

فصلنامه گیاهان دارویی

Journal homepage: www.jmp.irپژوهشکده گیاهان دارویی
جهاد دانشگاهی

مقاله تحقیقاتی

تهیه نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره‌های زوفا و چوچاق و بررسی اثرات آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی آنها

مرجان نوری*

باشگاه پژوهشگران جوان و نخبگان، واحد رودهن، دانشگاه آزاد اسلامی، رودهن، ایران

اطلاعات مقاله

چکیده

گل‌واژگان:

آنتی‌اکسیدانی

زوفا

چوچاق

ضدباکتری

نانولیپوزوم

مقدمه: گرایش عمومی جامعه به استفاده از عصاره‌های طبیعی به عنوان ترکیبات ضد میکروب، پاداکسنده و نگهدارنده در طی سال‌های اخیر افزایش یافته است. **هدف:** هدف این پژوهش بهبود خصوصیات کاربردی دو گیاه زوفا و چوچاق است که با مقایسه افزایش پایداری خصوصیات ضد میکروبی و ضد اکسیدانی نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره‌های آنها با ترکیبات شاهد (عصاره‌های آزاد) محقق می‌شود. **روش بررسی:** عصاره‌گیری آبی پس از شناسایی هر دو گیاه انجام پذیرفت و نانولیپوزوم‌های چوچاق، زوفا و ترکیب آنها بر اساس روش آب پوشانی لایه نازک تولید شد. آزمون‌های بازده درون پوشانی، ظرفیت بارگذاری، اندازه ذرات با دستگاه پراکنندگی نور پویا، پتانسل زتا با زتا سائزر، فعالیت آنتی‌اکسیدانی با روش رادیکال مقاوم DPPH و خاصیت ضد میکروبی به روش چاهک تعیین شد. **نتایج:** نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره چوچاق به طور معنی‌داری ظرفیت بارگذاری (۱۷/۵ درصد) و بازده درون پوشانی (۲۳/۵ درصد) بیشتری داشتند. میانگین اندازه ذات نانولیپوزوم عصاره چوچاق به طور محسوسی نسبت به سایر نمونه‌ها بالاتر (۵۴/۲۱ نانومتر) بود. فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌ها بعد از کپسولاسیون در نانولیپوزوم افزایش یافت و EC_{50} عصاره چوچاق نانولیپوزومی به ۲۷/۱۴ (میکروگرم بر میلی‌لیتر) کاهش یافت. در میان باکتری‌ها استرپتوکوکوس اینیه (۱۹/۴۳ میلی‌متر) و استافیلوکوکوس اورئوس (۱۸/۳۸ میلی‌متر) به ترتیب در حضور نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره چوچاق و زوفا هاله‌ی عدم رشد بیشتری در مقایسه با سایر باکتری‌ها از خود نشان دادند. **نتیجه‌گیری:** نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره‌ی چوچاق و زوفا می‌تواند به بهترین شکل خصوصیات کاربردی این گیاهان دارویی را افزایش دهد و جهت کاربرد صنعتی توصیه می‌شود.

۱. مقدمه

ترکیبات در صنعت غذا و دارو به عنوان مواد ضد میکروب، امروزه ترکیبات طبیعی به دلیل نداشتن عوارض جانبی پاداکسنده و نگهدارنده رو به افزایش است. اسانس‌های گیاهی، ترکیبات طبیعی هستند که خواص ضد میکروبی آنها در برابر میکروارگانیسم‌های پاتوژن و مولد فساد به اثبات رسیده

مخفف‌ها: DPPH، ۲ و ۲ دی فنیل - ۱- پیکریل هیدرازیل؛ EC_{50} ، نصف حداکثر غلظت موثر

* نویسنده مسؤول: M.Nouri@riau.ac.ir

تاریخ دریافت: ۲۵ خرداد ۱۳۹۸؛ تاریخ دریافت اصلاحات: ۵ مهر ۱۳۹۸؛ تاریخ پذیرش: ۲۱ آبان ۱۳۹۸

doi: [10.29252/jmp.19.75.118](https://doi.org/10.29252/jmp.19.75.118)© 2020. Open access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)

است [۱]. برخی از پژوهش‌های منتشر شده امکان استفاده از اسانس‌های گیاهی مانند دارچین و میخک را به عنوان ترکیبات ضد میکروب طبیعی در فرآورده‌های غذاهایی مانند شیر و ماهی و یا کاربرد مریم‌گلی و آویشن جهت نگهداری پنیر را تأیید کرده‌اند. اسانس‌های گیاهی و ترکیبات مؤثر آنها در برابر انواع گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌ها، شامل باکتری‌های گرم منفی، مثبت، کپک و مخمرها فعال شناخته شده‌اند [۲].

گیاه زوفا با نام علمی *Hyssopus officinalis* گیاهی پایا، بسیار معطر و دارای ساقه‌های متعدد چوبی شده به ارتفاع ۲۰ تا ۶۰ سانتی‌متر است که به حالت خودرو در نواحی جنوبی اروپا، آسیای صغیر، ایران و روسیه مشاهده می‌شود. گیاه زوفا در زمین‌های آهکی بهتر رشد پیدا می‌کند و در کوهستان‌ها نیز تا ارتفاعات ۲۰۰۰ متری بالا می‌رود. این گیاه ریشه ضخیم و منشعب دارد و ساقه‌های متعدد آن مجموعاً ظاهری پرپشت به آن می‌بخشد. برگ‌های کوچک و متقابل آن، ظاهر نوک‌تیز، کامل و گل‌های زیبای آن رنگ‌های آبی تیره مایل به بنفش، سفید و گاهی قرمز دارد. از دمکرده‌ی پیکر رویشی این گیاه برای درمان بیماری‌های مربوط به دستگاه تنفس مانند سرفه، سیاه سرفه، برونشیت و آسم استفاده می‌شود [۳]. مواد مؤثره این گیاه سبب کنترل فشارخون، هضم غذا و کاهش تورم معده می‌شود. مهم‌ترین ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس آن پینوکامفن، آلفا و بتاپینین، کامفن و الکل‌های سزکویی‌ترین است و پیکر رویشی این گیاه حاوی فلاونوئید، تانن (۵ تا ۸ درصد) مواد تلخ (۳ تا ۶ درصد)، دیوزمین، هیسوپین و ترکیبات موسیلاژی است. اسانس آن تلخ، تند، خشک و اندکی گرم‌کننده است [۴]. در مطالعات گذشته اثرات آنتی‌اکسیدانتی [۵]، ضدقارچی [۶] و ضدباکتریایی [۷] این گیاه بررسی شده است.

گیاه چوچاق، بومی مناطق شمال ایران با نام علمی *Eryngium caeruleum* M.Bieb است که گیاهی دو یا

چند ساله، علفی، مونوکارپیک و متعلق به خانواده چتریان می‌باشد و از سالیان دور مورد توجه بومیان منطقه قرار گرفته است [۸]. بومیان منطقه در اوایل بهار این گیاه را قبل از گلدهی و زایش جمع‌آوری و به عنوان سبزی و طعم‌دهنده استفاده می‌کنند. چوچاق از جمله گیاهان دارویی است که برگ‌ها و سر شاخه‌های گلدار آن بواسطه‌ی وجود ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی، دارای خواص آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروب، محرک قوی، ضدالتهاب و اشتهاآور است [۹]. در طب سنتی از این گیاه برای بهبود بواسیر، تسکین‌دهنده بیماری‌های رماتیسمی و رفع التهابات، تسکین‌دهنده دل درد، بهبود ورم، درمان سیاه سرفه، عفونت‌ها و از بین بردن سنگ کلیه استفاده می‌شود [۱۰]. مواد مؤثره اسانس و عصاره‌های گونه‌های مختلف آن شامل منوترین، پلی فنول و فلاونوئید، ساپونین‌ها، کومارین‌ها، ترپنوئیدها و استروئیدها می‌باشد [۱۱]. مطالعات نشان داده است که نوع، میزان ترکیبات و مواد مؤثره موجود در اسانس و عصاره چوچاق تابع موقعیت جغرافیایی، تغییرات فصلی، فاز رویشی یا زایشی گیاه است. پلی‌فنول‌ها مانند عصاره‌های گیاهی گروه بزرگی از ترکیبات زیست فعال هستند که اخیراً تحقیقات در مورد خصوصیات سلامتی بخش آنها گسترش یافته است. گیاهان چوچاق و زوفا به دلیل داشتن خواص ضد میکروبی و ضد اکسیدانی خود مورد توجه هستند اما ناپایدار بودن خواص آنها در مقابل عوامل محیطی مانند اکسیژن، نور، رطوبت و pH طی فرآیند تولید و نگهداری باعث محدودیت استفاده از آنها شده است [۱۲]. بنابراین استفاده از روش‌های جدید جهت محافظت ترکیبات طبیعی ضروری به نظر می‌رسد به همین منظور روش نانوکپسولاسیون از روش‌های نوین جهت افزایش پایداری ترکیبات فعال زیستی در مقابل عوامل نامساعد محیطی و تداخلی ترکیبات است. این روش شامل دستکاری اتم‌ها و مولکول‌ها است که منجر به ایجاد ساختارهایی در اندازه نانو

است [۱]. برخی از پژوهش‌های منتشر شده امکان استفاده از اسانس‌های گیاهی مانند دارچین و میخک را به عنوان ترکیبات ضد میکروب طبیعی در فرآورده‌های غذاهایی مانند شیر و ماهی و یا کاربرد مریم‌گلی و آویشن جهت نگهداری پنیر را تأیید کرده‌اند. اسانس‌های گیاهی و ترکیبات مؤثر آنها در برابر انواع گسترده‌ای از میکروارگانیسم‌ها، شامل باکتری‌های گرم منفی، مثبت، کپک و مخمرها فعال شناخته شده‌اند [۲].

گیاه زوفا با نام علمی *Hyssopus officinalis* گیاهی پایا، بسیار معطر و دارای ساقه‌های متعدد چوبی شده به ارتفاع ۲۰ تا ۶۰ سانتی‌متر است که به حالت خودرو در نواحی جنوبی اروپا، آسیای صغیر، ایران و روسیه مشاهده می‌شود. گیاه زوفا در زمین‌های آهکی بهتر رشد پیدا می‌کند و در کوهستان‌ها نیز تا ارتفاعات ۲۰۰۰ متری بالا می‌رود. این گیاه ریشه ضخیم و منشعب دارد و ساقه‌های متعدد آن مجموعاً ظاهری پرپشت به آن می‌بخشد. برگ‌های کوچک و متقابل آن، ظاهر نوک‌تیز، کامل و گل‌های زیبای آن رنگ‌های آبی تیره مایل به بنفش، سفید و گاهی قرمز دارد. از دمکرده‌ی پیکر رویشی این گیاه برای درمان بیماری‌های مربوط به دستگاه تنفس مانند سرفه، سیاه سرفه، برونشیت و آسم استفاده می‌شود [۳]. مواد مؤثره این گیاه سبب کنترل فشارخون، هضم غذا و کاهش تورم معده می‌شود. مهم‌ترین ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس آن پینوکامفن، آلفا و بتاپینین، کامفن و الکل‌های سزکویی‌ترین است و پیکر رویشی این گیاه حاوی فلاونوئید، تانن (۵ تا ۸ درصد) مواد تلخ (۳ تا ۶ درصد)، دیوزمین، هیسوپین و ترکیبات موسیلاژی است. اسانس آن تلخ، تند، خشک و اندکی گرم‌کننده است [۴]. در مطالعات گذشته اثرات آنتی‌اکسیدانتی [۵]، ضدقارچی [۶] و ضدباکتریایی [۷] این گیاه بررسی شده است.

گیاه چوچاق، بومی مناطق شمال ایران با نام علمی *Eryngium caeruleum* M.Bieb است که گیاهی دو یا

۱). این گیاهان به دور از نور مستقیم خورشید و در سایه خشک و سپس با آسیاب تبدیل به پودر شدند. عصاره آبی گیاهان چوچاق و زوفا با مخلوط کردن پودر گیاهان در آب مقطر (۱ به ۱۰ وزنی/حجمی، ۱۰۰ درجه سلسیوس) تهیه و به مدت ۱۰ دقیقه همراه با همزدن جوشانده و بوسیله فیلتراسیون ذرات جامد آنها گرفته شد. عصاره حاصله در آن با حرارت ۶۰ درجه سلسیوس خشک و در ۴ درجه سلسیوس تا هنگام استفاده ذخیره شد [۱۵]. عصاره‌های هدف شامل چوچاق، زوفا و مخلوط آنها (نسبت مساوی از هر دو عصاره) بودند که در مراحل بعد مورد استفاده قرار گرفتند.

۲.۲. تهیه نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره زوفا، چوچاق و ترکیب آنها

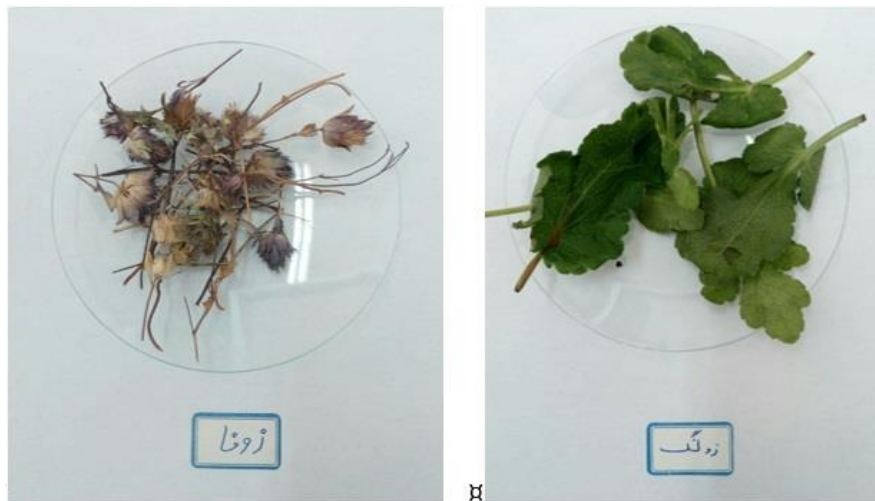
لیپوزوم‌های چند لایه‌ای بر اساس روش آب پوشانی لایه نازک تهیه شدند، بدین منظور ابتدا ۹۰ میلی‌گرم لسیتین با توزین دقیق و افزودن حلال اتانول کاملاً حل شد. لایه نازک با تبخیر حلال در دستگاه تبخیر کننده دوار (شرکت Heidolph، کشور آلمان) با سرعت ۱۴۰ rpm و دمای ۵۰ درجه سلسیوس تشکیل یافت، سپس با افزودن نسبت ۱ به ۵ از عصاره زوفا، چوچاق و مخلوطی به نسبت ۱ به ۱ از عصاره‌های موردنظر با آب مقطر عمل هیدراسیون انجام شد. در انتها به منظور ریز کردن لیپوزوم‌های چند لایه‌ای و تبدیل آنها به لیپوزوم تک لایه نمونه توسط هموژنایزر (شرکت Heidolph، کشور آلمان) با دور ۲۰۰۰۰ rpm و در دمای بالاتر از انتقال فاز لیپوزومی به مدت ۱۰ دقیقه همگن شد. در نهایت با استفاده از دستگاه سونیکاتور پروبدار (Materials & Sonics, vibracell، کشور انگلستان) ریز کردن لیپوزوم در مدت ۵ دقیقه، طی ۵ چرخه ۱ دقیقه‌ای با فاصله ۱ دقیقه استراحت انجام شد. به این صورت لیپوزوم‌های تک لایه‌ای در مقیاس نانومتری تولید شدند [۱۶].

(اغلب ۱۰۰ نانومتر یا کمتر) و حفاظت از خواص مطلوب کاری عصاره در مدت زمان ماندگاری می‌شود. ترکیبات نانوکپسوله به دلیل اندازه کوچک، از فعالیت زیستی بالاتری برخوردار هستند [۱۳]. کاربردهای درون‌پوشانی ترکیبات زیست فعال شامل پوشاندن طعم یا بوی نامطلوب مواد داخل هسته، محافظت از مواد داخل هسته در برابر شرایط نامطلوب محیط بیرونی در طول فراوری و نگهداری، کاهش فراریت و افزایش پایداری برخی ترکیبات داخل هسته، کمک به جدا کردن اجزاء یک ماده ترکیبی به منظور جلوگیری از واکنش دادن آنها با یکدیگر، کاهش و تنظیم نرخ رهایش انتقال مواد داخل هسته در طول زمان به محیط بیرونی، محافظت از آنها پس از مصرف در زمان عبورشان از معده شده و امکان رهایش کنترل شده‌ی آنها را در روده کوچک (مکانی که ترکیبات جذب جریان خون می‌شوند) و تغییر ویژگی‌های فیزیکی مواد داخل هسته به منظور تسهیل فرآیندهای جایجایی و حمل و نقل این مواد می‌باشد [۱۴]. از آنجایی که هر دو گیاه چوچاق و زوفا از گیاهان ارزشمند ایران هستند هدف از این پژوهش بررسی و مقایسه افزایش پایداری خصوصیات ضد میکروبی و ضد اکسیدانی نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره‌های زوفا و چوچاق با ترکیبات شاهد (عصاره‌های آزاد) آنها است. البته بررسی‌های میدانی نشان داد که تا کنون نانوذره‌ای حاوی عصاره‌های موردنظر تهیه نشده است و لزوم انجام این تحقیق بیشتر احساس شد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. جمع‌آوری گیاه و عصاره‌گیری

در این مطالعه گیاه چوچاق از مناطق اطراف شهرستان ساری در فروردین ۹۷ جمع‌آوری شد، همچنین گیاه زوفا از کوهپایه‌های اطراف زشک (مکانی در نزدیکی مشهد) در همین فصل بهار جمع‌آوری شد و توسط متخصصان گیاه شناسی هر دو گیاه شناسایی و مورد تأیید قرار گرفت (شکل



شکل ۱. شمایی کلی از دو گیاه چوچاق (زولنگ) و زونا

استاندارد میزان عصاره بارگذاری نشده تعیین شد [۱۷].
منحنی کالیبراسیون استاندارد از رسم غلظت‌های مورد نظر
(۰/۱، ۰/۴، ۰/۷، ۱ و ۱/۳ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) عصاره‌های
هدف در محلول متانول (محور عمودی) در مقابل مقادیر
جذب (محور افقی) رسم شد و شدت جذب نمونه‌ها به
ترتیب غلظت در طول موج ۴۱۵ نانومتر اندازه‌گیری و
سپس از معادلات ۱، ۲ و ۳ استفاده شد.

اندازه‌گیری ذره‌ای نانولیپوزوم‌ها توسط دستگاه
پراکندگی نور پویا (مدل Nanophox Sympatec
GmbH، ساخت آلمان) در دمای ۲۵ درجه سلسیوس تعیین
شد. نمونه‌ها با آب دیونیزه شده رقیق شدند تا تعداد ذرات
محدوده‌ای مشخص (بین ۲۰۰ تا ۲۰۰۰ kCPS) داشته
باشند. جهت تعیین پتانسیل زتا لیپوزوم‌های حاوی اسانس
از دستگاه زتا سایزر (Nano-ZS) استفاده شد. اندازه‌گیری
پتانسیل زتا محلول لیپوزوم‌ها در pH ۷/۴، دمای ۲۵ درجه
سلسیوس و توان ۱۴۹ وات انجام شد [۱۸].

۳.۲. خواص فیزیکی - شیمیایی و مورفولوژی
نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره زونا، چوچاق و ترکیب آنها
در این مطالعه خصوصیات فیزیکوشیمیایی و
مورفولوژی نانولیپوزوم‌ها از جمله تعیین بازده درون‌پوشانی
(Encapsulation efficiency)، ظرفیت بارگذاری
(Loading capacity) اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات
(درصد پراکندگی) و پتانسیل زتا مورد بررسی قرار گرفت.
تعیین بازده درون‌پوشانی و ظرفیت بارگذاری نانو ذرات
دیسپرسیون محلول‌های مورد نظر را با محلول هیدروکلریک
در دمای ۹۵ درجه سلسیوس به مدت ۳۰ دقیقه همزده و
حرارت‌دهی به منظور شکستن ساختار و آزادسازی نانو
ذرات درون‌پوشانی شده اعمال شد. به محلول موردنظر
مدت زمانی اجازه سرد شدن داده و قبل از جداسازی با
سانتریفیوژ (۹۰۰۰ دور بر دقیقه، ۲ دقیقه) با محلول متانول
مخلوط شد، سپس شدت جذب میزان عصاره آزاد
(بارگذاری نشده) و محلول در سوپرناتانت با دستگاه
اسپکتروفتومتر خوانده و با استفاده از منحنی کالیبراسیون

- | | |
|---|----------|
| مقدار عصاره بارگذاری نشده - مقدار عصاره اولیه = مقدار عصاره بارگذاری شده | معادله ۱ |
| $100 \times (\text{مقدار عصاره اولیه} / \text{مقدار عصاره بارگذاری شده}) = \text{درصد بازده درون پوشانی}$ | معادله ۲ |
| $100 \times (\text{مقدار نمونه} / \text{مقدار عصاره بارگذاری شده}) = \text{درصد ظرفیت بارگذاری}$ | معادله ۳ |

جهت حفظ فعالیت حیاتی سوش‌های تهیه شده هر ماه کشت جدید از آنها تهیه و در یخچال نگهداری شد. در این مرحله میکروارگانیسم‌های هدف به محیط کشت BHI براث تلقیح و برای رسیدن به میزان 10^6 CFU/ml در محلول سالین رقیق شدند. سپس $0/1$ میلی‌لیتر از آنها به صورت سطحی در پلیت‌های نوترینت آگار کشت داده شد. بعد از کشت، چاهک‌هایی (۸ میلی‌متری) در آگار ایجاد شده و این چاهک‌ها با 70 میکرولیتر از 1 درصد عصاره زوفا و چوچاق نانولیپوزومی پر شد. پلیت‌های آماده به مدت 2 ساعت در دمای 37 درجه سلسیوس گرمخانه گذاری شدند. همه پلیت‌ها از نظر میزان عدم رشد در اطراف چاه بررسی شد و نتایج (میلی‌متر هاله مهار رشد) به صورت میانگین اعلام شد.

۶.۲. تجزیه و تحلیل آماری

جهت آنالیز داده‌ها از طرح کاملاً تصادفی و مقایسه میانگین داده‌ها از تست LSD در سطح 99 درصد استفاده شد. نرم‌افزار Statistix نسخه ۸ جهت آنالیز آماری بکار رفت و تمام آزمون‌های ذکر شده در سه تکرار برای هر نمونه انجام پذیرفت.

۳. نتایج

۱.۳. نتایج بررسی خواص فیزیکی- شیمیایی و مورفولوژی نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره زوفا، چوچاق و ترکیب آنها خصوصیات فیزیکوشیمیایی و مورفولوژی نانولیپوزوم‌های عصاره‌های زوفا، چوچاق و ترکیب آنها از جمله بازده درون‌پوشانی، ظرفیت بارگذاری، اندازه ذرات، توزیع اندازه ذرات، درصد پراکندگی و پتانسیل زتا مورد ارزیابی انجام گرفت.

بازده درون‌پوشانی و ظرفیت بارگذاری نانوذرات مقیاسی از ظرفیت ذرات در نگهداری و قدرت رهایش

۴.۲. ارزیابی عملکرد آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های شاهد و نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره زوفا، چوچاق و ترکیب آنها توانایی آنتی‌اکسیدانی محلول زوفا و چوچاق (دادن اتم هیدروژن یا الکترون)، قبل و بعد از کپسوله کردن در نانولیپوزوم، با ارزیابی کاهش رنگ بنفش محلول متانولی DPPH اندازه‌گیری شد. این ارزیابی اسپکتوفتومتری با استفاده از رادیکال مقاوم DPPH به عنوان معرف بر طبق روش بوریتز و بوکدار انجام شد [۱۹]. مقدار 50 میکرولیتر از عصاره زوفا و چوچاق قبل و بعد از کپسوله کردن (غلظت‌های مختلف) به 5 میکرولیتر محلول DPPH (محلول متانولی $0/04$ درصد) اضافه شد بعد از 30 دقیقه نگهداری در دمای اتاق، جذب آن در مقابل متانول خالص در 517 نانومتر قرائت شد و در آخر درصد مهار رادیکال نمونه بر طبق معادله ۴ محاسبه شد و در نهایت نتایج به صورت $EC50$ (مقداری از آنتی‌اکسیدان که لازم است تا غلظت DPPH به 50 درصد مقدار اولیه برسد گزارش شده است).

معادله ۴

$100 \times (\text{میزان جذب کنترل} / \text{میزان جذب نمونه} - \text{میزان}$

جذب کنترل) = درصد جذب

۵.۲. ارزیابی عملکرد ضد میکروبی نمونه‌های شاهد و نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره زوفا، چوچاق و ترکیب آنها فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های زوفا و چوچاق نانولیپوزومی به وسیله روش چاهک بر طبق روش استاندارد انجام شد [۱۹]. این آزمایش بر روی 6 میکروارگانیسم بیماری‌زا مطرح در مواد غذایی با نام‌های باسیلوس سرئوس، سالمونلا تیفی موریوم (ATCC 14028)، اشیریشیا کولای (PTCC 1399)، لیستریا مونوسایتوژنز (PTCC 1163)، استافیلوکوکوس اورئوس (PTCC 1431) و استرپتوکوکوس اینیه (PTCC 1887) انجام شد.

(نمودار A) به طور محسوسی نسبت به سایر نمونه‌ها بالاتر است ($P < 0/01$).

نتایج دو مولفه دیگر خصوصیات فیزیکوشیمیایی شامل شاخص پراکندگی و پتانسیل زتا در جدول ۲ نشان داده شده است. در این پژوهش تأثیر افزودن عصاره بر پایداری سیستم از طریق تغییرات پتانسیل زتا پایش شد زیرا این عامل در هر محیط نشاندهنده پایداری و عدم رسوب ذرات و سیستم‌های هیدروکلوئیدی است که با کاهش آن از پایداری سیستم کاسته می‌شود. در جدول ۲ پتانسیل زتا دارای گستره $12/14 - 10/05$ میلی‌ولت بود و در میان نمونه‌ها با تفاوت معنی داری نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره چوچاق دارای پتانسیل زتا منفی‌تری هستند و هر سه تیمار نانولیپوزوم دارای شاخص پراکندگی در محدوده تقریباً یکسانی هستند ($P \geq 0/01$).

۲.۳. نتایج عملکرد آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های شاهد و نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره زوفا، چوچاق و ترکیب آنها نتایج محتوای فنولی کل و ظرفیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های زوفا و چوچاق نانولیپوزومی براساس میزان مهار DPPH و با اصطلاح EC_{50} مطابق با معادله ۳ در جدول ۳ آمده است. از آنجایی که هدف بررسی تفاوت میان خصوصیات عصاره شاهد و نانولیپوزوم آنها است، این عوامل برای هر دو حالت عصاره‌ها سنجیده شد.

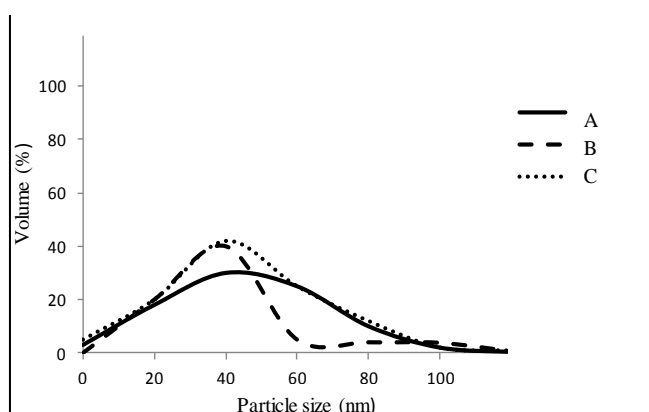
جدول ۱. نتایج ظرفیت بارگذاری و بازده درون‌پوشانی نمونه‌های نانولیپوزوم (خطا استاندارد \pm میانگین)

نمونه‌ها	ظرفیت بارگذاری (درصد)	بازده درون‌پوشانی (درصد)
نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره چوچاق	$17/8^c \pm 0/5$	$23/5^b \pm 0/7$
نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره زوفا	$12/4^a \pm 0/3$	$20/8^a \pm 0/4$
نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره ترکیبی چوچاق و زوفا	$15/2^b \pm 0/2$	$19/9^a \pm 0/6$

ترکیبات محتوایی است که عواملی مانند خلوص ماده‌ی اولیه، دما، مدت زمان مخلوط کردن، انرژی مورد نیاز مخلوط کردن، نوع و محتوای نمک، پتانسیل زتا و نقطه ژله‌ای شدن بر آنها تأثیرگذار می‌باشند [۲۱].

با به کارگیری معادلات ذکر شده (معادلات ۱ تا ۳) در جدول ۱ مولفه‌های درصد بازده درون‌پوشانی، ظرفیت بارگذاری نشان داده شده است. ظرفیت بارگذاری و بازده درون‌پوشانی نمونه‌ها به ترتیب دارای گستره $12/4$ تا $17/8$ درصد و $19/9$ تا $23/5$ درصد هستند. جدول ۱ نشان داد که نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره چوچاق به طور معنی‌داری درصد ظرفیت بارگذاری و بازده درون‌پوشانی بیشتری نسبت به دو نمونه دیگر دارند.

از جمله خواص تعیین کننده در نوع و کاربرد نانو ذرات، اندازه ذرات آنها است [۲۱]. تغییرات اندازه ذرات نمونه‌ها در شکل ۲ نشان داده شد که لیپوزوم‌های به دست آمده و زیکول‌هایی با پراکندگی مناسب هستند. با توجه به شکل می‌توان دریافت که میانگین اندازه ذرات نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره چوچاق $54/21$ نانومتر (A)، نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره زوفا $38/62$ نانومتر (B) و نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره ترکیبی $43/21$ نانومتر (C) هستند. با توجه به شکل ۲ می‌توان گفت نوع عصاره به کار رفته در فرآیند بر شاخص توزیع اندازه ذرات تأثیر معنی‌داری داشته است. میانگین این شاخص در نانولیپوزوم عصاره چوچاق



شکل ۲. اندازه ذرات نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره چوچاق (A)، نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره زوفا (B) و نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره ترکیبی چوچاق و زوفا (C)

جدول ۲. نتایج اندازه پراکنندگی و پتانسیل زتا نمونه‌های لیپوزوم (خطا استاندارد \pm میانگین)

نمونه‌ها	ظرفیت بارگذاری (درصد)	بازده درون پوشانی (درصد)
نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره چوچاق	$17/8^c \pm 0/5$	$23/5^b \pm 0/7$
نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره زوفا	$12/4^a \pm 0/3$	$20/8^a \pm 0/4$
نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره ترکیبی چوچاق و زوفا	$15/2^b \pm 0/2$	$19/9^a \pm 0/6$

جدول ۳. میانگین محتوای فنولی کل (میلی گرم اسید گالیک/گرم عصاره) و فعالیت آنتی‌اکسیدانی DPPH (میزان EC_{50} برحسب میکروگرم/میلی لیتر) نمونه‌های شاهد و نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره زوفا، چوچاق و ترکیب آنها

نمونه	محتوای فنولی کل (میلی گرم اسید گالیک/گرم عصاره)	EC_{50} (برحسب میکروگرم/میلی لیتر)
عصاره چوچاق (شاهد)	$26/84^a \pm 2/74$	$38/60^d \pm 0/7$
نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره چوچاق	$67/10^b \pm 2/27$	$27/14^c \pm 0/22$
عصاره زوفا (شاهد)	$111/3^c \pm 15/1$	$19/6^b \pm 3/4$
نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره زوفا	$278/25^d \pm 13/2$	$3/46^a \pm 2/3$
نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره ترکیبی چوچاق و زوفا	$270/82^d \pm 11/0$	$2/92^a \pm 0/7$

همانطور که در جدول ۳ نشان داده شده است، میانگین محتوای فنولیک کل در عصاره‌های چوچاق و نانولیپوزوم آن به ترتیب برابر با $26/84$ و $67/10$ (میلی گرم اسید گالیک/گرم عصاره)، در عصاره‌های زوفا (شاهد) و نانولیپوزومی آن، به ترتیب $111/3$ و $278/25$ (میلی گرم اسید گالیک/گرم عصاره) و عصاره ترکیبی نانو لیپوزومی $270/82$ (میلی گرم اسید گالیک/گرم عصاره) بود.

همچنین جدول ۳ نشان داد که مقدار EC_{50} عصاره چوچاق شاهد برابر با $38/60$ (میکروگرم بر میلی لیتر) بود و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره چوچاق به طور معنی‌داری بعد از کپسولاسیون در نانولیپوزوم افزایش یافت، به طوری که EC_{50} عصاره چوچاق نانولیپوزومی به $27/14$ (میکروگرم بر میلی لیتر) کاهش یافت. این روند در عصاره گیاه زوفا نیز مشاهده شد به طوری که میزان فعالیت آنتی‌اکسیدانی در نمونه شاهد و نانولیپوزومی

همانطور که در جدول ۳ نشان داده شده است، میانگین محتوای فنولیک کل در عصاره‌های چوچاق و نانولیپوزوم آن به ترتیب برابر با $26/84$ و $67/10$ (میلی گرم اسید گالیک/گرم عصاره)، در عصاره‌های زوفا (شاهد) و نانولیپوزومی آن، به ترتیب $111/3$ و $278/25$ (میلی گرم اسید گالیک/گرم عصاره) و عصاره ترکیبی نانو لیپوزومی $270/82$ (میلی گرم اسید گالیک/گرم عصاره) بود.

به ترتیب برابر ۱۹/۶ و ۳/۴۶ (میکروگرم بر میلی‌لیتر) بود که مشابه با روند نانولیپوزوم ترکیبی است.

در این شرایط نشان داد. البته بدون تفاوت معنی‌داری هاله عدم رشد در مورد سه باکتری باسیلوس سرئوس، اشیریشیا کولای و استافیلوکوکوس اورئوس مشابه استرپتوکوکوس اینیه یکسان بود و باکتری سالمونلا تیفی موریوم با تفاوت معنی‌داری نسبت به سه باکتری قبل مقاومت بیشتری نسبت به حضور نانولیپوزوم چوچاق از خود نشان داد. همچنین نتایج نشان داد هنگام به کارگیری نانولیپوزوم گیاه زوفا، در میان باکتری‌ها استافیلوکوکوس اورئوس منطقه عدم رشد بیشتری (۱۸/۳۸ میلی‌متر) در مقایسه با سایر باکتری‌ها داشته است در حالی‌که اشیریشیا کلی (۶/۲۷ میلی‌متر) کمترین حساسیت را نشان داد. البته بدون تفاوت معنی‌داری استرپتوکوکوس اینیه نیز مشابه استافیلوکوکوس اورئوس عمل کرد و در مورد سایر باکتری‌ها عدم هاله رشد از بیشترین به کمترین به ترتیب شامل باسیلوس سرئوس، لیستریا مونوسیتوزنز و سالمونلا تیفی موریوم بود. نتایج نانولیپوزوم ترکیبی از دو عصاره نیز دارای روندی مشابه با نمونه‌های ذکر شده بود.

۳.۳. نتایج عملکرد ضد میکروبی نمونه‌های شاهد و نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره زوفا، چوچاق و ترکیب آنها فعالیت ضد میکروبی نمونه‌ها بر ۶ نوع باکتری پاتوژن مورد آزمایش قرار گرفت و نتایج در جدول ۴ گزارش شده است. تمام نمونه‌ها دارای خاصیت ممانعت‌کنندگی بر باکتری‌های باسیلوس سرئوس، سالمونلا تیفی موریوم، اشیریشیا کولای، لیستریا مونوسیتوزنز، استافیلوکوکوس اورئوس و استرپتوکوکوس اینیه بوده‌اند. عصاره‌های هر دو گیاه در مقابل باکتری‌های مورد آزمایش، نقش بازدارندگی از خود نشان دادند و نمونه‌ها ترکیبی مؤثر بر مهارکنندگی هر دو نوع باکتری گرم مثبت و منفی بوده‌اند. در میان باکتری‌ها استرپتوکوکوس اینیه هاله‌ی عدم رشد بیشتری (۱۹/۴۳ میلی‌متر) در حضور نانولیپوزوم حاوی عصاره چوچاق در مقایسه با سایر باکتری‌ها داشت در حالیکه لیستریا مونوسیتوزنز (۱۰/۱۴ میلی‌متر) کمترین حساسیت را

جدول ۴. فعالیت ضد میکروبی نمونه‌های شاهد و نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره زوفا، چوچاق و ترکیب آنها (بر حسب میلی‌متر هاله مهار رشد)

گونه باکتری	فعالیت ضد میکروبی عصاره چوچاق (میلی‌متر)		فعالیت ضد میکروبی عصاره زوفا (میلی‌متر)		فعالیت ضد میکروبی نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره ترکیبی چوچاق و زوفا
	شاهد	نانولیپوزوم	شاهد	نانولیپوزوم	
لیستریا مونوسیتوزنز	۷/۵ ^a ± ۰/۷۱	۱۰/۱۴ ^a ± ۰/۳۱	۱۰/۱۳ ^b ± ۰/۰۳	۱۴/۲۸ ^b ± ۰/۰۷	۱۳/۱۶ ^b ± ۰/۰۵
باسیلوس سرئوس	۱۱/۴۱ ^c ± ۰/۴۳	۱۷/۳۵ ^c ± ۱/۰۴	۱۲/۴۵ ^c ± ۰/۰۵	۱۶/۴۵ ^c ± ۰/۰۴	۱۶/۹۷ ^c ± ۰/۱۲
سالمونلا تیفی موریوم	۹/۱۰ ^b ± ۰/۳۵	۱۲/۲۵ ^b ± ۰/۲۴	۵/۳۰ ^a ± ۰/۰۲	۷/۳ ^a ± ۱/۳۰	۱۱/۱۴ ^a ± ۱/۰۲
اشیریشیا کلی	۱۰/۲۲ ^{bc} ± ۰/۰۶	۱۷/۲۱ ^c ± ۰/۳۰	۴/۱۰ ^a ± ۱/۱۰	۶/۲۷ ^a ± ۱/۲۱	۹/۷۵ ^a ± ۰/۹۵
استافیلوکوکوس اورئوس	۱۱/۶۵ ^c ± ۰/۲۲	۱۸/۵۱ ^c ± ۱/۲۰	۱۳/۷۴ ^c ± ۰/۰۳	۱۸/۳۸ ^d ± ۰/۰۷	۱۸/۰۳ ^d ± ۰/۰۲
استرپتوکوکوس اینیه	۱۳/۵۷ ^d ± ۰/۲۱	۱۹/۴۳ ^c ± ۰/۱۶	۱۴/۱۳ ^c ± ۰/۹۲	۱۸/۱۶ ^d ± ۰/۱۴	۱۸/۹۸ ^d ± ۰/۴۶

۴. بحث

عواملی مانند مواد دیواره، ساختمان کپسول، مقادیر کلسترول، لیپید و واکنش بین مواد موجود در دیواره و درون سلول در میزان محصورسازی تأثیرگذار می‌باشد

۱.۴. بحث خواص فیزیکی و شیمیایی و مورفولوژی نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره زوفا، چوچاق و ترکیب آنها

نقاط متناظر در نمودارهای B و C شده است. نتایج شکل ۲ نشان داد که در نسبت‌های مساوی دو عصاره میانگین اندازه ذرات کاهش یافته است، احتمالاً در این تیمار به دلیل ایجاد اتصالات جدید میان دو عصاره و کاهش بازده درون پوشانی میزان عصاره کمتری در نانوذرات مبحوس شده که ماحصل آن اندازه ذرات کوچک‌تر است.

پتانسیل زتا تابعی از بار سطحی وزیکول‌های لیپیدی، لایه‌های جذب شده سطحی و ماهیت محیطی است که لیپوزوم‌ها در آن پراکنده شده‌اند. بار سطحی بالاتر لیپوزوم به دلیل نیروهای دافعه بیشتر، از تجمع وزیکول‌ها جلوگیری کرده و پایداری لیپوزوم بیشتر شده است. از طرف دیگر، در جدول ۲ ملاحظه شد که نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره چوچاق دارای پایداری بیشتری هستند زیرا در مرحله تولید نانوذرات اتصالات هیدروژنی بیشتری برقرار شده است و اتصالات نسبتاً قوی منجر به تولید محیطی پایدار شده است. پس ذراتی با اندازه کوچک‌تر و پایداری بیشتر تولید شده‌اند. این بار سطحی باعث افزایش برهمکش‌های میان سلول با لیپوزوم و کارایی بهتر ترکیب زیست فعال هدف می‌شود. در نمونه نانولیپوزوم حاوی عصاره زوفا به دلیل وجود اندازه ذرات بزرگتر احتمال رسوب و ناپایداری بیشتر است اما در نمونه ترکیبی به دلیل حضور باندهای دوگانه موجود در ساختار خطی ترکیبات فنلی و ترپنی عصاره استخراجی، تداخل در تعادل الکترواستاتیک و ناپایداری سیستم نسبت به حالت اولیه خود شده است. البته نتایج جدول ۲ نشان داد که همه نمونه‌ها در شرایط عادی پایدار بوده و رسوب نمی‌کنند. بر طبق نتایج منتج شده از روش DLS، وزیکول‌ها پراکندگی قابل قبولی داشتند و شاخص پراکندگی پایینی به دست آمد. تفاوت نتایج این پژوهش با سایر مطالعات به دلیل تفاوت در میزان نیروی مکانیکی به کار رفته است زیرا در صورت استفاده از نیروی بیشتر ذرات کوچک‌تری حاصل می‌شود [۲۴، ۲۵]. همچنین استفاده از اتانل باعث تغییر بار

[۲۲]. نتایج جدول ۱ نشان داد درصد ظرفیت بارگذاری با به کارگیری عصاره چوچاق با تفاوت معنی‌داری بیشترین میزان است. ظرفیت بارگذاری عصاره چوچاق حجم بیشتری از نمونه اولیه را اشغال کرده پس مقادیر کلی ذره بیشتر و کسر ظرفیت بارگذاری به دلیل مخرج بزرگتر عدد کوچک‌تری را نشان می‌دهد. احتمال دیگری نیز وجود دارد که عصاره زوفا که دارای چربی کمتر، قدرت آبدوستی بیشتر و میانگین اندازه ذرات کوچک‌تری است منجر به جذب آب بیشتر و چروکیدگی و انقباض آن می‌شود پس صورت کسر (محتوای عصاره بارگذاری شده) عدد کوچک‌تری شده و نمونه مقادیر عددی کمتری از این عامل را نشان داده است [۲۳]. درصد بازده درون‌پوشانی عصاره چوچاق دارای مقادیر بیشتری نسبت به عصاره زوفا است (جدول ۱). کاهش این درصد به صورت معنی‌داری در دو نمونه دیگر مشاهده شد ($P < 0/01$). ممکن است که در مورد عصاره زوفا به دلیل ریزتر بودن ذره محدودیت بارگذاری در نانوذرات مشاهده شود و مقادیر بیشتری از عصاره قابلیت کپسوله شدن را نداشته باشد. کاهش این عامل نیز ممکن است به همان مورد انقباض و چروکیدگی گفته شده در بارگذاری مرتبط باشد. بالاترین درصد کارایی درون‌پوشانی هنگامی مشاهده می‌شود که مناسب‌ترین اتصالات میان گروه‌های هیدروکسیل در عصاره حاصل شود.

افزایش معنی‌دار میانگین اندازه ذرات در سطح ۰/۰۱ معنی‌داری نمونه A نسبت به سایر نمونه‌ها را می‌توان برحسب تعریف این شاخص به افزایش ابعاد ذرات پس از فرآیند نسبت داد، درچنین عملیاتی احتمالاً ذرات عصاره بهم نزدیک شده و اتصالات هیدروژنی برقرار شده است اما از آنجایی که عصاره چربی دوست‌تر از سایر نمونه‌ها است پس اتصالات حجم بیشتری را اشغال کرده که ماحصل تحولات گفته شده تولید نانو ذرات درشت‌تری در مقایسه با

و در دسترس قرار دادن هر چه بیشتر، بهبود می‌دهد [۲۹]. اما نتایج این پژوهش با نتایج برخی محققین ناهمسو است، از جمله گونزالز-پارادس و همکاران که تحقیق آنها خاصیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولیک آزاد و کپسوله بقایای زیتون آسیاب شده را بدون تفاوت چندانی گزارش کرد [۳۰] و یانگ و همکاران بیان کردند که فعالیت حذف رادیکالی DPPH ویتامین C از طریق کپسولاسیون نانولیپوزومی تغییری نمی‌کند [۳۱].

۳.۴. بحث خواص ضد میکروبی نمونه‌های شاهد و نانولیپوزوم‌های عصاره زوفا، چوچاق و ترکیب آنها در مورد نحوه‌ی تأثیر خاصیت بازدارندگی عصاره‌ها بر انواع باکتری‌ها، فرآیندهای متفاوتی مطرح شده است از جمله اینکه، ترکیبات ترپنی و فنولیک علاوه بر صدمه به غشای سلولی باکتری‌ها که سبب نابود شدن لایه و نفوذپذیری آن می‌شوند، می‌توانند بر عملکرد لایه نظیر اختلال در انتقال الکترون، سنتز پروتئین و اسید نوکلئیک تأثیر مخرب گذاشته و یا سبب نابودی غشای سلولی و تراوش مواد داخل سلولی به خارج سلول شده و در نهایت منجر به بازدارندگی فعالیت باکتری شوند [۳۲]. گزارش‌های مختلفی وجود ارتباط بین ترکیبات فنولی و فعالیت‌های ضد میکروبی را بیان می‌کند، در مطالعه‌ی عصاره‌ی چند گیاه دارویی، میزان ترکیبات فنولیک کل و فلاونوئیدها نشان داد که ارتباط معناداری بین فعالیت ضد میکروبی و ترکیبات پلی فنولیک گیاهان مورد مطالعه وجود دارد [۳۳]. در برخی از موارد نتایج نشان داد که علی‌رغم بالا یا پایین تر بودن ترکیبات فنولیک، خواص ضد میکروبی متناسب با این ترکیبات عمل نمی‌کند. در تحقیق حاضر نیز ارتباط معنی‌داری بین دو عامل ذکر شده مشاهده نشد که در راستای توجیه این مسأله عوامل بیشماری از جمله شرایط اقلیمی از جمله آب، هوا، خاک، ارتفاع، میزان ترکیبات

سیستم، تغییر درجه پایداری استری و کاهش سایز ذرات شده است [۲۶]. نتایج پتانسل زتا نانولیپوزوم‌های این مطالعه با نتایج پیشین تفاوت‌هایی دارد که علت آن به دلیل نوع فسفولیپیدها و کلسترول به کار رفته در تولید نانولیپوزوم است که از ترکیبات اصلی نانولیپوزوم‌ها می‌باشند [۲۵].

۲.۴. بحث خواص آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های شاهد و نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره زوفا، چوچاق و ترکیب آنها فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره زوفا و چوچاق از طریق ارزیابی میزان حذف رادیکالی DPPH انجام شد. لاکسیمون راما و همکاران بیان کردند که بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و محتوای فنولیک عصاره‌های گیاهان، میوه‌ها و ... ارتباط خطی وجود دارد که با نتیجه‌ی پژوهش حاضر هم‌راستا است [۲۷]. جدول ۳ نشان داد هر دو عامل میانگین محتوای فنولیک کل و خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره زوفا نتایج بهتری با تفاوت معنی‌داری نسبت به عصاره چوچاق دارد دلیل این امر حضور ترکیبات فنولیک بیشتر و حرکت بهتر آنها در محیط آبدوستی است که این گیاه نسبت به گیاه چوچاق دارا است. از سوی دیگر نتایج بیانگر این بود که هر یک از نانولیپوزوم‌ها با تفاوت معنی‌داری نسبت به شرایط شاهد خود دارای خصوصیات بهتر آنتی‌اکسیدانی هستند که به دلیل وجود ترکیبات بیشتر فنولیک در نسبت سطح به حجم بیشتر است [۲۸]. در میان نمونه‌ها نانولیپوزوم ترکیبی از عصاره‌ها دارای بهترین خصوصیت آنتی‌اکسیدانی است البته با نتایج خصوصیات آنتی‌اکسیدانی نانولیپوزوم حاوی زوفا تفاوت معنی‌داری نداشت. نتایج به دست آمده با نتایج بسیاری محققان همسو است، از جمله اسپینگو و همکاران نشان دادند که تکنولوژی کپسولاسیون نانولیپوزوم، فعالیت آنتی‌اکسیدانی ترکیبات فنولیک را در مقابل اکسیداسیون لیپیدی، از طریق پخش شدن بهتر آن در محیط

۵. نتیجه‌گیری

نتایج به دست آمده از این پژوهش به شرح ذیل می‌باشد: ظرفیت بارگذاری و بازده درون‌پوشانی نمونه‌ها به ترتیب دارای گستره ۱۲/۴ تا ۱۷/۸ درصد و ۱۹/۹ تا ۲۳/۵ درصد بود. میانگین اندازه ذرات نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره چوچاق ۵۴/۲۱ نانومتر (A)، نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره زوفا ۳۸/۶۲ نانومتر (B) و نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره ترکیبی ۴۳/۲۱ نانومتر (C) بود. میانگین محتوای فنولی کل در عصاره‌های چوچاق و نانولیپوزومی آن به ترتیب برابر با ۶۷/۱۰ و ۲۶/۸۴ (میلی‌گرم اسید گالیک / گرم عصاره)، در عصاره‌های زوفا (شاهد) و نانولیپوزومی آن، به ترتیب ۱۱۱/۳ و ۲۷۸/۲۵ (میلی‌گرم اسید گالیک / گرم عصاره) و عصاره ترکیبی نانولیپوزومی ۲۷۰/۸۲ (میلی‌گرم اسید گالیک / گرم عصاره) بود. در میان باکتری‌های موجود برای نانولیپوزوم عصاره چوچاق استرپتوکوکوس اینیه‌هاله‌ی عدم رشد بیشتری (۱۹/۴۳ میلی‌متر) در مقایسه با سایر باکتری‌ها داشته است در حالی که لیستریا مونوسیتورنز (۱۰/۱۴ میلی‌متر) کمترین حساسیت را نشان داد. آزمون نانولیپوزوم گیاه زوفا، در میان باکتری‌ها استافیلوکوکوس اورئوس منطقه عدم رشد بیشتری (۱۸/۳۸ میلی‌متر) در مقایسه با سایر باکتری‌ها داشته است در حالی که اشیریشیا کلی (۶/۲۷ میلی‌متر) کمترین حساسیت را نشان داد.

به طور کلی نتایج تحقیق حاضر نشان می‌دهد که نانولیپوزوم‌های گیاهان چوچاق و زوفا می‌تواند به بهترین شکل خصوصیات کاربردی این گیاهان دارویی را افزایش دهد و برای صنعتگران این روش توصیه می‌شود.

مشارکت نویسندگان

مرجان نوری، طراحی پروژه تحقیقاتی، انجام کار آزمایشگاهی و نوشتن مقاله.

شیمیایی و سایر عوامل محیطی نیز منجر به تغییر در میزان و تنوع مواد مؤثره گیاهان دارویی را می‌توان بیان کرد [۳۴]. فعالیت ضد میکروبی عصاره‌های هر دو گیاه بعد از کپسوله کردن در نانولیپوزوم به طور معنی‌داری افزایش یافت. این نتایج حاکی از مؤثر بودن پوشش نانوکپسول می‌باشد دلایل بسیار زیادی در این مورد بیان شده است اما محتمل‌ترین آنها بدین صورت است که همواره نانو ذرات ضد میکروبی نسبت به ذرات ضد میکروبی (در ابعاد بزرگتر) دارای تأثیر مهارکنندگی رشد میکروبی بیشتری هستند زیرا نانو ذرات در مقابل ذرات بزرگتر، نسبت سطح به حجم بیشتری داشته پس سطوح بیشتری برای اتصال به ریزه سازواره‌ها، اختلال بر نفوذپذیری غشا، ایجاد حفرات بیشتر در دیواره سلولی باکتری‌ها (آسیب فیزیکی)، برهم‌کنش الکترواستاتیکی قوی بین نانوذرات و غشا سلولی یا آنزیم‌ها و اعمال تغییرات تخریبی بر سلول میکروبی دارند [۳۵]. لیولیس و همکاران اظهار کردند که استفاده از نانولیپوزوم‌ها می‌تواند انتقال سلولی و رهاسازی ترکیبات فعال را درون سلول‌های باکتری بهبود بخشد در نتیجه شدت و سرعت نابودی میکروارگانیسم‌ها در حضور این ترکیبات افزایش می‌یابد [۳۶]. این نتایج می‌تواند به دلیل واکنش میان نانولیپوزوم‌ها و سلول‌های باکتری باشد که از راه‌های مختلفی مانند نقل و انتقالات درون غشایی، رهایش تماسی، اتصال و الحاق، جذب و فاگوسیتوز انجام می‌شود. اما از سویی زو و همکاران چنین بیان کرده‌اند که فعالیت ضد میکروبی مواد بیولوژیک توسط نانوکپسولاسیون به دلیل ممانعت از رهایی مواد اصلی از درون نانولیپوزوم‌ها، واکنش با پروتئین‌ها و تشکیل رسوب، کاهش می‌یابد [۲۴]. در پژوهش حاضر ترکیب نانوذرات و ساختار عصاره به صورت سینرژیستی (هم‌افزایی) منجر به بروز افزایش خاصیت ضد میکروبی بیشتر شده است.

تضاد منافع

نویسنده مقاله اعلام می‌دارد که در فرآیند انجام پژوهش و گزارش نتایج بی‌طرفی رعایت شد و این مطالعه هیچ گونه تضاد منفعی ندارد.

تقدیر و تشکر

بدینوسیله نویسنده تقدیر و تشکر خود را از دانشگاه آزاد اسلامی واحد رودهن به خاطر همکاری در به سرانجام رساندن این مقاله اعلام می‌دارم.

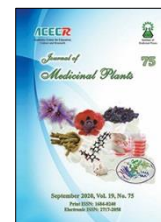
منابع

1. Santamaria-Echart A, Fernandes I, Barreiro F, Retegi A, Arbelaiz A, Corcuera MA and Eceiza A. Development of waterborne polyurethane-ureas added with plant extracts: Study of different incorporation routes and their influence on particle size, thermal, mechanical and antibacterial properties. *Prog. Org. Coat.* 2018; 117: 76-90.
2. Gómez-Estaca J, López AL, López-Caballero ME, Gómez-Guillén MC and Montero P. Biodegradable gelatine-chitosan films incorporated with essential oils as antimicrobial agents for fish preservation. *Food Microbiol.* 2010; 27: 889-96.
3. Hajdari A, Giorgi A, Beretta G, Gelmini F, Buratti S, Benedetti S, Merkouri A, Mala X, Kabashi S, Pentimalli D, Pulaj B and Mustafa B. Phytochemical and sensorial characterization of *Hyssopus officinalis* subsp. *aristatus* (godr.) Nyman (*Lamiaceae*) by GC-MS, HPLC-UV-DAD, spectrophotometric assays and e-nose with aid of chemometric techniques. *Eur. Food Res. Technol.* 2018; 44: 1-15.
4. Dehghanzadeh N, Ketabchi S and Alizadeh A. Essential Oil composition and antibacterial activity of *Hyssopus Officinalis* L. grown in Iran. *Asian J. Exp. Biol. Sci.* 2012; 3(4): 767-71.
5. Fathiazad F, Mazandarani M and Hamedeyazdan S. Phytochemical analysis and antioxidant activity of *Hyssopus officinalis* L. from Iran. *Adv Pharm Bull.* 2011; 1(2): 63-7.
6. Glamoclija JM, Sokovic MD, Vukojevic JB, Milenkovic IM, Brkic DD and Griensven LJLD. Antifungal activity of essential oil of *Hyssopus officinalis* L. against mycopathogen *Mycogone perniciosus* (Mang). *Zb. Matitse Srp. Prir. Nauke.* 2005; 109: 123-28.
7. Vlase L, Benedec D, Hanganu D, Damian G, Csillag I, Sevastre B and et al. Evaluation of antioxidant and antimicrobial activities and phenolic profile for *Hyssopus officinalis*, *Ocimum basilicum* and *Teucrium chamaedrys*. *Molecules* 2014; 19(5): 5490-507.
8. Nabavi SM, Nabavi SF, Ebrahimzadeh MA and Eslami B. In Vitro Antioxidant Activity of *Pyrus Boissieriana*, *Diospyros Lotus*, *Eryngium Caucasicum* and *Froriepia Subpinnata*. *JRUMS.* 2009; 8(2): 139-50.
9. Vukic MD, Vukovic NL, Djelic GT, Obradovic AM, Kacaniova M, Markovic S, Popović S and Dejan B. Phytochemical analysis, antioxidant, antibacterial and cytotoxic activity of different plant organs of *Eryngium serbicum* L. *Ind. Crop. Prod.* 2018; 115(3): 88-97.
10. Flamini G, Tebano M and Cion PL. Composition of the essential oils from leafy parts of the shoots, flowers and fruits of *Eryngium amethystinum* from Amiata Mount (Tuscany, Italy). *Food Chem.* 2007; 107(2): 671-4.

11. Salmanian S, Sadeghi MA, Jamson M and Tabatabaee AB. Identification and quantification of phenolic acids, radical scavenging activity and ferric reducing power of *Eryngium caucasicum Trautv.* ethanolic and methanolic extracts. *JRIFST*. 2013; 2(2): 193-204.
12. Hashemabadi D and Kaviani B. Seasonal and geographical variations in the essential oils of *Eryngium caucasicum Trautv* growing in Iran. *AEJAES*. 2010; 8(2): 212-5.
13. Luo Y, Zhang B, Cheng WH and Wang Q. Preparation, characterization and evaluation of selenite-loaded chitosan/TPP nanoparticles with or without zein coating. *Carbohydr. Polym.* 2011; 82(3): 942-51.
14. Desai. KGH and Park HJ. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technol.* 2005; 23: 1361-94.
15. Molan A, Flanagan J, Wei W and Moughan P. Selenium-containing green tea has higher antioxidant and prebiotic activities than regular green tea. *Food Chem.* 2009; 114: 829-35.
16. Xia S and Xu S. Ferrous sulfate liposomes: preparation, stability and application in fluid milk. *Food Res. Int.* 2005; 38(3): 289-96.
17. Woranuch S and Yoksan R. Eugenol-loaded chitosan nanoparticles: I. Thermal stability improvement of eugenol through encapsulation. *Carbohydr Polym.* 2012; 96(2): 578-85.
18. Moghimi R, Ghaderi L, Rafati H, Aliahmadi A and McClements DJ. Superior antibacterial activity of nanoemulsion of *Thymus daenensis* essential oil against *E. coli*. *Food Chem.* 2016; 194: 410-5.
19. Burits M and Bucar F. Antioxidant activity of *Nigella sativa* essential oil. *Phytother. Res.* 2000; 14(5): 323-8.
20. NCCLS Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 3rd International Supplement: 1999, M 100-S 109.
21. Gaonkar AG, Vasisht N, Khare AR and Sobel R. Microencapsulation in the Food Industry A Practical Implementation Guide. Academic Press is an Imprint of Elsevier. 2014, pp: 187-98.
22. Fan M, Xu S, Xia S and Zhang X. Preparation of salidroside nano-liposomes by ethanol injection method and in vitro release study. *Eur. Food Res. Technol.* 2008; 227: 167-74.
23. Wisuitiprot W, Somsiri A, Ingkaninan K and Waranuch N. A novel technique for chitosan microparticle preparation using a water/silicone emulsion: Green tea model. *Int. J. Cosmet. Sci.* 2011; 33: 351-8.
24. Zou LQ, Liu W, Liu W, Liang R, Li T and Liu C. Characterization and bioavailability of tea polyphenol nanoliposome prepared by combining an ethanol injection method with dynamic high-pressure microfluidization. *J. Agric Food Chem.* 2014; 62: 934-41.
25. Gulseren I and Corredig M. Storage stability and physical characteristics of tea-polyphenolbearing nanoliposomes prepared with milk fat globule membrane phospholipids. *J. Agric. Food Chem.* 2013; 61: 3242-51.
26. Heurtault B, Saulnier P, Pech B, Proust JE and Benoit JP. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. *Biomaterials* 2003; 24: 4283-300.
27. Luximon-Ramma A, Bahorun T, Soobrattee MA and Aruoma OI. Antioxidant activities of phenolic, proanthocyanidin, and flavonoid components in extracts of *Cassia fistula*. *J. Agric. Food Chem.* 2002; 50: 5042-7.
28. Akbrian A, Rahimmalek M, Sabzalian MR and Saeidi G. Assessment of Phytochemical,

- Morphological and Antioxidant Variation of Bilehar (*Dorema aucheri*) Populations Cultivated in Different Environmental Conditions. *J. Med. Plants*. 2017; 16(2): 120-35.
29. Spigno G, Donsì F, Amendola D, Sessa M, Ferrari G and De Faveri DM. Nanoencapsulation systems to improve solubility and antioxidant efficiency of a grape marc extract into hazelnut paste. *J. Food Eng*. 2013; 114: 207-14.
30. González-Paredes A, Clarés-Naveros B, Ruiz-Martínez MA, Durbán-Fornieles, JJ, Ramos-Cormenzana A and Monteoliva-Sánchez M. Delivery systems for natural antioxidant compounds: Archaeosomes and archaeosomal hydrogels characterization and release study. *Int. J. Pharm*. 2011; 421(2): 321-31.
31. Yang T, Koo M. Hypocholesterolemic effects of Chinese tea. *Pharmacol. Res*. 1997; 35: 505-12.
32. Amin M, Nikoopour and Fazeli MR. A survey of antibacterial effects of *oliveria decumbens* and *Nepeta binaludensis* essential oils on *staphylococcus aureus* and *escherichia coli* in doogh. *J. Med. Plants*. 2018; 18(1): 134-43.
33. Zakerin AR, Ahmadi E, Fasihi Ramandi M, Abdollahi S, Molazadeh AR and Jafari S. The Effects of Ecologic Condition on Antimicrobial Activity of Endemic Herbal Extracts in Fars Province. *JFUMS*. 2015; 5(1): 111-9.
34. Srivastava AW and Shym S. Citrus: Climate and soil. Edition 1st. Delhy, India: International Book Distributing Company. 2002, p: 151-65.
35. Hallaj-Nezhadi S and Hassan M. Nanoliposome-based antibacterial drug delivery. *Drug Deliv*. 2015; 22(5): 581-9.
36. Liolios C, Gortzi O, Lalas S, Tsaknis J and Chinou I. Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and *in vitro* antimicrobial activity. *Food Chem*. 2009; 112: 77-83.

How to cite this article: Nouri M. Preparation of nanoliposomes containing *Hyssopus officinalis* L. and *Eryngium caeruleum* M. Bieb extracts and investigate their antimicrobial and antimicrobial effects. *Journal of Medicinal Plants* 2020; 19(75): 118-131. doi: 10.29252/jmp.19.75.118



Research Article

Preparation of nanoliposomes containing *Hyssopus officinalis* L. and *Eryngium caeruleum* M.Bieb extracts and investigate their antimicrobial and antioxidant effects

Marjan Nouri*

Young Researchers and Elite Club, Roudhen Branch, Islamic Azad University, Roudhen, Iran

ARTICLE INFO

Keywords:

Eryngium caeruleum M.Bieb

Hyssopus officinalis

Antibacterial

Antioxidant

Nanoliposome

ABSTRACT

Background: The general tendency of society in the use of natural extracts as antimicrobial, antioxidant and preservative compounds has increased in recent years. **Objective:** The purpose of this study is to improve the functional properties of two native plants (*Hyssopus officinalis* and *Eryngium caeruleum* M.Bieb) of the country that was accomplished by comparing the increasing stability of the antimicrobial and antioxidant properties of nanoliposomes containing their extracts with the control compounds (free extracts). **Methods:** Aqueous extraction was performed after identification of both plants and nanoliposomes of *H. officinalis*, *E. caeruleum* and their compound were produced based on thin- film hydration method. Tests of encapsulation efficiency, loading capacity, particle size with dynamic light scattering, zeta potential with zetasizer, antioxidant activity by the DPPH radical scavenging method and antimicrobial property were determined by well method. **Results:** Nanoliposomes containing *E. caeruleum* extract had significantly higher loading capacity (5.17 %) and encapsulation efficiency (5.23 %). The mean size of nanoliposome particles of *E. caeruleum* extract was significantly higher (21.54 nm) than other samples. The antioxidant activity of the extracts was increased after encapsulation in the nanoliposome, and the EC₅₀ of the nanoliposomal *E. caeruleum* extract was decreased to 14.27 (µg/ml). Among the microsatellites, *Streptococcus iniae* (43.19 mm) and *Staphylococcus aureus* (38.18 mm), respectively, showed a higher growth inhibition compared to other bacterias in the presence of nanoliposomes containing *H. officinalis* and *E. caeruleum* extracts. **Conclusion:** Nanoliposomes containing *Hyssopus officinalis* and *E. caeruleum* extracts can best increase the functional properties of these medicinal plants and are recommended for industrial application.

Abbreviations: DPPH, 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl; EC₅₀, Half maximal effective concentration

* Corresponding author: M.Nouri@riau.ac.ir

doi: [10.29252/jmp.19.75.118](https://doi.org/10.29252/jmp.19.75.118)

Received 15 June 2019; Received in revised form 27 September 2019; Accepted 12 November 2019

© 2020. Open access. This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/>)