



مقاله پژوهشی

درون پوشانی اسانس باریجه در سیستم نانولیپوزومی و ارزیابی ویژگی های فیزیکی و ضد میکروبی آن

مسعود نجف نجفی^{۱*}، آیتنا آریان مهر^۲، علی محمدی ثانی^۳

۱. دانشیار، گروه صنایع غذایی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد

۲. دانش آموزخته کارشناسی ارشد، علوم و صنایع غذایی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان

۳. دانشیار، گروه علوم و صنایع غذایی، واحد قوچان، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان

(تاریخ دریافت: ۹۸/۲/۷، تاریخ آخرین بازنگری: ۹۸/۴/۲۹، تاریخ پذیرش: ۹۸/۵/۱)

چکیده

هدف از این پژوهش درون پوشانی اسانس باریجه در سیستم نانولیپوزومی و ارزیابی ویژگی های فیزیکی و میکروبی آن بود. بر همین اساس نانولیپوزوم ها با استفاده از نسبت های مشخصی از لسیتین-کلیسترول به روش هیدراسیون لایه نازک و امواج فراصوت تولید و ترکیب های تشکیل دهنده اسانس با استفاده از روش اسپکتروسکوپی GC-Mass شناسایی گردید. ویژگی های فیزیکی لیپوزوم ها نظیر اندازه ذرات، شاخص پراکندگی، پتانسیل زتا و کارایی سیستم درون پوشانی مورد بررسی قرار گرفت. ارزیابی ویژگی های ضد میکروبی با دو روش حداقل غلظت بازدارنده رشد و انتشار دیسک بر روی /شیریشیا کلی O157:H7 انجام شد. همچنین رشد این باکتری در مجاورت غلظت های مختلفی از حداقل غلظت اسانس جهت بازدارندگی رشد در دو حالت آزاد و درون پوشانی شده در ۲۴ hr پس از کشت ارزیابی گردید. مهم ترین ترکیبات تشکیل دهنده اسانس، بتاپینن (۶۰/۸۴٪) و آلفاپینن (۹/۱۴٪) بودند. میانگین اندازه ذرات لیپوزوم های حاوی اسانس در محدوده ۹۹/۹۳-۷۴/۲۷ nm بود که تفاوت معنی داری با نانولیپوزوم فاقد اسانس (۱۳۸/۷۶ nm) داشت ($p < 0/05$). افزودن کلیسترول به لسیتین در غشاء دولایه ای لیپوزوم باعث افزایش اندازه ذرات و کاهش کارایی درون پوشانی شد ($p < 0/05$). پایداری الکترواستاتیک لیپوزوم های فاقد اسانس با افزودن مقادیر مشخصی از کلیسترول بهبود یافت، اما پتانسیل زتا در زمانی که اسانس در لیپوزوم ها جایگزین شد، در نمونه های دارای کلیسترول تغییر معنی داری پیدا نکرد ($p < 0/05$). حداقل غلظت بازدارنده رشد اسانس در حالت درون پوشانی در سیستم لیپوزومی فاقد کلیسترول نسبت به حالت آزاد کمتر بود. این مورد با اندازه گیری قطر هاله عدم رشد باکتری نیز تأیید شد. نمونه نانولیپوزوم حاوی اسانس (دارای ۶۰ mg لسیتین) با غلظت ۵۰ و ۷۵٪ حداقل غلظت بازدارنده رشد، به شکل معنی داری باعث کاهش رشد باکتری /شیریشیا کلی O157:H7 در مقایسه با اسانس آزاد گردید ($p < 0/05$). این تحقیق نشان داد که نانولیپوزوم اسانس باریجه با مؤلفیت به روش هیدراسیون لایه نازک و امواج فراصوت تولید شد و نمونه فاقد کلیسترول در غشاء لیپوزومی اثر ضد میکروبی بیشتری بر روی /شیریشیا کلی نسبت به اسانس آزاد داشت.

واژه های کلیدی: اسانس باریجه، نانولیپوزوم، اثر ضد میکروبی، درون پوشانی، کلیسترول.



۱. مقدمه

میکروارگانیزم‌های بیماری‌زا، علت عمده مرگ و میر در کشورهای در حال توسعه می‌باشند. طبق گزارش سازمان بهداشت جهانی در سال ۲۰۱۱، علت حدود ۱۸ میلیون مرگ و میر در سراسر جهان، بیماری‌های عفونی بوده است [۱]. امروزه از مقاومت آنتی‌بیوتیکی به‌عنوان یکی از مهم‌ترین و چالش برانگیزترین مشکلات بهداشتی در برنامه‌های بهداشت جهانی نام برده می‌شود. بنابراین، محققان در طول دو دهه گذشته توجه خاصی به کشف عوامل ضد میکروبی جدید از منابع طبیعی داشته‌اند. ترکیبات طبیعی ضد میکروبی علاوه بر اثربخشی بیشتر، غیرسمی هستند و به‌عنوان یکی از رویکردهای درمانی سالم مورد توجه قرار گرفته‌اند [۲]. تا به امروز بیش از ۱۳۴۰ گیاه با فعالیت‌های ضد میکروبی تعریف شده و بیش از ۳۰ هزار ترکیبات ضد میکروبی از گیاهان جدا شده‌اند [۳]. در میان گیاهان دارویی، جنس *Ferula* به‌عنوان یک منبع غنی از ترکیبات ضد میکروبی شناخته شده است. این جنس شامل بیش از ۱۵۰ گونه است که به‌طور عمده در منطقه مدیترانه و آسیای مرکزی گسترده شده‌اند [۴]. یکی از این گونه‌ها، باریجه (*Ferula gummosa*) نام دارد. باریجه، گیاه بومی منطقه خاورمیانه و به‌ویژه ایران است و گاهی اوقات در منطقه شمال و غرب هیمالیا نیز رشد می‌کند [۴]. در طب سنتی ایران، اولئورزین باریجه به‌عنوان عامل هضم کننده، تحریک کننده، ضد التهاب و درد برای درمان استفراغ، کولیک و برونشیت مزمن استفاده می‌شود [۳]. در دهه‌های اخیر مطالعات متعددی بر خواص گیاه باریجه و اسانس آن انجام گرفته است. سانسورینو و داسیلوا ترکیب لیمونن جدا شده از اسانس این گیاه را عامل اصلی بوی معطر باریجه ذکر کردند [۵]. سیاح و همکاران ترکیبات شیمیایی اسانس باریجه منطقه پلور تهران را بررسی کردند. آن‌ها نشان دادند که منوترپن‌ها حدود ۷۹ درصد ترکیبات موجود در اسانس باریجه را تشکیل می‌دهند [۶]. در خصوص تأثیر اسانس باریجه بر میکروارگانیزم‌های مختلف و اثر ضد میکروبی آن نیز مطالعات متعددی انجام شده است. اثر اسانس باریجه بر *باسیلوس سوبتیلیس*، *استافیلوکوکوس اورئوس*، *اشریشیا کلی* و *سودوموناس* [۷]، *سالمونلا تیفی* و *شیگلا دیسانتری* [۸]، *پروتئوس میرابیلیس*، *اشریشیا کلی*، *کلبسیلا پنومونیه* و *سودوموناس* [۹] و اثر ضدقارچی این اسانس

[۴] تاکنون مورد بررسی قرار گرفته است. مشخص گردیده خواص ضد میکروبی اسانس باریجه مربوط به ترکیبات آلفا و بتاپینن موجود در آن می‌باشد [۳].

علی‌رغم مزیت‌های اسانس‌های حاصل از گیاهان دارویی، استفاده از این ترکیبات با ارزش به‌صورت آزاد با محدودیت‌هایی همراه است، زیرا نسبت به شرایط محیطی نظیر اکسیژن، نور و دما حساس هستند و در آب نیز نامحلول می‌باشند. علاوه بر این، اسانس‌ها در محصولات ایجاد بو و مزه می‌کنند که این امر خوشایند مصرف‌کنندگان نیست [۱۰]. یکی از روش‌های کاهش این محدودیت‌ها، درون‌پوشانی کردن اسانس‌ها در سیستم‌های لیپوزومی می‌باشد. لیپوزوم‌ها بر حسب اندازه ذرات تولید شده به دو گروه میکرو و نانو تقسیم می‌شوند [۱۱]. تهیه نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس می‌تواند به محافظت آن‌ها در برابر شرایط محیطی کمک بیشتری کند. همچنین حلالیت اسانس را در آب افزایش می‌دهد، به رهایش هدفمند آن کمک می‌کند و نیز سبب افزایش کارایی و دسترسی زیستی این قبیل ترکیبات آبریز خواهد شد [۱۱]. نانولیپوزوم‌ها ذرات کلوئیدی تشکیل شده از مولکول‌های لیپیدی (عمدتاً فسفولیپیدها) هستند که به محض واکنش با آب به شکل سازمان یافته و به فرم غشاهای دولایه‌ای تجمع می‌یابند و در اثر وارد شدن انرژی و نیروی برشی (هموزنی‌اسیون و سونیکاسیون) به‌صورت کروی (وزیکول) در می‌آیند و با توجه به ساختار منحصر به فرد و خصوصیات فیزیکوشیمیایی خاص؛ می‌توانند هر سه گروه ترکیبات آبدوست، آبریز و دوگانه‌دوست را درون‌پوشانی کنند [۱۲]. در سال‌های اخیر تحقیقات فراوانی برای استفاده از نانولیپوزوم‌ها به‌منظور درون‌پوشانی اسانس‌های طبیعی گیاهان انجام شده است. استفاده از نانولیپوزوم‌ها در درون‌پوشانی اسانس‌های شوید (*Anethum graveolens*) [۱۰]، آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) [۱۲]، بومادران (*Santolinainsularis*) [۱۳]، *tingoassuiba Zanthoxylum* [۱۳]، و نعنا فلفلی (*Mentha piperita*) [۱۵] از جمله این پژوهش‌ها می‌باشند. ولی تاکنون گزارشی مبنی بر درون‌پوشانی اسانس باریجه با سیستم لیپوزومی منتشر نشده است لذا این تحقیق با هدف تولید نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس باریجه و ارزیابی ویژگی‌های فیزیکی و خصوصیات ضد میکروبی آن بر علیه یکی از مهم‌ترین باکتری‌های بیماری‌زا در مواد غذایی یعنی

Heidolph, مدل MB400, ساخت کشور آلمان در دمای 30°C انجام شد. لایه نازک تشکیل شده توسط ۱۵ mL آب مقطر استریل هیدراته گردید. لیپوزوم‌های تولید شده در این مرحله چندلایه و در مقیاس میکرومتری بودند [۱۷]. هموژنیزاسیون نمونه‌ها توسط دستگاه هموژنایزر Heidolph, مدل ART31126, ساخت کشور آلمان با دور ۲۰۰۰ rpm و در دمای بالاتر از انتقال فاز لیپوزومی (70°C) به مدت ۱۰ min انجام گرفت [۱۸]. در نهایت عمل صوت‌دهی نمونه‌های لیپوزومی توسط دستگاه سونیکاتور پروب‌دار مدل Up 200Ht, ساخت کشور آلمان با ۵ سیکل ۱ min و ۱ min استراحت بین هر سیکل، در دمای محیط انجام شد. به این صورت لیپوزوم‌های تک‌لایه‌ای در مقیاس نانومتریک تولید شدند.

۴.۲. تعیین اندازه و توزیع اندازه ذرات

اندازه و توزیع اندازه ذرات نانولپوزوم‌های خالی و حاوی اسانس بلافاصله پس از تهیه مطابق با روش بوآراب و همکاران و با استفاده از دستگاه زتاسایزر مدل Nano-ZS ساخت شرکت Malvern کشور انگلستان در دمای 25°C تعیین شد [۱۹]. کلیه نمونه‌ها در سه تکرار اندازه‌گیری و قطر متوسط هیدرودینامیک و شاخص پراکندگی گزارش گردید.

۵.۲. پتانسیل زتا

برای تعیین پتانسیل زتا لیپوزوم‌های فاقد و حاوی اسانس از دستگاه زتا سایزر مدل Nano-ZS ساخت شرکت Malvern کشور انگلستان استفاده شد. نمونه‌ها نخست با استفاده از آب مقطر ۵۰ برابر رقیق شدند. اندازه‌گیری پتانسیل زتا محلول لیپوزومی در $\text{pH}=7/4$, دمای 25°C و توان ۱۴۹ W انجام شد [۲۰].

۶.۲. کارایی درون‌پوشانی

کارایی درون‌پوشانی توسط روش دیالیز در 4°C با استفاده از یک غشاء سلولزی با وزن مولکولی ۱۰ KDa برای جدا کردن نانولپوزوم‌ها و اسانس‌های درون‌پوشانی شده تعیین گردید [۲۱]. لیپوزوم‌های دیالیز شده به وسیله حلال متانول تخریب و مقدار اسانس درون‌پوشانی شده با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر مدل Shimadzu UV 160A, ساخت

اشریشیا کلی O157:H7 انجام شد.

۲. مواد و روش‌ها

۱.۲. مواد اولیه

مواد فسفولیپید (ال- آلفا- لسیتین گرانولار با درجه خلوص ۹۹٪، شرکت Across ساخت کشور آمریکا)، کلسترول (با درجه خلوص ۹۵٪، شرکت Merck ساخت کشور آلمان)، دی-کلرومتان، متانل، محیط کشت‌های مولر هینتون آگار، آب‌گوشت مغز و قلب و سایر مواد از شرکت مواد شیمیایی مرک (ساخت کشور آلمان) تهیه شدند. اسانس باریجه از شرکت باریج اسانس (ساخت کشور ایران) خریداری گردید.

۲.۲. شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس

نمونه اسانس با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی گازی جرمی مدل Agilent technologies, Agilent 7890B, ساخت کشور آمریکا حاوی ستون موبینه، به طول ۳۰m، قطر داخلی ۰/۲۵mm و ضخامت لایه فاز ساکن $0/25\ \mu\text{m}$ ، متصل به طیف‌سنج جرمی مدل Agilent 5977A, ساخت کشور آمریکا تجزیه شد. دتکتور FID، یونیزاسیون شعله هیدروژن، گاز حامل هلیوم، سرعت جریان گاز حامل ۱/۱ ml/min و انرژی یونیزاسیون در طیف‌سنجی جرمی معادل ۷۰ eV بود. برنامه دمایی ستون از ۶۰ تا 250°C با سرعت افزایش $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$ تنظیم شد و به مدت ۱۰ min در 250°C ثابت ماند. شناسایی اجزای اسانس در نتیجه مقایسه طیف جرمی آن‌ها با بانک طیفی و مقایسه زمان بازداری آن‌ها با مقادیر مرجع صورت گرفت [۱۶].

۳.۲. تهیه نانولپوزوم

نانولپوزوم اسانس باریجه با استفاده از روش ترکیبی هیدراسیون لایه نازک و امواج فراصوت مطابق روش محمدی و همکاران با اندکی تغییر تهیه گردید [۱۷]. برای این منظور، غلظت‌های متفاوت از لسیتین کلسترول (۳۰-۳۰، ۴۰-۲۰، ۵۰-۱۰ و ۶۰-۰) در ترکیبی از حلال‌های دی‌کلرومتان-متانول با نسبت مساوی حل شد. سپس اسانس باریجه با نسبت ۴:۱ فاز لیپیدی به این مخلوط اضافه گردید. تبخیر حلال در دستگاه تبخیر کننده تحت خلاء چرخشی



مشاهده نشد، به عنوان حداقل غلظت بازدارنده رشد گزارش گردید [۲].

کشور ژاپن در طول موج ۵۱۷ nm اندازه گیری گردید.

۷.۲. تهیه سوسپانسیون باکتریایی

به منظور انجام تحقیق از سویه استاندارد باکتری گرم منفی *شریشیا کلی* O157:H7 تهیه شده از مرکز ذخایر ژنتیک ایران استفاده شد. برای تهیه سوسپانسیون میکروبی ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایش، به کمک آنس استریل از کشت ذخیره به محیط کشت شیب دار مولر هینتون آگار تلقیح انجام شد. سوسپانسیون غلیظ میکروبی با استفاده از محلول رینگر پس از رشد باکتری بر سطح شیب دار آگار تهیه گردید. سپس کدورت سوسپانسیون حاصل توسط اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه گیری و تا برابر شدن کدورت محلول با کدورت ۰/۵ محلول استاندارد مک فارلند $10^8 \times 1/5$ CFU/mL توسط محلول رینگر رقیق شد [۱].

۱۰.۲. ارزیابی رشد و تکثیر باکتری *شریشیا کلی* تحت تأثیر نانولیپوزوم های حاوی اسانس باریجه

جهت اثبات خاصیت ضد میکروبی نانولیپوزوم های حاوی اسانس باریجه از روش تهیه رقت در آگار استفاده شد. باکتری *شریشیا کلی* با غلظت $10^5 \times 1$ CFU/mL در محیط آبگوشت قلب و مغز با غلظت های مختلف بازدارنده از نمونه های نانولیپوزوم حاوی اسانس (فرمول حاوی ۶۰ mg لسیتین) و اسانس آزاد باریجه (۲۵، ۵۰، ۷۵٪) حداقل غلظت بازدارنده (رشد) تهیه و در 35°C گرمخانه گذاری شدند. شمارش کلنی ها در ۰، ۱، ۳، ۵، ۱۲ و ۲۴ h پس از گرمخانه گذاری بر روی محیط آبگوشت قلب و مغز انجام شد.

۸.۲. تعیین اثر ضد میکروبی به روش انتشار دیسک در آگار

ابتدا از سوسپانسیون میکروبی تهیه شده با کدورت معادل ۰/۵ مک فارلند و با استفاده از سوآپ استریل روی سطح پلیت های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت انجام گرفت. سپس دیسک های کاغذی ۶ mm استریل ساخت شرکت Sigma، کشور آلمان با غلظت مشخصی از نانولیپوزوم حاوی اسانس مخلوط شده و با فاصله ای معین از یکدیگر و لبه پلیت بر سطح آگار آلوده به باکتری قرار گرفتند. بعد از ۲۴ hr در دمای 37°C قطر هاله مهار رشد *شریشیا کلی* بر حسب ml اندازه گیری و با نمونه کنترل (اسانس آزاد) مقایسه شد [۲]. این آزمایش با سه تکرار انجام و میانگین آن گزارش گردید.

۱۱.۲. طرح آماری

آزمون ها در سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی انجام شد. نرم افزار آماری Minitab در سطح احتمال ۹۵٪ ($p < 0.05$) و آزمون چند دامنه ای دانکن برای تأیید وجود اختلاف بین میانگین ها مورد استفاده قرار گرفت.

۳. نتایج و بحث

۱.۳. بررسی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس باریجه

در این تحقیق ۱۶ ترکیب در اسانس باریجه شناسایی شد (جدول ۱). بتاپینن (۶۰/۸۴٪)، آلفاپینن (۹/۱۴٪) و بتافنالدین (۶/۹۴٪) عمده ترکیبات موجود در این اسانس بودند. قاسمی و همکاران گزارش کردند که آلفاپینن (۲۷/۲۷٪)، بتاپینن (۴۳/۷۸٪) و میرین (۳/۳۷٪) سه ترکیب عمده تشکیل دهنده اسانس باریجه هستند [۳]. مرتضایی نژاد و صادقیان ترکیبات مؤثره گیاه باریجه در سه منطقه مختلف در استان کاشان را مورد بررسی قرار دادند. آن ها دریافتند که بتا و آلفاپینن عمده ترین ترکیبات موجود در اسانس باریجه هستند [۲۲]. در تحقیق دیگری مشخص گردید که پس از دو ترکیب فوق، لینالول، آلفا ترپینولن، دلتا-۳-کارن و ترپینولن مهم ترین ترکیبات تشکیل دهنده

۹.۲. تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد

برای تعیین حداقل غلظت بازدارنده رشد، روش رقت سازی در لوله مورد استفاده قرار گرفت. غلظت های مختلف از فرم های آزاد و نانولیپوزومی از اسانس باریجه (۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸ و ۲۵۶ mg/ml) تهیه شد. پس از کشت تمام لوله ها در دمای 37°C به مدت ۲۴ hr گرمخانه گذاری و در نهایت کمترین غلظتی که مانع از رشد باکتری شده و در آن کدورتی

دتونی و همکاران و خطیبی و همکاران به ترتیب در خصوص *Zataria multiflora* Bioss. و *Zanthoxylum tingoassuiba* حاصل شده است [۱۴-۲۱]. همچنین با توجه به نتایج جدول (۲) مشخص گردید که غلظت‌های مختلف لسیتین به کلسترول بر اندازه نانولپوزوم‌های حاوی اسانس تأثیر معنی‌داری داشت ($p < 0/05$). مالهیروس و همکاران نیز به نتیجه مشابهی دست یافتند. آن‌ها عنوان کردند که افزودن کلسترول سبب افزایش قطر وزیکول‌ها در لیپوزوم‌های حاوی نایسین گردید [۲۶] اما گوپینات و همکاران [۲۷] و محمدی و همکاران [۱۷] گزارش کردند که افزایش غلظت کلسترول تغییر معنی‌داری در اندازه ذرات ایجاد نکرد. همان‌گونه که ملاحظه شد گزارش‌های متضادی در مورد اثر کلسترول بر اندازه ذرات لیپوزومی منتشر شده است. اصولاً لسیتین به‌عنوان اسکلت اصلی در فرمولاسیون لیپوزوم‌ها عمل می‌کند و کلسترول به‌منظور افزایش پایداری و تثبیت لیپوزوم‌های تشکیل یافته به فرمولاسیون اضافه می‌شود [۲۸]. بدین ترتیب غشاهای لیپوزومی غنی از لسیتین و آرایش زنجیره‌های آسید در یک جهت، موجب کاهش فضاهای به‌وجود آمده در اثر گروه‌های قطبی حجیم موجود در سر لیپید می‌شود که در نتیجه تماس و برهم کنش بین زنجیرها را افزایش می‌دهد. از طرف دیگر، کلسترول ممکن است پیوستگی مولکول‌های آب‌گریز در غشاء دولایه‌ای را با کمک یکی از مکانیسم‌های ذیل کاهش دهد:

اسانس باریجه مورد بررسی بوده است [۲۳]. پژوهش حاضر با شناسایی دو ترکیب عمده آلفا و بتاپینن مشابه نتایج سایرین بود و تفاوت‌های مشاهده شده در میزان مواد تشکیل دهنده اسانس با سایر گزارشات احتمالاً به دلیل تفاوت در رویشگاه و زمان جمع‌آوری گیاه و روش اسانس‌گیری باشد.

۲.۳. تعیین اندازه ذرات، شاخص پراکندگی، و کارایی درون‌پوشانی

نتایج مربوط به میانگین اندازه ذرات، شاخص پراکندگی و کارایی درون‌پوشانی نانولپوزوم‌های حاوی اسانس باریجه در مقایسه با نانولپوزوم فاقد اسانس در جدول (۲) آورده شده است. همان‌طور که نتایج نشان می‌دهد اسانس توانسته در کلیه نمونه‌ها اندازه نانولپوزوم را تحت تأثیر قرار دهد و نانولپوزوم فاقد اسانس اندازه بزرگ‌تری داشت ($p < 0/05$). دلیل این پدیده مربوط به قابلیت اسانس‌ها برای ایجاد انسجام و فشردگی بیشتر بین زنجیره‌های غیرقطبی در وزیکول‌های غشایی است [۲۴]. تورینا و همکاران پیشنهاد کردند منوترپن‌ها با توجه به ساختار مولکولی‌شان که مشتق شده از هیدروکربن‌های ایزوپرن (۲-متیل-۳،۱-بوتادین) هستند و به‌وسیله پیوستن دو یا چند مولکول ایزوپرن به‌وجود می‌آیند، می‌توانند اندازه لیپوزوم‌ها را با افزایش انحنای سطح فسفاتیدیل کولین کاهش داده و آن‌ها را روی گروه قطبی غشاء قرار دهند [۲۵]. نتایج مشابهی توسط

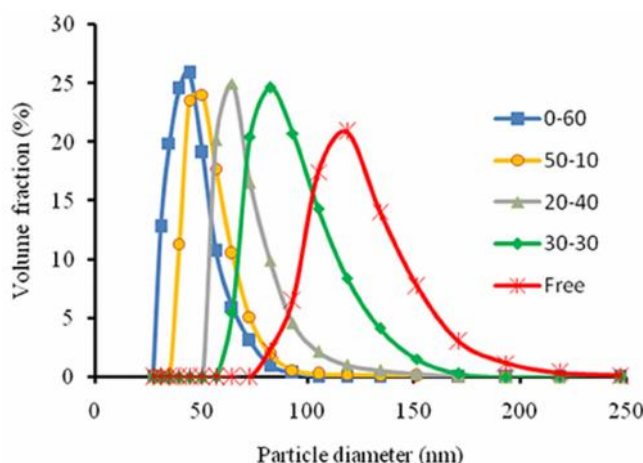
جدول (۱) ترکیب شیمیایی اسانس باریجه توسط دستگاه گاز کروماتوگرافی گازی جرمی.

Table 1 Chemical composition of *Ferula gummosa* (Barije) essential oil by GC- Mass .

Row ردیف	Compound نام ماده	Retention time زمان بازداری	Percent (%)
1	IR- -Pinene	4.219	9.14
2	-Pinene	5.088	60.84
3	-Myrcene	5.223	3.05
4	3-Carene	5.685	4.64
5	-Cymene	6.018	1.43
6	-Phellandrene	6.181	6.94
7	1,3,5-Undecatriene, (E,Z)-	9.738	1.21
8	p-Cymene, 2-methoxy	11.394	2.15
9	-Terpinyl acetate	14.225	0.93
10	Guaiol	15.277	1.44
11	2-(4a,8-Dimethyl-2,3,4,5,6,8a-hexahydro-1H-naphthalen-2-yl)propan-2-ol	17.83	0.77
12	---	18.251	1.45
13	Guaiac acetate	20.131	0.61
14	---	20.369	1.3
15	Bulnesol	21.917	1.49
16	Guaiac acetate	23.016	0.63

به نتایج حاصل شده می توان نتیجه گرفت که روش تولید مورد استفاده (هیدراسیون لایه نازک و امواج فراصوت) مستقل از غلظت های متفاوت لسیتین-کلیسترول، برای تولید لیپوزوم های پایدار در مقیاس نانو و توزیع اندازه ذرات یکنواخت مناسب بوده است. شکل (۱) منحنی های توزیع اندازه ذرات نانولیپوزوم های حاوی اسانس در غلظت های مختلف لسیتین-کلیسترول و نانولیپوزوم فاقد اسانس را نشان می دهد. همان طور که از اعداد شاخص بس پاشیدگی در جدول (۲) نیز پیدا بود تمامی منحنی ها به شکل یکنواخت و تک قله ای بودند (شکل ۱). همچنین نسبت های لایه های لیپوزوم بر کارایی درون پوشانی تأثیر معنی داری داشت (جدول ۲) ($p < 0.05$). بالاترین میزان کارایی درون پوشانی مربوط به نمونه حاوی لسیتین به تنهایی بود. افزایش غلظت کلیسترول سبب کاهش کارایی درون پوشانی

مولکول های چربی دوست مانند فسفولیپیدها با مولکول های کلیسترول برای تصاحب فضای لیپوفیلیک در غشاهای لیپیدی رقابت می کنند [۲۹] و یا کلیسترول با کاهش انعطاف پذیری غشاء دو لایه ای سبب بهم پیوستن مولکول های لیپوفیلیک به غشاء لیپیدی می شود [۳۰]. سیستم نانولیپوزومی تهیه شده در این مطالعه، پراکندگی مطلوبی (شاخص بس پاشیدگی پایین) را برای وزیکول ها نشان داد (جدول ۲). کوچک بودن این شاخص، بیان گر توزیع ذره ای باریک تر است، بنابراین قطر ذرات یکنواخت تر می باشد [۱۹]. مقدار کمتر از ۰/۱ برای این شاخص نشان می دهد که ذرات همگن هستند و بیش از ۰/۳ نشان دهنده ناهمگنی ذرات است [۱]. اعداد حاصل برایشاخص بس پاشیدگی در کلیه نمونه ها در این تحقیق بین ۰/۱ تا ۰/۲ بودند و اختلاف معنی داری نیز نداشتند ($p > 0.05$) لذا با توجه



شکل (۱) توزیع اندازه ذرات نانولیپوزوم های فاقد و حاوی اسانس باریجه با مقادیر مختلف لسیتین:کلیسترول

Fig. 1 Particle size distribution of with and without *Ferula gummosa* nanoliposomes with various quantities of lecithin: Cholesterol

جدول (۲) میانگین اندازه ذرات، شاخص پراکندگی و کارایی درون پوشانی نانولیپوزوم های حاوی اسانس باریجه با مقادیر مختلف لسیتین:کلیسترول و مقایسه آن با نانولیپوزوم فاقد اسانس.

Table 2 Mean size, polydispersity index and encapsulation efficiency Of *Ferula gummosa* nanoliposomes with various quantities of lecithin: Cholesterol and compare it with empty nanoliposome.

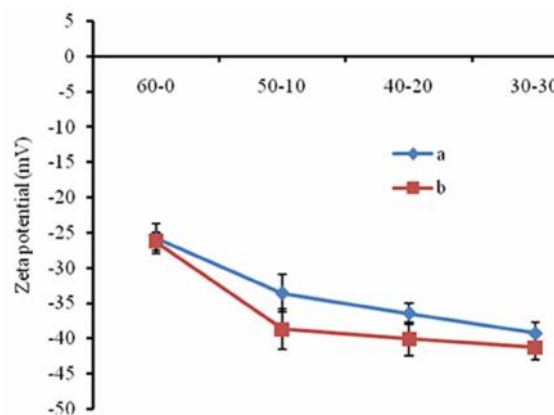
Sample نمونه	Various quantities of lecithin: cholesterol مقادیر لسیتین:کلیسترول (mg)	Mean particle size (nm) میانگین اندازه ذرات	polydispersity index شاخص پراکندگی	Encapsulation efficiency (%) کارایی درون پوشانی
Empty nanoliposome نانولیپوزوم فاقد اسانس		138.76 ± 2.37 ^a	0.181 ± 0.05 ^a	-
Nanoliposome with essential oil نانولیپوزوم حاوی اسانس	0-60	74.27 ± 2.85 ^b	0.113 ± 0.14 ^a	73.26 ± 2.87
	10-50	81.47 ± 2.92 ^c	0.122 ± 0.11 ^a	58.84 ± 3.27
	20-40	98.90 ± 1.01 ^d	0.190 ± 0.09 ^a	52.36 ± 4.63
	30-30	99.93 ± 0.23 ^d	0.161 ± 0.07 ^a	49.78 ± 2.56

که مشاهده می‌شود تمامی لیپوزوم‌ها دارای زتا پتانسیل بالای 25 mV بودند. اصولاً مقادیر پتانسیل زتا حدود 25 mV (مثبت یا منفی) به‌عنوان معیاری برای تفکیک سطوح ذرات با بار الکتریکی بالا و پایین در نظر گرفته می‌شود. سیستم‌های کلئیدی حاوی ذرات با پتانسیل زتا پایین (مثبت یا منفی)، در صورت عدم وجود عوامل بازدارنده دیگر نظیر ویسکوزیته بالا و ممانعت فضایی، تمایل زیادی به تجمع دارند [۱۵]. پتانسیل زتا نانولپوزوم بدون کلسترول و اسانس $25/1 \pm 2/8 \text{ mV}$ بود که به‌دلیل یونیزاسیون گروه‌های فسفات موجود در لسیتین می‌باشد. با اضافه شدن کلسترول به ساختار لیپوزوم، پتانسیل زتا افزایش یافت و در نمونه حاوی 30 mg ، به $41/3 \pm 1/8$ رسید. دلیل این امر احتمالاً به این خاطر است که کلسترول یک مولکول خنثی می‌باشد و بار منفی ذرات می‌تواند در اثر تشکیل پیوند هیدروژنی بین گروه کولین در فسفاتیدیل کولین و گروه هیدروکسیل در سر کلسترول ایجاد گردد. در نتیجه تشکیل این پیوند، گروه کولین با بار مثبت به داخل غشاء و گروه فسفاتیدیل با بار منفی به سطح غشاء کشیده شده و بدین ترتیب بار منفی ذرات و دافعه الکترواستاتیک بین آن‌ها افزایش می‌یابد [۳۳]. با درون‌پوشانی اسانس در نانولپوزوم و در مقایسه با انواع بدون اسانس، پتانسیل زتا در نمونه‌های دارای کلسترول تغییر معنی‌داری پیدا نکرد (شکل ۲) ($p < 0/05$). مالهیروس و همکاران نیز نشان دادند که افزودن کلسترول به لیپوزوم حاوی نایسین، باعث افزایش پتانسیل زتا گردید [۲۶].

گردید به‌طوری که به $49/78 \pm 2/56 \%$ در نمونه دارای 30 mg کلسترول و لسیتین رسید. افزایش کلسترول در فرمول لیپوزوم باعث افزایش احتباس اسانس و پایداری بیشتر می‌شود اما به‌کار بردن زیاد آن، سبب پر شدن فضای دو لایه توسط کلسترول و کاهش بارگذاری اسانس در لایه‌های لیپوزومی می‌گردد به‌طوری که کلسترول و اسانس برای پر کردن فضای بین لایه‌ای رقابت می‌کنند [۱۹]. علاوه بر این، در طول شکل‌گیری وزیکول، کاهش سیالیت غشاء نیز باعث کاهش بارگذاری اسانس در لایه‌ها می‌شود [۲۸]. نتایج این پژوهش با نتایج به‌دست آمده توسط مالهیروس و همکاران [۱۲] و اورتان و همکاران که کاهش کارایی درون‌پوشانی با افزایش میزان کلسترول در دیواره لیپوزوم را گزارش کردند، مطابقت داشت [۳۱].

۳.۳. پتانسیل زتا

پتانسیل زتا یکی دیگر از ویژگی‌های فیزیکی مهم لیپوزوم‌ها است که عامل مهمی در تعیین پایداری سیستم‌های کلئیدی محسوب می‌شود و بهترین شاخص برای تعیین وضعیت الکتریکی سطحی دیسپرسیون‌ها می‌باشد. این عامل، نشان‌دهنده میزان تجمع بار در لایه غیرمتحرک و شدت جذب یون‌های مخالف به سطح ذره و در نتیجه میزان پایداری الکترواستاتیک است [۱۵]. پتانسیل زتا به‌صورت مستقیم قابل اندازه‌گیری نیست و با استفاده از تحرک الکتروفوریتیک یا تحرک الکتروفوریتیک پویا تعیین می‌شود [۳۲]. نتایج حاصل از پتانسیل زتا نانولپوزوم‌های بدون اسانس و حاوی اسانس در شکل (۲) آمده است. همان‌طور



شکل (۲) پتانسیل زتا الف) نانولپوزوم فاقد اسانس و ب) نانولپوزوم حاوی اسانس باریجه با مقادیر مختلف لسیتین: کلسترول

Fig. 2 Zeta potential of empty nanoliposome (a), *Ferula gommosa* nanoliposome (b) with various quantities of lecithin: Cholesterol



در سیستم لیپوزومی بهبود یافت. بیشترین میزان قطر هاله عدم رشد (۴۵ mm) مربوط به نمونه نانولیپوزوم حاوی اسانس بدون کلسترول بود که از لحاظ آماری با سایر نمونه‌های حاوی اسانس و نمونه کنترل (اسانس) اختلاف معنی‌داری داشت ($p < 0.05$). احتمالاً دلیل افزایش خاصیت ضد میکروبی در نانولیپوزوم‌ها این است که در سطح غشاء باکتری حفراتی وجود دارد که محل ورود و خروج مواد می‌باشد. هرچه نانوذرات تولیدی کوچک‌تر باشند راحت‌تر می‌توانند وارد این حفرات شده و اسانس محصور شده را رها کنند. همچنین با توجه به این‌که جنس نانولیپوزوم از فسفولیپید بود، سیالیت غشایی بیشتری داشته و در این شرایط اسانس راحت‌تر می‌تواند از غشاء باکتری به داخل سلول نفوذ کند و سبب تخریب دیواره سلولی شود [۳۵].

۴.۳. بررسی فعالیت ضد میکروبی نانولیپوزوم اسانس باریجه به روش انتشار دیسک در آگار

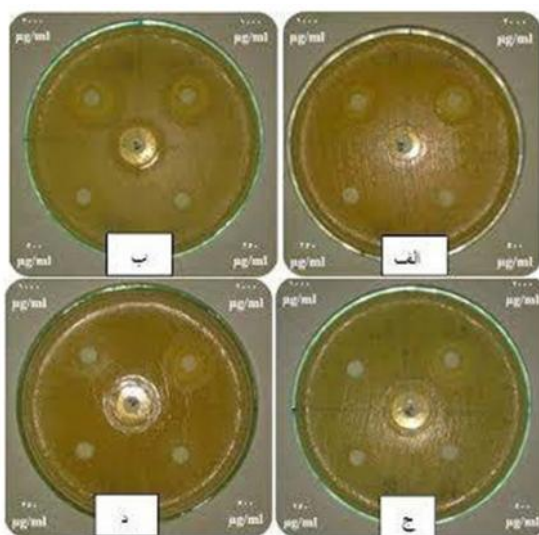
با استفاده از روش انتشار دیسک در آگار، اثر ضد میکروبی نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس باریجه بر باکتری *اشریشیا کلی* بررسی (شکل ۳) و نتایج حاصل در جدول (۳) آورده شده است. از نظر تئوری، قطر هاله که نشان‌دهنده عدم رشد باکتری‌ها می‌باشد، عکس‌العملی از غلظت ماده مؤثره موجود در گیاه است. این پدیده یک ارتباط خطی بین اندازه هاله و لگاریتم غلظت ماده مورد آزمایش بوده که با اندازه‌گیری قطر هاله و مقایسه آن با نمونه کنترل، قدرت ضد میکروبی ماده مورد آزمایش را مشخص می‌کند [۳۴]. همان‌گونه که نتایج نشان داد خاصیت ضد میکروبی اسانس باریجه در اثر درون‌پوشانی

جدول (۳) میانگین قطر هاله مهار رشد (mm) *اشریشیا کلی* بر اساس نتایج آزمون انتشار دیسک نانولیپوزوم‌ها و اسانس باریجه.

Table 3 The mean diameter of the growth inhibition zones (mm) of *E. coli* based on the results of disc diffusion test nanoliposomes and *Ferula gommosa* essential oil.

نمونه Sample	مقادیر لستین: کلسترول (mg) Various quantities of lecithin: cholesterol	قطر هاله (mm) Zone of inhibition
Free essential oil اسانس آزاد		40 ^b
Nanoliposomes with essential oil نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس	0-60	45 ^{ab}
	10-50	30 ^c
	20-40	25 ^d
	30-30	10 ^e

* Means within a column with the same letters are not significantly different at $P < 0.05$



شکل (۳) تأثیر قطر هاله مهار رشد نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس باریجه تهیه شده با مقادیر مختلف لستین: کلسترول (۱) ۳۰-۳۰، (۲) ۵۰-۱۰، (۳) ۴۰-۲۰ و (۴) ۶۰-۰ روی *اشریشیا کلی* O157:H7

Fig. 3 The effect of growth inhibition zone diameter of *Ferula gommosa* essential oil loaded nanoliposomes prepared with various quantities of lecithin: cholesterol 30-30 (1), 50-10 (2), 20-40 (3) and 0-60 (4) on *E. coli* O157:H7

نیز حل می‌شوند در نتیجه باعث ایجاد اغتشاش در بخش لپیدی پلازما و غشاء زیستی میکروارگانیسم‌ها می‌گردند. این تغییرات منجر به نفوذپذیری غشاء و نشت ترکیبات داخل سلول و در نهایت مرگ سلول می‌گردد [۸]. همچنین ممکن است اسانس باریجه توانایی عبور از غشاء را به دلیل همخوانی ساختارش با ساختار غشاء میکروبی داشته باشد [۴]. دو ترکیب عمده موجود در اسانس باریجه یعنی آلفا و بتا پینن، دارای فعالیت ضد میکروبی بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی بوده و اثر حشره‌کشی نیز دارند [۳]. صالحی و همکاران دریافتند عصاره الکلی گیاه باریجه بر سودوموناس *آئروژینوزا* و *کاندیدا آلبیکنس* اثر مهاری و کشندگی دارد [۳۸]. قاسمی و همکاران فعالیت ضد میکروبی بر روی باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی و ضدقارچی اسانس باریجه را به میزان آلفا و بتاپینن موجود در اسانس نسبت دادند [۳].

نتایج این تحقیق مشخص کرد که حداقل غلظت بازدارندگی اسانس پس از درون‌پوشانی در نانولیپوزوم بدون کلسترول به‌طور معنی‌داری کاهش یافت ($p < 0.05$) و در سایر نمونه‌ها با افزایش غلظت کلسترول در غشاء لیپوزومی افزایش نشان داد (جدول ۴). به عبارت دیگر، فعالیت ضد باکتریایی فقط در سیستم لیپوزومی فاقد کلسترول نسبت به حالت آزاد بیشتر بود. علت این امر احتمالاً به این دلیل است که نانوحامل‌هایی مانند نانولیپوزوم‌ها، با توجه به اندازه‌های کوچک سلولی، می‌توانند فعالیت‌های ضد میکروبی ترکیبات درون‌پوشانی شده را با افزایش مکانیسم جذب سلولی غیرفعال و کاهش مقاومت در برابر انتقال جرم افزایش دهند [۳۸]. علاوه بر این، افزایش فعالیت ضد میکروبی اسانس لیپوزومی در این مطالعه ممکن است به برهم‌کنش مؤثر بین باکتری و اسانس نیز مرتبط باشد. بدین صورت که با افزایش میزان کلسترول در فرمولاسیون

لیولیوس و همکاران دریافتند که نانولیپوزوم‌ها از راه‌های متفاوتی مانند انتقال بین‌غشایی، آزادی تماس، جذب، فاگوسیتوز و انتقال سلولی با سلول‌های باکتریایی بر هم‌کنش داده و آزادسازی ترکیبات فعال را داخل سلول‌های باکتری بهبود می‌بخشند و سبب افزایش خاصیت ضد میکروبی آن‌ها می‌شوند [۳۶]. در تأیید نتیجه به دست آمده، ذبیحی و همکاران [۱]، فرقانی و همکاران [۱۵]، خطیبی و همکاران [۲۱] و قره‌نقده و همکاران [۳۵] با تولید نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس‌های به ترتیب سیر، آویشن، نعناع فلفلی و مریم‌گلی به نتیجه مشابهی دست یافتند. همچنین کمترین میزان قطر هاله عدم رشد (۱۰ mm) به نمونه دارای ۳۰ mg کلسترول مربوط بود (جدول ۳). با دقت در داده‌ها می‌توان دریافت که با اضافه شدن کلسترول به فرمولاسیون لیپوزوم، از خاصیت ضد میکروبی آن بر علیه باکتری *شریشیا کلی* کاسته شده است. علت این امر احتمالاً به خاطر این است که با افزایش نسبت کلسترول در لیپوزوم، دیواره پایدارتر و ضخیم‌تر شده و اندازه نانولیپوزوم نیز بزرگ‌تر گردید (جدول ۲) در نتیجه رهایش اسانس آهسته‌تر انجام گرفت.

۵.۳. حداقل غلظت بازدارندگی رشد

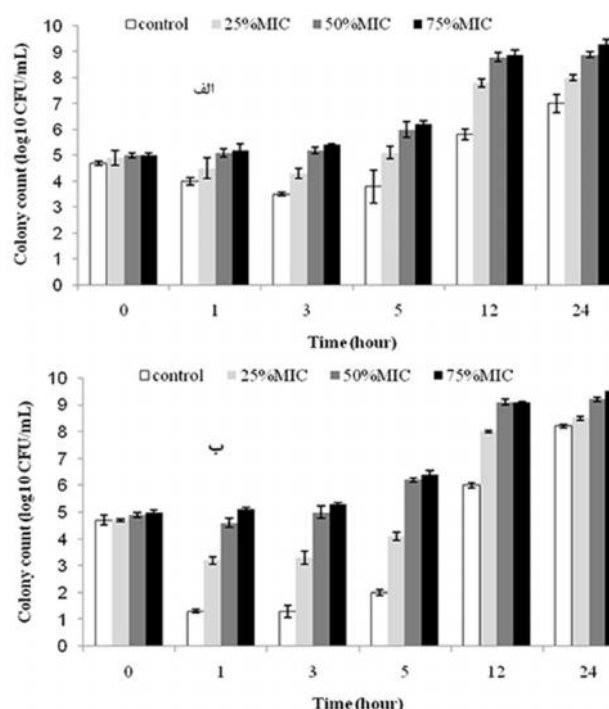
مطالعات انجام شده به منظور شناسایی ترکیبات تشکیل دهنده اسانس باریجه نشان داده است که حدود ۷۵-۶۳٪ اسانس باریجه را هیدروکربن‌های مونوترپنی تشکیل می‌دهند که حاوی بتاپینن، آلفاپینن، دلتا-۳-کارن و هیدروکربن‌های دیگر مانند میرسن، پاراسیمن، لیمونن، ترپینولن، الکل‌های مونوترپنی و استات، سزکوئیترپن‌ها، آزلون‌ها، استرهای تیول، پیرازین‌ها و هیدروکربن‌های با اسکلت غیر ترپنی می‌باشد [۶]. ترکیبات مونوترپنی، خاصیت چربی‌دوستی نسبی دارند و در آب

جدول (۴) حداقل غلظت بازدارندگی اسانس آزاد و نانولیپوزوم حاوی اسانس باریجه بر علیه باکتری *شریشیا کلی* O157:H7.

Table 4 Minimum inhibitory concentration of free essential oil and nanoliposomes with *Ferula gommosa* essential oil on the *E. coli* O157:H7.

Sample نمونه	مقادیر لستین: کلسترول (mg) Various concentrations of lecithin: cholesterol	حداقل غلظت بازدارندگی (µg/ml) Minimum inhibitory concentration
Free essential oil اسانس آزاد		11 ^b
Nanoliposomes with essential oil نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس	0-60	10 ^{a*}
	10-50	11.5 ^c
	20-40	13.5 ^d
	30-30	14.5 ^e

* Means within a column with the same letters are not significantly different at $P < 0.05$.



شکل (۴) تشکیل کلنی/شیریشیاکلی در غلظت های ۰، ۲۵، ۵۰ و ۷۵٪ حداقل غلظت کشندگی (۱) نانولیپوزوم حاوی اسانس باریجه و (۲) اسانس باریجه
Fig. 4 Colony counting of *E. coli* O157:H7 cultured at sub-MIC concentration of nanoliposomal *Ferula gommosa* EO (1) and free *Ferula gommosa* EO (2)

رشد باکتری/شیریشیاکلی در مقایسه با اسانس آزاد گردید (شکل ۴) ($p < 0.05$). استفاده از اسانس آزاد با غلظت ۷۵٪ حداقل غلظت کشندگی در مقایسه با نمونه کنترل سبب کاهش لگاریتمی تعداد باکتری ۳/۲۸ و ۱/۱۲ CFU/mL به ترتیب در ۱۲ و ۲۴ h پس از کشت گردید. این کاهش در نانولیپوزوم حاوی اسانس به ترتیب ۳/۴ و ۲/۵۳ لگاریتم بود ($p < 0.05$). جمعیت نهایی باکتریها (CFU/mL) در تمامی ساعت‌های مورد بررسی مخصوصاً پس از ۲۴ h، در مورد ۵۰ و ۷۵٪ حداقل غلظت بازدارندگی کمتر از نمونه اسانس آزاد بود. این اثر می‌تواند به رهایش تدریجی اسانس از لیپوزومها مرتبط باشد که در ۲۴ h بعد از تلقیح باکتری نیز همچنان ادامه داشت.

۴. نتیجه‌گیری

در این مطالعه نانولیپوزومهای اسانس باریجه با استفاده از روش ترکیبی هیدراسیون لایه نازک و امواج فراصوت تهیه شدند و تأثیر غلظت لسیتین-کلسترول بر ویژگی‌های فیزیکی و

لیپوزومها و افزایش استحکام غشاء لیپوزومی امکان رهایش سریع اسانس فراهم نگردیده است و اندازه لیپوزوم، ضخامت و استحکام غشاء لیپوزومی بر مکانیسم‌های موجود در برهم‌کنش لیپوزومها با سلول‌های زنده تأثیرگذار می‌باشد [۴۰]. در همین ارتباط، ساختلی و همکاران افزایش خاصیت ضد میکروبی سیستم لیپوزومی حاوی اسانس را مرتبط با دو مکانیسم دانستند: (۱) لیپوزومها با غشاء سلول باکتری آمیخته شده و محتویاتشان را به داخل سیتوپلاسم می‌ریزند و یا (۲) لایه لیپیدی لیپوزوم با غشاء سلولی باکتری بر هم‌کنش داده و در آن ایجاد منفذ می‌کند و از این منفذ محتویات لیپوزومها به درون سلول آزاد می‌شود [۴۱].

۶.۳. ارزیابی رشد و تکثیر باکتری/شیریشیاکلی تحت

تأثیر نانولیپوزوم اسانس باریجه

نتایج حاصل از این تحقیق نشان داد که نمونه نانولیپوزوم حاوی اسانس (دارای ۶۰ میلی‌گرم لسیتین) با غلظت ۵۰ و ۷۵٪ حداقل غلظت بازدارندگی، به شکل معنی‌داری باعث کاهش

اسانس در نانولیپوزوم‌ها جایگزین شد، تغییر معنی‌داری پیدا نکرد. همچنین نانولیپوزوم متشکل از لسیتین خاصیت ضد میکروبی مطلوب‌تری نسبت به سایر نمونه‌ها داشت.

میکروبی آن‌ها بررسی شد. نتایج نشان داد که با افزایش کلسترول در فرمولاسیون، اندازه ذرات افزایش و کارایی کاهش پیدا کرد. پایداری الکترواستاتیک لیپوزوم‌ها با افزودن مقادیر مشخصی از کلسترول بهبود یافت، اما پتانسیل زتا در زمانی که

منابع

- (2009). Studies concerning the entrapment of *Anethum graveolens* essential oil in liposomes. *Rom Biotechnol Lett.*, 14, 4411-4417.
- [11] Samperio C., Boyer R., Egle W.N., Holland K.W., Mckinney J.S., O'keefe S.F., Smith R., Marcy J.E. (2010). Enhancement of plant essential oils' aqueous solubility and stability using alpha and beta cyclodextrin. *J Agric Food Chem.*, 58, 12950-12956.
- [12] Khatibi S.A., Misaghi A., Moosavy M.H., Akhondzadeh Basti A., Koochi M.K., Khosravi P., Haghirosadat F. (2016). Encapsulation of *Zataria Multiflora* Bioss. Essential oil into nanoliposomes and in vitro antibacterial activity against *Escherichia coli* O157:H7. *J Food Process Preserv.*, 41, 1-10.
- [13] Valenti D., De Logu A., Loy G., Sinico C., Bonsignore L., Cottiglia F., Garau D., Fadda A.M. (2001). Liposome-incorporation *Santolina insularis* essential oil: Preparation, characterization and in vitro antiviral activity. *J Liposome Res.*, 11, 73-90.
- [14] Detoni C.B., Cabral-Albuquerque E.C.M., Hohlemweger S.V.A., Sampaio C., Barros T.F., Velozo E.S. (2009). Essential oil from *Zanthoxylum tingoassuba* loaded into multi lamellar liposomes useful as antimicrobial agents. *J. Microencapsulation*, 26, 684-691.
- [۱۵] فرقانی، س.؛ قره‌نقده، س.؛ صوتی خیابانی، م.؛ قره‌نقده، س. (۱۳۹۶). بررسی خاصیت ضد میکروبی عصاره متانولی، اسانس و نانولیپوزوم حاوی اسانس نعناع فلفلی. *علوم و صنایع غذایی*، شماره ۶۸، دوره ۱۴، ص ۹۳-۱۰۲.
- [16] Adams R.P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography /Mass Spectroscopy. (1995). Allured Publishing Co. IL.
- [۱۷] محمدی، م.؛ قنبرزاده، ب.؛ همیشه کار، ح.؛ رضایی مکرّم، ر.؛ محمدی فر، م.ا. (۱۳۹۲). ارزیابی ویژگی‌های فیزیکی نانولیپوزوم‌های حامل ویتامین D_۳ تولید شده به روش هیدراسیون لایه نازک- سونیکاسیون. *علوم تغذیه و صنایع غذایی ایران*. جلد ۸، شماره ۴، ص ۱۷۵-۱۸۸.
- [18] Kirby C., Gregoriadis G. (1984). Dehydration rehydration vesicles: a simple method for high yield drug entrapment in liposomes. *Nat Biotechnol.*, 2(11),
- [1] Zabihi A., Akhondzadeh Basti A., Amoabediny G., Khanjari A., Tavakkoly Bazzaz J., Mohammadkhan F., Hajjar Bargh A., Vanaki E. (2017). Physicochemical characteristics of nanoliposome garlic (*Allium sativum* L.) essential oil and its antibacterial effect on *Escherichia coli* O157:H7. *J. Food Qual. Hazards Control.*, 4, 24-28.
- [2] Espinel-Ingroff A., Fothergill A., Peter J., Rinaldi M., Walsh T. (2002). Testing conditions for determination of minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for *Aspergillus* spp.: NCCLS collaborative study. *J. Clin. Microbiol.*, 40(9), 3204-8.
- [3] Ghasemi Y., Faridi P., Mehregan I., Mohagheghzadeh A. (2005). *Ferula gummosa* fruits: an aromatic antimicrobial agent. *Chem. Nat Compd.*, 41, 311-314.
- [4] Jahansooz, F., Ebrahimzadeh, H., Najafi, A.A., Naghavi, M.R., Kouyakh, E.T., Farzaneh, H. (2008). Composition and antifungal activity of the oil of *Ferula gummosa* samples from Iran. *J. Essent. Oil Bear. Plants.*, 3, 284-291.
- [5] Sanseverino, A.M., Dasilva, F.M. (2000). Cohalogenation of Limonene, Carvomethene and related monoterpenic alcohols, *J Brazilian Chem. Soci.*, 11, 330- 333.
- [6] Sayyah, M., Kamalinejad, M., Bahrami Hidage, R., and Rustaiyan, A. (2001). Antiepileptic Potential and Composition of the Fruit Essential Oil of *Ferula Gummosa* boiss. *Iranian Biomed. J.*, 5, 69-72.
- [7] Eftekhari, F., Yousefzadi, M., Borhani, K. (2004). Antibacterial activity of the essential oil from *Ferula gummosa* seed. *Fitoterapia*, 75(7-8), 758-759.
- [8] Ebrahimzadeh, M.A., Nabavi, S.M. (2011). Antioxidant activity of hydroalcoholic extract of *Ferula gummosa* Boiss roots. *Eur Rev. med pharmocol sci.*, 15(6), 658-64.
- [9] Fayaz, F., Rahmati Roodsari, S., Gachkar, L., Pourkaveh, B., Ghasemian Safaei, H. (2011). The antimicrobial activity of *Ferula gummosa* on bacterial strains isolated from patients with gastroenteritis. *Iran J. clin. infect Dis.*, 6, 21-24.
- [10] Ortan A., Campeanu G., Dinu--Pirv C., Popesco L.



optimisation of drug loading and ESEM analysis of stability. *Int. J Pharm.*, 285, 23–34.

[31] Ortan A., Campeanu G., Dinu-Pirv C., Popesc L. (2009). Studies concerning the entrapment of Anethum graveolens essential oil in liposomes. *Rom Biotechnol Lett.*, 14, 4411–17.

[32] Gregoriadis G. (2007). Liposome technology, liposome preparation and related techniques, 3rd edn, vol. 1. New York: Informa Healthcare Inc.

[33] Makino, k., Yamada, T., Kimura, M., Oka, T., Ohshima, H., and Kondo, T. (1991). Temperature and ionic strength-induced conformational changes in the lipid head group region of liposomes as suggested by zeta potential data. *Biophys. Chem.*, 41, 75-183.

[34] Balouiri, M., Sadiki, M., Ibensouda, S.K. (2016). Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *J. Pharm. Anal.*, 6, 71-79.

[۳۵] قره‌نقده، س؛ صمدلویی، ح.م؛ صوتی خیابانی، م؛

همیشه‌کار، ح؛ رضایی مکرّم، ر. (۱۳۹۶). ارزیابی خواص ضد میکروبی و آنتی اکسیدانی نانولیپوزوم حاوی اسانس مریم گلی. *علوم و صنایع غذایی*، شماره ۶۲، دوره ۱۴، ص ۲۸۲-۲۷۱.

[36] Liolios, C.C., Gortzi, O., Lalas, S., Tsaknis, J., Chinou, I. (2009). Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. *Food Chem.*, 112(1), 77-83.

[۳۷] هاشمی کروئی، س.م؛ صالحی، م؛ اصغر حیدری، م؛

مبینی، م؛ نصرالهی عمران، آ. (۱۳۹۵). اثر عصاره های آبی و الکلی ریشه باریجه علیه چند سویه پاتوژن باکتریایی. *مجله دانشکده علوم پزشکی نیشابور*. دوره ۴، شماره ۳، ص ۱۰-۱۸.

[38] Salehi M, Hashemi Karoui M, Nasrollahi Omran A, Mobini M, Aaghar Heydari M. (2015). Antifungal activity of in vitro aqueous and alcoholic extracts of Barije root (*Ferula gummosa*). *J Birjand Uni Med Sci*. 2015;21(4):444-450. [in Persian]

[39] Wu J, Liu H, Ge S, Wang S, Qin Z, Li C, Zheng Q, Liu Q, Zhang Q. (2015). The preparation, characterization, antimicrobial stability and in vitro release evaluation of fish gelatin films incorporated with cinnamon essential oil nanoliposomes. *Food Hydrocolloids*, 43, 427–435.

[40] Shoji Y, Nakashima H. (2004). Nutraceuticals and delivery systems. *J Drug Targeting.*, 12, 385–391.

[41] Sachelletti S, Khalil H, Chen T, Beaulac C, Senechal S, Lagace J. (2000). Demonstration of a fusion mechanism between a fluid bactericidal liposomal formulation and bacterial cells. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1463, 254–266.

979-984.

[19] Bouarab, L., Maherani, B., Kheiriloom, A., Hasan, M., Aliakbarian, B., Linder, M., Arab Tehrany, E. (2014). Influence of lecithin–lipid composition on physicochemical properties of nanoliposomes loaded with a hydrophobic molecule. *Colloids Surf., B: Biointerfaces*, 115, 197-204.

[20] Fatouros, D.G., Antimisariis, S.G. (2002). Effect of amphiphilic drugs on test ability and zeta-potential of their liposome formulations: a study with prednisolone, diazepam, and griseofulvin. *J. Colloid Interface Sci.*, 251(2), 271-277.

[21] Khatibi S.A., Misaghi A., Moosavy M.H., Akhondzadeh Basti A., Koochi M.K., Khosravi P., Haghirosadat F. (2016). Encapsulation of *Zataria Multiflora* Bioss. Essential oil into nanoliposomes and in vitro antibacterial activity against *Escherishia coli* O157:H7. *J Food Process Preserv.*, 41, 1-10.

[۲۲] مرتضایی‌نژاد، ف؛ صادقیان، م.م. (۲۰۰۷). مقایسه ترکیبات فعال باریجه در سه ناحیه کاشان. *پژوهش در علوم کشاورزی*. شماره ۳، ص ۱۷۲-۱۷۷.

[23] Nabavi, S.F., Habtemariam, S., Sureda, A., Nabavi, S.M. (2012). *Ferula gummosa* Boiss as a rich source of natural antioxidants with numerous therapeutic uses. *Res. Signpost.*, 2, 15-26.

[24] Valenti D., De Logu A., Loy G., Sinico C., Bonsignore L., Cottiglia F., Garau D., Fadda A.M. (2001). Liposome-incorporation *Santolina insularis* essential oil: Preparation, characterization and in vitro antiviral activity. *J Liposome Res.*, 11, 73–90.

[25] Turina A.V., Nolan M.V., Zygadlo J.A., Perillo M.A. (2006). Natural terpenes: Self-assembly and membrane partitioning. *Biophys Chem.*, 122, 101–113.

[26] Malheiros, P.D.S., Sant Anna, V., Barbosa, M.D.S., Brandelli, A., Franco, B.D.G.D.M. (2012). Effect of liposome-encapsulated nisin and bacteriocin-like substance P34 on *Listeria monocytogenes* growth in Minas frescal cheese. *Int. J. Food Microbiol.*, 156(3), 272-277.

[27] Gopinath, D., Ravi, D., Rao, B., Apte, S., Renuka, D., Rambhau, D. (2004). Ascorbyl palmitate vesicles (Aspasomes): formation, characterization and applications. *Int. J. Pharm.*, 271(1), 95-113.

[28] Jaafar-Maalej C., Diab R., Andrieu V., Elaissari A., Fessi H. (2010). Ethanol injection method for hydrophilic and lipophilic drug-loaded liposome preparation. *J Liposome Res.*, 20, 228–43.

[29] Fang J.Y., Hong C.T., Chiu W.T., Wang Y.Y. (2001). Effect of liposomes and niosomes on skin permeation of enoxacin. *Int. J Pharm.*, 219, 61–72.

[30] Mohammed A.R., Weston N., Coombes A.G., Fitzgerald M., Perrie Y. (2004). Liposome formulation of poorly water soluble drugs:

*Research Article***Encapsulation of Barije essential oil in nanoliposomal system and evaluation of its physical and antimicrobial properties****Masoud Najaf Najafi^{1*}, Anita Arianmehr², Ali Mohammadi sani³**

1. Associate professor, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Mashhad, Iran.
2. Master of Science in Food Science & Technology, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran.
3. Associate Professor, Department of Food Science & Technology, Quchan Branch, Islamic Azad University, Quchan, Iran.

Abstract

The aim of this study was to encapsulate the Barije (*Ferula gummosa*) essential oil (EO) in liposomal system and evaluate its physical and microbial properties. Accordingly, nanoliposomes were produced by using specific ratios of lecithin-cholesterol by thin-film hydration-sonication method. Constitutive compounds of essential oil were identified using GC-Mass. The physical properties of the liposomes, such as particle size, polydispersity index, zeta potential, and the efficiency of encapsulating system, were studied. Evaluation of antimicrobial properties was performed by the two methods of minimum inhibitory concentration (MIC) and disc diffusion test on *E. coli* O157:H7. Also, the effect of sub-inhibitory concentration of EO (sub-MIC) was evaluated before and after encapsulation against the growth of bacteria over 24 h. The most important constituents of EO were α -pinene (60.84%) and β -pinin (9.14%). The average particle size of EO loaded liposomes was in the range of 74.27 to 99.93 nm, which had a significant difference with the empty nanoliposome (138.76 nm) ($p < 0.05$). Adding cholesterol to lecithin in a double-layered membrane of liposomes increases particle size and reduces the effectiveness of encapsulation ($p < 0.05$). Electrostatic stability of empty liposomes was improved by adding a certain amount of cholesterol, but the zeta potential did not change significantly in cholesterol-based samples when essential oil was replaced in the liposomes ($p < 0.05$). MIC of EO in encapsulating mode was lower in the liposomal system without cholesterol than in free mode. This was confirmed by measuring the diameter of the bacteria's lack of growth. Nanoliposome specimens containing essential oil (60 mg lecithin) with concentration of 50 and 75% MIC significantly decreased the growth of *E. coli* O157:H7 compared to free essential oil ($p < 0.05$). This research showed that nano-liposomal essential oil was successfully produced by thin layer and ultrasonic hydration method and the cholesterol-free sample in the liposomal membrane had an antimicrobial effect on *E. coli* O157:H7 relative to its free essential oil.

Keywords: Barije essential oil, Nanoliposome, Antimicrobial effect, Encapsulation, Cholesterol.

* Corresponding author: m.najafnajafi@areeo.ac.ir