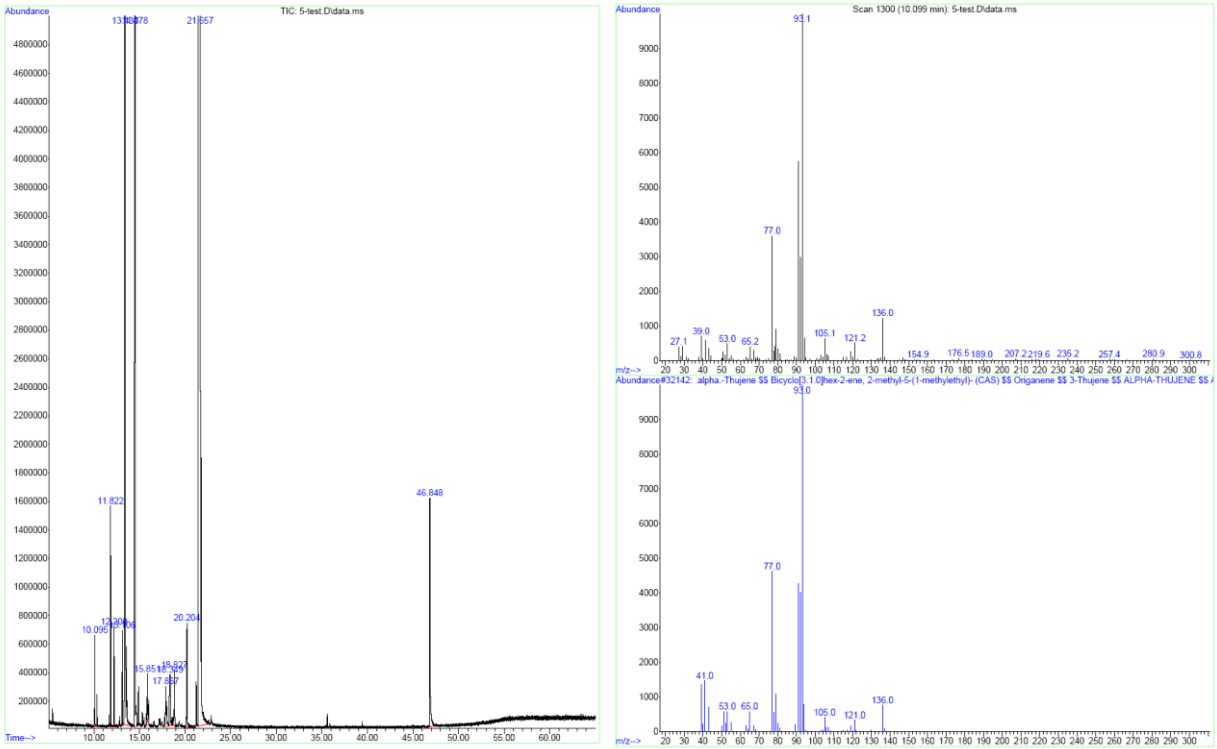
تعداد ترکیبات موجود در اسانس زنیان در منابع مختلف بین ۱۱ تا ۱۷ مورد گزارش شده است. همچنین مقدار تیمول موجود در اسانس در منابع مختلف ۳۹/۳، ۴۵/۲ و ۴۱/۷ درصد ذکر گردیده است. در مطالعه‌ای انجام گرفته بر روی زنیان درصد تیمول ۴۵/۲ و دلتا سیمین ۴۱/۹ درصد گزارش شد. همچنین طبق مطالعات پیشین تیمول(۶۴/۹٪)، گاماترپنین (۱۱/۱٪) و سایمن(۲۱/۷۴٪) مواد عمده تشکیل دهنده اسانس بذر زنیان بومی استان یزد بودند که تایید کننده نتایج پژوهش حاضر است(۱۵-۱۳).

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-01-21]

در مورد بررسی ترکیبات اسانس زنیان بومی استان یزد مطالعه پیشینی در دست نیست؛ اما در مطالعه‌ای اکبری‌نیا و همکاران(۱۳۸۴) ترکیب‌های شیمیایی اسانس ۱۲ نمونه گیاه دارویی زنیان را مورد ارزیابی قرار دادند. نتایج آن‌ها میزان اسانس را بین ۳/۱ تا ۳/۵ درصد نشان داد. سه ماده اصلی ترکیب اسانس تیمول، گاماترپنین و پارا سیمین تشخیص داده شدند که بیش از ۸۵ درصد اسانس را تشکیل می‌دادند. در بین ۱۲ نمونه بررسی شده زنیان، میزان تیمول ۴۵-۴۰ درصد، گاماترپنین ۳۲-۲۸ درصد و پاراسیمین ۲۵-۱۶ درصد بودند(۱۶).

ترکیبات اسانس زنیان مشابه با بررسی‌های پیشین انجام شده تیمول، گاماترپنین و سایمن است. در تحقیق اکبری نیا و همکاران(۱۳۷۹) میزان تیمول در نمونه‌های زنیان استان قزوین ۴۵-۴۰ درصد بود در صورتی که در تحقیق ما بر روی زنیان بومی استان یزد میزان این ماده ۶۵ درصد است که بسیار بالاتر از نتایج تحقیق مشابه استان قزوین است. در مقایسه با گونه‌های دیگری که منابع مهم تیمول هستند، مانند اسانس آویشن دنایی Thymus daenensis(نمونه گیاهی خراسان) وجود Thymol با ۵۰/۷۱٪ و آنالیز اسانس گونه Thymus longicaulis (نمونه گیاهی یونان) حاکی از وجود ۶۰/۸۲٪ Thymol و گونه Thymus pulegioides (نمونه گیاهی شمال پرتغال) با ۲۶٪ Thymol و گونه آویشن کوهی Zataria multiflora جمع‌آوری شده از فیروزآباد فارس ۳۷/۵۹٪ Thymol گزارش شده، نیز میزان این ماده بالاتر است(۱۹-۱۷).

همان‌گونه که مشاهده می‌شود ترکیب عمده تشکیل دهنده اسانس زنیان بومی استان یزد ماده با ارزش تیمول است که 6-isopropyl-3-methyl phenol نام دیگر آن است. تیمول دارای ارزش زیادی در صنایع غذایی و دارویی و بهداشتی است. از نظر دارویی کاهنده فشارخون است و درمان بیماری‌های پوستی مانند آکنه، پسوریازیس و درماتیت همراه با سایر ترکیبات فنولی کاربرد دارد. از این رو در ادامه مطالعه حاضر زنیان استان یزد در حامل‌های لیپوزومی بارگذاری شد(۲۰).



نمودار ۱: گراف حاصل از آنالیز GC/MS برای زنیان رشته‌کوه‌های خرانق استان یزد

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-01-21]

جدول۱: ترکیبات عمده شناسایی‌شده در زنیان رشته‌کوه‌های خرانق

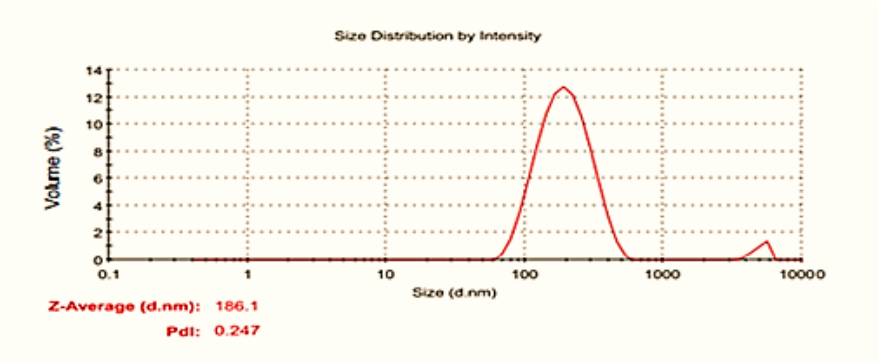
نام ترکیب	درصد ترکیب	زمان بازداری	روش شناسایی
β-pinene	0.86	11.822	GC/MS
Cymene	21.74	13.43	GC/MS
γ-Terpinene	11.1	14.478	GC/MS
6-isopropyl-3-methyl phenol	64.9	21.657	GC/MS
کل	98.6		

۳-۲- بررسی میزان اسانس بارگذاری شده

به منظور تهیه لیپوزوم‌های حاوی زنیان، روش آب‌پوشانی لایه نازک چربی انتخاب گردید. روش آب‌پوشانی لایه نازک چربی، روشی کلاسیک و با تکرارپذیری بالاست. میزان بارگذاری اسانس با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر فرابنفش و مقایسه با منحنی استاندارد اسانس زنیان تعیین گردید. نتایج بررسی‌ها حاکی از این است که مقدار اسانس بارگذاری ۷/۴ ± ۳۵/۶ شده است.

۳-۳- بررسی اندازه و توزیع اندازه نانو وزیکول‌های زنیانی

میانگین اندازه لیپوزوم‌های زنیانی ساخته شده حدود ۱۸۶/۱nm است. توزیع اندازه نانوذرات ساخته شده در نمودار ۲ نمایش داده شده است. همچنین شاخص پراکندگی نانو ذرات ۰/۲۴۷ است که حاکی از این است که ذرات به هم چسبیده و اگلومره نیستند.



نمودار ۲: اندازه نانو لیپوزوم‌های تولیدی حامل دارو با مد حجمی

۳-۴- تعیین پتانسیل زتای نانو ذرات لیپوزومی

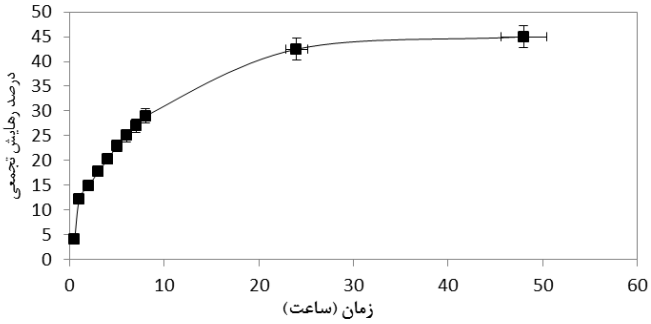
میانگین پتانسیل زتا سطح نانو لیپوزوم های تولیدی حاوی اسانس با استفاده از دستگاه زتا سایزر اندازه‌گیری گردید مقدار پتانسیل زتای نانوذرات بین ۱- تا ۶/۷- متغیر بود. با توجه به نتیجه به دست آمده می‌توان ادعا کرد نانو ذرات تهیه شده تقریباً از جهت بار الکتریکی خنثی می‌باشند.

۳-۵- بررسی الگوی رهایش اسانس زنیان از وزیکول‌های لیپوزومی

نتایج حاصل از سه بار تکرار بررسی میزان آزاد سازی اسانس از نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس زنیان محاسبه شد و الگو در شکل ۵ نشان داده شده است. مقدار اسانس آزادشده از فرمولاسیون اسانس نانولیپوزومه در آب طی بازه‌های زمانی ۱ ساعت، ۲ ساعت، ۳ ساعت، ۴ ساعت، ۶ ساعت، ۸ ساعت، ۲۴ ساعت، ۴۸ ساعت با استفاده از منحنی استاندارد اسانس زنیان در آب و با استفاده از روش کیسه دیالیز محاسبه شد. این نمودار نشان می‌دهد که حداکثر مقدار اسانس آزادشده از

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-01-21]

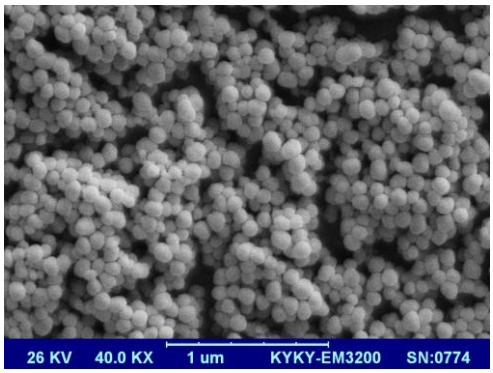
لیپوزوم‌ها در مدت ۴۸ ساعت برابر ۴۴/۷۸ درصد است. بر اساس پروفایل رهایش گزارش شده می‌توان نتیجه گرفت، وزیکول‌های حاوی اسانس زنیان در شرایط فیزیولوژیک رهایش کنترل شده دارند؛ به عبارت دیگر چنانچه وزیکول‌های لیپیدی حاوی اسانس زنیان در شرایط فیزیولوژیک بکار گرفته شود، اسانس زنیان به تدریج از وزیکول آزادشده و تأثیر درمانی خود را اعمال می‌سازد.



نمودار ۳: نمودار رهایش اسانس در آب

۳-۶- بررسی مورفولوژی نانوذرات ساخته شده

نمودار ۳، مورفولوژی نانوذرات ساخته شده با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی را نمایش می‌دهد. همان‌گونه که در شکل ۳ مشخص‌شده ذرات دارای توزیع اندازه مناسب و ساختار کروی شکل هستند. همچنین بر اساس شکل، مشخص می‌شود ذرات داری مورفولوژی همگن و یکنواخت هستند. مرز ذرات از یکدیگر قابل تفکیک است و به هم چسبیدگی در تصویر ذرات نشان داده نمی‌شود. اندازه کمتر از ۲۰۰ نانومتر نیز برای ذرات قابل اثبات مجدد است.

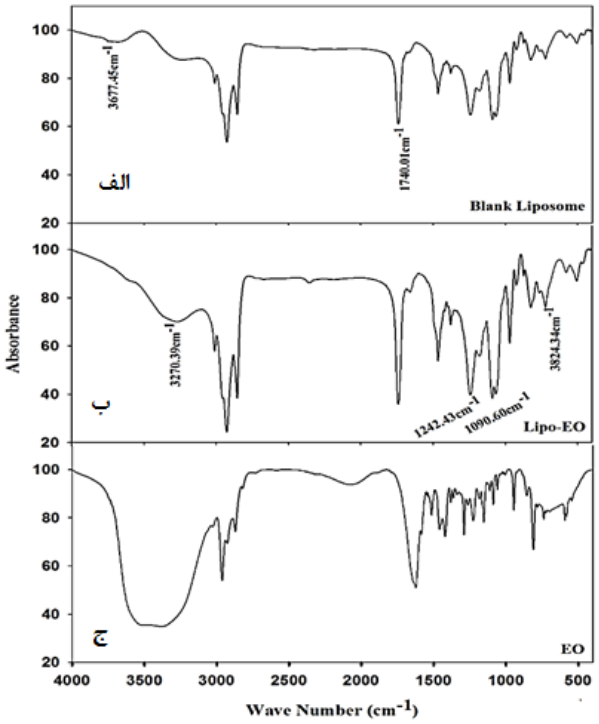


شکل ۱: تصویر میکروسکوپ الکترونی لیپوزوم‌های زنیانی

۳-۷- بررسی برهمکنش اسانس و لیپوزوم

گراف FTIR اسانس زنیان، لیپوزوم و همچنین برهمکنش اسانس زنیان و لیپوزم به ترتیب در شکل‌های ۵- الف، ۵- ب و ۵- ج نشان داده شده است. با مقایسه سه شکل مذکور، می‌توان دریافت هیچ پیک جدیدی ایجاد نشده است و در واقع پیوندی بین اسانس زنیان و لیپوزم ایجاد نشده است و برهمکنش شیمایی جدیدی ایجاد نشده است و در واقع اسانس زنیان ماهیت خود را حفظ کرده است؛ به عبارت دیگر اسانس زنیان در حین فرمولیشن پایدار مانده است. با بررسی هم‌زمان شکل ۱ و نمودار ۳ می‌تواند دریافت اسانس زنیان فعالیت زیستی خود را همچنان حفظ کرده است.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-01-21]



نمودار ۴: گراف FTIR برای بررسی برهمکنش اسانس زنیان و لیپوزوم. الف: لیپوزوم تنها. ب: لیپوزوم و اسانس زنیان. ج: اسانس زنیان تنها

حسینی و همکاران در سال ۲۰۱۳، نانو ذرات بر پایه کیتوزان حاوی اسانس پونه کوهی را تهیه کردند و توانستند به طور میانگین ۳۴ درصد از اسانس را درون ذرات به دام اندازند. اندازه ذرات تهیه شده توسط این گروه به طور متوسط ۳۴۴ نانومتر گزارش شده است(۲۱).

کلیا و همکاران در سال ۲۰۱۳، نانو ذرات لیپوزومی حاوی اسانس ترنج را سنتز کردند که همانند پژوهش حاضر نانو ذرات با اندازه ۱۸۸ نانومتر و پتانسیل زتا ۳- گزارش شده است. آن‌ها با این روش توانستند خاصیت ضد سرطانی اسانس ترنج را افزایش دهند و بر حلالیت کم اسانس ترنج غلبه کنند(۲۲).

تائو و همکاران در سال ۲۰۱۴، نانو ذرات بتا دکستران حاوی اسانس آویشن را بر اساس دو متد مختلف تهیه کردند. ذرات تهیه شده اگلومره نشدند و میزان راندمان درون‌گیری در حدود ۸۰ درصد است و سایز نانو ذرات از ۳۲۰۰ تا ۵۸۰ نانومتر متغیر است. احتمالاً دلیل درصد انکپسولیشن بالا، سایز بزرگ ذرات است که فضای زیادی جهت درون گیری اسانس فراهم نموده است(۲۳).

تریفکویک و همکاران نیز در سال ۲۰۱۴ دانه‌های بزرگ کیتوزانی(۷۲ تا ۸۹۰ میکرومتر) حاوی اسانس آویشن را به منظور بهبود خواص آنتی باکتریال تهیه کردند و توانستند اسانس آویشن را به طور موفقیت آمیز تا ۶۰ درصد کپسول کنند(۲۴).

نتیجه‌گیری

در مطالعه حاضر برای اولین بار، بارگذاری اسانس زنیان در داخل نانو لیپوزوم به منظور افزایش پایداری، افزایش حلالیت و در نتیجه عملکرد بهتر در صورت گرفته است. از آنجایی که داروهای گیاهی در مقایسه با داروهای شیمیایی عوارض کمتری دارند، شناسایی سیستم دارورسانی مناسب که بتواند جایگزین سیستم‌های متداول درمانی شود کمک شایان توجهی به علم پزشکی می‌نماید. اسانس زنیان گیاه بومی استان یزد به روش تقطیر با آب استخراج گردید و آنالیز ترکیبات اسانس نشان دهنده مقدار زیاد تیمول در ترکیب اسانس است. یافته‌های موفقیت‌آمیزمان شواهد پیشین را برای توسعه فرمولاسیون لیپوزومی حاوی اسانس را تأیید کرده است. در این مطالعه فرمول جدیدی برای اسانس زنیان لیپوزومی گزارش کردیم که

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-01-21]

توسط چندین آزمایش مشخصه یابی، نتایج ما تأیید شده است. هیچ‌گونه برهمکنش شیمیایی میان دارو و حامل مشاهده نگردیده است. فرمولاسیون تهیه شده آهسته رهش است و می‌تواند پوشش مناسبی باشد و اسانس را در مقابل اکسیداسیون حفظ کند، پایداری آن را افزایش دهد و سمیت مصرف اساس آزاد را کاهش می‌دهد. مورفولوژی وزیکول‌های حاوی اسانس زنیان تهیه شده کروی با سایز کمتر از ۲۰۰ نانومتر هستند که میزان بارگذاری اسانس زنیان ۳۵ درصد است.

سپاسگزاری

انجام برخی از آزمایش‌ها با همکاری شرکت آبسار کویر یزد صورت گرفت که بدین وسیله از همکاری شرکت مذبور تشکر و قدردانی می‌گردد.

References:

1- Pour-seyedi S. ***Assessment of germination and cytology of three Iranian caraway genus: Bunium, Carum and Cuminum.*** University of Tehran: Tehran, 1994: 89.

2- Ghassemi H, Harrison G, Mohammad K. ***An accelerated nutrition transition in Iran.*** Pub Health Nutri 2002; 5(1a): 149-55.

3- HI JM, ***Flora Iranica***, 1987.

4- G Amin. ***Iranian traditional medicinal plants.*** Research Deputy of Health Ministry, Tehran; 1991: p.130.

5- MS. E***valuation and comparison of Macroscopic, microscopic and phytochemical properties of anise, Foeniculum vulgare and Trachyspermum Copticum fruits.*** Isfahan University of Medical Science, 1992.

6- C Engineer, J Parikh, A Raval. ***Review on hydrolytic degradation behavior of biodegradable polymers from controlled drug delivery system.*** Trends Biomater Artif Organs 2011; 25: 79-85.

7- KMK Selim, JH Lee, SJ Kim, Z Xing, IK Kang ,Y Chang, et al. ***Surface modification of magnetites using maltotrionic acid and folic acid for molecular imaging.*** Macromol Res 2006;14(6): 646-53.

8- SR Mittal, A Mathur, R Gokhroo, GGP Santosh Kaushik. ***Letter to the editor: Effects of the ayurvedic drug cholesteronil on cardiovascular risk factors, Cardiovasc.*** Drugs Ther 2000; 14(1): 95-6.

9- HF. T***he chemical assessment of seed essence and the Comparison of antioxidant effect among three native medicinal plants of the Yazd province (Bunium persicum Boiss, Cuminum cyminum L, Trachyspermum copticum L)***. Shahid Beheshti University; 2010.

10- F Haghirossadat, F Bernard, M Kalantar, MH Sheikhha, F Hokmollahi, M Azimzadeh, et al. ***Bunium persicum (Black Caraway) of Yazd province: chemical assessment and Evaluation of its antioxidant effects***. SSU J 2010; 18(3): 284-91.

11- K Begum, A Sarker, IJ Shimu, MMI Chowdhury, R ul Jalil. ***Characterization of Nanoemulsion Prepared from Self-emulsifying Rifampicin and its Antibacterial Effect on Staphylococcus aureus and Stap.*** epidermidis Isolated from Acne: Dhaka Uni J Pharm Sci 2016; 14(2): 171-7.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-01-21]

12- F Haghiralsadat, G Amoabediny, MH Sheikhha, B Zandieh-doulabi, S Naderinezhad, M Helder. ***New liposomal doxorubicin nanoformulation for osteosarcoma?*** Drug release kinetic study based on thermo and pH sensitivity, RSC Adv. (n.d.).

13- S Nagulakshmi, NB Shankaracharya, JP Naik, LJM Rao. S***tudies on chemical and technological aspects of ajowan aspects (Trachyspermum ammi).*** J Food Sci Techol Mysore. 39 (2000) 277–281.

14- K.V.M. lagevio M.B, ***Trachyspermum ammian essential crop for north persian.*** J Med Aromat Plant Sci 1999; 4: 996.

15- T.L. Steveson F, Jonn sron M, Peckie J. C***attle manure as a Corps in zero and conventional tillage systems***. Can J Plant Sci 1998; 48(6): 1267-72.

16- T SAZ Akbarinia A, SF, Ghalavand A. ***Chemical composition of seed essence of Trachyspermum copticum produced in Qazvin Province.*** Sci J Med Univ Qazvin 2005; 36: 22-6.

17- N Chorianopoulos, E Kalpoutzakis, N Aligiannis, S Mitaku, GJ Nychas, SA Haroutounian. ***Essential oils of Satureja, Origanum, and Thymus species: chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens.*** J. Agric Food Chem 2004; 52: 8261-7.

18- E Pinto, C Pina Vaz, L Salgueiro, MJ, Gonçalves S. Costa-de-Oliveira, C Cavaleiro, et al. ***Antifungal activity of the essential oil of Thymus pulegioides on Candida, Aspergillus and dermatophyte species.*** J Med Microbiol 2006; 55(10): 1367-73.

19- F Sharififar, MH Moshafi, SH Mansouri, M Khodashenas, M Khoshnoodi. ***In vitro evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil and methanol extract of endemic Zataria multiflora Boiss.*** Food Control 2007; 18(7): 800-5.

20- M Srivastava, P Baby, A Saxena. ***GC-MS investigation and antimicrobial activity of the essential oil of Carum copticum Benth & Hook.*** Acta Aliment 1999; 28(3): 291-5.

21- SF Hosseini, M Zandi, M Rezaei, F Farahmandghavi. ***Two-step method for encapsulation of oregano essential oil in chitosan nanoparticles: preparation, characterization and in vitro release study.*** Carbohydr Polym 2013; 95(1): 50-6.

22- C Celia, E Trapasso, M Locatelli, M Navarra, CA Ventura, J Wolfram, et al. ***Anticancer activity of liposomal bergamot essential oil (BEO) on human neuroblastoma cells, Colloids Surfaces B Biointerfaces.*** 2013; 112: 548-53.

23- F Tao, LE Hill, Y Peng, CL Gomes. ***Synthesis and characterization of β-cyclodextrin inclusion complexes of thymol and thyme oil for antimicrobial delivery applications.*** LWT-Food Sci Technol 2014; 59(1): 247-55.

24- KT Trifković, NZ Milašinović, .B Djordjević, MTK Krušić, ZD Knežević-Jugović, VA Nedović, et al. ***Chitosan microbeads for encapsulation of thyme (Thymus serpyllum L.) polyphenols, Carbohydr.*** Polym 2014; 111: 901-7.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-01-21]

Strategy of Improvements in the rapeutic index of medicinal herbs of Iranianin digenous: Synthesis and characterization of phospholipid lipid-based vesicles in corporated Trachyspermum copticum

Fateme Haghiralsadat (PhD Student)[*1], Maryam Azhdari (MSc)[2], Seyed Mahdi Kalantar (PhD)[3]
Samira Naderinezhad (MSc) [4], Keramat Teymourizadeh (MSc)[5] , Mozhgan Yazdani (MSc Student)[6]
Mohadese Hashemi (PhD Student)[7], Fateme Daneshmand (PhD) [8]

[1] *Department of Nanobiotechnology, Faculty of new science and technology, Tehran University, Tehran, Iran.*
[2] *Department of Biochemistry, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences and Health Services, Yazd, Iran.*
[3] *International Campus, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran.*
[4] *Department of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, School of Chemical Engineering, College of Engineering, University of Tehran, Tehran, Iran.*
[5] *Yazd Agriculture Jahad Organization, Yazd, Iran.*
[6] *Department of Biochemistry, Payame Noor University, Yazd, Iran.*
[7] *Department of Biomedical Engineering, Faculty of new science and technology, Tehran University, Tehran, Iran.*
[8] *Assistant Professor, Department of Biochemistry, Payame Noor University, Tehran, Iran.*

Received: 7 Sep 2015 ***Accepted:*** 2 Jun 2016

Abstract

Introduction: Medicinal herbs are one of the most valuable Iranian National assets. Herbal essential oils have valuable therapeutic properties. Oxidation and volatile of essential oils caused some limitations in its usage. Nanoliposomes are nonometric lipid-based vesicles. Drug delivery carrier to improve delivery of therapeutic agent is one of the most well-known application of liposomal vesicles. In recent years, scientists paid much attention to encapsulate plant essential oil in nanocarriers. The goal of presented study was encapsulation of Trachyspermumcopticum in nanoliposomal carriers to improve the therapeutic functionality.

Methods: The essential oil of Trachyspermumcopticum was extracted by Clevenger instrument using hydrodistilation method and its components were determined with gas-mass chromatography. Small unilamellar lipid based vesicles containing Trachyspermumcopticum essential oil were prepared using thin film hydration method. Lipid phase were contained SPC 80, cholesterol and Trachyspermumcopticum essential oil. Nano-vesicles were evaluated by several analyses such as encapsulation efficiency, size, zeta potential, release kinetic profile and surface morphology.

Results: Results showed that the encapsulation efficiency of entrapped essential oil was 35.6±7.4% and mean nano-liposome diameter was 186.1 nm. The prepared nano-vesicle led to controlled release profile.

Conclusion: In the present study, encapsulation of Trachyspermumcopticum essential oil into nano liposome was performed in order increasing stability, water- solubility and improving therapeutic index. The prepared formulation was slow-release, well-coating to preserve the essential oil against oxidation and increasing stability.

Keywords: Phospholipid Based Vesicle; Trachyspermum Copticum Essential Oil; Encapsulation; Essential Oil Extraction; AndThymol

This paper should be cited as:
Fateme Haghiralsadat, Maryam Azhdari, Seyed Mahdi Kalantar, Samira Naderinezhad, Keramat Teymourizadeh, Mozhgan Yazdani, Mohadese Hashemi, Fateme Daneshmand. ***Strategy of improvements in therapeutic index of***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-01-21]

medicinal herbs of iranian indigenous: synthesis and characterization of phospholipid lipid-based vesicles incorporated trachyspermum copticum. J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2016; 24(6): 468-78.

****Corresponding author: Tel: 09132507158, email: fhaghirosadat@ut.ac.ir***

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2025-01-21]