Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences
Vol. 25, No.11, Feb 2018
Pages: 853-864

مجله علمی پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی یزد
دوره ۲۵، شماره ۱۱، بهمن ۱۳۹۶
صفحه: ۸۶۴-۸۵۳

(استراتژی نوین در بهبود شاخصه‌های درمانی داروهای گیاهی: ساخت و مشخصه یابی نانو لیپوزومهای حاوی اسانس نعناع فلفلی(Mentha piperita))

محمد مجدی‌زاده[۱]، سعید رضایی‌زارچی[۲]، افسانه السادات موحدپور[۳]،
هاشم شاهی مالمیر[۴]، الهام ساسانی[۵]، بی‌بی فاطمه حقیرالسادات[۶*]

چکیده

مقدمه: اسانس و ترکیبات گیاهی از خواص ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانی و ضدتوموری بالایی برخوردار هستند، اما استفاده از آنها به صورت سنتی با چالش‌های جدی روبرو است. یکی از استراتژی‌های دارویی مطرح برای غلبه بر این مشکلات، نانوحامل‌های لیپوزومی است. در این مطالعه سامانه لیپوزومی آهسته رهش حاوی اسانس نعناع فلفلی به منظور بهبود شاخصه‌های ضدمیکروبی، آنتی اکسیدانی و ضد توموری اسانس تهیه شده است.

روش بررسی: وزیکول‌های لیپوزومی با استفاده از فسفاتیدیل کولین (۸۰٪) و کلسترول (۲۰٪) و با روش فیلم نازک تهیه شدند. اسانس نعناع فلفلی به روش غیرفعال درون لیپوزوم‌ها بارگذاری شد. بررسی شاخصه‌های فیزیکوشیمیایی آن‌ها با استفاده از دستگاه‌های زتا سایزر، FTIR، SEM انجام شد و در پایان میزان رهایش اسانس در دمای ۳۷ ^{o}C محاسبه گردید.

نتایج: وزیکول‌های لیپوزومی حاوی اسانس نعناع فلفلی با اندازه nm ۱۳/۳۹ ± ۲۴۷، ۲/۷ ± ۶۱/۳۸ درصد میزان راندمان انکپسولاسیون، پتانسیل زتا ۰/۷۴ ± ۳۴/۵۴- میلی‌ولت و شاخص پراکندگی (polydispersity index) ۰/۰۱ ± ۰/۳۲ می‌باشد. رهایش اسانس در این نانوسامانه کنترل شده است و بررسی FTIR و SEM، نشان می‌دهد که اسانس و نانوسامانه برهمکنشی نداشته‌اند و ذرات آن ساختاری کروی دارند.

نتیجه‌گیری: در پژوهش حاضر اسانس نعناع فلفلی درون حامل‌های لیپوزومی بارگذاری شد و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی آن مورد بررسی قرار گرفت. نتایج این بررسی ضمن تایید آهسته رهش بودن سامانه، نشان میدهد که این نانوسامانه آنیونی، بدون ایجاد تغییر در ماهیت شیمیایی اسانس، سبب افزایش پایداری آن شده است. بدین ترتیب نانو حامل لیپوزومی می‌تواند بعنوان حاملی مناسب و دارای پتانسیل برای اسانس باشد.

واژه‌های کلیدی: لیپوزوم، گیاهان دارویی، نعناع فلفلی، اسانس گیاهی

۱- کارشناسی ارشد بیو فیزیک، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور تفت، یزد
۲- استادیار گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور تفت، یزد
۳- کارشناسی ارشد مهندسی تکنولوژی نساجی، گروه مهندسی نساجی و پلیمر، دانشگاه آزاد اسلامی واحد یزد
۴- کارشناسی ارشد بیوتکنولوژی میکروبی، گروه زیست شناسی، موسسه آموزش عالی نور دانش، میمه، اصفهان
۵- کارشناسی ارشد بیو شیمی، دانشکده علوم پایه، گروه زیست شناسی، دانشگاه پیام نور تفت، یزد
۶- دکتری نانوبیوتکنولوژی گروه علوم و فنون نوین پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد
*(نویسنده مسئول)؛ تلفن: ۰۹۱۳۲۵۰۷۱۵۸، پست الکترونیکی: fhaghirosadat@gmail.com

تاریخ دریافت:۱۳۹۶/۶/۹ تاریخ پذیرش:۱۳۹۶/۸/۱۱

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

مقدمه

عبارت گیاهان دارویی به آن دسته از گیاهانی اطلاق می‌شود که دارای مقدار معینی ماده موثره است که برای تشخیص، درمان، پیشگیری، کمک به اعمال فیزیولوژیک و حفظ بهداشت بدن استفاده می‌شود(۵-۱). نعنا با نام علمی منتا گیاهی دولپه، علفی و چند ساله است که متعلق به خانواده بزرگی از گیاهان بنام لابیاته است. این خانواده دارای ۲۳۶ جنس و بالغ بر ۷۰۰۰ گونه است. در این میان گیاه نعنا ۳۰-۲۵ گونه از این خانواده را به خود اختصاص داده است که نعنا فلفلی، پونه، نعنا سبز، نعنا وحشی و غیره از جمله گونه‌های پر ارزش نعنا به شمار می‌روند (۸-۶).

اسانس‌ها ترکیبات طبیعی، بی رنگ، فرار و پیچیده‌ای هستند که از همه اندام‌های گیاه و یا از تعدادی از اندام‌های گیاه، قابل استخراج است (۹). اسانس استخراج شده از گیاهان ترکیب پیچیده‌ای از ترکیبات مختلف است که در حالت تازه معمولا بیرنگ است و طعم و رایحه‌ی نسبتا تندی دارد ولی به مرور زمان در اثر اکسید شدن، رنگ آن به زرد مایل به سبز تغییر پیدا می‌کند (۱۰). در اسانس نعناع فلفلی ترکیبات مختلفی از جمله منتول، منتون، اترهای منتول (استات، بوتیرات و ایزو والرینات)، ترپن‌ها (لیمونن)، لینالول، ۱ و ۸- سینئول و غیره حضور دارد (۱۳-۱۱).

امروزه از اسانس‌های گیاهی علاوه بر طب سنتی، به منظور تهیه ماده مؤثره بسیاری از داروها و مواد آرایشی و بهداشتی استفاده می‌شود. اما آنچه بیش از پیش اسانس‌های گیاهی را مورد توجه قرار داده است، وجود اثرات بیولوژیکی مهم و متنوع آنها از جمله خواص آنتی اکسیدانی، ضدتوموری و ضدمیکروبی است(۱۵، ۱۴).

خاصیت ضدمیکروبی اسانس بر پایه آب گریزی آن استوار است. اسانس نامحلول در آب، به درون غشای سلول (میکروب) نفوذ می‌کند و سبب نشت سیتوپلاسم به خارج از سلول و به دنبال آن تجزیه پروتئین‌های غشا، لخته شدن سیتوپلاسم، خروج نیرو محرکه پروتونی و مرگ سلول را رقم می‌زند (۱۷، ۱۶).

از دیگر ویژگی‌های بیولوژیکی اسانس‌ها خاصیت آنتی‌اکسیدانی است. ترکیباتی به نام رادیکال‌های آزاد قادرند با انجام واکنش‌های برگشت ناپذیر، مولکول‌های زیستی مهمی را از جمله لیپیدها، لیپوپروتئین‌ها، DNA و غیره تخریب نمایند و آسیب‌های جدی به سلول وارد کنند(۱۸) و باعث ایجاد سرطان‌هایی نظیر خون، سینه، تخمدان، روده، ریه شوند(۲۰-۱۸، ۱۵). امروزه پژوهشگران دریافته‌اند که، ترکیبات گیاهی دارای فعالیت ضد توموری هستند و باعث مهار سرطان در مراحل شروع، پیشرفت و گسترش می‌شوند، در حالیکه میزان عوارض جانبی آن نسبت به روش‌های معمول، کم و هزینه‌های درمانی آن نیز بسیار پایین است(۲۱).

در میان تمامی این مزایا، کاربرد اسانس و ترکیبات گیاهی با چالش‌های جدی از جمله، اثرگذاری نامطلوب بر ارگان‌های غیر هدف و اکسید شدن برخی از مواد موثره اسانس‌ها، روبرو است. در این میان فناوری نانو با ساخت و تهیه نانو حامل‌های دارویی از جمله لیپوزوم توانسته است بسیاری از مشکلات یاد شده را کاهش داده و یا برطرف نماید(۲۴-۲۲)

لیپوزوم‌ها ساختارهای کروی نانو مقیاسی هستند که از دولایه-ی فسفولیپیدی ساخته شده‌اند که در هسته مرکزی خود یک فضای آبی را احاطه نموده‌اند. این حامل‌ها در دهه ۱۹۶۰ توسط الک بنگام (Alec Bangham) کشف شد. برای ساخت لیپوزوم عمدتاً از فسفاتیدیل کولین استخراج شده از سویا یا تخم مرغ استفاده می‌شود. هنگامی که فسفولیپیدها در آب قرار می‌گیرند به گونه‌ای آرایش می‌یابند که سر هیدروفیل آن‌ها دارای تماسِ حداکثر با آب و دم آبگریزشان دارای تماس حداقلی با آب باشد. در نتیجه غشاهایی کروی و دولایه شکل می‌یابند به طوریکه گروهای هیدروفیل آن به سمت خارج و گروه‌های هیدروفوب آن به سمت داخل آرایش یافته‌اند. غیر سمی بودن، زیست سازگار بودن، رهایش کنترل شده دارو، زیست تخریب‌پذیر بودن، حساسیت پایین دستگاه ایمنی به لیپوزوم‌ها از مهم‌ترین شاخصه‌های لیپوزوم‌ها به عنوان حامل‌های دارویی است. در کنار تمامی مزایای یاد شده، استفاده از لیپوزوم با مشکلاتی همچون، نیمه عمر پایین، پایداری کم و هزینه بالای تولید همراه است(۳۱-۲۵).

با توجه به کار بردهای گسترده ی درمانی اسانس نعناع فلفلی و نیز مزایای زیاد لیپوزوم به عنوان یک حامل دارویی، هدف از انجام

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

این پژوهش ساخت و مشخصه یابی نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس نعناع فلفلی به روش آب پوشانی لایه نازک است.

روش بررسی

۱. تهیه گیاه نعناع فلفلی و اسانس گیری

ابتدا گیاه نعناع فلفلی از باغ گیاهشناسی مشهد وابسته به شهرداری مشهد در تیرماه جمع‌آوری گردید و نوع گونه آن توسط کارشناسان پژوهشکده گیاهی دانشگاه فردوسی مشهد تایید شد. پس از خشک‌کردن گیاه نعناع فلفلی در محیطی خشک و دور از نور خورشید، با استفاده از دستگاه کلونجر و به روش تقطیر با آب، عمل اسانس‌گیری از برگ‌های گیاه انجام شد. برای این منظور اجزای خشک شده را تا حدودی نرم نموده و در هر نوبت حدود ۲۵ gr از آن را به همراه ۲۵۰ ml آب مقطر، وارد بالن ۵۰۰ ml نموده و بالن محتوی آب و اجزای خشک گیاه را، به دستگاه کلونجر متصل می‌کنیم. بالن متصل به دستگاه کلونجر را درون Heater (هیتر) قرار داده و دمای هیتر را روی ماکزیمم تنظیم می‌کنیم. با به جوش آمدن آب بالن، دمای Heater را کاهش داده تا اسانس از اجزای گیاه خارج شده و به همراه آب تبخیر گردد. عمل اسانس‌گیری به مدت ۳ ساعت به طول انجامید و در پایان، اسانس تولید شده، از دستگاه کلونجر خارج کرده و برای انجام مراحل بعدی جمع‌آوری گردید(۲۲).

۲. رسم نمودار استاندارد اسانس نعناع فلفلی در ایزوپروپیل و بافر PBS (Phosphate Buffered Saline)

در این مرحله ابتدا استوک ۰/۵ mg/ml اسانس نعناع فلفلی در حلال متانول تهیه گردید و با استفاده از آن، سری رقت‌های مختلف اسانس نعناع فلفلی در حلال ایزوپروپیل تهیه گردید. سپس به کمک دستگاه اسپکترفتومتر، میزان جذب هریک از رقت‌ها اندازه‌گیری شد. آزمایش در این مرحله سه مرتبه تکرار گردید و سپس با استفاده از طول موج‌های جذبی به دست آمده، نمودار استاندارد اسانس نعناع فلفلی در ایزوپروپیل رسم گردید. هم چنین به منظور رسم نمودار استاندارد اسانس نعناع فلفلی در بافر PBS، ابتدا استوک ۰/۵ mg/ml اسانس نعناع فلفلی در حلال متانول تهیه گردید و سپس با استفاده از آن، سری رقت‌های مختلف اسانس نعناع فلفلی در حلال PBS تهیه گردید و با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر، میزان جذب هریک از رقت‌ها اندازه‌گیری شد. آزمایش در این مرحله نیز سه مرتبه تکرار گردید و سپس با استفاده از طول موج‌های جذبی به دست آمده، نمودار استاندارد اسانس نعناع فلفلی در PBS رسم گردید(۲۲).

۳. تهیه لیپوزوم حاوی اسانس نعناع فلفلی

لیپوزوم‌های حاوی اسانس نعناع فلفلی به روش آب‌پوشانی لایه نازک و با ترکیبی شامل فسفاتیدیل کولین سویا (۰/۰۵۶ gr)، کلسترول (۰/۰۰۶ gr) و اسانس نعناع فلفلی با غلظت ۰/۵ mg/ml تهیه گردید، که خلاصه آن بدین شرح است: ابتدا فسفاتیدیل کولین سویا، کلسترول و اسانس نعناع فلفلی در حلال کلروفرم و در دمای ۴۵ ^{o}C بر روی روتاری (هایدولف، آلمان) حل شده و تحت شرایط خلأ، فیلم نازک خشک تهیه گردید. سپس عمل هیدراته کردن با افزودن آب مقطر استریل طی مدت یک ساعت و در دمای ۵۵ ^{o}C انجام گردید. سپس نانوذرات تهیه شده، با استفاده از سونیکیت حمامی برای مدت ۴۰ دقیقه کاهش سایز داده شد(۲۲).

۴. تعیین درصد بارگذاری اسانس در لیپوزوم

برای این منظور ابتدا نانو لیپوزوم‌ها را بعد از کاهش سایز وارد کیسه دیالیز نموده و به مدت یک ساعت درون بشری با cc ۴۵۰ آب مقطر و در دمای ۴ ^{o}C قرار داده شد تا اسانس آزاد و انکپسوله نشده حذف گردد. سپس لیپوزوم‌های ساخته شده را با نسبت ۱ به ۲۰ با ایزوپروپیل مخلوط کرده تا دیواره لیپیدی اطراف اسانس نعناع فلفلی شکسته شود و اسانس نعناع فلفلی آزاد گردد. در مرحله بعد میزان جذب اسانس نعناع انکپسوله شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتری در طول موج ماکزیمم نعناع که در مراحل قبلی تعیین گردیده بود محاسبه شد. در پایان با استفاده از نمودار استاندارد اسانس نعناع فلفلی در ایزوپروپیل، و رابطه (۱)، درصد لود اسانس نعناع فلفلی در لیپوزوم محاسبه گردید(۲۲).

$$\text{راندمان بارگذاری نعناع فلفلی} = \frac{\text{مقدار اسانس نعناع فلفلی محصور شده}}{\text{مقدار اسانس نعناع فلفلی اولیه}} \times 100$$

رابطه (۱)

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

۵. تعیین اندازه نانو ذرات و ضریب پراکندگی

محدوده توزیع اندازه ذرات و همچنین پیک اندازه ذرات با استفاده از دستگاه تفرق دینامیکی نور (DLS) تعیین می‌شود که بدین منظور از دستگاه نانوسایزر Brookhaven Instruments Corp استفاده گردید. اندازه‌گیری نانو لیپوزوم‌ها در یک زاویه ۹۰ درجه و تابش نور لیزر با طول موج ۶۵۷ nm در دمای ۲۵ ^{o}C صورت گرفت نمونه مورد استفاده به صورت رقیق شده در غلظت ۰/۱mg/ml آماده گردید. و بلافاصله پس از آماده‌سازی اندازه گیری صورت گرفت. همچنین اندازه گیری نمونه‌ها در ۳ مرتبه و هر مرتبه به مدت ۳۰ ثانیه انجام گردید.

۶. تعیین پتانسیل زتا نانو لیپوزوم‌ها

میزان بار سطحی و پتانسیل زتا نانو لیپوزوم‌ها حامل دارو با استفاده از دستگاه زتاسایزر شرکت Brookhaven Instruments Corp در دمای ۲۵ ^{o}C اندازه‌گیری گردید. برای تعیین بار سطحی به ۱۵۰۰ µL با غلظت ۰/۱ mg/ml نیاز است.

۷. تصویر برداری از نانو لیپوزوم

از نانو لیپوزوم‌ها با استفاده از میکروسکوپ الکترونیکی روبشی (Scanning electron microscope) به منظور بررسی شکل و ساختار نانو لیپوزوم‌های تولیدی حامل دارو تصویر گرفته شد (از نمونه با غلظت ۰/۱ mg/ml یک قطره روی لام ریخته و می‌گذاریم خشک شود سپس روی نمونه، اپراتور، پوشش طلا داده و تصویر تهیه می‌گردد.).

۸. آنالیز نانولیپوزوم سنتز شده توسط دستگاه طیف سنجی مادون قرمز

گروه‌های عاملی سطح نانولیپوزوم تولید شده توسط آنالیز طیف سنجی زیر (مادون) قرمز (IR) بررسی گردید. در طیف زیر قرمز عمدتاً دو ناحیه مورد توجه است. ناحیه گروه عاملی از $1550\ cm^{-1}$ تا ۴۰۰۰، ناحیه‌ای است که بیشتر کشش‌های پیوندی اتفاق می‌افتد. این ناحیه معمولاً تعداد نسبتاً کمی پیک دارند. اما بسیاری از پیک‌های آن مشخص کننده گروه‌های عاملی هستند. برای اطمینان از نبود داروی آزاد و مواد اضافی در نمونه نانو لیپوزوم، از نمونه دیالیز شده نانو لیپوزوم‌ها، استفاده گردید و به منظور کاهش رطوبت، حدود نیم ساعت نمونه در آون با دمای تقریبی ۶۰ ^{o}C قرار داده شد.

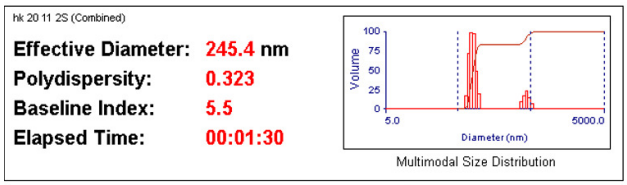
۹. بررسی روند رهایش دارو

بررسی رهایش اسانس از سامانه لیپوزومی با استفاده از روش کیسه دیالیز صورت گرفت. در این روش مقدار مشخصی از لیپوزوم حاوی اسانس نعناع فلفلی در کیسه دیالیز ریخته شد و در مجاورت بافر PBS در دمای ۳۷ ^{o}C و PH= ۷/۴ به مدت ۶۰ ساعت قرار گرفت و در فواصل زمانی نیم، ۱، ۲، ۳، ۶، ۹، ۱۲، ۲۴، ۳۶، ۴۸ و ۶۰ ساعت، مقدار مشخصی از بافر PBS اطراف کیسه دیالیز برداشته و مقدار جذب آن توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر خوانده شد و بر اساس آن، نمودار رهایش اسانس از لیپوزوم رسم گردید(۲۲).

نتایج

۱. اندازه، شاخص پراکندگی و سایز زتای نانو لیپوزوم حاوی اسانس

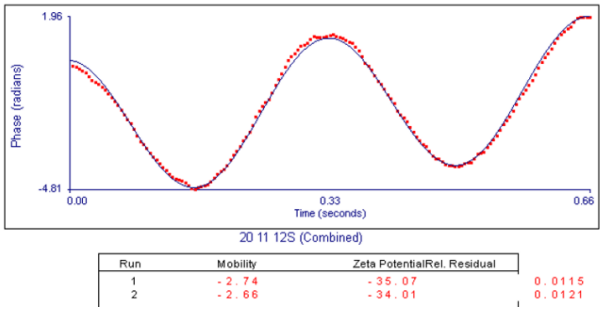
نتایج پژوهش با توجه به تصویر ۱ نشان می‌دهد که اندازه نانو ذرات تهیه شده در ۱۳ nm ± ۲۴۷ و شاخص پراکندگی آن‌ها ۰/۰۱ ± ۰/۳۲ می‌باشد. هم چنین با توجه به تصویر ۲، پتانسیل زتای لیپوزوم حاوی اسانس، ۰/۷۴mV ± ۳۴/۵۴- است.



Run	Eff. Diam. (nm)	Half Width (nm)	Polydispersity	Baseline Index
1	237.9	137.5	0.334	4.7
2	262.5	145.9	0.309	8.5
3	241.0	132.6	0.303	1.0

تصویر ۱: اندازه و شاخص پراکندگی نانو ذرات

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]



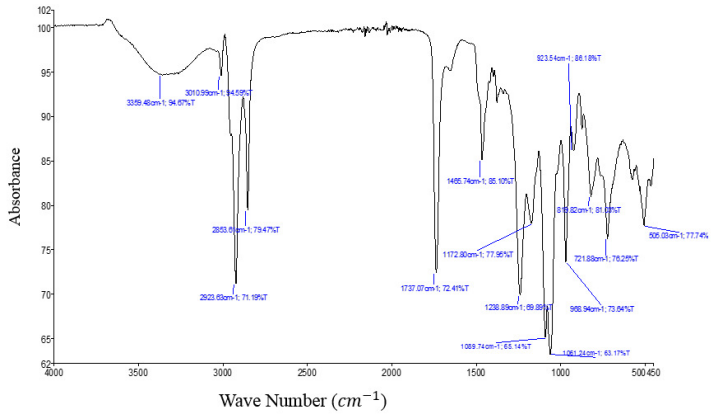
تصویر ۲: پتانسیل زتای نانو ذرات

۲. بررسی برهمکنش میان اسانس و سامانه

بررسی نمودار FTIR اسانس (تصویر ۳) نشان می‌دهد که، پیک پهن ناحیه cm^{-1} ۳۵۰۰ مشخصه گروه OH، فنل‌ها و الکل-ها، طول موج cm^{-1} ۲۹۲۴/۹۶ مشخصه ارتعاش کششی CH_3 ، طول موج cm^{-1} ۱۶۶۲/۴۹ مشخصه ارتعاش کششی C=O، طول موج cm^{-1} ۱۳۷۷/۸۷ مشخصه گروه‌های نیترو، طول موج cm^{-1} ۱۴۴۳/۵۵ مشخصه حرکت خمشی CH_3 ، پیک‌های موجود در ناحیه cm^{-1} ۱۰۰۰ تا ۱۳۰۰مربوط به گروه C-O، طول موج cm^{-1} ۹۸۴/۲۲ مشخصه P-OR، طول موج cm^{-1} ۸۷۲/۹۴ مشخصه P-O است.

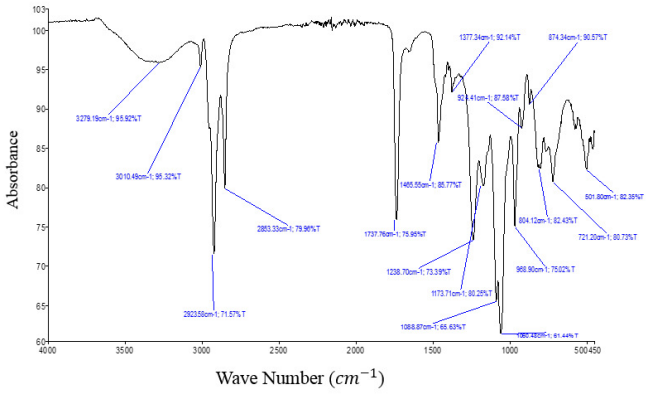
هم چنین با بررسی نمودار FTIR لیپوزوم بلانک (تصویر ۴) و نمودار FTIR لیپوزوم حاوی اسانس (تصویر ۵) مشخص می‌شود که طول موج cm^{-1} ۳۲۷۹/۱۹ مشخصه گروه عاملی OH، طول موج‌های cm^{-1} ۳۰۱۰/۴۹۱۹ و cm^{-1} ۲۹۲۳/۵۸۱۹ مشخصه ارتعاش کششی CH_3، طول موج cm^{-1} ۲۸۵۳/۳۳ مربوط به ارتعاش کششی CH_2، طول موج cm^{-1} ۱۷۳۷/۷۶مشخصه پیوند C=O، طول موج cm^{-1} ۱۴۶۵/۵۵ مشخصه حرکت خمشی CH_2، cm^{-1} ۱۳۷۷/۳۴ مشخصه حرکت خمشی CH_3 ، پیک‌های موجود در ناحیه cm^{-1} ۱۳۰۰ -۱۰۰۰ مربوط به گروه C-O، طول موج cm^{-1} ۹۶۸/۹۰ و ۹۲۴/۴۱ مشخصه P-OR، طول موج cm^{-1} ۸۷۴/۳۴ مشخصه P-O، طول موج cm^{-1} ۱۲۳۸/۷۰ مشخصه پیوند P=O و طول موج cm^{-1} ۷۲۱/۲۰ مربوط به حرکت خمشی CH_2 در یک زنجیره باز (long chain band) است.

مقایسه نمودار FTIR سامانه لیپوزومی قبل از بارگذاری اسانس و بعد از بارگذاری اسانس نشان می‌دهد که این دو طیف به دلیل تشابه گروهای عاملی اسانس و گروه‌های عاملی سامانه فاقد اسانس، دارای پیک‌های مشابهی هستند و در سامانه لیپوزومی دارای اسانس هیچ پیک اضافه ای دیده نمی‌شود، که این مطلب بیانگر این است که هیچ برهمکنش شیمیایی بین سامانه لیپوزومی و اسانس صورت نگرفته است. از طرف دیگر پیک‌های ایجاد شده در طیف FTIR سامانه دارای اسانس نسبت به سامانه فاقد اسانس، دچار تغییرات مکانی جزیی شده اند که دال بر انکپسوله شدن اسانس درون لیپوزوم است.

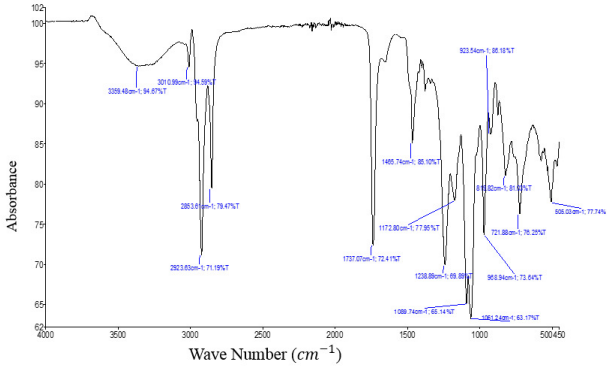


تصویر ۳: طیف FTIR اسانس نعناع

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]



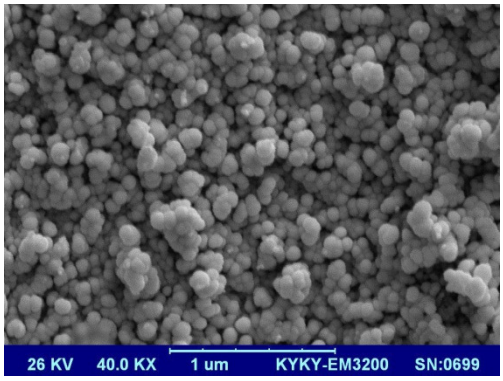
تصویر ۴: طیف FTIR لیپوزوم بلانک (فاقد اسانس)



تصویر ۵: طیف FTIR لیپوزوم حاوی اسانس نعناع

۳. بررسی مورفولوژی نانوذرات ساخته شده

تصویر ۶، مورفولوژی نانوذرات ساخته شده با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی را نمایش می‌دهد. همان گونه که در این تصویر مشخص است، ذرات دارای توزیع اندازه مناسب و ساختار کروی هستند. همچنین بر اساس شکل مشخص می‌شود که ذرات دارای مورفولوژی همگن و یکنواختی هستند و مرز میان ذرات قابل تشخیص است. همچنین این تصویر نشان می‌دهد که چسبیدگی میان ذرات مشاهده نمی‌شود.



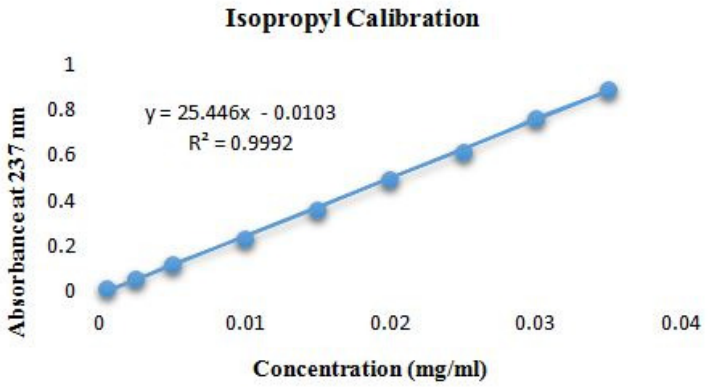
تصویر ۶: بررسی مورفولوژی نانو ذرات با میکروسکوپ الکترونی

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

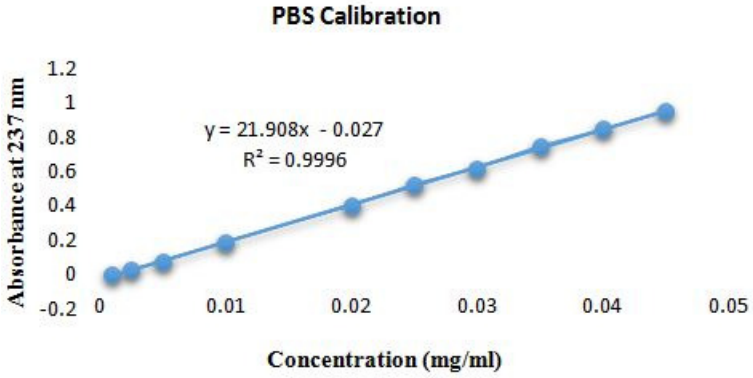
۴. درصد بارگذاری اسانس در نانو لیپوزوم و بررسی رهایش اسانس

با استناد به نمودار استاندارد اسانس نعناع فلفلی (تصویر ۷) و رابطه ۱، درصد انکپسولاسیون اسانس در حدود ۲/۷ ± ۶۱/۳۸ درصد است.

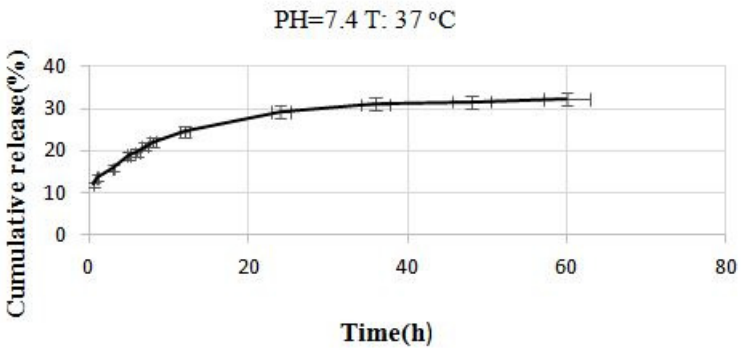
همچنین بررسی رهایش دارو با توجه به تصویر ۹ نشان می‌دهد که نانو سامانه طراحی شده، در شرایط فیزیولوژیک، آهسته رهش بوده و فرایند آزاد کردن دارو با شیب ملایمی انجام شده است به گونه ای که حداکثر رهایش آن در طی مدت ۶۰ ساعت، ۰/۵۱± ۳۲/۲۳ درصد است.



تصویر ۷: نمودار استاندارد اسانس نعناع فلفلی در ایزوپروپیل



تصویر ۸: نمودار استاندارد اسانس نعناع فلفلی در بافر PBS



تصویر ۹: نمودار رهایش اسانس از لیپوزوم در طی ۶۰ ساعت

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

بحث

پژوهش پیش رو نشان می‌دهد نانو سامانه تهیه شده با درصد انکپسولاسیون ۲/۷ ± ۶۱/۳۸، آهسته رهش است چرا که بعد از گذشت ۶۰ ساعت حداکثر رهایش دارو ۰/۵۱± ۳۲/۲۳ درصد بوده است. بررسی آنالیز FTIR و مقایسه FTIRهای حاصل از اسانس نعناع فلفلی، لیپوزوم بلانک و لیپوزوم حاوی اسانس نشان دهنده این امر است که اسانس موقعیت دارویی خود را به خوبی حفظ نموده و با نانوحامل لیپوزومی برهمکنش نداشته است. همچنین آنالیز نانو ذره با دستگاه DLS تائید می‌کند که نانولیپوزوم ضمن برخورداری از سایز nm ۱۳ ± ۲۴۷ و پراکندگی ۰/۰۱ ± ۰/۳۲، آنیونی بوده که از سمیت پایینی برای سلول برخودار است(۳۲). هم چنین تصویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی روبشی، نشان می‌دهد نانو ذرات حاصل ضمن برخورداری از اندازه و توزیع مناسب، دارای شکل کروی و سطحی صاف می‌باشند.

والنتی و همکاران در سال ۲۰۰۱، نانو لیپوزم‌های چند لایه و تک لایه حاوی اسانس سانتولینا، تهیه نمودند که در نانولیپوزوم‌های چند لایه، اندازه، شاخص پراکندگی ذرات و درصد درون پوشانی به ترتیب، nm ۴۶۷، ۰/۳۳ و ۷۸/۵ درصد و در نانولیپوزوم‌های تک لایه، اندازه، شاخص پراکندگی ذرات و درصد درون پوشانی به ترتیب، nm ۶۳، ۰/۱۵ و ۸۰ درصد گزارش شده است(۳۳).

دتونی و همکاران در سال ۲۰۰۹، نانولیپوزوم‌های چند لایه حاوی اسانس Zanthoxylum tingoassuiba با استفاده از روش فیلم نازک تهیه نمودند که اندازه آن‌ها nm ۹۳۷ و درصد درون پوشانی ۴۳/۷ درصد گزارش شد(۳۴).

کلیا و همکاران در سال ۲۰۱۳ نانو لیپوزوم‌های حاوی اسانس ترنج را تهیه نمودند که این نانو ذرات ضمن افزایش میزان حلالیت اسانس و بهبود شاخصه‌های ضد سرطانی آن، دارای پتانسیل زتای ۶ - و اندازه ذرات nm ۱۸۶ بودند (۳۵).

تائو و همکاران نیز در سال ۲۰۱۴، نانوذرات کیتوزان حاوی اسانس آویش تهیه نمودند که در این پژوهش میزان درون‌گیر شدن اسانس ۸۰ درصد و اندازه نانوذرات بین ۳۲۰۰ تا ۵۸۰ نانومتر گزارش شده است(۳۶).

حقجو و همکاران در سال ۲۰۱۵ نانو لیپوزوم‌های حاوی اسانس گزنه در غلظت‌های مختلفی از فسفاتیدیل کولین و کلسترول تهیه نمودند که حداکثر میزان درون پوشانی اسانس ۶۸/۸۳، محدوده اندازه ذرات بین ۸۱ تا ۹۴ نانومتر و شاخص پراکندگی ذرات مانند پژوهش حاضر، ۰/۳ گزارش شده است(۳۷).

صحرا بشیری و همکاران در سال ۲۰۱۵، نانو لیپوزوم‌های حاوی بتاکاروتن تهیه نمودند و به بررسی میزان پایدارای این ذرات با گذشت زمان پرداختند. آن‌ها گزارش کرده‌اند که اندازه نانو لیپوزوم‌های تهیه شده در حدود nm ۶۴ بوده و میزان درون پوشانی در بهترین فرمول حدود ۸۹/۷۷ درصد بوده است(۳۸).

ابراهیمی خوسفی و همکاران در سال ۲۰۱۵، لیپوزوم‌های حاوی اسانس آویشن شیرازی تهیه نمودند که درصد درون پوشانی را در نقطه بهینه ۵۴/۴ درصد گزارش نمودند. همچنین پژوهش یادشده نشان می‌دهد که مهمترین پارامتر موثر بر ریز پوشانی، درصد محتوای فسفاتیدیل کولین بکار رفته در سنتز لیپوزوم است و با کپسوله‌کردن اسانس آویشن می‌توان خاصیت آنتی‌باکتریال اسانس را افزایش داد(۳۹).

Haiying Cui و همکاران در سال ۲۰۱۵ نانو لیپوزوم‌های حاوی اسانس میخک تهیه نمودند که اندازه نانو ذرات را بین ۷۸/۳ تا ۱۵۶/۱ نانومتر، شاخص پراکندگی ذرات را ۰/۱۹۶، پتانسیل زتا ذرات را ۵/ ۲۴- و میزان درون پوشانی را ۲۰/۴۱ درصد گزارش نمودند(۴۰).

حقیرالسادات و همکاران در سال ۲۰۱۶ نانو ذرات لیپیدی حاوی اسانس زنیان تهیه نمودند که میزان انکپسولاسیون اسانس۳۵/۶ درصد و اندازه نانوذرات حاوی اسانس nm ۱۸۶/۱ بوده است. همچنین پتانسیل زتای نانو ذرات در این پژوهش بین ۱- تا ۶/۷ – گزارش شده است(۲۲).

قره نقده و همکاران در سال ۲۰۱۷، نانو لیپوزوم‌های حاوی اسانس مریم گلی با فرمول‌های مختلف (۹۰-۰، ۸۰-۱۰ و ۲۰-۷۰ میلی‌گرم) تهیه نمودند که اندازه ذرات و شاخص

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

پراکندگی ذرات به ترتیب در محدوده ۸۲-۸۸ نانومتر و ۰/۳۹ – ۰/۴۲ و میزان درون پوشانی اسانس در تمامی فرمول‌ها بالای ۷۰ درصد گزارش شده است(۴۱).

نتیجه‌گیری

در پژوهش حاضر، بارگذاری اسانس نعناع فلفلی به منظور افزایش شاخصه‌های درمانی آن و در نتیجه عملکرد بهتر اسانس صورت گرفت هر چند بررسی سمیت، آزمایش‌های درون تنی و برون تنی و انجام تست‌های آنتی باکتریال و آنتی اکسیدانت قبل هرگونه استفاده از این نانوذرات حاوی اسانس ضروری است. از آنجا که ترکیبات گیاهی در مقایسه با داروهای شیمیایی، عوارض جانبی کم تری دارند، بنابراین شناسایی استراتژی‌های نوین به منظور بهبود سیستم دارورسانی گیاهان دارویی که بتواند جایگزین مناسبی برای سیستم‌های دارورسانی شیمیایی باشد، می‌تواند بسیاری از چالش‌های پیش رو روی علم پزشکی را کاهش و یا برطرف نماید. در این مطالعه ضمن استخراج اسانس نعناع فلفلی به روش تقطیر با آب، فرمولی برای انکپسولاسیون نعناع فلفلی پیشنهاد شد که مشخصه‌های فیزیکی – شیمیایی مناسب آن از جمله اندازه و شاخص پراکندگی مناسب، پتانسیل زتای مطلوب، میزان درون پوشانی و الگوی رهایش قابل قبول و نیز عدم برهم کنش میان اسانس و سامانه، توسط چندین آزمایش مشخصه‌یابی تایید شد. بنابراین با توجه به شواهد فوق می‌توان پیشنهاد نمود که نانو سامانه حاضر با برخوداری از ویژگی‌های فیزیکو شیمیایی مناسب، می‌تواند جهت کاربردهای بالینی متعدد از جمله استفاده به عنوان ترکیب ضدمیکروبی، آنتی‌اکسیدانت و ضد توموری مورد استفاده قرار گیرد.

References:

*1-*Omidi M, Farzin N. ***Biotechnology Solutions to Increase the Efficiency of Medicinal Plants.*** Genet New 2012; 7(3): 209–20.[persion]

*2-*Javadzadeh SM, Pouyan M. ***Medicinal plants of the city of Qainat: its properties and applications. First.*** Mashhad: Sokhangostar; 2010.pp. 484. [persion]

*3-*Ebadi M. ***The basis of pharmacodynamic medicinal plants.*** First. Tehran; 2007.

*4-*Mosaffa N. ***Review of experimental methods to study the effects of medicinal plants: from research to approach***. Res Med 2011; 35(3): 182–5. [persion]

*5-*Majnoon Hoseini N, Davazdah Imami S. ***Farming and production of medicinal plants and Spice plant***. First. Tehran: Tehran Uni; 2007.[persion]

*6-*Torbatinejad P, Mirtaghi SM, Lavasani F, Bagheri H. ***Compare antibacterial effect of methanol extract of leaves of Mentha longifolia (L.) Hud in Different regions in northern Iran.*** Eco-phytochemical J Med Plant 2014; 2(3): 57–67.[persion]

*7-*Moaveni P. ***Medicinal Plants. First. Tehran: Islamic Azad University of Ghods*** city; 2009.

*8-*Badrzadeh M. ***A review of the classification of plants (Angiosperms).*** First. Tabriz: Amidi; 2007.

*9-*Rubiolo P, Sgorbini B, Liberto E, Cordero C, Bicchi C. ***Essential oils and volatiles: sample preparation and analysis.*** Flavour Fragr J 2010; 25(5): 282–90.

10- Alankar S. ***A review on peppermint oil***. Asian J Pharm Clin Res 2009; 2(2): 27–33.

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

11- Zargar A. ***Medicinal Plants. fourth.*** Tehran: Tehran Univercity; 1990. [persion]

12- Golparvar AR, Hadipanah A. ***Chemical compositions of the essential oil from peppermint (Mentha piperita L.) cultivated in Isfahan conditions***. Golparvar Hadipanah, J Herb Drugs 2013; 4(2): 75–8.

13- İşcan G, Kirimer N, Kürkcüoğlu M, Başer HC, DEMIrci F. ***Antimicrobial Screening of Mentha piperita Essential Oils***. Agric Food Chem 2002; 50(14): 3943–6.

14- Diaz-Maroto, M Consuelo Perez-Coello, M Soledad Gonzalez Vinas, MA Cabezudo MD. ***Influence of drying on the flavor quality of spearmint (Mentha spicata L.)***. J Agric Food Chem 2003; 51(5): 1265–9.

15- Miguel MG. ***Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review***. molecules 2010; 15(12): 9252–87.

16- Smith-Palmer A, Stewart J, Fyfe L. ***The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese.*** Food Microbiol 2001; 18(4): 463-70.

17- Burt S. ***Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods***. Int J Food Microbiol 2004; 94(3): 223–53.

18- Zarban A, Malekaneh M, Najjari MT, Abad M. ***The antioxidant properties of 28 medicinal plants in Iran.*** J Birjand Univ Med Sci 2004; 11(1): 5–13. [Persion]

19- Noguchi N, Niki E. ***Phenolic antioxidants: A rationale for design and evaluation of novel antioxidant drug for atherosclerosis***. Free Radic Biol Med 2000; 28(10): 1538–46.

20- Bayala B, Bassole IH, Scifo R, Gnoula C, Morel L, Lobaccaro JM SJ. ***Anticancer activity of essential oils and their chemical components - a review***. Am J Cancer Res 2014; 4(6): 591–607.

21- Bhalla Y, Gupta K, Jaitak V. ***Anticancer activity of essential oils: a review***. J Sci Food Agric 2013; 93(15): 3643–53.

22- Haghiralsadat F, Azhdari M, Kalantar SM, Nadernezhad S, Teymorizadeh K, Yazdani M, et al. ***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***. J Shahid Sadoughi Uni Med Sci 2016; 24(6):468–78.

23- Engineer C, Parikh J, Raval A. ***Review on Hydrolytic Degradation Behavior of Biodegradable Polymers from Controlled Drug Delivery System.*** Trends Biomater Artif Organs 2011; 25(2): 79–85.

24- Sherry M, Charcosset C, Fessi H, Greige-Gerges H. ***Essential oils encapsulated in liposomes: a review***. J Liposome Res 2013; 23(4): 268–75.

25- Lodish H, Berk A, Kaiser C, Monty Krieger M, Bretscher A, Ploegh H, et al. ***Molecular cell biology***. 7th ed. W. H. Freeman; 2013.

26- Mansoori MA, Agrawal S, Jawade S, Khan MI. ***A review on liposome.*** IJARPB 2012; 2(4): 453–64.

27- Tikshdeep C, Sonia A, Bharat P, Abhishek C. ***Liposome Drug Delivery : A Review***. J Pharm Chem Sci

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

2012; 1(3): 754–64.

28- Sirisha VNL, Bhavaniharika I, Sruthi B, Namrata M, Kirankumar P, Kiran Y, et al. ***Liposomes – the potential drug carriers***. J Pharm 2012; 2(5): 26–38.

29- Wagner A, Vorauer-Uhl K. ***Liposome Technology for Industrial Purposes.*** J Drug Deliv 2011; 2011(1): 1–9.

30- Daraee H, Etemadi A, Kouhi M, Alimirzalu S, Akbarzadeh A. ***Application of liposomes in medicine and drug delivery.*** Artif Cells, Nanomedicine, Biotechnol 2016; 44(1): 381–91.

31- Cheraghi M, Negahdari B, Daraee H, Etemadi A. ***Heart targeted nanoliposomal/nanoparticles drug delivery: An updated review.*** Bio Pharm 2017; 86(1): 316–23.

32- Haghiralsadat Fateme, Amoabediny G, Sheikhha MH, Forouzanfar T, Arough JM, Helder MN, et al. ***A novel approach on drug delivery: Investigation of new nano-formulation of liposomal doxorubicin and biological evaluation of entrapped doxorubicin on various osteosarcomas cell lines.*** Cell J 2017; 19(1): 55–65. [Persion]

33- Valenti D, Logu A De, Loy G, Bonsignore L, Cottiglia F, Fadda AM. ***Insularis Essential Oil : Preparation, Characterization And In Vitro Antiviral Activity.*** J Liposome Res 2001; 11(1): 73–90.

34- Detoni CB, Hohlemweger SVA, Sampaio C, Barros TF. ***Essential oil from Zanthoxylum tingoassuiba loaded into multilamellar liposomes useful as antimicrobial agents.*** J Microencapsul 2009; 26(8): 684–91.

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

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

37- Haghjoo S, Ghanbarzadeh B, Hamishekar H, Asnaashari S, Dehghannia J. ***Evaluation of colloidal and antioxidant properties of nano liposomes containing nettle extract***. Innov Food Tech 2015; 2(3): 11–23. [Persion]

38- Bashiri S, Ghanbarzadeh B, Hamishekar H, Dehghannya J. ***Beta-Carotene loaded nanoliposome: effects of gama –oryzanol on particle size stability and encapsulation***. J Res Inno Food Sci Tech 2015; 4(4): 365–82. [Persion]

39- Ebrahimi K, housfi M, Khosravi darani K, Hoseini H, Arabi S, Kamali Fonoud R, et al. Production of nanoliposomes containing essential oil of Boiss Zatariamultiflora by response surface method. Nano scale 2014; 1(2): 119–28. [Persion]

40- Cui H, Zhao C, Lin L. ***The specific antibacterial activity of liposome-encapsulated Clove oil and its application in tofu***. Food Control 2015; 56(1): 128–34.

41- Gharenaghadeh S, Samadlouie HR, Sowti M, Hamisekar H, Mokaram RR. ***Evaluation of the antimicrobial and antioxidant properties of Salvia essential oil nano liposome (Salvia multicaulis).*** JFST 2017; 14(62): 271–82. [Persion]

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]

A new strategy in improving therapeutic indexes of medicinal herbs: preparation and characterization of nano-liposomes containing Mentha piperita essential oil

Mohammad Majdizadeh [1], Saeed Rezaei Zarchi [2], Afsaneh Alsadat Movahedpour [3], Hashem Shahi Malmir [4], Elham Sasani [5], Bibi Fatemeh Haghiralsadat [*6]

[1,2,5] Department of Biology, Taft Payame Noor University, Yazd, Iran

[3] Department of Textile and Polymer, Islamic Azad University, Yazd, Iran

[4] Microbial Biotechnology, Department of Biology, Nourdanesh Higher Education Institute, Meymeh, Esfehan, Iran

[6] Department of Advanced Medical Sciences and Technologies, School of Paramedicine, Shahid Sadoughi University of Medical Sciences, Yazd, Iran

Received: 31 Agu 2017 **Accepted:** 2 Nov 2017

Abstract

Introduction: Herbal Compound and their essential oils possess high antimicrobial, antioxidant, and anti-tumor properties, but conventional prescribing of them faces serious challenges. Liposomal nano-carrier is one of the common pharmaceutical strategies to overcome these challenges. In this study, slow-released liposomal system containing Mentha piperita's essential oil was prepared in order to improve its antimicrobial, antioxidant and antitumor properties.

Methods: Liposomal vesicles were prepared using phosphatidylcholine (80%) and cholesterol (20%) by thin-film method. Mentha piperita's essential oil were loaded into the liposomes using inactive loading method. Their physico-chemical features were assayed using Zeta-Sizer, FTIR and SEM, and at the end, the essential oil release amount was calculated at 37° C.

Results: Liposomal vesicles containing Mentha piperita's essential oil showed the size of 247 ± 13.39 nm, 61.38% ± 2.7 essential oil encapsulation efficiency, -34.54 ± 0.74 mV of zeta potential and polydispersity index (PDI) of 0.32 ± .01. The prepared liposomal system presented essential oil controlled release and FTIR and SEM investigation showed no interaction between nanocarrier and the essential oil and the carriers have spherical structures.

Conclusion: In the present study, Mentha piperita's essential oil encapsulated in liposomal carriers and its physicochemical properties investigated. The results confrimed the slow-releasing ability of system and also showed that the anionic nanosystem increased the essential oil's stability without any change in its chemical nature. Taken together, liposomal nanocarrier could be a potent and suitable carrier for the essential oil.

Keywords: Liposome, Medicinal herbs, Mentha piperita, Plant Oils

This paper should be cited as:

Majdizadeh M, Rezaei Zarchi S, Alsadat Movahedpour A, Shahi Malmir H, Sasani E, Haghiralsadat BF. **A new strategy in improving therapeutic indexes of medicinal herbs: preparation and characterization of nano-liposomes containing Mentha piperita essential oil.** J Shahid Sadoughi Univ Med Sci 2018; 25(11): 853-64.

***Corresponding author: Tel: 09132507158, email: fhaghirosadat@gmail.com**

[Downloaded from jssu.ssu.ac.ir on 2024-10-12]