

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

محمد مجدىزاده^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 داروبی 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، آنتیاکسیدانی و ضدتوموری اسانس تهیه شده است.

روش بررسی: وزیکول‌های لیپوزومی با استفاده از فسفاتیدیل کولین (۰/۸۰٪) و کلسترول (۰/۲۰٪) 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، SEM، FTIR، انجام شد و در پایان میزان رهایش اسانس در دمای ۳۷ °C محاسبه گردید.

نتایج: وزیکول‌های لیپوزومی حاوی اسانس نعناع فلفلی با اندازه nm ۱۳/۳۹ ± ۲/۷، ۲۴۷ ± ۰/۳۸ 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 داروبی، 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 پرآپزشکی، 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

مقدمه

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(۱۵، ۱۸-۲۰). امروزه پژوهشگران دریافت‌هایند 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 انسانس و ترکیبات گیاهی با چالش‌های جدی از جمله، اثرگذاری نامطلوب بر ارگان‌های غیر هدف و اکسید شدن برخی از مواد مؤثره انسان‌ها، 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(۲۲-۲۴).

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 حداقل با آب و دم آبگریزشان دارای تماس حداقلی با آب باشد. در نتیجه غشاها بیکروی 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(۲۵-۳۱).

با توجه به کاربردهای گسترده‌ی درمانی انسانس ننانع فلفلی و نیز مزایای زیاد لیپوزوم به عنوان یک حامل دارویی، هدف از انجام

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 لابیانه است. این خانواده دارای ۲۳۶ جنس و بالغ بر ۷۰۰۰ گونه است. در این میان گیاه نعنا ۲۵-۳۰ 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 (۶-۸).

انسان‌ها ترکیبات طبیعی، بی رنگ، فرار و پیچیده‌ای هستند که از همه اندام‌های گیاه و یا از تعدادی از اندام‌های گیاه، قابل استخراج است (۹). انسانس استخراج شده از گیاهان ترکیب پیچیده‌ای از ترکیبات مختلف است که در حالت تازه عموماً 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 انسانس ننانع 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 (۱۱-۱۳).

امروزه از انسان‌های 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 انسان‌های گیاهی را مورد توجه قرار داده است، وجود اثرات بیولوژیکی مهم و متنوع آنها از جمله خواص آنتی اکسیدانی، ضد توموری و ضد میکروبی است(۱۴، ۱۵).

خاصیت ضد میکروبی انسانس بر پایه آب گریزی آن استوار است. انسانس 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 محركه پروتونی و مرگ سلول را رقم می‌زند (۱۶، ۱۷).

از دیگر ویژگی‌های بیولوژیکی انسانس‌ها خاصیت آنتی اکسیدانی است. ترکیباتی به نام رادیکال‌های آزاد قادرند با انجام واکنش‌های

مختلف انسنس نعناع فلفلی در حلال PBS تهیه گردید و با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر، 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 انسنس نعناع فلفلی در PBS رسم گردید(۲۲).

۳. تهیه لیپوزوم حاوی انسنس نعناع فلفلی

لیپوزوم‌های حاوی انسنس نعناع فلفلی به روش آب‌پوشانی لایه نازک و با ترکیبی شامل فسفاتیدیل کولین سویا (gr ۰/۰۵۶ mg/ml) کلسترول (gr ۰/۰۰۶) و انسنس نعناع فلفلی با غلظت ۰/۵ تهیه گردید، که خلاصه آن بدین شرح است: ابتدا فسفاتیدیل کولین سویا، کلسترول و انسنس نعناع فلفلی در حلال کلروفرم و در دمای $^{\circ}\text{C}$ ۴۵ بر روی روتاری (هایدوف، آلمان) حل شده و تحت شرایط خلا، فیلم نازک خشک تهیه گردید. سپس عمل هیدراته کردن با افزودن آب مقطر استریل طی مدت یک ساعت و در دمای $^{\circ}\text{C}$ 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 انسنس در لیپوزوم

برای این منظور ابتدا نانو لیپوزوم‌ها را بعد از کاهش سایز ۵۰ وارد کیسه دیالیز نموده و به مدت یک ساعت درون بشری با آب مقطر و در دمای $^{\circ}\text{C}$ ۴ قرار داده شد تا انسنس آزاد و انکپسوله نشده حذف گردد. سپس لیپوزوم‌های ساخته شده را با نسبت ۱ به ۲۰ با ایزوپروپیل مخلوط کرده تا دیواره لیپیدی اطراف انسنس نعناع فلفلی شکسته شود و انسنس نعناع فلفلی آزاد گردد. در مرحله بعد میزان جذب انسنس نعناع انکپسوله شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر در طول موج ماکزیمم نعناع که در مراحل قبلی تعیین گردیده بود محاسبه شد. در پایان با استفاده از نمودار استاندارد انسنس نعناع فلفلی در ایزوپروپیل، و رابطه (۱)، درصد لود انسنس نعناع فلفلی در لیپوزوم محاسبه گردید(۲۲).

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

رابطه (۱)

این پژوهش ساخت و مشخصه یابی نanoliposomes‌های حاوی انسنس نعناع فلفلی به روش آب‌پوشانی لایه نازک است.

روش بررسی

۱. تهیه گیاه نعناع فلفلی و انسنس 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 اسننس‌گیری از برگ‌های گیاه انجام شد. برای این منظور اجزای خشک شده را تا حدودی نرم ۲۵۰ ml نموده و در هر نوبت حدود gr ۲۵ از آن را به همراه آب مقطر، وارد بالن ۵۰۰ ml نموده و بالن محتوى 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 اسننس از اجزای گیاه خارج شده و به همراه آب تبخیر گردد. عمل اسننس‌گیری به مدت ۳ ساعت به طول انجامید و در پایان، اسننس تولید شده، از دستگاه کلونجر خارج کرده و برای انجام مراحل بعدی جمع‌آوری گردید(۲۲).

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

در این مرحله ابتدا استوک ۰/۵ mg/ml انسنس نعناع فلفلی در حلال متابول تهیه گردید و با استفاده از آن، سری رقت‌های مختلف انسنس نعناع فلفلی در حلال ایزوپروپیل تهیه گردید. سپس به کمک دستگاه اسپکتروفوتومتر، 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 انسنس نعناع فلفلی در ایزوپروپیل رسم گردید. هم چنین به منظور رسم نمودار استاندارد انسنس نعناع فلفلی در بافر PBS، ابتدا استوک ۰/۵ mg/ml انسنس نعناع فلفلی در حلال متابول 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 cm^{-1} ، 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 انسانس از سامانه لیپوزومی با استفاده از روش کیسه دیالیز صورت گرفت. در این روش مقدار مشخصی از لیپوزوم حاوی انسانس نعناع 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 انسانس از لیپوزوم رسم گردید(۲۲).

نتایج

۱. اندازه، شاخص پراکنده‌گی و سایز زتای نانو لیپوزوم حاوی انسانس نتایج پژوهش با توجه به تصویر ۱ نشان می‌دهد که اندازه نانو ذرات تهیه شده در $13\text{ nm} \pm 247$ و شاخص پراکنده‌گی آن‌ها 0.32 ± 0.32 می‌باشد. هم‌چنین با توجه به تصویر ۲، پتانسیل زتای لیپوزوم حاوی انسانس، $0.74\text{ mV} \pm 0.54$ است.

Hk 20 11 2S (Combined)
Effective Diameter: **245.4 nm**
Polydispersity: **0.323**
Baseline Index: **5.5**
Elapsed Time: **00:01:30**

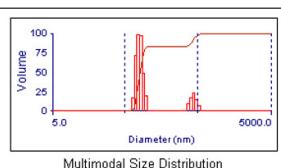
۵. تعیین اندازه نانو ذرات و ضریب پراکنده‌گی محدوده توزیع اندازه ذرات و همچنین پیک اندازه ذرات با استفاده از دستگاه تفرق دینامیکی نور (DLS) تعیین می‌شود که Brookhaven Instruments Corp بدین منظور از دستگاه نانوسایزر استفاده گردید. اندازه‌گیری نانو لیپوزومها در یک زاویه 90° درجه و تابش نور لیزر با طول موج 657 nm در دمای 25°C صورت گرفت نمونه مورد استفاده به صورت رقیق شده در غلظت 0.1 mg/ml آماده گردید. و بلافضلله 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 زتابایزر شرکت Brookhaven Instruments Corp در دمای 25°C اندازه گیری گردید. برای تعیین بار سطحی به 1 mL 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).

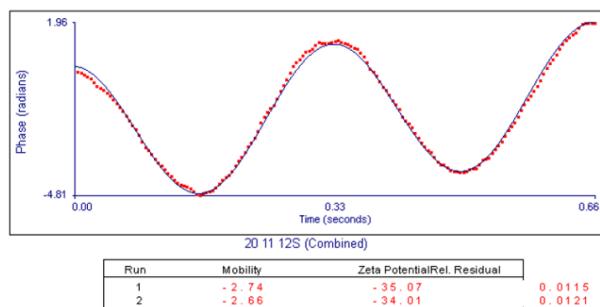
۸. آنالیز نanoliposomes سنتز شده توسط دستگاه طیف سنجی مادون قرمز

گروه‌های عاملی سطح nanoliposomes 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 پراکنده‌گی نانو ذرات



تصویر ۲: پتانسیل زتای نانو ذرات

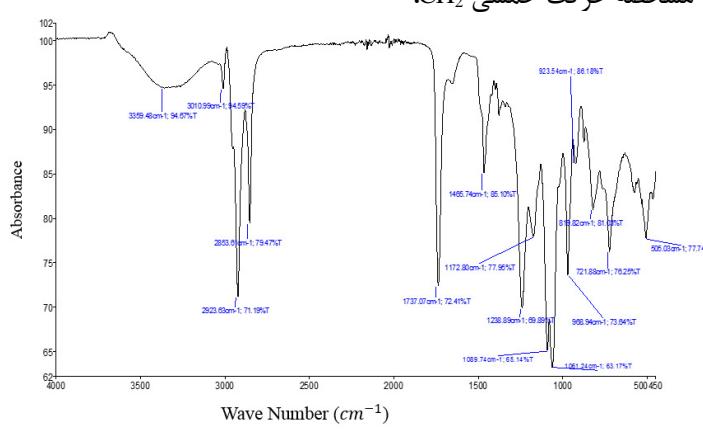
۱۳۷۷/۳۴ cm^{-1} مشخصه حرکت خمثی CH_3 ، پیکهای موجود در ناحیه $1300 - 1300 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به گروه C-O، طول $968/90 \text{ cm}^{-1}$ و $924/41 \text{ cm}^{-1}$ مشخصه P-OR، طول موج $874/34 \text{ cm}^{-1}$ مشخصه P-O، طول موج $1238/70 \text{ cm}^{-1}$ مشخصه پیوند P=O و طول موج $721/20 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به حرکت خمثی CH_2 در یک زنجیره باز (long chain band) است.

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

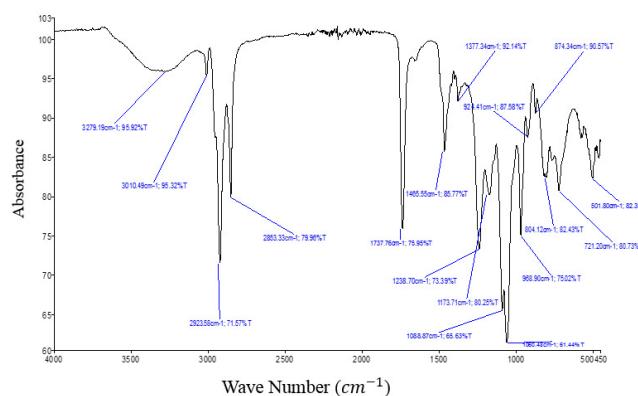
۲. بررسی برهمکنش میان اسانس و سامانه

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 C=O ، طول موج $1377/87 \text{ cm}^{-1}$ مشخصه گروههای نیترو، طول موج $1443/55 \text{ cm}^{-1}$ مشخصه حرکت خمثی CH_3 ، پیکهای موجود در ناحیه $1000 - 1300 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به گروه C-O، طول موج $872/94 \text{ cm}^{-1}$ مشخصه P-OR، طول موج $984/22 \text{ cm}^{-1}$ مشخصه P-O است.

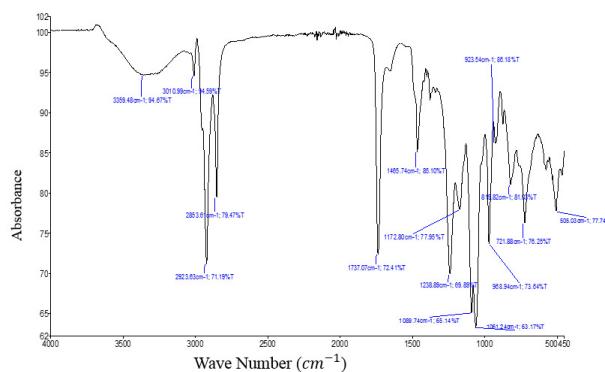
هم چنین با بررسی نمودار FTIR لیپوزوم بلانک (تصویر ۴) و نمودار لیپوزوم حاوی اسانس (تصویر ۵) مشخص می‌شود که طول موج $3279/19 \text{ cm}^{-1}$ مشخصه گروه عاملی OH، طول موجهای $3010/4919 \text{ cm}^{-1}$ و $2923/5819 \text{ cm}^{-1}$ مشخصه ارتعاش کششی CH_3 ، طول موج $2853/33 \text{ cm}^{-1}$ مربوط به ارتعاش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



تصویر ۳: طیف FTIR اسانس نعناع



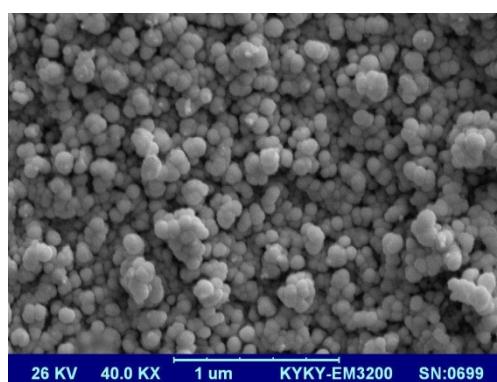
تصویر ۴: طیف FTIR لیپوزوم بلانک (فاقد اسانس)



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

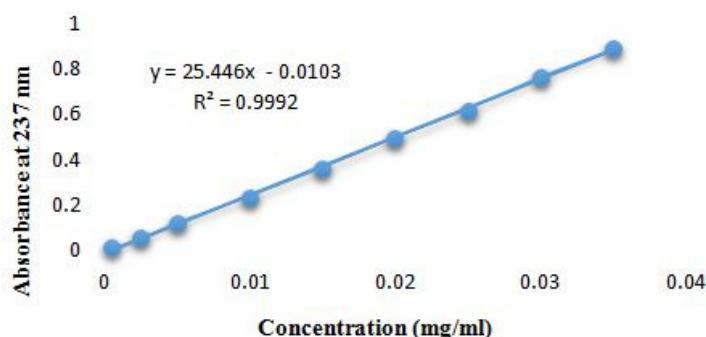


تصویر ۶: بررسی مورفولوژی نانوذرات با میکروسکوپ الکترونی

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 شبیه ملایمی انجام شده است به گونه‌ای که حداقل رهایش آن در طی مدت ۶۰ ساعت، $32/23 \pm 0/51$ درصد است.

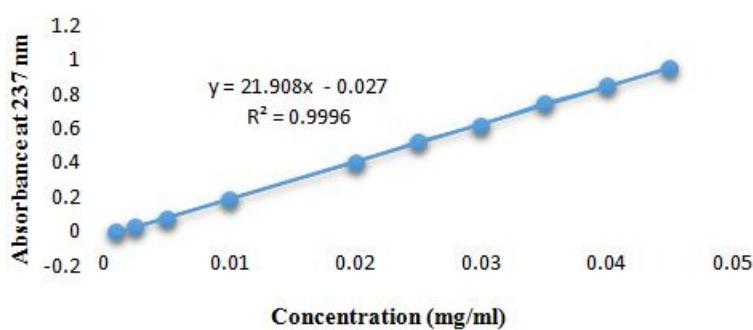
۴. درصد بارگذاری انسانس در نانو لیپوزوم و بررسی رهایش انسانس با استناد به نمودار استاندارد انسانس نعناع فلفلی (تصویر ۷) و رابطه ۱، درصد انکپسولاسیون انسانس در حدود $2/7 \pm 38/61$ درصد است.

Isopropyl Calibration



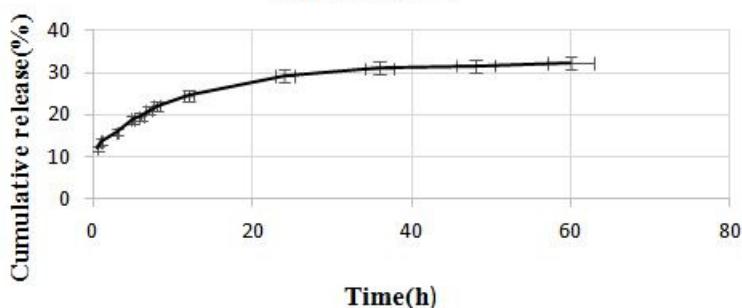
تصویر ۷: نمودار استاندارد انسانس نعناع فلفلی در ایزوپروپیل

PBS Calibration



تصویر ۸: نمودار استاندارد انسانس نعناع فلفلی در بافر PBS

PH=7.4 T: 37 °C



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

بحث

شدن انسانس ۸۰ درصد و اندازه نانوذرات بین ۳۲۰۰ تا ۵۸۰ نانومتر گزارش شده است (۳۶).

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

صرحا 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 کردند که اندازه نانو لیپوزوم‌های تهیه شده در حدود ۶۴ nm بوده و میزان درون پوشانی در بهترین فرمول حدود $۸۹/۷۷$ درصد بوده است (۳۸). ابراهیمی خوسفی و همکاران در سال ۲۰۱۵، لیپوزوم‌های حاوی انسانس آویشن شیرازی تهیه نمودند که درصد درون پوشانی را در نقطه بهینه $۵۴/۴$ درصد گزارش نمودند. همچنانی 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 انسانس آویشن می‌توان خاصیت آنتی‌باکتریال انسانس را افزایش داد (۳۹).

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

حقیرالسادات و همکاران در سال ۲۰۱۶ نانو ذرات لیپیدی حاوی انسانس زنیان تهیه نمودند که میزان انکپسولاژیون انسانس $۳۵/۶$ درصد و اندازه نانوذرات حاوی انسانس $۱۸۶/۱\text{ nm}$ بوده است. همچنانی پتانسیل زتا نانو ذرات در این پژوهش بین ۱- تا $۶/۷$ - گزارش شده است (۲۲).

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

پژوهش پیش رو نشان می‌دهد نانو سامانه تهیه شده با درصد انکپسولاژیون $۲/۷ \pm ۱/۳۸$ ، آهسته رهش است چرا که بعد از گذشت ۶۰ ساعت حداکثر رهایش دارو $\pm ۰/۵۱$ $۳۲/۲۳$ درصد بوده است. بررسی آنالیز FTIR و مقایسه FTIR‌های حاصل از انسانس نعناع فلفلی، لیپوزوم بلانک و لیپوزوم حاوی انسانس نشان دهنده این امر است که انسانس لیپوزوم دارویی خود را به خوبی حفظ نموده و با نانو حامل موقعیت دارویی خود را به خوبی حفظ نموده باشد.

همچنان آنالیز نانو ذره با دستگاه DLS تأیید می‌کند که نانولیپوزوم ضمن برخورداری از سایز $۱۳\text{ nm} \pm ۰/۰۱$ و پراکنده‌گی $۲۴۷ \pm ۰/۳۲$ آنیونی بوده که از سمیت پایینی برای سلول برخوردار است (۳۲). هم چنان تصویر حاصل از میکروسکوپ الکترونی روبشی، نشان می‌دهد نانو ذرات حاصل ضمن برخورداری از اندازه و توزیع مناسب، دارای شکل کروی و سطحی صاف می‌باشد.

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

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

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

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

شیمیایی باشد، می‌تواند بسیاری از چالش‌های پیش رو روش 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 نانوسامانه 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.

پراکندگی ذرات به ترتیب در محدوده ۸۲-۸۸ نانومتر و $۰/۴۲-۰/۳۹$ 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 مشخصه‌های درمانی آن و در نتیجه عملکرد بهتر اسانس صورت گرفت هر چند بررسی سمتی، 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.[persian]
- 2-Javadzadeh SM, Pouyan M. *Medicinal plants of the city of Qainat: its properties and applications*. First. Mashhad: Sokhangostar; 2010.pp. 484. [persian]
- 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. [persian]
- 5-Majnoon Hoseini N, Davazdah Imami S. *Farming and production of medicinal plants and Spice plant*. First. Tehran: Tehran Uni; 2007.[persian]
- 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.[persian]
- 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 Univercity; 1990. [persian]
- 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, Kürkçüoğlu M, Başer HC, DEMIrıcı 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- Haghitalsadat 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- Haghitalsadat 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, 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. [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 Zatariamultiflora 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 Majdzadeh¹, 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 antitumor 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 confirmed 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:

Majdzadeh 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: fhaghrosadat@gmail.com