



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

محمد مجدی زاده^۱، سعید رضایی زارچی^۲، افسانه السادات موحدپور^۳،
هاشم شاهی مالمیر^۴، الهام ساسانی^۵، بی بی فاطمه حقیرالسادات^{۶*}

چکیده

مقدمه: اسانس و ترکیبات گیاهی از خواص ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی و ضد توموری 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 ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی 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 فیزیکیوشیمیایی آن‌ها با استفاده از دستگاه‌های زتا سایزر، FTIR، SEM انجام شد و در پایان میزان رهش اسانس در دمای ۳۷ °C محاسبه گردید.

نتایج: وزیکول‌های لیپوزومی حاوی اسانس نعناع فلفلی با اندازه ۱۳۳/۳۹ ± ۲/۷ nm، ۲۴۷ ± ۱۳۳/۳۹ nm، ۶۱/۳۸ ± ۲/۷ درصد میزان راندمان انکپسولاسیون، پتانسیل زتا ۰/۷۴ ± -۳۴/۵۴ میلی‌ولت و شاخص پراکندگی (polydispersity index) ۰/۰۱ ± ۰/۳۲ می‌باشد. رهش 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 فیزیکیوشیمیایی 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 بیوفیزیک، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور تفت، یزد

۲- استادیار گروه بیوفیزیک، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، 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 زیست‌شناسی، موسسه آموزش عالی نور دانش، میمه، اصفهان

۵- کارشناسی ارشد بیوشیمی، دانشکده علوم پایه، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور تفت، یزد

۶- دکتری نانو بیوتکنولوژی گروه علوم و فنون نوین پزشکی، دانشکده پیراپزشکی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد

* (نویسنده مسئول): تلفن: ۰۹۱۳۳۵۰۷۱۵۸، پست الکترونیکی: fhaghirosadat@gmail.com

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۶/۸/۱۱

تاریخ دریافت: ۱۳۹۶/۶/۹

مقدمه

عبارت گیاهان دارویی به آن دسته از گیاهانی اطلاق می‌شود که دارای مقدار معینی ماده مؤثره 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 معمولاً بیرنگ است و طعم و رایحه‌ی نسبتاً 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، اثرهای منتول (استات، بوتیرات و ایزو والرینات)، ترپن‌ها (لیمونن)، لینالول، ۱ و ۸-سینئول و غیره حضور دارد (۱۱-۱۳).

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 آنتی‌اکسیدانی، ضدتوموری و ضد میکروبی است (۱۴، ۱۵).

خاصیت ضد میکروبی اسانس بر پایه آب‌گریزی 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 (۱۶، ۱۷).

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 مؤثره 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 تماس حداکثر با آب و دم‌آبگریزشان دارای تماس حداقلی با آب باشد. در نتیجه غشاهایی کروی و دولایه شکل می‌یابند به طوریکه گروه‌های 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 کاربردهای گسترده‌ی درمانی اسانس نعناع فلفلی و نیز مزایای زیاد لیپوزوم به عنوان یک حامل دارویی، هدف از انجام

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 (gr ۰/۰۵۶)، کلسترول (gr ۰/۰۰۶) 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 °C ۴۵ 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 °C ۵۵ 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 °C ۴ 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).

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

رابطه (۱)

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 خشک کردن 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 gr ۲۵ از آن را به همراه ml ۲۵۰ 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 اسپکتروفتومتر، 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

عمدتاً دو ناحیه مورد توجه است. ناحیه گروه عاملی از 1550 cm^{-1} تا 4000 ، 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 60°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 نعنای فلفلی در کیسه دیالیز ریخته شد و در مجاورت بافر PBS در دمای 37°C و $\text{pH} = 7.4$ 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 $13 \pm 247 \text{ nm}$ و شاخص پراکندگی آن‌ها 0.1 ± 0.32 می‌باشد. هم چنین با توجه به تصویر ۲، پتانسیل زتای لیپوزوم حاوی اسانس، $0.74 \text{ mV} \pm 34/54$ - است.

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 نانو سایزر Brookhaven Instruments Corp استفاده گردید. اندازه‌گیری نانو لیپوزوم‌ها در یک زاویه 90° درجه و تابش نور لیزر با طول موج 657 nm در دمای 25°C صورت گرفت نمونه مورد استفاده به صورت رقیق شده در غلظت 0.1 mg/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

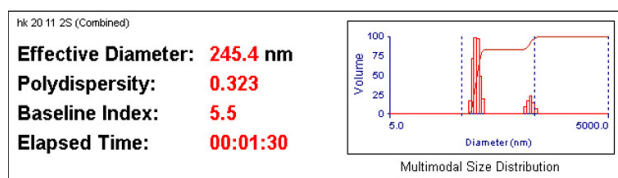
میزان بار سطحی و پتانسیل زتا نانو لیپوزوم‌ها حامل دارو با استفاده از دستگاه زتاسایزر شرکت Brookhaven Instruments Corp در دمای 25°C اندازه‌گیری گردید. برای تعیین بار سطحی به $1500 \mu\text{L}$ با غلظت 0.1 mg/ml نیاز است.

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 0.1 mg/ml یک قطره روی لام ریخته و می‌گذاریم خشک شود سپس روی نمونه، اپراتور، پوشش طلا داده و تصویر تهیه می‌گردد).

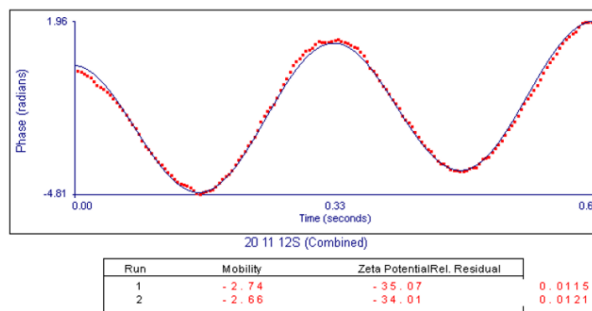
۸. آنالیز نانو لیپوزوم سنتز شده توسط دستگاه طیف سنجی

مادون قرمز
گروه‌های عاملی سطح نانو لیپوزوم تولید شده توسط آنالیز طیف سنجی زیر (مادون) قرمز (IR) بررسی گردید. در طیف زیر قرمز



Run	Eff. Diam. (nm)	HalfWidth (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

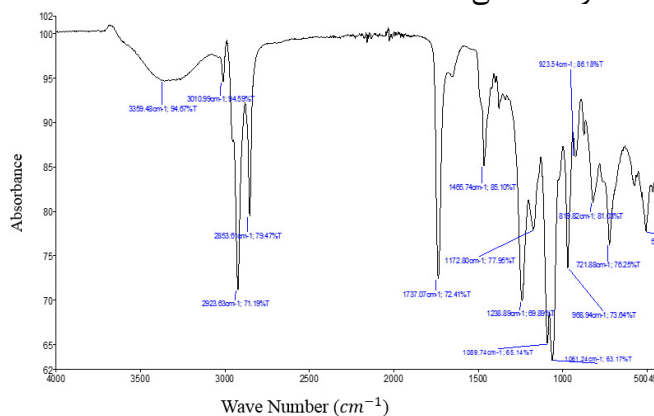


تصویر ۲: پتانسیل زتای نانو ذرات

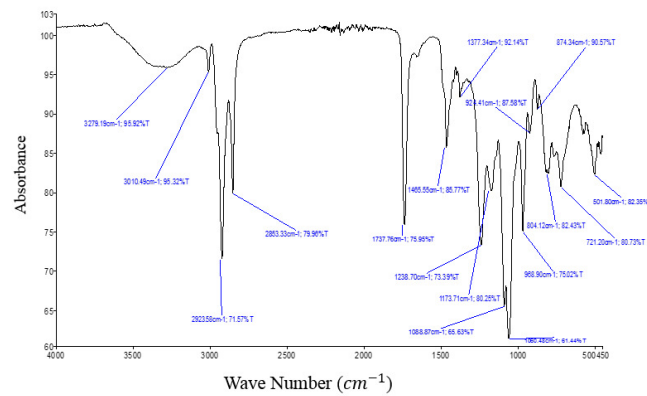
۲. بررسی برهمکنش میان اسانس و سامانه
 بررسی نمودار FTIR اسانس (تصویر ۳) نشان می‌دهد که، پیک پهن ناحیه 3500 cm^{-1} مشخصه گروه OH، فنل‌ها و الکل-ها، طول موج $2924/96\text{ cm}^{-1}$ مشخصه ارتعاش کششی CH_3 ، طول موج $1662/49\text{ cm}^{-1}$ مشخصه ارتعاش کششی $\text{C}=\text{O}$ ، طول موج $1377/87\text{ cm}^{-1}$ مشخصه گروه‌های نیترو، طول موج $1443/55\text{ cm}^{-1}$ مشخصه حرکت خمشی CH_3 ، پیک‌های موجود در ناحیه 1000 cm^{-1} تا 1300 cm^{-1} مربوط به گروه C-O، طول موج $984/22\text{ cm}^{-1}$ مشخصه P-OR، طول موج $872/94\text{ cm}^{-1}$ مشخصه P-O است.

مقایسه نمودار FTIR سامانه لیپوزومی قبل از بارگذاری اسانس و بعد از بارگذاری اسانس نشان می‌دهد که این دو طیف به دلیل تشابه گروه‌های 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 جزئی شده اند که دال بر انکپسوله شدن اسانس درون لیپوزوم است.

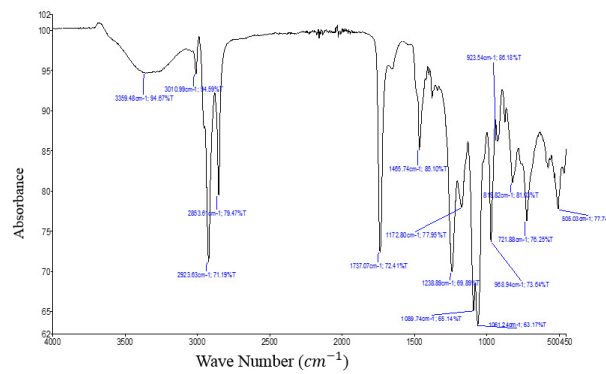
هم چنین با بررسی نمودار FTIR لیپوزوم بلانک (تصویر ۴) و نمودار FTIR لیپوزوم حاوی اسانس (تصویر ۵) مشخص می‌شود که طول موج $3279/19\text{ cm}^{-1}$ مشخصه گروه عاملی OH، طول موج‌های $3010/4919\text{ cm}^{-1}$ و $2923/5819\text{ cm}^{-1}$ مشخصه ارتعاش کششی CH_3 ، طول موج $2853/33\text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاش کششی CH_2 ، طول موج $1737/76\text{ cm}^{-1}$ مشخصه پیوند $\text{C}=\text{O}$ ، طول موج $1465/55\text{ cm}^{-1}$ مشخصه حرکت خمشی CH_2 است.



تصویر ۳: طیف FTIR اسانس نعناع



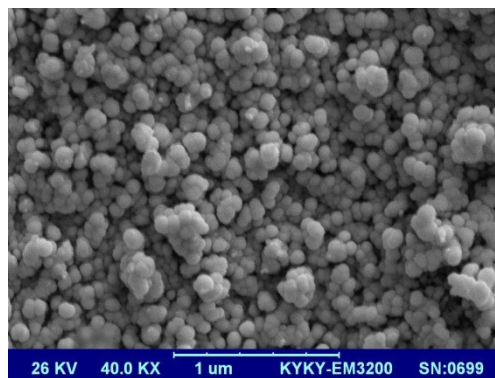
تصویر ۴: طیف FTIR لیپوزوم بلانک (فاقد اسانس)



تصویر ۵: طیف FTIR لیپوزوم حاوی اسانس نعناع

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.

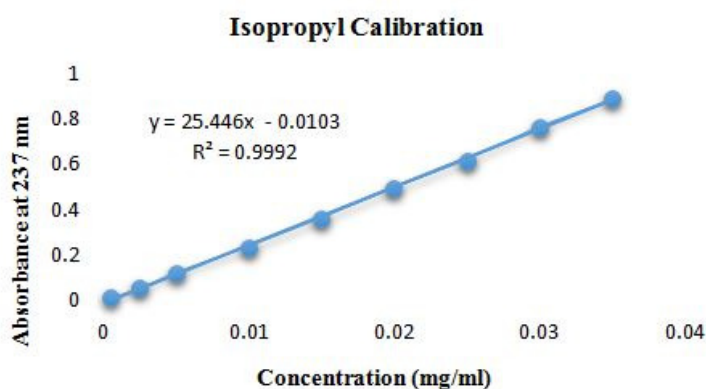
۳. بررسی مورفولوژی نانوذرات ساخته شده تصویر ۶، مورفولوژی نانوذرات ساخته شده با استفاده از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی را نمایش می‌دهد. همان گونه که در این تصویر مشخص است، ذرات دارای توزیع اندازه مناسب و ساختار کروی هستند. همچنین بر اساس شکل



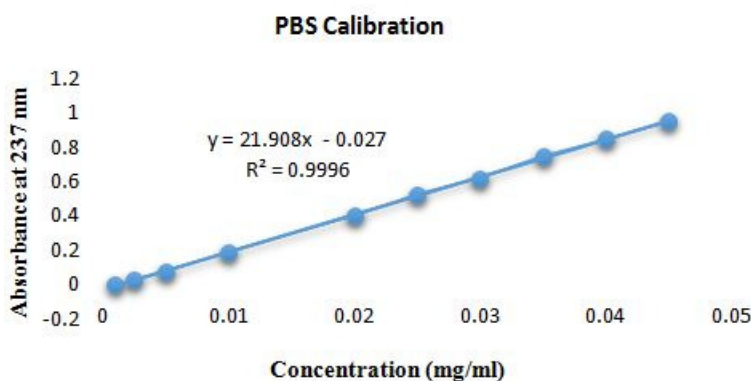
تصویر ۶: بررسی مورفولوژی نانو ذرات با میکروسکوپ الکترونی

همچنین بررسی رهائش 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 رهائش آن در طی مدت ۶۰ ساعت، $32/23 \pm 0/51$ درصد است.

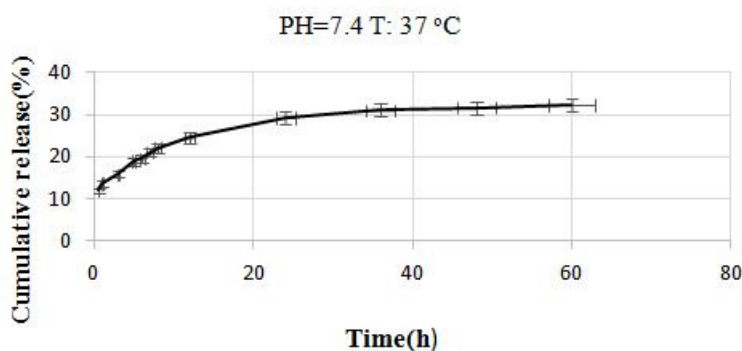
۴. درصد بارگذاری اسانس در نانو لیپوزوم و بررسی رهائش اسانس با استناد به نمودار استاندارد اسانس نعنای فلفلی (تصویر ۷) و رابطه ۱، درصد انکپسولاسیون اسانس در حدود $61/38 \pm 2/7$ درصد است.



تصویر ۷: نمودار استاندارد اسانس نعنای فلفلی در ایزوپروپیل



تصویر ۸: نمودار استاندارد اسانس نعنای فلفلی در بافر PBS



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

بحث

پژوهش پیش رو نشان می‌دهد نانو سامانه تهیه شده با درصد انکپسولاسیون $2/7 \pm 61/38$ ، آهسته رهش است چرا که بعد از گذشت ۶۰ ساعت حداکثر رهش دارو $0/51 \pm 22/23$ 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 13 ± 247 nm و پراکندگی $0/01 \pm 0/32$ ، آبیونی بوده که از سمیت پایینی برای سلول برخوردار 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 لیپوزوم‌های 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، 467 nm، $0/33$ و $78/5$ درصد و در نانولیپوزوم‌های تک لایه، اندازه، شاخص پراکندگی ذرات و درصد درون پوشانی به ترتیب، 63 nm، $0/15$ و 80 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 937 nm و درصد درون پوشانی $42/7$ 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 186 nm بودند (۳۵).

تائو و همکاران نیز در سال ۲۰۱۴، نانوذرات کیتوزان حاوی اسانس آویش تهیه نمودند که در این پژوهش میزان درون گیر

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 $68/83$ ، محدوده اندازه ذرات بین ۸۱ تا ۹۴ نانومتر و شاخص پراکندگی ذرات مانند پژوهش حاضر، $0/3$ گزارش شده است (۳۷).

صحرا بشیری و همکاران در سال ۲۰۱۵، نانو لیپوزوم‌های حاوی بتاکاروتن تهیه نمودند و به بررسی میزان پایداری این ذرات با گذشت زمان پرداختند. آن‌ها گزارش کرده‌اند که اندازه نانو لیپوزوم‌های تهیه شده در حدود 64 nm بوده و میزان درون پوشانی در بهترین فرمول حدود $89/77$ 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 $54/4$ 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 کپسوله کردن 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 $78/3$ تا $156/1$ نانومتر، شاخص پراکندگی ذرات را $0/196$ ، پتانسیل زتا ذرات را $24/5$ - و میزان درون پوشانی را $20/41$ درصد گزارش نمودند (۴۰).

حقیرالسادات و همکاران در سال ۲۰۱۶ نانو ذرات لیپیدی حاوی اسانس زنیان تهیه نمودند که میزان انکپسولاسیون اسانس $35/6$ درصد و اندازه نانوذرات حاوی اسانس $186/1$ nm بوده است. همچنین پتانسیل زتای نانو ذرات در این پژوهش بین ۱- تا $6/7$ - گزارش شده است (۲۲).

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

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 برخورداری از ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی مناسب، می‌تواند جهت کاربردهای بالینی متعدد از جمله استفاده به عنوان ترکیب ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانت و ضد توموری مورد استفاده قرار گیرد.

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

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.

- 11- Zargar A. *Medicinal Plants, fourth*. Tehran: Tehran University; 1990. [persian]
- 12- Golparvar AR, Hadipanah A. *Chemical compositions of the essential oil from peppermint (Mentha piperita L.) cultivated in Isfahan conditions*. *J Herb Drugs* 2013; 4(2): 75–8.
- 13- İşcan G, Kirimer N, Kürkcüoğlu M, Başer HC, DEMİrci 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. [Persian]
- 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- Haghirsadat 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*

- 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- Haghirsadat 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. [Persian]
- 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. [Persian]
- 38- Bashiri S, Ghanbarzadeh B, Hamishekar H, Dehghannia J. *Beta-Carotene loaded nanoliposome: effects of gamma-oryzanol on particle size stability and encapsulation*. J Res Inno Food Sci Tech 2015; 4(4): 365–82. [Persian]
- 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 Zataria multiflora by response surface method*. Nano scale 2014; 1(2): 119–28. [Persian]
- 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. [Persian]

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

Mohammad Majdizadeh¹, Saeed Rezaei Zarchi², Afsaneh Alsadat Movahedpour³,
Hashem Shahi Malmir⁴, Elham Sasani⁵, Bibi Fatemeh Haghirsadat^{*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, Esfahan, 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, $61.38\% \pm 2.7$ essential oil encapsulation efficiency, -34.54 ± 0.74 mV of zeta potential and polydispersity index (PDI) of $0.32 \pm .01$. 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, Haghirsadat 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: fhaghirsadat@gmail.com**