

## سنتز نانو ذرات بر پایه سورفکتنت حاوی اسانس *Mentha pulegium L.* و *Mentha piperita L.* به منظور بررسی رهایش اسانس و فعالیت آنتی اکسیدانی

مطهره السادات مظلوم<sup>۱</sup>، سمیرا نادری نژاد<sup>۲\*</sup>، فرشته واحدیان<sup>۱</sup>، فاطمه حقیرالسادات<sup>۳</sup> و فاطمه دانشمند<sup>۴</sup>

۱- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه بیوشیمی، دانشگاه پیام نور تفت، یزد، ایران

۲- نویسنده مسئول، کارشناس ارشد مهندسی بیوتکنولوژی، گروه مهندسی بیوتکنولوژی و داروسازی، دانشکده مهندسی شیمی، پردیس دانشکده‌های فنی،

دانشگاه تهران، تهران، ایران، پست الکترونیک: s.naderinezhad@ut.ac.ir

۳- دکترای نانویوتکنولوژی، گروه مهندسی علوم زیستی، دانشکده علوم و فنون نوین، دانشگاه تهران، تهران، ایران

۴- استادیار، گروه زیست‌شناسی، دانشگاه پیام نور، یزد، ایران

تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۹۶

تاریخ اصلاح نهایی: بهمن ۱۳۹۶

تاریخ دریافت: فروردین ۱۳۹۶

### چکیده

اسانس‌ها ترکیب‌هایی بسیار فرار هستند. انکپسوله کردن اسانس درون حامل دارویی باعث کاهش فرآریت اسانس، کاهش اکسیدشوندگی و افزایش بازدهی اثرگذاری اسانس می‌شود. هدف از این تحقیق ساخت نانونیوزوم زیست سازگار حاوی اسانس نعنای (*Mentha piperita L.*) و پونه (*Mentha pulegium L.*) و توسعه سامانه گیاهی-دارویی با میزان بارگذاری مناسب می‌باشد. از این رو، اثر مقدار و نوع سورفکتنت و همچنین مقدار فسفولیپید بر روی فرمولاسیون‌های مختلف نیوزومی بررسی شد. در ادامه با بررسی اثر اسیدیته بافر هیدراته کننده در pHهای ۷/۴ (خنتی)، ۵ (اسیدی) و ۹ (بازی) فرمولاسیون بهینه از نظر درصد بارگذاری اسانس معرفی شد. همچنین سینتیک رهایش اسانس در بافر PBS و دو pH، ۷/۴ (سلول سالم) و ۵/۴ (سلول سرطانی) و همچنین در دو سطح دماهای ۳۷ (شرایط فیزیولوژیک) و ۴۲ (سلول سرطانی) درجه سلسیوس بر رهایش سامانه حاوی اسانس بررسی شد. فرمولاسیون‌های مختلف نیوزومی با استفاده از روش هیدراتاسیون فیلم نازک تهیه شد و اندازه ذرات، مورفولوژی، پتانسیل زتا و برهم‌کنش شیمیایی مشخصه‌یابی شد و بعد خاصیت آنتی‌اکسیدانی نانوذرات با روش مهار رادیکال DPPH ارزیابی شد. نتایج این تحقیق نشان داد که فرمولاسیون نیوزومی حاوی فسفاتیدیل کولین سویا، کلسترول و توئین ۶۰ بارگذاری شده با اسانس نعنای یا پونه با غلظت ۰/۵mg/mL، هیدراته شده با PBS در pH=۹ بیشترین بازدهی بارگذاری را نشان داده‌است. میزان اسانس بارگذاری شده برای اسانس نعنای و پونه به ترتیب ۶۱/۳۶٪ و ۷۴/۳۱٪ می‌باشد. ذرات به صورت کروی با اندازه کمتر از ۸۰ نانومتر و آنیونی می‌باشند. همچنین میزان رهایش اسانس در شرایط اسیدی و دمای ۴۲ درجه سلسیوس بیشتر از شرایط فیزیولوژیک می‌باشد که نشان می‌دهد فرمولاسیون تهیه شده حساس به دما و pH می‌باشد. نتایج حاصل از آنالیز طیف مادون قرمز نشان داده است که بین اسانس و نیوزوم برهم‌کنش شیمیایی رخ نداده است و بارگذاری اسانس درون نیوزوم‌ها به صورت فیزیکی بوده است. همچنین خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسانس طی درون‌گیری حفظ شده‌است.

واژه‌های کلیدی: نیوزوم، نعنایان، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، آهسته رهش، سرطان، حساس به دما و pH.

## مقدمه

بسیاری از گیاهان معطر و دارویی حاوی ترکیب‌های شیمیایی با فعالیت آنتی‌اکسیدانی هستند. در میان ترکیب‌های طبیعی، فنل یکی از ترکیب‌های اصلی آنتی‌اکسیدان‌ها را تشکیل می‌دهد. تحقیقات علمی نشان می‌دهد که فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس‌های گیاهی اثرات مفیدی بر سلامت انسان دارد (Benabdallah *et al.*, 2016). برخی از مطالعات بالینی در مدل‌های سلولی و حیوانی فعالیت‌های ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی، ضد التهاب و ضد سرطانی اسانس‌ها را ثبت کرده‌اند و مکانیسم و هدف دارویی آنها را نیز روشن کرده‌اند، هرچند در مطالعات انسانی کمبودهای بسیاری وجود دارد (Sharifi-Rad *et al.*, 2017)، اما انسان‌ها با دارا بودن سیستم دفاع آنتی‌اکسیدانی به وسیله خنثی کردن رادیکال‌های آزاد، محققان را به این واداشته‌اند که به دنبال آنتی‌اکسیدان‌های بالقوه برای کاهش آسیب اکسیداتیو باشند (Li *et al.*, 2017). نعناع و پونه از گیاهان متعلق به خانواده نعناعیان می‌باشند که از نظر ترکیب‌های پلی‌فنولیک غنی هستند. این گیاهان به رادیکال‌های آزاد واکنش داده و گونه‌های فعال اکسیژن را محدود می‌کند (Benabdallah *et al.*, 2016). اسانس گیاهان این خانواده دارای خواص ضد میکروبی، آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌موتازنیک هستند (Al-Sahlany, 2016؛ Cristina *et al.*, 2017). این اسانس‌ها برای درمان بیماری‌های دستگاه گوارش و روده و به‌عنوان ضد نفخ، ضد اسپاسم و ضد التهاب استفاده می‌شوند (Sharifi-Rad *et al.*, 2017). امروزه از مهمترین مشکلات عمده بهداشت و درمان در سراسر جهان بیماری سرطان و به‌ویژه سرطان معده است (Huang *et al.*, 2016) که پنجمین سرطان شایع در جهان را شامل می‌شود (Hess *et al.*, 2016). از آنجا که این بیماری در مراحل پیشرفته تشخیص داده می‌شود ابداع راه‌حل‌های درمانی از اهمیت ویژه‌ای برخوردار است (Giampieri *et al.*, 2017). پژوهش‌های پیشین بر روی خاصیت ضد سرطانی نعناع و پونه نشان می‌دهد که این گیاه دارای خواص سیتوتوکسیک است (Sharma *et al.*, 2014). فعالیت سیتوتوکسیک

اسانس نعناع در سلول سرطان کولون انسانی مورد ارزیابی قرار گرفته است و نتایج نشان داده که برای پیشگیری و درمان این سرطان بسیار مناسب است (Weecharangsan *et al.*, 2014). همچنین بررسی عصاره‌های مختلف نعناع وحشی بر روی موش نشان می‌دهد که عصاره‌های مختلف این گیاه دارای اثر محافظتی بر زخم معده و اسید معده است (Londonkar & Poddar, 2009). بررسی‌های اخیر نشان داده‌است که استفاده از عصاره‌های گیاهی باعث افزایش ایمنی و بهبود فرایندهای هماتولوژی و بیوشیمیایی می‌شود.

اسانس‌ها ترکیب‌های آبریز و فرّاری هستند که استفاده از آنها به شکل آزاد باعث کاهش پایداری و از دست دادن خواص اسانس می‌شود. با استفاده از انکپسولاسیون می‌توان پایداری و حلالیت اسانس را در محیط‌های آبی مانند پلاسما افزایش داد و همچنین از اکسیداسیون آن جلوگیری کرد (Haghiralsadat *et al.*, 2016). نیوزوم‌ها حامل‌هایی هستند که از تجمع سورفکتانت‌های غیریونی و کلسترول در مرحله آبی تشکیل می‌شوند. نیوزوم‌ها زیست‌تخریب‌پذیر و دارای سمّیت کم هستند. این حامل‌های دارویی هم داروهای لیپوفیل و هم هیدروفیل را بارگیری می‌کنند. برای بهبود عملکرد تحویل دارو، اندازه ذرات و شارژ سطحی فرمولاسیون نیوزومی را می‌توان بهینه‌سازی کرد و کارایی اسانس را افزایش داد (Ag Seleci *et al.*, 2016؛ Haghiralsadat *et al.*, 2017). اثر ضد میکروبی اسانس آزاد چای و اسانس محصور شده در نانو ذره دارای توپین ۸۰ توسط محققان بررسی شد. آنان دریافتند که حامل حاوی اسانس مؤثرتر از اسانس آزاد می‌تواند به‌عنوان عامل ضد میکروبی عمل کند (Ge & Ge, 2016).

Asprea و همکاران (۲۰۱۷) فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس آویشن کیسوله شده را در شرایط آزمایشگاهی مورد بررسی قرار دادند. نتایج حاصل نشان داد که آویشن بارگذاری شده در نانوکپسول فعالیت آنتی‌اکسیدانی خود را حفظ کرده است.

در مطالعه Nieto و همکاران (۲۰۱۱) ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی رزماری و آویشن لیپوزوم ارائه شده‌است.

نام علمی *Mentha pulegium* می‌باشد. مواد مورد استفاده در این تحقیق، کلسترول (Cholesterol) Mw=386.65 (Sigma (آمریکا) بود. اسپن ۶۰ (Span 60) و توئین ۶۰ (Tween60) از شرکت DaeJung Chemicals & Metals (کره) و فسفاتیدیل کولین سویای ۸۰٪ (SPC 80) از شرکت Lipoid GmbH (آلمان) تهیه شد. حلال‌های کلروفرم، متانول، ایزو پروپانول و اتانول از شرکت Merck (آلمان) تهیه شد.

### روش‌ها

#### استخراج اسانس

اسانس‌گیری گیاهان مورد نظر، با روش تقطیر با آب و به‌وسیله دستگاه کلونجر انجام شد. پس از توزین و خرد کردن هر دو گیاه به‌طور جداگانه (۳۰ گرم پونه، ۵۰ گرم نعناع)، آن را به درون بالن ریخته و به آن ۵۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه گردید. پس از اتصال به دستگاه کلونجر به مدت یک ساعت اسانس استخراج گردید. ۱/۵CC اسانس نعناع و ۱/۲CC اسانس پونه حاصل شد که پس از آن به مدت ۱ دقیقه با دور ۳۰۰۰ (دور بر دقیقه) سانتریفیوژ (HERMLE Z233M-2، آلمان) شد تا اسانس خالص از آب جداسازی شود. اسانس تهیه شده برای استفاده‌های بیشتر در شرایط تاریک و دور از جریان هوا قرار داده شد.

#### روش ساخت نیوزوم حاوی اسانس

برای تهیه نیوزوم، روش آب‌پوشانی فیلم نازک (Thin film hydration) انتخاب شد. ۱/۵CC اسانس رقیق شده در متانول (۱mg/mL)، سورفکتانت‌ها و لیپیدهای مورد استفاده پس از توزین در کلروفرم حل شد و در دمای ۳۰ درجه سلسیوس به‌منظور تشکیل فیلم بر روی روتاری (Heidolph، آلمان) قرار داده شد تا فاز آلی تبخیر شود و فیلم نازک و یکنواختی تشکیل شود. به‌منظور بررسی اثر سورفکتانت فرمولاسیون‌های ارائه شده در جدول ۱ تهیه شدند.

آنان فرمولاسیون نانویی-گیاهی پیشنهادی را به‌دلیل حضور ترکیب‌های فنلی و آنتی‌اکسیدانی در آن، به‌عنوان جایگزینی برای آنتی‌اکسیدان‌های مصنوعی معرفی کردند.

در مطالعه‌ای Varona و همکاران (۲۰۱۱)، دو روش فیلم نازک و خشک کردن با محلول اشباع گازی را در تهیه فرمولاسیون لیپوزومی حاوی کلسترول، لسیتین سویا و اسانس لوآتین مورد بررسی قرار دادند. نتایج نشان داد که لیپوزوم‌های تهیه شده از روش فیلم نازک دارای اندازه کوچکتر، میزان بیشتر بارگذاری اسانس و همچنین دارای پایداری طولانی مدت هستند.

Zawadzki و همکاران (۲۰۱۶) اسانس پرتقال را به دو روش اسپری خشک توسط مالتودکسترین و همچنین متراکم کردن توسط آلزینات سدیم محصور کردند. نتایج آنان نشان داد که آلزینات سدیم پایداری حرارتی بالاتری نسبت به مالتو دکسترین دارد، در نتیجه بیشتر می‌تواند اسانس را درون کیسول حفظ کند. میکروذراتی که با روش متراکم شدن تشکیل شده بودند پایداری حرارتی بالاتری نسبت به روش اسپری خشک داشتند و توزیع ذرات یکنواخت‌تر بود. مطالعات محدودی در زمینه فرمولاسیون نانو ذرات نیوزومی و بررسی پارامترهای فرایندی برای درون‌گیری اسانس وجود دارد. این مطالعه با هدف بررسی درون‌گیری دو اسانس خانواده نعناعیان تحت شرایط مختلف آماده‌سازی انجام شد. با توجه به خاصیت بالقوه اسانس نعناع و پونه برای پیشگیری و درمان سرطان معده، شبیه‌سازی شرایط رهایش برون تن اسانس با شرایط فیزیولوژیک و سرطانی انجام گردید. در ادامه بر آن شدیم تا پتانسیل نانو ذره حاصل را برای توسعه به‌عنوان داروی گیاهی آنتی‌اکسیدان ارزیابی کنیم.

### مواد و روش‌ها

#### مواد

نمونه‌ای از گیاهان مورد نظر پس از تهیه توسط سازمان جهاد کشاورزی استان یزد مورد تأیید قرار گرفت. نمونه‌های مذکور، نعناع فلفلی با نام علمی *Mentha piperita* و پونه با

جدول ۱- معرفی فرمولاسیون‌های مختلف نیوزومی تهیه شده برای بارگذاری اسانس با استفاده از

انواع مختلف سورفکتنت در مقادیر مختلف

فرمول‌ها	فسفاتیدیل کولین سویا	کلسترویل	اسپن ۶۰	توئین ۶۰
۱	۵	۳۰	۶۵	-
۲	۵	۳۰	۱۰	۵۵
۳	۵	۳۰	۵۵	۱۰
۴	۵	۳۰	-	۶۵

همچنین به منظور بررسی اثر میزان فسفولیپید در فرمولاسیون نیوزومی، میزان فسفولیپید در سامانه در دو سطح ۵٪ و ۱۵٪ بررسی شد.

هیدراته کردن فیلم لیپیدی حاوی اسانس با بافر PBS انجام شد و پس از آن بالون حاوی محلول شیری رنگ لیپید، اسانس و بافر به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس روی روتاری با دور ۲۰۰ دور بر دقیقه قرار داده شد. برای بررسی اثر pH بافر هیدراته‌کننده، بافر PBS در سه سطح ۷/۴، ۵ و ۹ تنظیم pH شد و برای هیدراته مورد استفاده قرار گرفت. همچنین از آب استریل تزریق نیز برای هیدراته استفاده شد که با بافر مورد مقایسه قرار گرفت. برای کاهش اندازه ذرات از سونیکیت حمامی استفاده گردید و برای جداسازی ذرات بزرگتر از ذرات کوچکتر از فیلتر ۰/۲۲ میکرومتر استفاده شد. برای جداسازی اسانس انکپسوله نشده، سوسپانسیون شیری رنگ تهیه شده داخل کیسه دیالیز ریخته شد و به مدت ۱ ساعت در دمای ۴ درجه سلسیوس درون محیط حاوی PBS خنثی استیرر شد.

اسانس انباشته درون نیوزوم با روش نورسنجی به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر (Spectrophotometry) اندازه‌گیری شد. نیوزوم‌ها را با نسبت‌های مختلف با محلول ایزوپروپانول مخلوط کرده و جذب فرابنفش آنها در طول موج بیشینه تعیین گردید. سپس غلظت اسانس انباشته شده با توجه به رابطه استاندارد تعیین گردید. پس از اتمام این مراحل برای هر یک از آزمایش‌های فوق،

فرمول و pH بهینه در بارگذاری اسانس بدست آمد. برای تعیین اندازه و بار سطحی نیوزوم‌های حاوی اسانس از دستگاه پراکنش دینامیکی نور (Dynamic Light Scattering) با مدل Brookhaven Instruments در دمای ۲۵ درجه سلسیوس استفاده شد. برای بررسی شکل و ساختار نانونیوزوم‌های حاوی اسانس از دستگاه میکروسکوپ الکترونی روبشی (Microscope Scanning Electron) استفاده شد. برای بررسی گروه‌های عاملی و برهم‌کنش سطح نانونیوزوم‌ها و اسانس از دستگاه طیف‌سنجی مادون قرمز استفاده گردید. تعیین میزان رهائش اسانس از نانونیوزوم با تکنیک انتشار بررسی شد. به این منظور، ۱CC از محلول نیوزوم حاوی اسانس داخل کیسه دیالیز سلولوزی ریخته شد. سپس کیسه دیالیز در ظرف حاوی ۱۰CC بافر با ۷/۴ و pH=۵/۴ در دماهای ۳۷ و ۴۲ درجه سلسیوس غوطه‌ور شد. در فواصل زمانی ۳۰ دقیقه تا ۴۸ ساعت، هر بار ۱CC از بافر را برداشته و ۱CC بافر تازه جایگزین آن شد. جذب نمونه‌ها در طول موج بیشینه توسط دستگاه اسپکتروفتومتر بررسی گردید.

بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی

برای بررسی آزمایش آنتی‌اکسیدانی از روش کاهش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی استفاده شد. دی‌فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل (DPPH) محلولی است با رنگ بنفش که قادر به دام‌اندازی رادیکال‌های آزاد است. هرچه میزان DPPH بیشتری مصرف شود رنگ بنفش به رنگ زرد مایل

نیوزومی + ۳۸۰ μl بافر فسفات + ۴۰۰ μl محلول متانول DPPH بود و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای آزمایشگاه انکوبه شد. سپس ۱۰۰ μl نمونه را به چاهک‌های الیزا اضافه نموده و در طول موج ۵۲۰ نانومتر توسط دستگاه الیزا اندازه‌گیری شد و ظرفیت به دام‌اندازی DPPH طبق رابطه ۱ محاسبه شد:

$$\text{رابطه (۱)} \quad \text{درصد احیای DPPH} = \frac{(\text{جذب نمونه} - \text{جذب شاهد})}{\text{جذب شاهد}} \times 100$$

$$\text{رابطه (۴)} \quad y = 0.0178x + 0.0166 \quad R^2 = 0.9959$$

$$\text{رابطه (۵)} \quad y = 0.0223x + 0.003 \quad R^2 = 0.9989$$

ضریب همبستگی  $R^2$  نزدیک به ۱ می‌باشد که برازش مناسب داده‌های تجربی و خط را نشان می‌دهد.

#### بررسی اثر سورفکتانت

در جدول ۲ فرمولاسیون‌های مختلف نیوزومی حاوی اسانس نعناع یا پونه از نظر بازده درون‌گیری اسانس مورد مقایسه قرار گرفته است. براساس نتایج به‌طور کلی بارگذاری اسانس پونه موفقیت‌آمیزتر بوده است و با افزایش میزان توئین ۶۰ در فرمولاسیون میزان درون‌گیری اسانس افزایش می‌یابد و فرمولاسیون حاوی اسپین ۶۰ کمترین میزان بارگذاری اسانس را دارد.

#### بررسی اثر pH و نوع مایع هیدراته‌کننده

بافر PBS جایگزین آب استریل تزریق شد و برای هیدراتاسیون فرمولاسیون بهینه مرحله قبل (فرمول ۴) استفاده گردید و اثر pHهای مختلف بافر هیدراته‌کننده فیلم نیوزومی حاوی اسانس بر روی میزان بارگذاری بررسی شد (جدول ۳). گرچه بر طبق نتایج، در فرمولاسیون ۴ و ۵ هر دو pH ماده هیدراته‌کننده یکسان است ولی بازدهی درون‌گیری اسانس متفاوت است. پارامتر کیفی ماده هیدراته‌کننده بر روی بازدهی اثر گذاشته است و با تغییر

می‌شود. برای تهیه محلول DPPH، پودر معرف DPPH به اندازه ۰/۰۰۳۹g وزن گردید و در فالدکون ریخته شد و ۱۰CC متانول به آن اضافه گردید و به دنبال آن ورتکس شد. سپس ۱CC از این محلول را برداشته و ۹CC متانول به آن اضافه شد و محلول متانول DPPH آماده گردید. سپس هر نمونه حاوی ۲۰ μl اسانس آزاد یا اسانس

فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس آزاد و انکپسوله شده مقایسه شد.

#### تجزیه و تحلیل آماری

در این تحقیق نمودارهای استاندارد بدست آمده توسط یک رابطه خط برازش شدند و کیفیت برازش توسط ضریب همبستگی  $R^2$  تعیین شد. نوار خطا (Error bar) برای بررسی تکراری‌پذیری نتایج به‌وسیله نرم‌افزار اکسل محاسبه گردید. بررسی معنی‌داری نتایج با استفاده از آزمون ANOVA یک‌طرفه انجام شد و مقدار p-value کمتر از ۵٪ نشان‌دهنده معنی‌داری آماری اختلاف‌ها بوده است.

#### نتایج

طیف فرابنفش نمونه اسانس نعناع و پونه در دو محلول ایزوپروپانول و PBS در محدوده طول موج ۲۰۰ تا ۶۰۰ نانومتر بدست آمد. در محدوده مذکور طول موج بیشینه اسانس نعناع و پونه به ترتیب ۲۳۵ و ۲۳۷ نانومتر بود. همچنین نمودار استاندارد هر دو اسانس در ایزوپروپانول و بافر PBS به صورت سه بار تکرار رسم شد و میانگین رابطه خطوط برای ایزوپروپانول و بافر به ترتیب در روابط ۲ و ۳ برای اسانس نعناع و در روابط ۴ و ۵ برای اسانس پونه گزارش شده است:

$$\text{رابطه (۲)} \quad y = 0.015x + 0.024 \quad R^2 = 0.995$$

$$\text{رابطه (۳)} \quad y = 0.0227x - 0.0105 \quad R^2 = 0.9772$$

آب به بافر موجب افزایش بازدهی بارگذاری شده است. همچنین براساس نتایج با فاصله گرفتن از حالت بافر خنثی به ویژه در حالت بازی بازدهی بارگذاری تغییر می‌کند، این تغییر برای اسانس پونه چشم‌گیرتر می‌باشد. همانطور که در جدول ۲ نیز تأیید شد، به طور کلی بازدهی بارگذاری اسانس پونه با موفقیت بیشتری همراه بوده است.

جدول ۲- بررسی اثر سورفکتنت‌های مورد استفاده از نظر نوع و مقدار بر روی بازده درون‌گیری اسانس

فرمول‌ها	بازده درون‌گیری اسانس نعناع	بازده درون‌گیری اسانس پونه
۱	%۶/۹۷	%۱۰/۶۲
۲	%۲۷/۵۱	%۴۳/۴۲
۳	%۸	%۱۵/۹۸
۴	%۳۸/۳۹	%۴۷/۹۰

جدول ۳- بررسی اثر pH هیدراته بر روی میزان بازده درون‌گیری اسانس

فرمول	مایع هیدراته‌کننده	pH مایع هیدراته	بازدهی درون‌گیری اسانس نعناع	بازده درون‌گیری اسانس پونه
۴	آب استریل تزریق	۵	%۳۸/۳۹	%۴۵/۵۸
۵	PBS	۵	%۴۱/۵۷	%۴۷/۹۷
۶	PBS	۹	%۴۹/۹۹	%۷۱/۴۴
۷	PBS	۷/۴	%۴۰/۶۸	%۴۱/۹۴

#### بررسی اثر فسفولیپید

می‌سازد. در این پژوهش برای افزایش زیست‌سازگاری نیوزوم، فسفاتیدیل کولین سویا در مقادیر مختلف (۵٪ و ۱۵٪) به فرمولاسیون افزوده شد و نتایج در جدول ۴ نمایش داده شده است. همانطور که مشاهده می‌شود با افزایش میزان فسفاتیدیل کولین سویا بارگذاری اسانس بهبود یافته است. این افزایش برای اسانس پونه بیشتر از اسانس نعناع بوده است.

نیوزوم‌ها ذراتی هستند که گرچه در مقایسه با لیپوزوم‌ها مزایای زیادی همانند افزایش ظرفیت درون‌گیری عوامل دارویی و پایداری دارند ولی زیست‌سازگاری لیپوزوم‌ها به دلیل هم‌جنس بودن با غشای سلول عاملی است که جایگزینی لیپوزوم با هر حامل دیگری را با تردید روبرو

جدول ۴- بررسی اثر میزان فسفولیپید فرمولاسیون نیوزومی بر روی بازده درون‌گیری اسانس

فرمول	میزان فسفاتیدیل کولین سویا	بازدهی درون‌گیری اسانس نعناع	بازده درون‌گیری اسانس پونه
۷	۵	%۴۰/۶۸	%۴۱/۹۴
۸	۱۵	%۶۱/۳۶	%۷۴/۳۱

#### مشخصه‌یابی فرمولاسیون بهینه

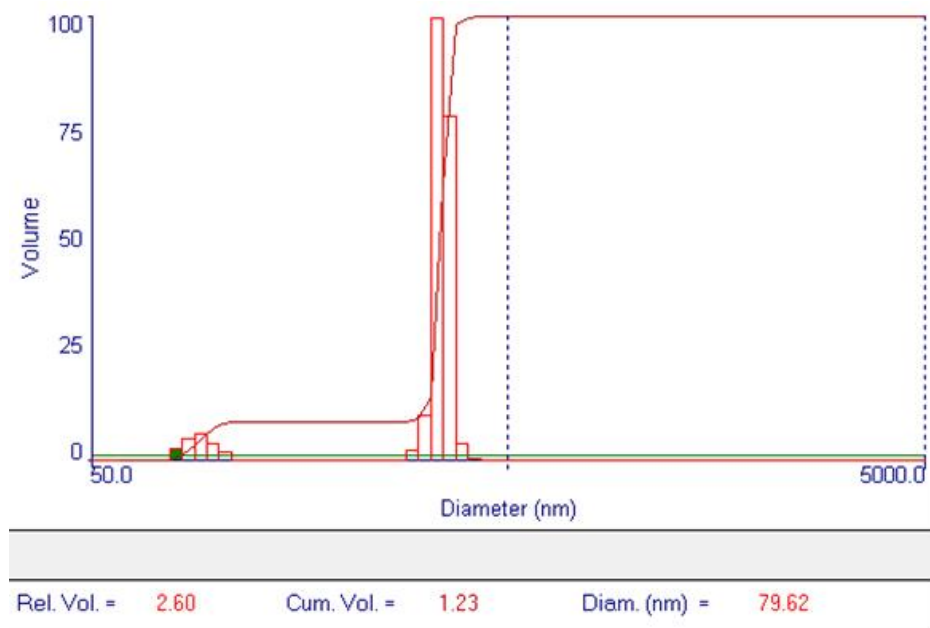
کولین سویا، ۳۰٪ کلسترول و ۵۵٪ توئین ۶۰ می‌باشد و غلظت اسانس بارگذاری شده ۰/۵mg/mL می‌باشد. میزان بازده درون‌گیری اسانس نعناع و پونه در این فرمولاسیون

فرمولاسیون بهینه برای هر دو اسانس نعناع و پونه، فرمولاسیون شماره ۸ می‌باشد که حاوی ۱۵٪ فسفاتیدیل

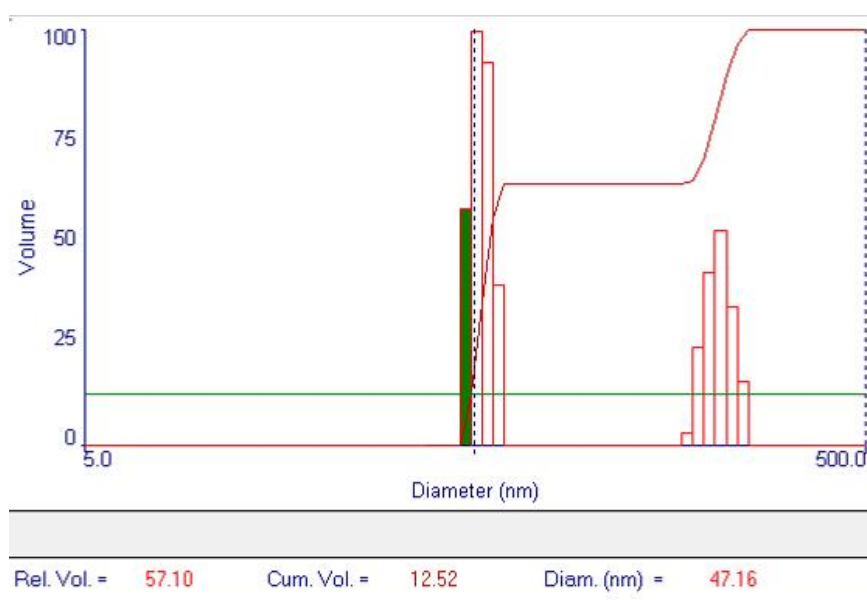
میانگین اندازه ذرات و شارژ سطحی ذرات حاوی اسانس پونه نیز به ترتیب  $47/16$  نانومتر و  $38/74 \pm 0/17$  تعیین شد. نتایج در شکل‌های ۱ و ۲ نشان داده شده است. براساس نتایج، ذرات تهیه شده آنیونی می‌باشند.

به ترتیب  $61/36\%$  و  $74/31\%$  بدست آمد. همچنین پتانسیل زتا و قطر ذرات که به وسیله سونیکیت حمامی کاهش سایز داده شده بودند توسط دستگاه زتا سایز تعیین شد. به این ترتیب اندازه ذرات و شارژ سطحی نانو نیوزوم‌های حاوی اسانس نعناع  $79/62$  نانومتر و  $46/11 \pm 0/52$  می‌باشد.

(الف)

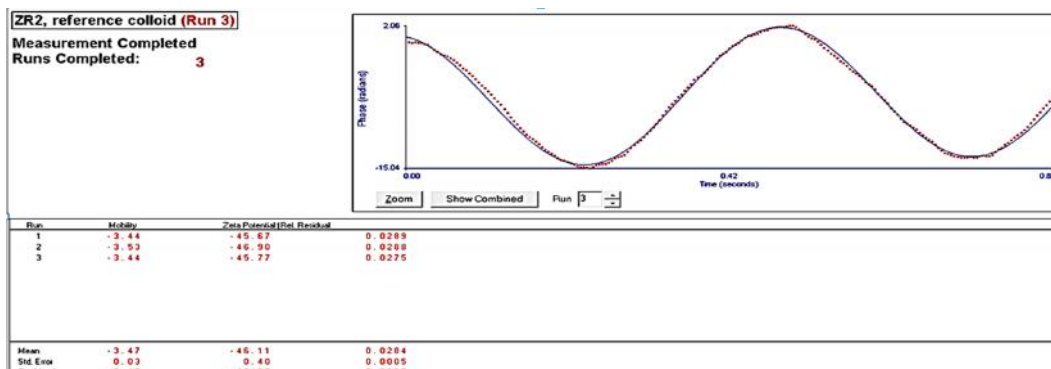


(ب)

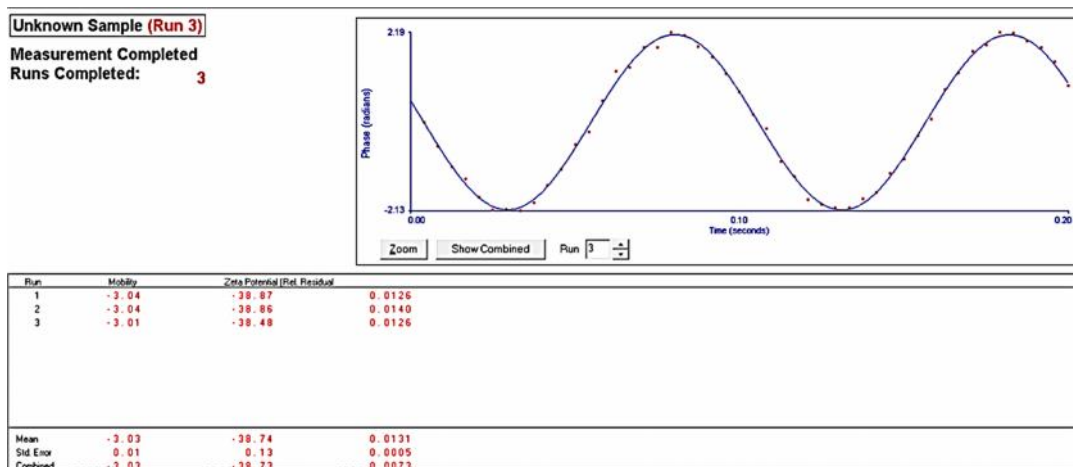


شکل ۱- اندازه نیوزوم حاوی اسانس نعناع (الف) و پونه (ب)

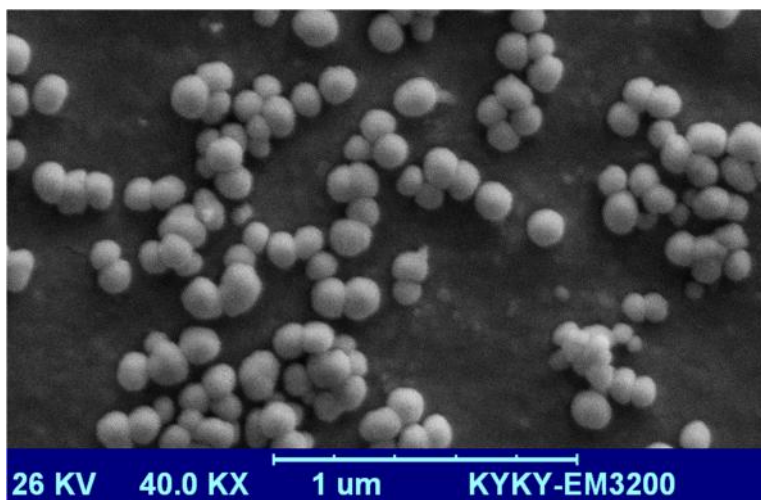
(الف)



(ب)



شکل ۲- شارژ سطحی نیوزوم حاوی اسانس نعناع (الف) و اسانس پونه (ب)



شکل ۳- مورفولوژی سطحی نانو ذره



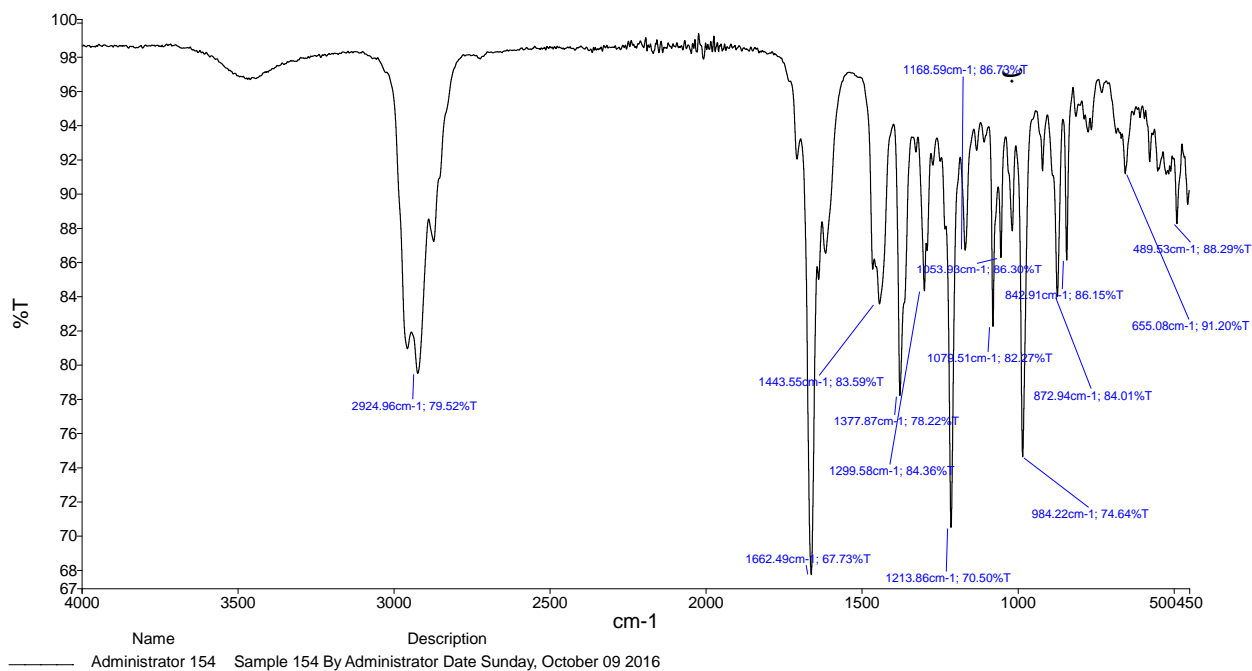
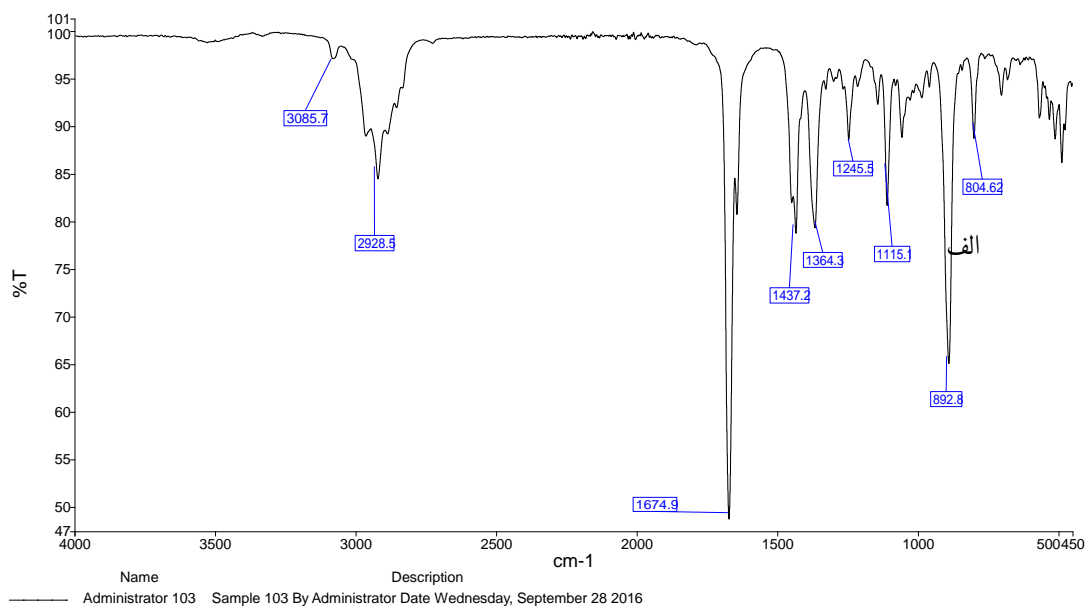
## مورفولوژی سطحی نانونیوزوم

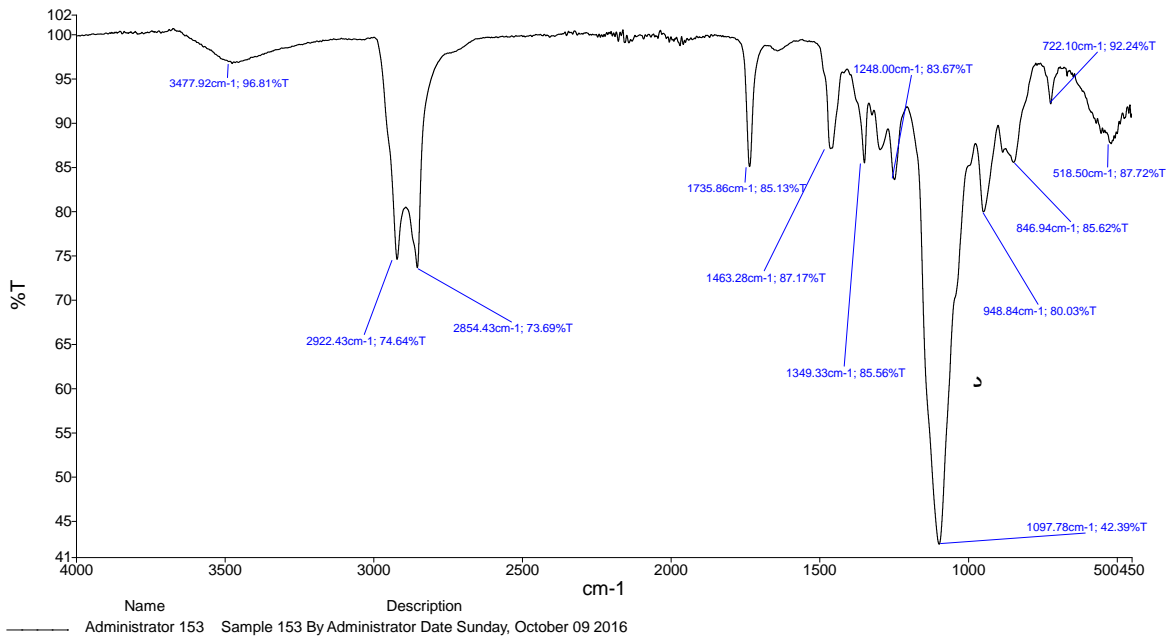
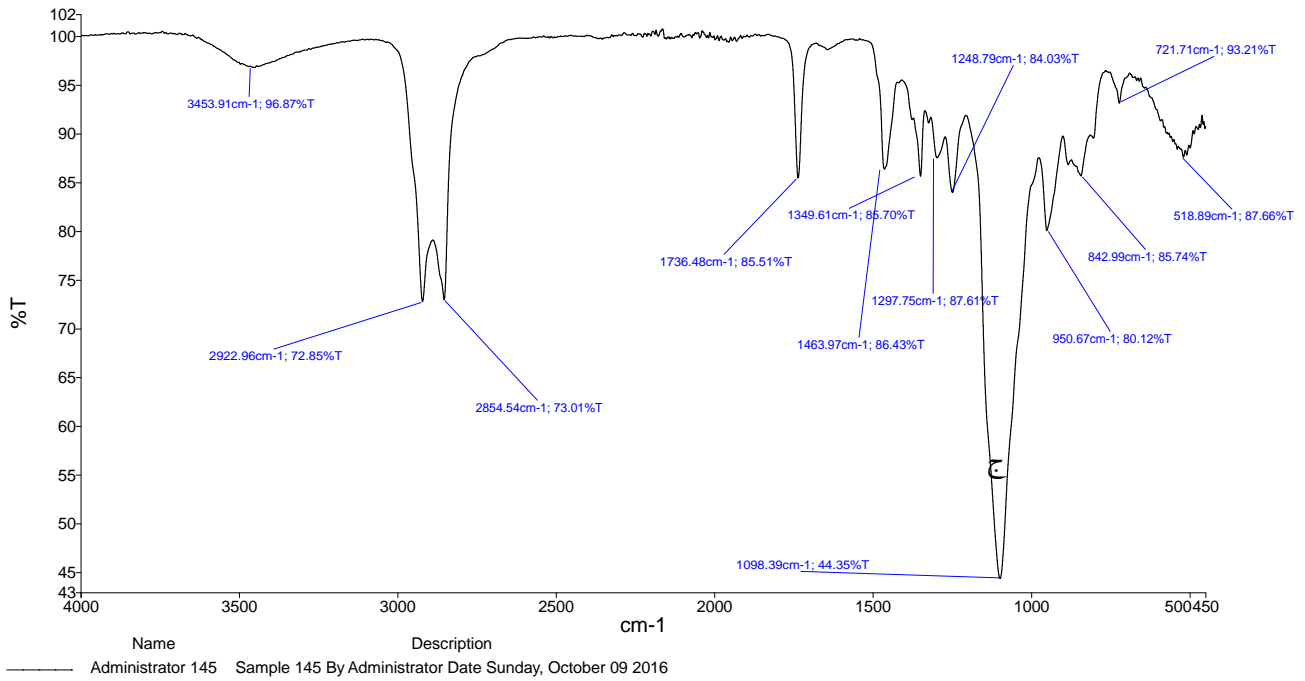
مورفولوژی سطحی نانو ذرات توسط دستگاه میکروسکوپ الکترونی روشی تصویربرداری شد. شکل ۳ نانو ذرات تهیه شده را نشان می دهد که به صورت توده ای و کروی شکل، یکنواخت و با مرز خارجی مشخص هستند. همچنین تأیید می شود که اندازه ذرات تهیه شده کمتر از ۱۰۰ نانومتر می باشد.

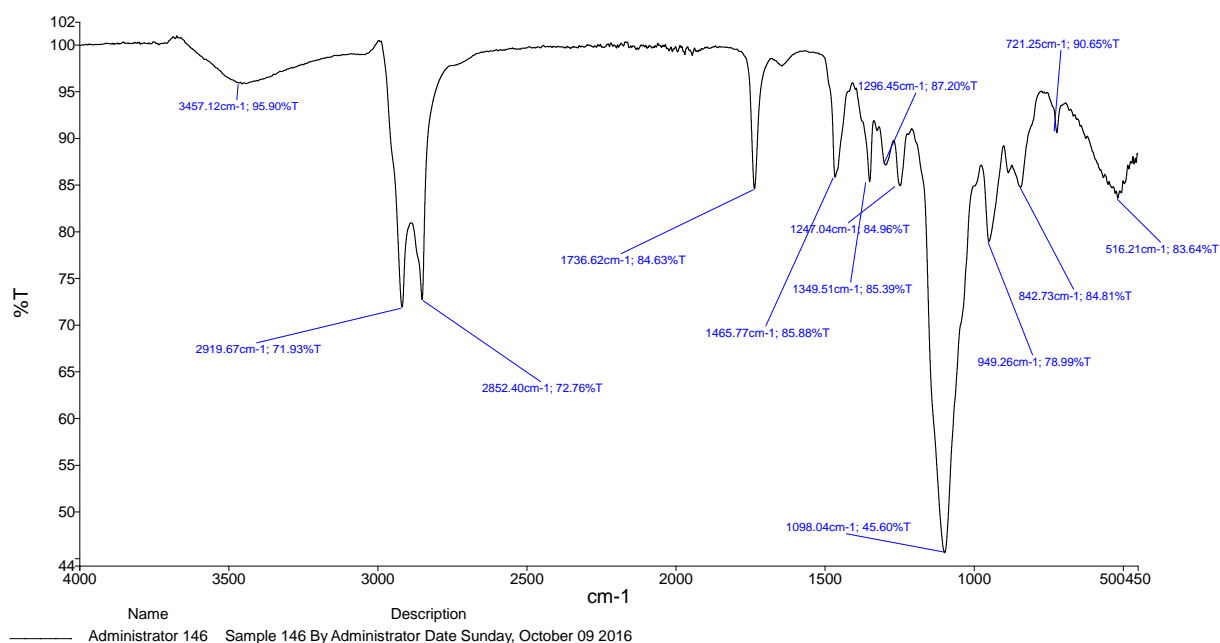
## طیف سنجی مادون قرمز نانو ذره حاوی اسانس

طیف مادون قرمز نیوزوم بدون اسانس، نیوزوم حاوی اسانس نعناع و پونه و همچنین اسانس آزاد پونه و نعناع بدست آمد (نتایج شکل ۴). تحلیل طیف های FTIR بدست آمده از نمونه ها در محدوده  $500\text{cm}^{-1}$  -  $4000\text{cm}^{-1}$  نشان می دهد که باند در محدوده  $3000\text{cm}^{-1}$  -  $3400\text{cm}^{-1}$  مربوط به گروه هیدروکسیل ترکیب های فنولی و الکلی است که هم در ترکیب های اصلی هر دو اسانس (منتول و اکتان-۳-ال) وجود دارد و هم توئین ۶۰ و کلسترول وجود دارد که جابه جایی آن در سایر پیک ها احتمالاً به دلیل رخ دادن پیوند هیدروژنی می باشد. پیک در محدوده  $2919\text{cm}^{-1}$  -  $2922\text{cm}^{-1}$  مربوط به گروه کششی متقارن متیل می باشد (برای اسانس ها مربوط به گروه متیل  $\text{C}(\text{CH}_3)_2$  می باشد). پیک در مرکزیت  $2852\text{cm}^{-1}$  مربوط به حضور ارتعاشی متقارن گروه اتیل می باشد. گروه عاملی  $\text{C}=\text{O}$  استری در پیک در محدوده  $1736\text{cm}^{-1}$  خود را نشان داده است. پیک های در حدود  $1662\text{cm}^{-1}$  و  $1674\text{cm}^{-1}$  به ترتیب مربوط به گروه کتونی  $\text{C}=\text{O}$  در پیریتون و پولگون اسانس پونه و منتون اسانس نعناع می باشد. پیک در محدوده  $1433\text{cm}^{-1}$  تا  $1437\text{cm}^{-1}$  مربوط به هر دو

اسانس وابسته به حضور ارتعاشات نامتقارن دفرمیشن دفرمیشن  $\text{CH}_3$ - و  $\text{CO}-\text{CH}_2$  می باشد. پیک در محدوده  $1465\text{cm}^{-1}$  مربوط به خمشی  $\text{CH}_2$ - در سورفکتنت و فسفولیپید می باشد. پیک در حدود  $1349\text{cm}^{-1}$  و  $1248\text{cm}^{-1}$  به ترتیب مربوط به حضور پیوند نوسانی  $\text{C}-\text{H}$  و کششی الکیل  $\text{C}-\text{N}$  می باشد. پیک در حدود  $1098\text{cm}^{-1}$  مربوط به حضور گروه های استری و اتری در توئین ۶۰ می باشد. پیک های  $1364\text{cm}^{-1}$  و  $1377\text{cm}^{-1}$  به ترتیب مربوط به گروه ایزوپروپیل منتول در اسانس نعناع و  $\text{C}-\text{H}$  دفرمیشن متقارن  $\text{CH}-\text{CH}_3$  در ایزومنتون و پولگون اسانس پونه می باشد. پیک در محدوده  $1050\text{cm}^{-1}$  تا  $1245\text{cm}^{-1}$  مربوط به  $\text{C}-\text{O}$  گروه های استری و اتری مربوط به ترکیب های منتوفوران و متیل استات اسانس نعناع می باشد. در مورد اسانس پونه پیک های در محدوده  $1213\text{cm}^{-1}$  نیز مربوط به ارتعاشات دفرمیشن  $\text{C}-\text{H}$  می باشد. پیک در مرکزیت  $950\text{cm}^{-1}$  مربوط به باند  $(\text{CH}_3)_3\text{N}^+$  در فسفولیپید می باشد. پیک در محدوده  $840\text{cm}^{-1}$  در طیف نیوزوم احتمالاً مربوط به حضور پیوند کششی نامتقارن  $\text{PO}$  گروه فسفولیپید می باشد. پیک در محدوده  $720\text{cm}^{-1}$  نیز مربوط به  $\text{C}-\text{H}$  آلکان ها می باشد. طبق نتایج، گرچه برخی پیک ها پهن تر گردیده اند و یا جابه جایی در برخی پیک ها رخ داده است ولی هیچ گونه پیک جدیدی ایجاد نشده است و نیوزوم ساخته شده هیچ برهم کنش شیمیایی با اسانس نداشته است. بنابراین بارگذاری اسانس درون نیوزوم فیزیکی و بازگشت پذیر بوده است و هیچ پیوند شیمیایی جدیدی ایجاد نشده است (Kanakis et al., 2012; Naderinezhad et al., 2017; Trivedi et al., 2015).





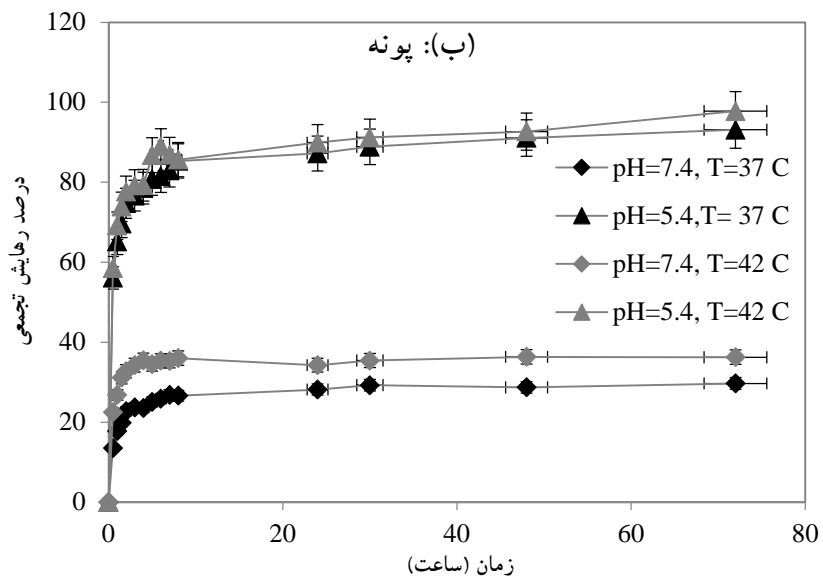
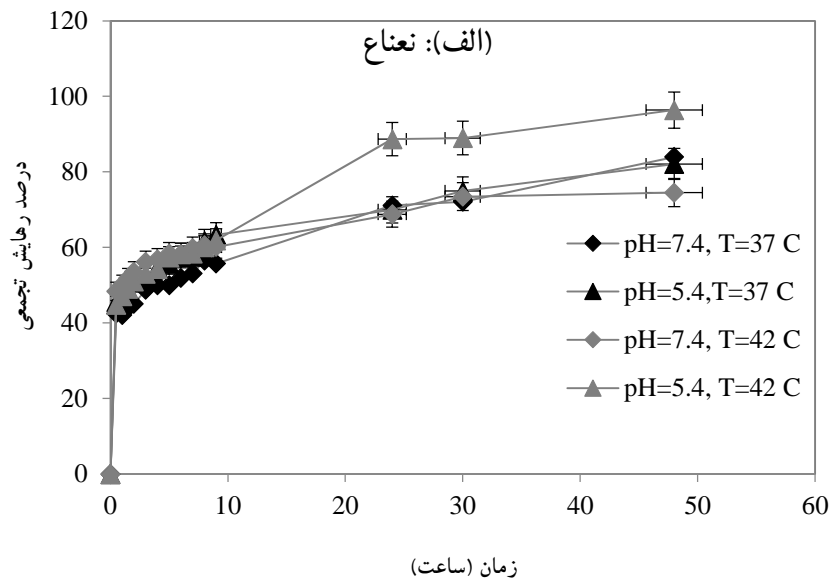


شکل ۴- طیف مادون قرمز اسانس آزاد نعناع (الف)، اسانس آزاد پونه (ب)، نیوزوم حاوی اسانس نعناع (ج)، نیوزوم حاوی اسانس پونه (د)، نیوزوم بدون اسانس (ی)

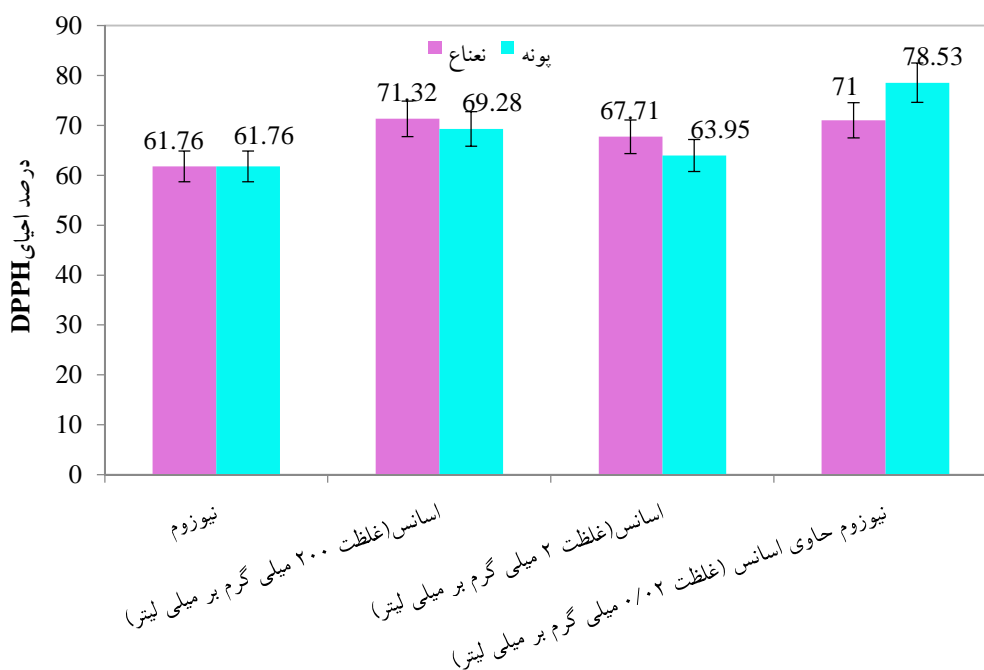
بدین ترتیب نتیجه‌گیری می‌شود که رهایش اسانس از نانو ذره علاوه بر اینکه تابع فرمولاسیون است بلکه تابع نوع ترکیب فعال دارویی (نوع اسانس) نیز می‌باشد.

مقایسه خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسانس آزاد و محصور شده آزمایش آنتی‌اکسیدان DPPH برای اسانس آزاد و محصور شده نعناع و پونه در غلظت‌های مختلف انجام شد. نتایج (شکل ۶) نشان می‌دهد که خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسانس نعناع و پونه در طول زمان انکپسولاسیون حفظ شده است. همچنین کاهش غلظت اسانس باعث کاهش خاصیت آنتی‌اکسیدانی شده است.

بررسی پروفایل وابسته به دما و pH رهایش اسانس رهایش سامانه حاوی اسانس در دو pH=۷/۴ و pH=۵/۴ و دو دمای ۳۷ و ۴۲ درجه سلسیوس مورد بررسی قرار گرفت (شکل ۵). در هر دو دمای ۳۷ و ۴۲ درجه سلسیوس، سامانه در pH=۵/۴ رهایش بیشتری داشته است و نیز مشاهده شد که در دمای ۴۲ درجه سلسیوس رهایش در هر دو pH در مقایسه با دمای ۳۷ درجه سلسیوس بیشتر می‌باشد. زیرا با افزایش دما فاصله بین فسفولیپیدها افزایش یافته و رهایش اسانس بیشتر می‌گردد. بنابراین نتیجه‌گیری می‌شود که سامانه در دمای ۳۷ درجه سلسیوس و pH=۷/۴ پایدارتر بوده است. رهایش اسانس پونه بیشتر وابسته به دما و pH است.



شکل ۵- سینتیک رهایش اسانس نعناع (الف) و پونه (ب) از سامانه نیوزومی در شرایط دمایی و pH مختلف



شکل ۶- مقایسه خاصیت آنتی‌اکسیدانی اسانس پونه و نعناع به صورت آزاد و محصور شده

## بحث

از اسانس باید به فکر یافتن روشی بود که بتوان کارایی آن را افزایش داد. یکی از مهمترین روش‌ها، استفاده از فرمولاسیون جدید و ایجاد تغییراتی در آن است تا بتوان کیفیت و میزان تأثیر آن را افزایش داد. انتخاب فرمولاسیون بستگی به عوامل فیزیکی، شیمیایی، خواص زیستی اسانس، نحوه اثر و چگونگی کاربرد آن دارد. طبق مطالعات انجام شده فرمولاسیون دارای رهایش کنترل شده بهترین گزینه می‌باشد. از این رو انکپسوله کردن اسانس به شکل نانو باعث ایجاد توانایی رهایش کنترل شده و موجب افزایش تأثیر درمانی و فعالیت زیستی طولانی‌تر می‌شود.

نانونیوزوم‌ها حامل‌های دارویی هستند که ترکیب دارویی را در مقابل تخریب حفاظت می‌کنند و باعث افزایش بازدهی اثرگذاری، کاهش میزان فرآریت اسانس‌ها و کاهش اکسیدشوندگی آنها می‌شوند. انکپسولاسیون، حساسیت ترکیب‌های فعال گیاهی را در برابر حرارت، رطوبت و pH محافظت می‌کند و در هنگام نیاز آنها را رها می‌سازد. مواد انکپسوله شده در واکنش به یک محرک منتشر شده و در نتیجه آنها را قادر می‌سازد تا به صورت کنترل شده در محل

فرآورده‌های گیاهی متنوع، خاصیت ضدسرطانی قوی، مؤثر و بی‌خطر دارند و می‌توانند به عنوان ترکیب‌های ضدسرطان در نظر گرفته شوند. مؤثر بودن ترکیب‌های بدست آمده از گیاهان در پیشگیری و یا درمان سرطان، بر روی سلول‌های سرطانی کشت داده شده در آزمایشگاه و نیز بعضی مدل‌های آزمایشگاهی مشخص شده است (Bayala *et al.*, 2014; Gautam *et al.*, 2014). برای افزایش شاخص درمانی، افزایش غلظت دارو در سلول‌های توموری و کاهش اثر بر بافت‌های طبیعی، از سیستم‌های دارورسانی استفاده می‌شود که از روش‌های موفق و مدرن دارورسانی فناوری نانو می‌باشد (Koochi Moftakhari Esfahani & Alavi, 2014).

اثربخشی بسیاری از گیاهان دارویی وابسته به ذخیره ترکیب‌های فعال است. بسیاری از ترکیب‌های فعال بیولوژیکی، مانند فلاونوئیدها، تانن‌ها و تریپنئوئیدها در آب محلول هستند اما دارای جذب پایینی هستند، زیرا کاملاً قادر به عبور از غشای چربی سلول‌ها نیستند. قبل از استفاده

هدف آزاد کند.

پیش‌تر در آزمایشی میکروانکپسولاسیون اسانس با روش امولوسیون اکستروژن به منظور کاهش فرآریت آن انجام و گزارش شد که انکپسوله‌سازی در میکروسفرهای کلسیم آلزینات به‌طور مؤثر می‌تواند به کاهش میزان تبخیر اسانس و در نتیجه منجر به افزایش فعالیت ضدقارچی آن شود (Soliman et al., 2013). در پژوهشی دیگر از حامل پرونیوزومال برای کاندسارتان به‌منظور درمان فشار خون بالا استفاده شد. کاندسارتان سیلکستیل یک گیرنده آنژیوتانسین II است. ژل پرونیوزومال با استفاده از لسیتین و کلسترول، سورفاکتانت و اسپن فرموله شد و اندازه ذرات در محدوده ۲۷۷/۷-۱۷۵/۰ نانومتر بدست آمد. ساختار مشاهده شده در میکروسکوپ نوری نشان داد که ذرات همگن بوده و دارای ساختار کروی می‌باشند، همه فرمول‌ها میزان رهايش صفر را نشان دادند و بررسی پایداری نشان داد که ژل پرونیوزومال در دمای ۴ تا ۸ درجه سلسیوس پایدار است (Mittal et al., 2013).

Yin و Faustman (۱۹۹۳) مدل لیپوزومی اکسی‌میوگلوبین را به‌منظور بررسی اثر pH استفاده کردند. آماده‌سازی تمام مراحل در دمای ۴ درجه سلسیوس، در pH=۵/۶ بافر سدیم سیترات، pH=۶/۴ و pH=۷/۲ بافر سدیم فسفات انجام شد. اندازه‌گیری اکسیداسیون لیپوزوم اکسی‌میوگلوبین در چهار درجه حرارت ۲۰، ۱۰، ۴ و ۳۷ درجه سلسیوس و سه pH ۷/۲، ۶/۰، ۶/۴ انجام شد. در سیستم لیپوزوم اکسی‌میوگلوبین در محیط دارای pH پایین، اکسیداسیون فسفولیپید و اکسی‌میوگلوبین سریع‌تر اتفاق افتاد. آنان نشان دادند که پایداری اکسی‌میوگلوبین در محیط اسیدی با کاهش pH کاهش می‌یابد. نتایج نشان داد که pH محیط، پیکربندی ساختار سوم گلوبین را به‌ویژه در اطراف منطقه هم تحت تأثیر قرار می‌دهد. در pH پایین ساختار سوم گلوبین از هم باز می‌شود و پروتئین هم در معرض محیط خارجی قرار می‌گیرد، در نتیجه منجر به کاهش پایداری پروتئین و افزایش اکسیداسیون می‌شود (Yin & Faustman, 1993).

دوکسوروبیسین یک داروی ضدسرطان آنتراسیکلین است که به‌طور موفقیت‌آمیز توسط Sanson و همکاران (۲۰۱۰)، درون وزیکول پلیمری پلی (تری‌متیل‌کربنات) (L-گلوتامیک اسید) (b\_PGA) (PTMC) توسط روش جایگزینی حلال بارگذاری شد. بررسی شرایط pH نشان داده است که تأثیر زیادی در ظرفیت بارگیری و نفوذ داشته است و بارگذاری دارو در pH=۱۰/۵ قابل توجه بوده است. در شرایط pH بازی در مقایسه با شرایط pH خنثی، وزیکول‌های حاوی دارو برای مدت طولانی‌تری (حدود ۶ ماه) پایدار می‌ماند. نتایج نشان داد که افزایش pH محلول بالاتر از pka دوکسوروبیسین، در طول فرایند بارگذاری می‌تواند ظرفیت بارگیری حامل را به‌وسیله کاهش حلالیت دارو بیشتر کند. آنان اشاره کردند که پارامتر انحلال‌پذیری غشاء به پارامتر انحلال‌پذیری دوکسوروبیسین مرتبط است. در زمانی که مولکول‌های دوکسوروبیسین بهم پیوسته باشند، بازده بارگذاری افزایش می‌یابد. محل و جایگاه دوکسوروبیسین پلیمرز به شدت به شرایط بارگذاری بستگی دارد. در بررسی اندازه ذرات یافتند که در pH=۷/۴ اندازه وزیکول‌ها بزرگتر از pH=۱۰/۵ است. همچنین در بررسی پروفایل رهايش، الگوی حساس به pH و دما را گزارش کردند (Sanson et al., 2010).

استفاده از pH برای افزایش بارگذاری دوکسوروبیسین توسط Kataoka و همکاران (۲۰۰۰) بررسی شد که یک محلول کلروفرمی از دوکسوروبیسین حاوی تری‌اتیل آمین را به محلول آبی میسلی اضافه کردند. تری‌اتیل آمین مورد استفاده منجر به دیپروتونه شدن دوکسوروبیسین در کلروفرم و در ادامه افزایش بارگذاری دوکسوروبیسین در هسته هیدروفوب مایسل گردید. آنان با بررسی pka پروتئین‌های آمینوگلیکوزیدی، دریافتند که دیپروتونه شدن گروه‌های آمینی در pH بالاتر از ۷ اتفاق می‌افتد و این افزایش pH موجب کاهش بارگذاری دارو می‌گردد. با جدا شدن گروه OH از حلقه آنتراسیکلین تجزیه دوکسوروبیسین اتفاق می‌افتد و در واقع کنترل pH در فرایند بارگذاری دوکسوروبیسین پراهمیت است (Kataoka et al., 2000).

که در این موقعیت گروه آسپیل که در دم قرار دارد، طوری قرار می‌گیرد که هم بیشترین تماس ایجاد شود و هم فضاهای خالی را کمتر کند. وجود کلسترول در غشاء، ساختار نانو ذره و جهت‌گیری زنجیره‌های آسپیل در دو لایه لیپیدی را تغییر می‌دهد. برهم‌کنش بین فسفولیپید و سورفکتنت با کلسترول باعث افزایش چسبندگی غشاء و همچنین سختی غشاء می‌شود. هرچه پیوندهای هیدروژنی بین گروه هیدروکسیل کلسترول و گروه کربونیل فسفولیپید بیشتر باشد، پایداری دو لایه لیپیدی بیشتر است. قرار گرفتن کلسترول در دو لایه، باعث افزایش تراکم مولکول‌های فسفولیپیدی شده و همچنین منجر به سختی ساختار می‌شود، به نحوی که با افزودن کلسترول سیالیت و زیکول‌ها کاهش می‌یابد و ماندگاری نانو دارو افزایش می‌یابد (Haghiralsadat *et al.*, 2016).

در پژوهش‌های پیشین، فرمولاسیون نیوزومال حاوی جنتامایسین با استفاده از سورفکتنت‌های مختلف در حضور کلسترول و القای بار منفی فسفات در نسبت مولی مختلف، به روش فیلم نازک لیپیدی آماده شد. آنان محلول جنتامایسین سولفات را درون نیوزوم ساخته شده از سورفکتنت‌های توئین ۶۰، توئین ۸۰ و Brij 35، در حضور کلسترول و دی‌استیل فسفات محصور کردند. آنان دریافتند که زیکول ساخته شده از توئین ۶۰ بازدهی نفوذپذیری بالاتری نسبت به نیوزوم ساخته شده با توئین ۸۰ و Brij35 دارد و توضیح دادند که زنجیره استریل (c18) توئین ۶۰ و زنجیره اوریل (c12) بر بازدهی بارگذاری دارو اثرگذار هستند، به این علت که زنجیره آلکیل بر مقدار HLB (Hydrophile-Lipophile Balance) سورفکتنت تأثیر می‌گذارد و با کاهش مقدار HLB سورفکتنت، بازدهی محصورسازی بیشتر می‌گردد. توئین ۶۰ دارای HLB=14/9 و Brij35 دارای HLB بالای ۹/۱۶ است. توئین ۸۰ دارای یک زنجیر آلکیل غیراشباع است و وجود باند دوگانه در زنجیره باعث خم شدن زنجیره می‌شود که در نهایت منجر به سستی غشای نیوزومی تشکیل شده از توئین ۸۰ می‌شود و نسبت به دو سورفکتنت دیگر بارگذاری داروی کمتری دارد.

در این پژوهش، در مرحله هیدراتاسیون از آب استریل تزریق و بافر PBS در سه حالت pH=۷ و pH=۹ و pH=۵ استفاده شد. مشاهدات حکایت از این داشت که در pH=۹ بارگذاری اسانس بیشتر است و در دو حالت pH=۷/۴ و pH=۵ بارگذاری اسانس کمتر و مشابه یکدیگر بوده است. این مشاهده در حالت اسیدی و خنثی به دلیل دو پدیده متفاوت می‌باشد. در حالت اسیدی غشاء ناپایدار است، گرچه موقع هیدراتاسیون این ناپایداری مزیت محسوب می‌شود و باعث می‌شود در این مرحله غشاء شل و نفوذپذیر باشد و اسانس زیادی وارد گردد ولی در مراحل بعد آماده‌سازی، به دلیل ناپایداری غشاء، اسانس نشت می‌کند و بازدهی درون‌گیری نهایی کم می‌شود. در حالت خنثی ولی به نظر می‌رسد به دلیل تعادل طرفین غشاء از نظر بار یونی، تبادل کمتری رخ بدهد که این موجب می‌شود اسانس کمتری وارد و زیکول شود. به‌طور کلی فیلم‌های سورفکتنتی هیدراته شده با بافر در درون‌گیری اسانس موفق‌تر از آب استریل هستند، این اتفاق به دو دلیل می‌تواند باشد، ۱- بافر به دلیل مقاومت به تغییر pH، غشای مقاوم‌تری را می‌سازد که در مقابل نوسانهای محیط بیرون مقاوم‌تر است و نشت را کم می‌کند و ۲- ماهیت بافر از نمک‌هایی با یون‌های مختلف تشکیل شده است. از این رو بهتر می‌تواند ترکیب‌های چربی‌دوستی را از سطح بالون جدا کند و زیکول‌های نیوزومی را تشکیل دهد.

یکی دیگر از اهداف این تحقیق، بررسی استفاده از سورفکتنت‌های مختلف در تشکیل نیوزوم است. رایج‌ترین نوع سورفکتنت مورد استفاده در آماده‌سازی و زیکول‌ها، سورفکتنت‌های غیر یونی به دلیل داشتن استحکام، سازگاری بهتر و سمیت پایین است. استفاده از سورفکتنت‌های غیر یونی به‌طور کلی با افزایش تجمع ترکیب دارویی، افزایش نفوذپذیری، کاهش کشش سطحی، کاهش اندازه ذرات و از همه مهمتر پایداری ترکیب دارویی همراه است. در غشاهای نیوزومی علاوه بر سورفکتنت‌ها از فسفاتیدیل کولین نیز استفاده می‌شود. فضاهای خالی در ساختار وجود دارد که به دلیل حضور گروه‌های قطبی بزرگ در سر فسفولیپید است



طولانی تری گلیسرید سبب کاهش انحلال پذیری آن در آب می شود، در نتیجه می تواند از افزایش اندازه ذرات امولسیون اوژینول جلوگیری کند. در ادامه دریافتند امولسیون تهیه شده از توئین ۸۰ همراه با مقدار کمی از اسانس پایداری بیشتری در مقایسه با امولسیون تهیه شده با سورفکتانت سدیم دو دسیل سولفات دارد. به طور مشابه در این پژوهش فرمولاسیون حاوی توئین ۸۰ در بارگذاری اسانس موفق تر بوده است (Li et al., 2015).

در این پژوهش روش مورد استفاده در سنتز نانوذرات روش آب پوشانی لایه نازک است که از جمله ویژگی های آن سادگی، بازدهی بالا برای ترکیب های چربی دوست، انعطاف پذیری بالا، سایز کوچک ذرات، عدم تخریب ترکیب داروی و حذف صد درصد حلال آلی و عدم سمیت فرمولاسیون می باشد (Amoabediny et al., 2017)؛ (Naderinezhad et al., 2017).

وابستگی پروفایل رهاش سامانه به pH و دما ترفندی است که از آن به عنوان هدفمندی غیرفعال یاد می شود. با استفاده از این تکنیک اثرات درمانی اسانس های گیاهی در نواحی سلول های سرطانی افزایش می یابد و بازدهی درمان به حداکثر می رسد.

در بدن انسان واکنش های بیوشیمیایی زیادی تولید اکسیژن فعال می کند که قادر به تخریب بیومولکول ها هستند. اثرات زیان بخش اکسیژن را می توان توسط آنتی اکسیدان ها بلوکه کرد. آنتی اکسیدان های مصنوعی سمی بوده و دارای اثرات سوء تغذیه ای هستند. گیاهان یکی از منابع مهم آنتی اکسیدان ها هستند و باعث حفظ سلول ها از آسیب های اکسیداتیو می شوند.

در تحقیقی دیگر به بررسی ظرفیت آنتی اکسیدان عصاره های مختلف اندام هوایی گیاه *Astragalus murinus* Boiss پرداخته شده است. به منظور بررسی اثر آنتی اکسیدانی از دو روش DPPH و TEAC استفاده گردید. در روش DPPH عدد IC<sub>50</sub> برای عصاره تام، کلروفومی، پلی فنلی و آبی به ترتیب ۰/۳۳۶، ۰/۸۰۴، ۰/۲۱۲ و ۰/۸۳۶ میلی گرم بر لیتر و در روش TEAC عدد بدست آمده برای عصاره

استفاده از کلسترول در فرمولاسیون باعث ایجاد پایداری نیوزوم و جلوگیری از نشت داروی محصور شده می شود. آنان از دی استیل فسفات برای جلوگیری از توده ای شدن و بهم پیوستگی نیوزوم ها استفاده کردند و دریافتند که نیوزوم ساخته شده با توئین ۶۰، کلسترول و دی استیل فسفات با نسبت ۵/۰: ۱:۱ بالاترین میزان بارگذاری دارو را دارد (Abdelbary & El-gendy, 2008).

سورفکتانت مورد استفاده در این تحقیق، استر اسید چرب سوربیتان می باشد که به نام اسپن شناخته شده است. اسپن با زنجیره آلکیل طویل تر منجر به بهره وری بالای به دام افتادن ترکیب دارویی می شود. اسپن ۶۰ به دلیل دارا بودن دمای گذر فاز ژل-مایع (TC) بالا (۵۳°C)، فرآیند به دام افتادن دارو را بهتر انجام می دهد (Yadav et al., 2010). نوع دیگری از سورفکتانت های غیر یونی مورد استفاده در این تحقیق با نام عمومی پلی سوربات و نام تجاری توئین شناخته شده است. توئین ها از پلی سوربات پگیله شده با استر های اسید چرب سوربیتان تحت فرآیند اتوکسی دار شدن به وجود می آیند. طی تحقیقات انجام شده، فیلم ساخته شده از توئین ۶۰ نسبت به اسپن ۶۰ بهتر هیدراته می شود و میزان بارگذاری اسانس در وزیکول بیشتر می شود که علت آن را می توان به بزرگتر بودن طول زنجیره هیدروکربنی موجود در توئین ۶۰ نسبت داد. زیرا هرچه طول زنجیره هیدروکربنی بیشتر باشد، حلالیت در چربی نیز بیشتر بوده، در نتیجه نفوذ پذیری بین لایه ها افزایش یافته و اسانس بیشتری به دام می افتد. علت دیگر بارگذاری بالای اسانس درون وزیکول تشکیل شده از توئین ۶۰، عامل پگیله چسبیده به زنجیره توئین است که هم باعث پایداری، هم کاهش سایز و هم بارگذاری بالای دارو می شود (Naderinezhad et al., 2017).

در بررسی اثر سورفکتانت های مختلف Li و همکاران (۲۰۱۵)، امولسیون اوژینول را با استفاده از دو سورفکتانت سدیم دو دسیل سولفات و توئین ۸۰ تهیه کردند. آنان با افزودن روغن لوبیا پایداری امولسیون را افزایش دادند و سایز ذرات را کاهش دادند. روغن لوبیا با داشتن زنجیره

همکاری‌های علمی سپاسگزاری می‌شود.

### منابع مورد استفاده

- Abdelbary, G. and El-gendy, N., 2008. Niosome-encapsulated gentamicin for ophthalmic controlled delivery. *AAPS PharmSciTech*, 9(3): 740-747.
- Ag Seleci, D., Seleci, M., Walter, J.G., Stahl, F. and Scheper, T., 2016. Niosomes as nanoparticulate drug carriers: fundamentals and recent applications. *Journal of Nanomaterial*, 2016: 1-13.
- Al-Sahlany, S.T.G., 2016. Effect of *Mentha piperita* essential oil against *Vibrio* spp. isolated from local cheeses. *Pakistan Journal of Food Sciences*, 26(2): 65-71.
- Amoabediny, G., Haghirsadat, F., Naderinezhad, S., Helder, M.N., Akhouni Kharanaghi, E., Mohammadnejad Arough, J. and Zandieh-Doulabi, B., 2017. Overview of preparation methods of polymeric and lipid-based (niosome, solid lipid, liposome) nanoparticles: a comprehensive review. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 67(6): 1-18.
- Asprea, M., Leto, I., Bergonzi, M.C. and Bilia, A.R., 2017. Thyme essential oil loaded in nanocochleates: Encapsulation efficiency, in vitro release study and antioxidant activity. *LWT-Food Science Technology*, 77: 497-502.
- Bayala, B., Bassole, I.H.N., Scifo, R., Gnoula, C., Morel, L., Lobaccaro, J.M.A. and Simporé, J., 2014. Anticancer activity of essential oils and their chemical components-a review. *American Journal of Cancer Research*, 4(6): 591-607.
- Benabdallah, A., Rahmoune, C., Boumendjel, M., Aissi, O. and Messaoud, C., 2016. Total phenolic content and antioxidant activity of six wild *Mentha* species (Lamiaceae) from northeast of Algeria. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 6(9): 760-766.
- Cristina, S., Trevisan, C., Pereira, A., Menezes, P. and Barbalho, S.M., 2017. Properties of *Mentha piperita*: A brief review. *World Journal of Pharmaceutical and Medical Research*, 3(1): 309-313.
- Gautam, N., Mantha, A.K. and Mittal, S., 2014. Essential oils and their constituents as anticancer agents: a mechanistic view. *BioMed Research International*, 2014: 1-23.
- Ge, Y. and Ge, M., 2016. Distribution of *Melaleuca alternifolia* essential oil in liposomes with Tween 80 addition and enhancement of in vitro antimicrobial effect. *Journal of Experimental Nanoscience*, 11(5): 345-358.
- Giampieri, R., Maccaroni, E., Mandolesi, A., Del Prete, M., Andrikou, K., Faloppi, L., Bittoni, A., Bianconi, M., Scarpelli, M. and Bracci, R., 2017.

تام، کلروفومی، پلی‌فنلی و آبی به ترتیب ۲۹/۳۸، ۱۴/۵۵، ۲۱/۲۹ و ۲۴/۲۲ میکرومول ترولوکس بر ۱۰۰ گرم ماده خشک گیاه بود. آنان دریافتند که عصاره‌های پلی‌فنلی دارای بیشترین اثر آنتی‌اکسیدانی هستند (Siahpoosh & Amraee, 2011).

نتایج ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی این تحقیق نشان می‌دهد که با وجود اینکه نیوزوم حاوی اسانس چندین مرتبه رقیق‌تر از اسانس آزاد است ولی خاصیت آنتی‌اکسیدانی آنها بیشتر بوده و در غلظت کم، درصد احیای DPPH بیشتری نشان داده‌اند، البته احتمالاً بخشی از خاصیت آنتی‌اکسیدانی، به دلیل خاصیت خود نیوزوم می‌باشد که در نمودار بدست آمده مشاهده می‌شود. گرچه ترکیب آنتی‌اکسیدان در اسانس نیوزومه و اسانس آزاد، هر دو یکسان است (اسانس نعنای و پونه) ولی جالب توجه است که غشای نیوزومی به دلیل خاصیت پوشش‌دهی، هم از فرار آنتی‌اکسیدان جلوگیری می‌کند، هم پوشش‌دهی مناسبی در برابر نور برای اسانس ایجاد می‌کند و همچنین از اکسید شدن آن جلوگیری می‌کند. احتمالاً این مسئله دلیل دیگری بر حفظ بیشتر فعالیت آنتی‌اکسیدانی اسانس در حالت انکپسوله می‌باشد.

همچنین با بررسی سامانه توسط آزمایش مادون قرمز و نبود پیک اضافه در نمودار مشخص شد که نیوزوم با اسانس برهم‌کنش شیمیایی نداشته و اسانس به صورت فیزیکی درون نیوزوم محصور است.

### سپاسگزاری

از سرکار خانم مریم ازدری (کارشناسی ارشد بیوشیمی - دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی شهید صدوقی یزد) برای همکاری در آزمایش ظرفیت آنتی‌اکسیدانی تقدیر می‌شود. از مسئولان محترم پژوهشکده پوشش‌های نانو ساختار پیام نور یزد و همچنین مرکز پژوهشی بیوتکنولوژی دارویی - پردیس بین‌الملل - دانشگاه علوم پزشکی شهید صدوقی به دلیل در اختیار قرار دادن امکانات آزمایشگاهی تشکر می‌شود. از شرکت ریز زیست‌فناوران فردانگر، برای

- nanoemulsions. *LWT-Food Science and Technology*, 62: 39-47.
- Londonkar, R.L. and Poddar, P.V., 2009. Studies on activity of various extracts of *Mentha arvensis* Linn. against drug induced gastric ulcer in mammals. *World Journal of Gastrointestinal Oncology*, 1: 82-88.
  - Mittal, S., Mittal, A., Sharma, K. and Alam, S., 2013. Proniosomes as a Drug Carrier for Transdermal Delivery of Candesartan Cilxetil. *International Journal of Nano Studies & Technology*, 2(2): 17-22.
  - Naderinezhad, S., Amoabediny, G. and Haghirsadat, F., 2017. Co-delivery of hydrophilic and hydrophobic anticancer drugs using biocompatible pH-sensitive lipid-based nano-carriers for multidrug-resistant cancers. *RSC Advances*, 7: 30008-30019.
  - Nieto, G., Huvaere, K. and Skibsted, L.H., 2011. Antioxidant activity of rosemary and thyme by-products and synergism with added antioxidant in a liposome system. *European Food Research and Technology*, 233: 11-18.
  - Sanson, C., Schatz, C., Le Meins, J.F., Soum, A., Thévenot, J., Garanger, E. and Lecommandoux, S., 2010. A simple method to achieve high doxorubicin loading in biodegradable polymersomes. *Journal of Controlled Release*, 147(3): 428-435.
  - Sharifi-Rad, J., Sureda, A., Tenore, G.C., Daglia, M., Sharifi-Rad, M., Valussi, M., Tundis, R., Sharifi-Rad, M., Loizzo, M.R. and Ademiluyi, A.O., 2017. Biological activities of essential oils: from plant chemoeology to traditional healing systems. *Molecules* 22: E70.
  - Sharma, V., Hussain, S., Gupta, M. and Saxena, A.K., 2014. In vitro anticancer activity of extracts of *Mentha* Spp. against human cancer cells. *Indian Journal of Biochemistry & Biophysics Journal*, 51(5): 416-419.
  - Siahpoosh, A. and Amraee, F., 2011. Antioxidant capacity of various extracts of *Asteragalus morinus* Boiss aerial parts. *Journal of Shahid Sadoughi University of Medical Sciences*, 19(4): 437-444.
  - Soliman, E.A., El-Moghazy, A.Y., El-Din, M.S.M. and Massoud, M.A., 2013. Microencapsulation of essential oils within alginate: formulation and in vitro evaluation of antifungal activity. *Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences*, 3: 48-55.
  - Trivedi, M., Patil, S., Mishra, R.K. and Jana, S., 2015. Structural and physical properties of biofield treated thymol and menthol. *Journal of Molecular Pharmaceutics & Organic Process Research*, 3(2): 1-10.
  - Varona, S., Martín, A. and Cocero, M.J., 2011. Liposomal incorporation of lavandin essential oil by a thin-film hydration method and by particles from gas-saturated solutions. *Industrial & Engineering Chemistry Research*, 50: 2088-2097.
  - Mismatch repair deficiency may affect clinical outcome through immune response activation in metastatic gastric cancer patients receiving first-line chemotherapy. *Gastric Cancer*, 20: 156-163.
  - Haghirsadat, F., Amoabediny, G., Forouzanfar, T., Akhoundi Kharanaghi, E., Helder, M.N. and Zandieh-doulabi, B., 2017. A comprehensive review of lipid-based nanoparticle preparation methods. *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, 67(6): 383-400.
  - Haghirsadat, F., Amoabediny, G., Sheikha, M.S., Forouzanfar, T., Helder, M.N. and Zandieh-doulabi, B., 2016. 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 Journal*, 19: 55-65.
  - Hess, L.M., Michael, D., Mytelka, D.S., Beyrer, J., Liepa, A.M. and Nicol, S., 2016. Chemotherapy treatment patterns, costs, and outcomes of patients with gastric cancer in the United States: a retrospective analysis of electronic medical record (EMR) and administrative claims data. *Gastric Cancer*, 19: 607-615.
  - Huang, S.C., Ng, K.F., Lee, S.E., Chen, K.H., Yeh, T.S. and Chen, T.C., 2016. HER2 testing in paired biopsy and excision specimens of gastric cancer: the reliability of the scoring system and the clinicopathological factors relevant to discordance. *Gastric Cancer*, 19: 176-182.
  - Kanakis, C.D., Petrakis, E.A., Kimbaris, A.C., Pappas, C., Tarantilis, P.A. and Polissiou, M.G., 2012. Classification of Greek *Mentha pulegium* L. (Pennyroyal) samples, according to geographical location by Fourier transform infrared spectroscopy. *Phytochemical Analysis*, 23: 34-43.
  - Kataoka, K., Matsumoto, T., Yokoyama, M., Okano, T., Sakurai, Y., Fukushima, S., Okamoto, K. and Kwon, G.S., 2000. Doxorubicin-loaded poly (ethylene glycol)-poly (L-benzyl-L-aspartate) copolymer micelles: their pharmaceutical characteristics and biological significance. *Journal of Controlled Release*, 64: 143-153.
  - Koohi Moftakhari Esfahani, M. and Alavi, S.E., 2014. Drug delivery of pegylated nanoliposomal paclitaxel to breast cancer cell line. *New Cellular and Molecular Biotechnology Journal*, 4: 47-50.
  - Li, S., Dai, S. and Shah, N.P., 2017. Sulfonation and antioxidative evaluation of polysaccharides from pleurotus mushroom and streptococcus thermophilus bacteria: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 16(2): 282-294.
  - Li, W., Chen, H., He, Z., Han, C., Liu, S. and Li, Y., 2015. Influence of surfactant and oil composition on the stability and antibacterial activity of eugenol

- Yin, M.C. and Faustman, C., 1993. Influence of temperature, pH, and phospholipid composition upon the stability of myoglobin and phospholipid: A liposome model. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 41: 853-857.
- Zawadzki, S.F., Perussello, C.A., Müller, P.S. and Scheer, A.P., 2016. Encapsulation efficiency and thermal stability of orange essential oil microencapsulated by spray drying and by coacervation. *Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, 34: 133-150.
- Weecharangsan, W., Sitthithaworn, W., Siripong, P., Sukma, M., Ngawhirunpat, T., Opanasopit, P., Thani, W., Vallisuta, O., Ruangwises, N. and Kongkathip, B., 2014. Cytotoxic activity of essential oils of *Mentha* spp. on human carcinoma cells. *Journal of Health Research*, 28: 9-12.
- Yadav, K., Yadav, D., Saroha, K., Nanda, S., Mathur, P. and Syan, N., 2010. Proniosomal Gel: A provesicular approach for transdermal drug delivery. *Der Pharmacia Lettre*, 2: 189-198.

## Synthesize of nanoparticle-based surfactants containing *Mentha piperita* L. and *Mentha pulegium* L. essential oil in order to study the essential oil release and antioxidant activity

M. Mazloom<sup>1</sup>, S. Naderinezhad<sup>2\*</sup>, F. Vahedian<sup>1</sup>, F. Haghirsadat<sup>3</sup> and F. Daneshmand<sup>4</sup>

1- M.Sc. student, Department of Biochemistry, Payame Noor University, Taft, Yazd, Iran

2\*- Corresponding authors, M.Sc Biotechnology, Department of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, School of Engineering, University of Tehran, Tehran, Iran, E-mail: s.naderinezhad@ut.ac.ir

3- Ph.D. in Nanobiotechnology, Faculty of New Science and Technologies, University of Tehran, Tehran, Iran

4- Department of Biology, Payam Nour University, Taft, Yazd, Iran

Received: April 2017

Revised: February 2018

Accepted: March 2018

### Abstract

Essential Oils (EO) are highly volatile compounds. Encapsulation of EO into the nano-carrier leads to reduced EO volatility and oxidation, as well as increased therapeutic efficiency. The aim of this study was to synthesize a biocompatible nano-niosome containing *Mentha piperita* L. and *Mentha pulegium* L. EO and develop herbal-medicine system with suitable encapsulation efficiency. Hence, the amount and type of surfactant and also the amount of phospholipid were investigated in various niosomal formulations. Furthermore, the optimized formulation was introduced in terms of EO loading efficiency by investigating the acidity effect of hydrating buffer at 7.4 (neutral), 5.0 (acidic) and 9.0 (alkaline) pH. In addition, the EO release kinetic from the system was investigated in physiological conditions of normal (pH= 7.4, Temperature 37°C) and cancerous cells (pH= 5.4, temperature 42°C). Various niosomal formulations were prepared using thin-film method and the particle's size, morphology, zeta potential and chemical interactions were characterized. Then, antioxidant activity of nanoparticles was evaluated by DPPH radical-scavenging assay. Results of the present study showed that the niosomal formulation containing soy phosphatidyl cholin, cholesterol, and tween-60 loaded with mint or *Mentha pulegium* EO (0.5 mg/mL),hydrated with PBS at pH= 9, had the highest loading efficiency. The EO loading efficiency for mint and *Mentha pulegium* was 61.36% and 74.31%, respectively. The investigation of morphology, size, and zeta showed particles to be spherical with the size less than 80 nm and anionic surface charge. EO release in acidic condition of cancerous cells and 42°C temperature was more than physiological conditions of normal cells, representing the sensitivity of synthesized formulation to pH and temperature. The FTIR analysis results showed that no interaction occurred between EO and niosome and the loading of EO into the niosomes did not make any changes in chemical nature of EO. In addition, the antioxidant activity of EO was very well preserved during the encapsulation.

**Keywords:** Niosome, Lamiaceae, antioxidants activity, controlled-release, cancer, thermo and pH sensitive.