

نوع مقاله: علمی - پژوهشی

## ارزیابی ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی و ضد میکروبی نانولیپوزوم حاوی اسانس کاکوتی کوهی (*Ziziphora clinopodioides*)

مسعود نجف نجفی<sup>۱\*</sup> و علی محمدی ثانی<sup>۲</sup>

۱- دانشیار گروه صنایع غذایی، مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی، سازمان تحقیقات، آموزش و ترویج کشاورزی، مشهد، ایران  
۲- دانشیار گروه علوم و صنایع غذایی، دانشگاه آزاد اسلامی، قوچان، ایران  
تاریخ دریافت: ۹۸/۴/۲۶؛ تاریخ پذیرش: ۹۸/۱۱/۳۰

### چکیده

درون پوششانی اسانس‌های خوراکی در نانولیپوزوم‌ها، روشی مؤثر برای محافظت از تخریب آنها در مقابل نور، اکسیژن و عوامل شیمیایی است. در این مطالعه، نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس کاکوتی کوهی با غلظت‌های مختلف لستین-کلیسترو (۳۰-۳۰، ۴۰-۴۰، ۵۰-۱۰ و ۶۰-۰ میلی‌گرم) با استفاده از روش هیدراتاسیون لایه نازک-امواج فراصوت تهیه شد. از روش اسپکتروسکوپی GC-Mass برای مطالعه ترکیب‌های تشکیل دهنده اسانس استفاده شد. نتایج نشان داد که پولگون (۴۹/۰۵٪) عمده‌ترین ترکیب اسانس است. اندازه ذرات، شاخص پراکندگی، پتانسیل زتا و کارایی سیستم درون پوششانی برای تعیین ویژگی‌های فیزیکی ارزیابی شد. فعالیت ضدباکتریایی نانولیپوزوم‌ها بر علیه باکتری *اشریشیا کلی* O157H:7 با استفاده از روش انتشار در آگار به کمک دیسک بررسی و حداقل غلظت بازدارندگی رشد (MIC) و حداقل غلظت کشندگی (MBC) تعیین شد. اندازه ذرات و شاخص پراکندگی به ترتیب در محدوده ۸۸/۶-۱۲۱/۹۷ نانومتر و ۰/۱۶۹-۰/۱۱۴ قرار داشتند. نتایج بررسی‌ها نشان می‌دهد استفاده از بالاترین غلظت کلیسترو برای آماده‌سازی نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس موجب افزایش اندازه و شاخص پراکندگی شده ولی کارایی درون پوششانی را کاهش داده است. معلوم شد غلظت کلیسترو تأثیر معنی‌داری بر پتانسیل زتا ندارد و فقط نمونه حاوی ۳۰ میلی‌گرم کلیسترو، پتانسیل زتای بیشتری دارد. MIC و MBC نانولیپوزوم فاقد کلیسترو حاوی اسانس به ترتیب ۱۴ و ۱۴ و نمونه کنترل (اسانس) ۱۵ و ۳۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر بود که با افزایش میزان کلیسترو در نمونه‌ها از شدت ویژگی ضد میکروبی نانولیپوزوم‌ها کاسته شد. نتایج این مطالعه نشان می‌دهد نانولیپوزوم می‌تواند حامل مناسبی برای اسانس کاکوتی کوهی به منظور کنترل رشد *اشریشیا کلی* باشد.

### واژه‌های کلیدی

اسانس خوراکی، *اشریشیا کلی*، پولگون، درون پوششانی، کلیسترو، لستین

### مقدمه

غذایی، دارویی، آرایشی و بهداشتی نقشی کلیدی دارند. بسیاری از مصرف‌کنندگان، متقاضی غذاهای بدون مواد شیمیایی مصنوعی و مضر، از جمله

در حال حاضر علاقه فراوانی به ترکیبات طبیعی وجود دارد که در بسیاری از صنایع مانند مواد

مونوترپن‌های اکسیژنی برجسته‌ترین بخش اسانس کاکوتی‌کوهی هستند و پولگون ترکیب اصلی اسانس است (Salehi et al., 2005). تاکنون مشخص شده که این اسانس روی باکتری‌های *Listeria monocytogenes* (Shahbazi, 2015a) *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella aureus* و *Staphylococcus typhimurium* (Shahbazi, 2015b) *Bacillus cereus* (Shahbazi et al., 2016) و قارچ *Sclerotinia sclerotiorum* (Ma et al., 2016) اثر بازدارندگی داشته است. با این حال و با وجود این ویژگی‌های جالب توجه، استفاده از اسانس کاکوتی‌کوهی محدودیت‌های زیادی دارد. اجزای تشکیل‌دهنده این اسانس مانند سایر اسانس‌های دیگر بسیار فرار هستند و به همین دلیل کارایی محدودی دارند و قدرت ضد میکروبی خود را نمی‌توانند برای مدت طولانی حفظ کنند. اغلب آنها ترکیبات حساسی هستند که می‌توانند به راحتی بر اثر گرما، اکسیژن و نور از بین بروند، می‌توانند با محیط واکنش دهند و کارایی‌شان کاهش پیدا کند (Khatibi et al., 2016). از این رو، بسیاری از روش‌های جدید برای افزایش ثبات و قابلیت زیست دسترس‌پذیری اسانس‌ها معرفی شده‌اند که از جمله آنها استفاده از تکنیک درون‌پوشانی در سیستم لیپوزومی است تا از آسیب رسیدن به مواد فعال در حین فراوری و نگهداری جلوگیری شود (Liolios et al., 2009). لیپوزوم‌ها، ذرات کروی (وزیکول) دو جداره از جنس مولکول‌های لیپیدی هستند که به محض واکنش با آب به صورت سازمان یافته و به فرم غشاهای دو لایه‌ای تجمع می‌یابند (Lu et al., 2014). مواد اصلی سازنده لیپوزوم‌ها معمولاً ترکیبات طبیعی و ایمن مانند لستین زرده تخم‌مرغ یا سویا و کلسترول

آنتی‌بیوتیک‌ها و مواد نگهدارنده، هستند. اسانس‌ها، از ترکیباتی هستند که بشر از آنها به عنوان نگهدارنده طبیعی استفاده می‌کند. اسانس‌ها، ترکیب پیچیده‌ای از متابولیت‌های ثانویه شامل هیدروکربن‌های ترپنوئیدی، ترپنوئیدهای اکسیژنی، مشتقات فنل، آمین‌ها و سولفیدها هستند (Bilia et al., 2014). اکثر این ترکیبات با دارا بودن فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی، اکسیداسیون لیپیدها و فساد میکروبی را کنترل می‌کنند. فساد میکروبی که ناشی از رشد و تکثیر میکروارگانیسم‌ها در مواد غذایی است، ارزش مواد غذایی را پایین می‌آورد و آنها را غیر قابل مصرف می‌سازد. کاکوتی‌کوهی (*Ziziphora clinopodioides* L.) گیاهی است که به دلیل ویژگی‌های مختلف اسانس آن از نظر ترکیبات تشکیل‌دهنده و اثرهای دارویی متعدد، مورد توجه محققان قرار دارد (Salehi et al., 2005). این گیاه متعلق به خانواده Lamiaceae است و در ایران، عراق و بخش‌هایی از ترکیه می‌روید. در ایران در اغلب نواحی مانند قسمت‌های شمالی، شرقی، مرکزی و جنوبی پراکندگی دارد (Babakhanloo et al., 1998). از این گیاه از دیرباز در طب سنتی و در درمان عفونت‌های دستگاه گوارش، دل‌درد و سرماخوردگی استفاده شده است. کاکوتی‌کوهی فعالیت ضد توموری دارد و سبب کاهش رشد غدد سرطانی می‌شود (Babakhanloo et al., 1998). در بسیاری از مناطق ایران از گیاه کاکوتی‌کوهی به عنوان چاشنی و معطرکننده به همراه ماست و سایر فرآورده‌های لبنی استفاده می‌شود (Salehi et al., 2005). به دلیل ویژگی‌های متعدد دارویی کاکوتی‌کوهی، اسانس آن از نظر ترکیبات تشکیل‌دهنده مطالعه شده است (Salehi et al., 2005; Shahbazi et al., 2016). این مطالعات نشان می‌دهد

درجه خلوص ۹۵٪، شرکت Merck آلمان)، دی کلرومتان، متانول، محیط کشت‌های مورد استفاده و سایر مواد از شرکت مواد شیمیایی مرک (Darmstadt, Germany chemical Co. Merck) تهیه شدند.

### تهیه اسانس کاکوتی کوهی

گیاه کاکوتی کوهی مورد مطالعه در فصل بهار جمع‌آوری و خشک گردید. گونه و جنس گیاه با همکاری مرکز تحقیقات و آموزش کشاورزی و منابع طبیعی خراسان رضوی تأیید شد. اسانس از قسمت برگ و ساقه گیاه با استفاده از روش تقطیر با آب و در دستگاه کلونجر تهیه شد. برای این منظور، ۱۰۰ گرم گیاه خشک شده با استفاده از یک دستگاه خردکن آسیاب شد و با آب مقطر به نسبت ۱:۵ مخلوط گردید. اسانس‌گیری به مدت ۳ ساعت ادامه یافت. اسانس تجمع یافته در بالای فاز آبی جمع‌آوری و با مقدار کمی سدیم سولفات بی‌آب ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ )، آب‌گیری شد. سپس اسانس جدا و در یک بطری شیشه‌ای تیره‌رنگ و در بسته در دمای یخچال تا زمان استفاده نگهداری شد (European Pharmacopoeia, 1997).

### شناسایی ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس

ترکیبات شیمیایی اسانس کاکوتی کوهی با استفاده از دستگاه گاز کروماتوگرافی گازی جرمی (GC-Mass) (مدل Agilent 7890B، Agilent USA technologies) حاوی ستون موئینه (به طول ۳۰ متر، قطر داخلی ۰/۲۵ میلی‌متر و ضخامت لایه فاز ساکن ۰/۲۵ میکرومتر) متصل به طیف‌سنج جرمی مدل Agilent 5977A، تجزیه شد. دتکتور FID (یونیزاسیون شعله هیدروژن)، گاز حامل هلیوم (درجه خلوص ۹۹/۹۹ درصد)، سرعت جریان گاز حامل ۱/۱ میلی‌لیتر در دقیقه و انرژی یونیزاسیون

هستند لیپوزوم‌ها، به‌عنوان حامل‌های کلونیدی، دارای مزایایی هستند از جمله سازگاری زیستی، زیست دسترس‌پذیری، بهبود حل‌پذیری ترکیبات حل‌ناپذیر و عملکرد پایدار در ره‌ایش هدفمند (Wu *et al.*, 2015). با درون‌پوشانی در لیپوزوم، فراریت و بی‌ثباتی شیمیایی اسانس‌ها بدون تغییر مواد شیمیایی آنها کاهش می‌یابد. لیپوزوم‌ها همچنین می‌توانند فعالیت ضد میکروبی اسانس‌ها را با توجه به اندازه بسیار کوچکی که دارند عمدتاً از دو طریق افزایش دهند: (۱) مکانیسم جذب منفذی سلول‌ها را تقویت می‌کنند و (۲) مقاومت به نفوذ و انتقال مواد را کاهش می‌دهند (Xiao *et al.*, 2011). در مورد استفاده از نانولیپوزوم‌ها برای درون‌پوشانی اسانس‌ها مطالعات متعددی در دسترس هست (Wu *et al.*, 2015; Liolios *et al.*, 2009; Lu *et al.*, 2014) اما تاکنون گزارشی مبنی بر تهیه نانولیپوزوم اسانس کاکوتی کوهی منتشر نشده است.

هدف اصلی این مطالعه، تهیه نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس کاکوتی کوهی با استفاده از نسبت‌های مختلف لستین-کلسترول و با روش هیدراتاسیون لایه نازک-امواج فراصوت است. ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی نانولیپوزوم حاوی و فاقد اسانس از قبیل اندازه ذرات، شاخص پراکندگی، کارایی درون‌پوشانی، پتانسیل زتا و پایداری و ویژگی‌های ضد میکروبی آنها علیه یکی از مهم‌ترین باکتری‌های بیماری‌زا در مواد غذایی یعنی /شیریشیا کولی O157:H7 بررسی شده است.

### مواد و روش‌ها

#### مواد اولیه

فسفولیپید (ال - آلفا - لستین گرانولار با درجه خلوص ۹۹٪، شرکت Across آمریکا)، کلسترول (با

### ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی

#### اندازه ذرات، شاخص پراکندگی و پتانسیل زتا

اندازه ذرات، شاخص پراکندگی و پتانسیل زتای نانولیپوزوم حاوی اسانس و فاقد اسانس با روش پراکنش نور پویا<sup>۱</sup> و با استفاده از دستگاه زتاسایزر (Nano-ZS، ساخت شرکت Malvern، انگلستان) تعیین شد. برای این منظور و جلوگیری از اثرهای پراکندگی چندگانه<sup>۲</sup>، نمونه‌ها با آب دیونیزه رقیق شدند. دما در تمام اندازه‌گیری‌ها روی ۲۵ درجه سلسیوس تنظیم شد (Bouarab *et al.*, 2014).

#### کارایی درون‌پوشانی

کارایی درون‌پوشانی با روش دیالیز در ۴ درجه سلسیوس با استفاده از یک غشای سلولزی (با وزن مولکولی ۱۰ کیلو دالتون) برای جدا کردن نانولیپوزوم‌ها و اسانس‌های درون‌پوشانی شده تعیین گردید (Khatibi *et al.*, 2016). لیپوزوم‌های دیالیز شده با متانول (Darmstadt, Merck، آلمان) تخریب شدند و مقدار اسانس درون‌پوشانی شده با استفاده از اسپکتروفتومتر (مدل Shimadzu UV 160A، ژاپن) در طول موج ۵۱۷ nm اندازه‌گیری شد.

#### فعالیت ضد میکروبی

##### تهیه سوسپانسیون باکتریایی

از سویه استاندارد باکتری گرم منفی /شریشیا کلی O157:H7 (ATCC 11303) تهیه شده از دانشگاه علوم پزشکی مشهد استفاده شد. برای تهیه سوسپانسیون میکروبی ۲۴ ساعت پیش از آزمایش، به کمک آنس استریل از کشت ذخیره به محیط کشت شیب‌دار مولر هینتون آگار تلقیح شد. سوسپانسیون غلیظ میکروبی با استفاده از محلول رینگر پس از رشد باکتری بر سطح شیب‌دار آگار تهیه گردید. کدورت سوسپانسیون حاصل با اسپکتروفتومتر در طول موج ۶۰۰ نانومتر اندازه‌گیری

در طیف‌سنجی جرمی معادل ۷۰ الکترون ولت بود. برنامه دمایی ستون از ۶۰ تا ۲۵۰ درجه سلسیوس با سرعت افزایش ۵ درجه سلسیوس در دقیقه تنظیم شد و به مدت ۱۰ دقیقه در ۲۵۰ درجه سلسیوس ثابت ماند. اجزای تشکیل‌دهنده با مقایسه طیف جرمی آنها با بانک طیفی و مقایسه زمان بازداری آنها با مقادیر مرجع شناسایی شدند (Adams, 1995).

#### تهیه نانولیپوزوم

نانولیپوزوم اسانس کاکوتی‌کوهی با استفاده از روش ترکیبی هیدراسیون لایه نازک و امواج فراصوت مطابق با روش محمدی و همکاران (Mohammadi *et al.*, 2014) با اندکی تغییر تهیه گردید. برای این منظور، غلظت‌های متفاوت از لستین-کلسترول (۳۰-۳۰، ۴۰-۲۰، ۵۰-۱۰ و ۶۰-۰ میلی‌گرم) در ترکیبی از حلال‌های دی‌کلرومتان-متانول با نسبت مساوی حل شد؛ اسانس به این مخلوط اضافه گردید؛ حلال در تبخیرکننده تحت خلأ چرخشی (Heidolph، مدل MB400، آلمان) در دمای ۳۰ درجه سلسیوس تبخیر شد. لایه نازک تشکیل شده با ۱۵ میلی‌لیتر آب مقطر استریل هیدراته گردید. لیپوزوم‌های تولید شده در این مرحله چند لایه و در مقیاس میکرومتری بودند (Mohammadi *et al.*, 2014). هوموژنیزاسیون نمونه‌ها با هوموژنایزر (Heidolph، مدل ART31126، آلمان) با سرعت ۲۰۰۰۰ دور در دقیقه و در دمای بالاتر از انتقال فاز لیپوزومی (۷۰ درجه سلسیوس) به مدت ۱۰ دقیقه اجرا شد (Kirby & Gregoriadis, 1984). نمونه‌های لیپوزومی با سونیکاتور پروب‌دار (مدل Up 200Ht، آلمان) با ۵ سیکل ۱ دقیقه‌ای و ۱ دقیقه استراحت بین هر سیکل، در دمای محیط صوت دهی و به این صورت لیپوزوم‌های تک‌لایه‌ای در مقیاس نانومتری تولید شدند.

در آنها مشاهده نشد در محیط کشت مولر هینتون آگار کشت داده شد. پس از ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، پلیت‌ها از نظر رشد باکتری بررسی شدند و غلظتی که حداقل ۹۹/۹ درصد از سلول‌های میکروبی را کاهش داد، به‌عنوان حداقل غلظت کشندگی در نظر گرفته شد (Nasirpour *et al.*, 2014).

### طرح آماری

آزمون‌ها در سه تکرار در قالب طرح کاملاً تصادفی اجرا شد. از نرم‌افزار آماری Minitab نسخه ۱۶ در سطح احتمال ۹۵ درصد ( $p < 0.05$ ) و آزمون چند دامنه‌ای دانکن برای تأیید وجود اختلاف بین میانگین‌ها استفاده شد.

### نتایج و بحث

#### بررسی ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس

#### کاکوتی کوهی

از آنجا که ترکیب اسانس می‌تواند بر ویژگی‌های فیزیکی لیپوزوم اثر گذارد، مشخص کردن و شناسایی اجزای آن مهم است. آنالیز اسانس با دستگاه کروماتوگرافی گازی متصل به طیف‌سنج جرمی به شناسایی ۱۷ ترکیب آلی مختلف انجامید که ۹۹/۹۸ درصد اسانس را تشکیل دادند (شکل ۱). درصد ترکیبات تشکیل‌دهنده اسانس در جدول ۱ نمایش داده شده است. در این جدول دیده می‌شود که ترکیبات اصلی اسانس پولگون (۴۹/۰۵ درصد)، پیپریتنون (۱۱/۶۱ درصد) و ۱- منتون (۹/۲۳ درصد) است. سایر اجزا به ترتیب عبارت‌اند از: اکالیپتول (۵،۸۷ درصد)، ایزومنتون (۴/۵۲ درصد) و ایزومنتول (۳/۵۵ درصد). چیت‌ساز و همکاران (Chitsaz *et al.*, 2007) ۲۲ ترکیب متفاوت را در اسانس کاکوتی کوهی شناسایی کردند که ۵ ترکیب

شد و تا برابر شدن کدورت محلول با کدورت ۰/۵ محلول استاندارد مک‌فارلند معادل  $10^8 \times 1/5$  CFU/mL توسط محلول رینگر رقیق شد (Zabihi *et al.*, 2017).

#### تعیین اثر ضد میکروبی به روش انتشار دیسک در آگار

ابتدا از سوسپانسیون میکروبی تهیه شده با کدورت معادل ۰/۵ مک‌فارلند و با استفاده از سوآپ استریل روی سطح پلیت‌های حاوی محیط کشت مولر هینتون آگار کشت انتقال داده شد. پس از آن دیسک‌های کاغذی ۶ میلی‌متری استریل (Sigma، آلمان) با غلظت مشخصی از نانولیپوزوم حاوی اسانس مخلوط شده و با فاصله‌ای معین از یکدیگر و لبه پلیت بر سطح آگار آلوده به باکتری قرار داده شدند. بعد از ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، قطر هاله مهار رشد/شیرشیا کلی بر حسب میلی‌متر اندازه‌گیری و با نمونه کنترل (اسانس آزاد) مقایسه شد (Espinell-Ingroff *et al.*, 2002). این آزمایش در سه تکرار اجرا و میانگین آن گزارش گردید.

#### تعیین حداقل غلظت بازدارندگی رشد<sup>۱</sup> (MIC) و حداقل غلظت کشندگی<sup>۲</sup> (MBC)

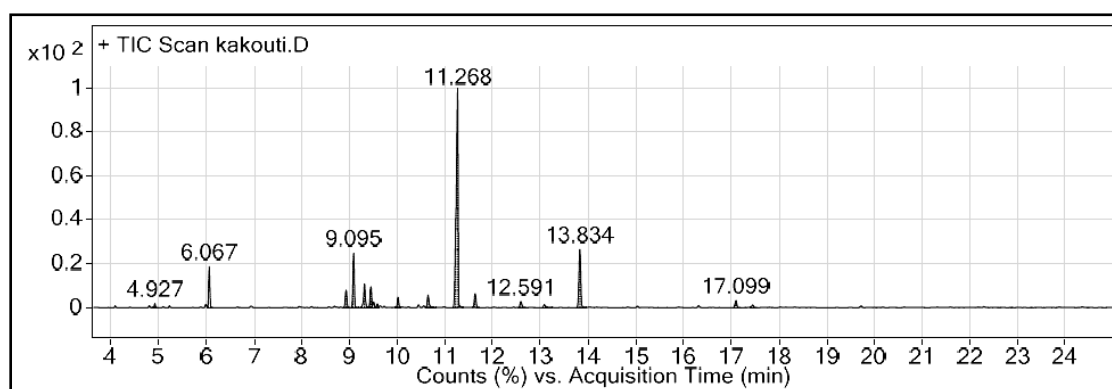
برای تعیین MIC، روش رقت‌سازی در لوله بر اساس دستورالعمل NCCLS به کار گرفته شد. غلظت‌های مختلف از فرم‌های آزاد و نانولیپوزومی از اسانس کاکوتی کوهی (۲، ۴، ۸، ۱۶، ۳۲، ۶۴، ۱۲۸ و ۲۵۶ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر) تهیه شد. پس از کشت، تمام لوله‌ها در دمای ۳۷ درجه سلسیوس به مدت ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شدند و در نهایت کم‌ترین غلظتی که مانع از رشد باکتری شده و در آن کدورتی مشاهده نشد به‌عنوان MIC گزارش گردید. برای مشخص کردن MBC، از رقت‌هایی که کدورتی

1- Minimum Inhibitory Concentration

2- Minimum Bactericidal Concentration

رویشگاهی بر کمیت و کیفیت اسانس کاکوتی کوهی را بررسی کرده‌اند. در تمامی نمونه‌های مورد مطالعه، پولگون جزء اصلی اسانس گزارش شده است. نتایج این تحقیق با یافته‌های مطالعات قبلی همخوانی دارد که اسانس آنها دارای مقادیر قابل توجهی پولگون بود. تفاوت در میزان ترکیبات تشکیل دهنده احتمالاً به دلیل شرایط متفاوت آب‌وهوایی، فصلی، جغرافیایی و زمین‌شناسی رویشگاه گیاه است (Daferera *et al.*, 2000).

بیش از ۷۳ درصد اسانس را تشکیل می‌دادند و پولگون با ۲۹/۳ درصد بیشترین میزان را داشت. وردیان‌ریزی (Verdianrizi *et al.*, 2008) اجزای اصلی اسانس کاکوتی کوهی را پولگون (۳۶/۴۵ درصد)، پیپریتنون (۹/۱۲ درصد)، منت-۲-ان-۱-اول (۵/۳ درصد)، کارواکرول (۵/۱ درصد)، منتول (۴/۷۸ درصد) و منتون (۴/۴۶ درصد) گزارش داده‌اند. دهقان و همکاران (Dehghan *et al.*, 2010) تأثیر برخی از شرایط



شکل ۱- کروماتوگرام GC-Mass اسانس گیاه کاکوتی کوهی

جدول ۱- ترکیب شیمیایی اسانس کاکوتی کوهی با استفاده از دستگاه کروماتوگرافی متصل به طیف‌سنج جرمی

ردیف	نام ترکیب	درصد	زمان بازداری (دقیقه)
۱	Pulegone	۴۹/۰۵	۱۱/۲۶۸
۲	Piperitenone	۱۱/۶۱	۱۱/۶۳۴
۳	l-Menthone	۹/۲۳	۹/۰۹۵
۴	Eucalyptol	۵/۸۷	۶/۰۶۷
۵	Isomenthone	۴/۵۲	۹/۳۱۹
۶	Isomenthol	۳/۵۵	۹/۴۵۵
۷	1-Cyclohexene-1-methanol, $\alpha,\alpha,4$ -trimethyl-	۲/۹۶	۸/۹۳۲
۸	8,9-Dehydrothymol	۲/۸۵	۱۰/۶۵
۹	Piperitone	۲/۵۶	۱۱/۶۳۴
۱۰	(1S,2R,5R)-(+)-Isomenthol	۱/۸۱	۱۰/۰۱۸
۱۱	-	۱/۳۵	۱۷/۰۹۹
۱۲	Thymol	۱/۲۱	۱۲/۵۹۱
۱۳	Isoborneol	۰/۸۸	۹/۵۰۹
۱۴	2-Methoxy-4-vinylphenol	۰/۷۴	۱۳/۰۸۷
۱۵	Isopulegon	۰/۶۵	۹/۵۸۴
۱۶	$\beta$ -Pinene	۰/۶۳	۴/۹۲۷
۱۷	Germacrene D	۰/۵۱	۱۷/۴۵۲

## اندازه و شاخص پراکندگی ذرات

اندازه ذرات عاملی برجسته در ارتباط مستقیم با پایداری، رهاسازی ترکیبات زیست‌فعال، کارایی به‌دام اندازی و کاربردهای واقعی نانو ذرات در نظر گرفته می‌شود. همان‌طور که در جدول ۲ نشان داده شده است، تمام نمونه‌ها دارای اندازه نانومتر هستند. نانولیپوزوم فاقد اسانس بیشترین میانگین اندازه را بین تیمارها دارد. به عبارت دیگر، حضور اسانس به کاهش اندازه لیپوزوم منجر شده و اسانس توانسته است در کلیه نمونه‌ها اندازه نانولیپوزوم را تحت تأثیر قرار دهد ( $p < 0.05$ ). این پدیده را می‌توان به ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی ترکیبات فنلی موجود در اسانس مانند قطبیت، حل‌پذیری و اندازه مولکول‌ها نسبت داد. ترکیبات فنلی، دارای گروه‌های هیدروکسیل فنلی هستند که می‌توانند در برخی شرایط به گروه‌های اکسیژنی با بار منفی تجزیه شوند. این گروه اکسیژنی دارای بار منفی می‌تواند با بار مثبت گروه‌های کولین قسمت سر فسفولیپیدها پیوندهای هیدروژنی یا پیوندهای خیلی مستحکم یونی ایجاد کند. از این رو ترکیبات فنلی با چندین گروه هیدروکسیل می‌توانند در اثر ایجاد این پیوندها تغییرات ساختاری در آرایش دو جداره لیپوزوم ایجاد کنند (Wink, 2010). به‌علاوه، این ترکیبات احتمالاً با شرکت در برهم‌کنش بین زنجیرهای آسیل غشای دو لایه و مولکول فعال به‌عنوان بخش‌های آب‌دوست درون غشای دو لایه لیپیدی، اندازه نانولیپوزوم را کاهش می‌دهند. کاهش اندازه لیپوزوم را می‌توان بر اساس سیالیت غشایی نیز توضیح داد. حضور ترکیبات فنلی مدول الاستیک و سیالیت غشای لیپوزوم را تحت تأثیر قرار می‌دهد (Rafiee et al., 2017). بنابراین، ترکیبات فنلی قادر هستند با واکنش با زنجیرهای آسیل لیپید و تغییر آرایش این

زنجیرها، اندازه لیپوزوم را کاهش دهند. در تأیید نتیجه به‌دست‌آمده از این تحقیق، لیو و پارک (Liu, Park, 2010) و الکساندر و همکاران (Alexander et al., 2012) افزایش اندازه ذرات نانولیپوزوم را در اثر افزایش غلظت فسفولیپید استفاده شده گزارش داده‌اند. محمدی و همکاران (Mohammadi et al., 2014) در تولید نانولیپوزوم‌های حاوی ویتامین D<sub>3</sub> دریافتند که افزایش غلظت کلسترول تأثیر معنی‌داری بر اندازه ذرات ندارد. گزارش‌های متفاوتی در مورد تأثیر کلسترول بر اندازه ذرات لیپوزومی منتشر شده است که به نظر می‌رسد روش تهیه لیپوزوم و نوع فسفولیپید مورد استفاده در آن بسیار مؤثر بوده است.

در جدول ۲ مشخص شده است که مقادیر شاخص پراکندگی<sup>۱</sup> (PdI) تمام نمونه‌ها در محدوده ۰/۱۱۴ تا ۰/۱۸۱ قرار دارد که نشان‌دهنده توزیع اندازه ذرات باریک و همگن بودن بالای سیستم نانولیپوزوم‌های تولید شده است. از اطلاعات جدول ۲ همچنین می‌توان دریافت که تفاوت معنی‌داری بین PdI نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس و فاقد اسانس وجود دارد ( $p < 0.05$ ). مقدار PdI کمتر از ۰/۳ و بالاتر از آن به ترتیب شاخص سوسپانسیون همگن و سوسپانسیون‌ناهمگن است (Hasan et al., 2014). نتایج مطالعات قبلی (Bouarab et al., 2014; Hasan et al., 2014) نتایج به‌دست‌آمده در خصوص مقادیر PdI در این تحقیق را تأیید می‌کنند. با توجه به نتایج به‌دست‌آمده می‌توان چنین نتیجه گرفت که روش تولید مورد استفاده (هیدراسیون لایه نازک و امواج فراصوت) مستقل از غلظت‌های متفاوت لستین-کلسترول، برای تولید نانولیپوزوم‌های پایدار با توزیع اندازه ذرات یکنواخت مناسب است.

1- Poly dispersity Index (PdI)

## پتانسیل زتا

اندازه‌گیری پتانسیل زتا در کنترل درهم‌آمیختگی و ته‌نشینی نانولیپوزوم‌ها که از عوامل مهم پایداری آنها محسوب می‌شوند، اهمیت بسزایی دارد. بالا بودن پتانسیل زتا بیانگر ازدیاد نیروی دافعه الکتروستاتیک و نقش این نیرو در جلوگیری از تجمع ذرات در مدت زمان نگهداری است. با توجه به جدول ۲، تمام نمونه‌ها بار سطحی منفی را در محدوده  $-۲۵/۸$  تا  $-۳۴/۸$  میلی‌ولت نشان می‌دهند. پتانسیل زتای نانولیپوزوم بدون کلاسترول و اسانس  $۱/۹ \pm -۲۵/۸$  میلی‌ولت است که به دلیل یونیزاسیون گروه‌های فسفات و کربوکسیل موجود در لستین است. تمامی لیپوزوم‌های حاوی اسانس، نسبت به نمونه فاقد اسانس، پتانسیل زتای بیشتری دارند ( $p < 0.05$ ).

دلیل این امر احتمالاً برهم‌کنش بین پوشش لیپیدی با اسانس است بدین شکل که ترکیبات موجود در اسانس باعث تغییر ساختار سطحی لیپوزوم‌ها و منفی‌تر شدن آن می‌شود. هنگامی که

اسانس در داخل دولایه لیپیدی قرار می‌گیرد، می‌تواند با غشای فسفولیپیدی واکنش دهد و سبب آرایش مجدد ساختارهای لیپیدی غشا شود. با اضافه شدن کلاسترول به ساختار لیپوزوم، پتانسیل زتا افزایش می‌یابد که در نمونه حاوی  $۳۰$  میلی‌گرم، به  $۱/۸ \pm ۳۴/۸$  رسیده است. دلیل این امر احتمالاً آن است که کلاسترول مولکولی است خنثی و بدون بار که بار منفی ذرات می‌تواند در اثر تشکیل پیوند هیدروژنی بین گروه کولین در فسفاتیدیل کولین و گروه هیدروکسیل در سر کلاسترول ایجاد شود. در نتیجه تشکیل این پیوند، گروه کولین با بار مثبت به داخل غشا کشیده و گروه فسفاتیدیل با بار منفی به سطح غشا رانده می‌شود و بدین ترتیب بار منفی ذرات و دافعه الکتروستاتیک بین آنها افزایش می‌یابد (Makino *et al.*, 1991). در تأیید نتیجه به دست آمده در این تحقیق، محمدی و همکاران (Mohammadi *et al.*, 2014) می‌گویند با افزایش مقدار کلاسترول، پتانسیل زتا به‌طور تدریجی افزایش می‌یابد.

جدول ۲- میانگین اندازه ذرات، شاخص پراکندگی، پتانسیل زتا و کارایی درون‌پوشانی نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس کاکوتی کوهی با مقادیر مختلف لستین: کلاسترول و مقایسه آن با نانولیپوزوم فاقد اسانس

کارایی درون‌پوشانی (درصد)	پتانسیل زتا (میلی‌ولت)	شاخص پراکندگی	میانگین اندازه ذرات (نانومتر)	مقادیر لستین: کلاسترول (میلی‌گرم)	نمونه
-	$-۲۵/۸ \pm ۱/۹$ a	$۰/۱۸۱ \pm ۰/۰۵$ d	$۱۳۸/۷۶ \pm ۲/۳۷$ d*	-	نانولیپوزوم فاقد اسانس
۵۹/۶۵	$-۲۹/۲ \pm ۱/۳$ b	$۰/۱۱۴ \pm ۰/۰۱۴$ a	$۸۸/۶ \pm ۱/۵۶$ a	۰-۶۰	نانولیپوزوم حاوی اسانس
۵۳/۹۳	$-۳۲/۴ \pm ۲/۹$ b	$۰/۱۱۹ \pm ۰/۰۰۹$ a	$۹۱/۱۷ \pm ۱/۷۶$ a	۱۰-۵۰	
۴۴/۵۵	$-۳۴/۴ \pm ۲/۴$ bc	$۰/۱۵۴ \pm ۰/۰۱۱$ b	$۱۰۷/۳۷ \pm ۳/۴۷$ b	۲۰-۴۰	
۴۰/۸۱	$-۳۴/۸ \pm ۱/۸$ c	$۰/۱۶۹ \pm ۰/۰۰۴$ c	$۱۲۱/۹۷ \pm ۲/۴۴$ c	۳۰-۳۰	

\*حروف غیر یکسان در هر ستون، نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین آنها در سطح ( $p < 0.05$ ) است



**کارایی درون پوشانی**

همان‌طور که در جدول ۲ نشان داده شده است، نسبت‌های لایه‌های لیپوزوم بر کارایی درون پوشانی تأثیر معنی‌داری دارند ( $p < 0.05$ ). بالاترین میزان کارایی درون پوشانی مربوط به نمونه حاوی لستین به تنهایی است. افزایش غلظت کلسترول سبب کاهش کارایی درون پوشانی شده به طوری که به ۴۰/۸۱ درصد در نمونه دارای ۳۰ میلی‌گرم کلسترول و لستین رسیده است اما بین نمونه فاقد کلسترول و نمونه دارای ۱۰ میلی‌گرم کلسترول اختلاف معنی‌داری مشاهده نمی‌شود ( $p < 0.05$ ). اصولاً لستین به‌عنوان اسکلت اصلی در فرمولاسیون لیپوزوم‌ها عمل می‌کند و کلسترول به‌منظور افزایش پایداری و تثبیت لیپوزوم‌های تشکیل یافته به فرمولاسیون اضافه می‌شود (Jaafar-Maalej *et al.*, 2010). هرچه میزان غلظت فسفولیپید بیشتر باشد، میزان پایداری بیشتر خواهد شد. از طرف دیگر، افزایش کلسترول در فرمول لیپوزوم باعث سفت‌تر شدن غشا و ایجاد محیطی متراکم می‌شود که با جلوگیری از حرکت آزادانه اسانس، به کاهش کارایی درون پوشانی می‌انجامد. به عبارت دیگر، حضور کلسترول باعث پر شدن فضای بین دو لایه لیپوزوم می‌شود و موجب خواهد شد تا فضای کافی برای قرار گرفتن اسانس وجود نداشته باشد (Mohammadi *et al.*, 2014). نتایج مشابهی برای لیپوزوم‌های حاوی عصاره فنلی چای جاوه یا ارتوزیفون (*Orthosiphon stamineus*) و شوید (*Anethum graveolens*) گزارش شده است (Ortan *et al.*, 2009; Aisha *et al.*, 2014).

**بررسی فعالیت ضد میکروبی نانولیپوزوم حاوی اسانس کاکوتی کوهی**

بر اساس نتایج حاصل از روش انتشار دیسک در آگار و همچنین MIC و MBC که در جدول ۳ نشان داده شده است، می‌توان چنین نتیجه گرفت که نانولیپوزوم حاوی اسانس و فاقد کلسترول، نسبت به سایر نانولیپوزوم‌ها و اسانس آزاد (نمونه کنترل)، اثر ضد میکروبی شدیدتری علیه باکتری / شریشیا کلی O157:H7 داشته است. بیشترین میزان قطر هاله رشد نیافتگی (۳۷ میلی‌متر) مربوط به نمونه نانولیپوزوم حاوی اسانس و فاقد کلسترول است که از لحاظ آماری با سایر نمونه‌های حاوی اسانس و نمونه کنترل اختلاف معنی‌دار دارد ( $p < 0.05$ ). با توجه به گستردگی ترکیبات و اجزای تشکیل‌دهنده اسانس‌ها، می‌توان گفت که خاصیت ضد میکروبی آنها وابسته به مکانیسمی واحد نیست، راه‌های متنوعی در این موضوع نقش دارد. یکی از راه‌های ممکن، آسیب‌رسانی غیر قابل برگشت به غشای سلول باکتری است که باعث نشت مواد سیتوپلاسمی، یون‌ها و ایجاد کمبود سوبستراهای انرژی‌زا مانند گلوکز می‌شود که در نهایت تجزیه شدن و مرگ باکتری را به دنبال دارد. راه احتمالی دیگر، مهار تولید آنزیم‌های آمیلاز و پروتئاز در سلول باکتری است که باعث توقف مکانیسم‌های سلولی و جریان الکترون می‌شود که در این حالت سلول منعقد می‌شود و می‌میرد (Bakkali *et al.*, 2008). پولگون، ترکیب شاخص اسانس کاکوتی کوهی، یک مونوترپن اکسیژن‌دار حلقوی است که فعالیت ضدباکتریایی شدیدی نیز دارد. به طور کلی، ترکیبات مونوترپنی خاصیت چربی‌دوستی نسبی دارند و در آب نیز حل می‌شوند در نتیجه باعث ایجاد اغتشاش در بخش لیپیدی پلاسم و غشای زیستی میکروارگانیسم‌ها خواهند شد. این تغییرات به نفوذپذیری غشا و نشت ترکیبات داخل سلول و در نهایت مرگ سلول

استحکام غشای لیپوزومی، امکان رهایش سریع اسانس فراهم نشده است و اندازه لیپوزوم، ضخامت و استحکام غشای لیپوزومی بر مکانیسم‌های موجود در برهم‌کنش لیپوزوم‌ها با سلول‌های زنده تأثیرگذار بوده است. تحقیقات نشان داده است که نانولیپوزوم‌ها، با توجه به اندازه‌های کوچک سلولی، می‌توانند فعالیت‌های ضد میکروبی ترکیبات درون پوشانی شده را با افزایش مکانیسم جذب سلولی غیرفعال و کاهش مقاومت در برابر انتقال جرم افزایش دهند (Salehi et al., 2015). در همین ارتباط، ساچتلی و همکاران (Sachetelli et al., 2000) می‌گویند افزایش خاصیت ضد میکروبی سیستم لیپوزومی حاوی اسانس مربوط به ممانعت نفوذپذیری و هیدرولیز آنزیمی با امتزاج بین لیپوزوم‌ها و غشای باکتری است. لیولیوس و همکاران (Liolios et al., 2009) نیز توضیح داده‌اند که استفاده از نانولیپوزوم‌ها از طریق برهم‌کنش با سلول‌های باکتریایی از راه‌های مختلف (مانند انتقال بین غشایی، آزادی تماس، جذب و فاگوسیتوز)، انتقال سلولی و آزادسازی ترکیبات فعال را داخل سلول‌های باکتری بهبود می‌بخشد و از ای رو سبب افزایش خاصیت ضد میکروبی می‌شوند.

می‌انجامد (Burt, 2004). مهربان سنگ آتش و همکاران (Mehraban Sangatash et al., 2007) در پژوهشی اثر ضد میکروبی عصاره کاکوتی کوهی را بر باکتری‌های مولد فساد و بیماری‌زای مواد غذایی به روش رقت لوله‌ای آزمایش کردند و به این نتیجه رسیدند که می‌توان استفاده از عصاره کاکوتی کوهی را به‌عنوان ترکیبی نگهدارنده و طعم‌دهنده طبیعی در فرآورده‌های غذایی پیشنهاد کرد. چیت‌ساز و همکاران (Chitsaz et al., 2007) در تحقیقات خود نشان دادند، کاکوتی کوهی اثر ضد میکروبی علیه انواعی از باکتری‌های گرم مثبت و گرم منفی، مخصوصاً *Salmonella typhimurium* دارد.

نتایج این تحقیق مشخص کرد که غلظت‌های MIC و MBC اسانس پس از درون پوشانی در نانولیپوزوم بدون کلسترول به‌طور معنی‌داری کاهش می‌یابد ( $p < 0.05$ ) و در سایر نمونه‌ها با افزایش غلظت کلسترول در غشای لیپوزومی افزایش نشان می‌دهد (جدول ۳). به عبارت دیگر، فعالیت ضد باکتریایی فقط در سیستم لیپوزومی فاقد کلسترول نسبت به حالت آزاد بیشتر است. احتمالاً با افزایش میزان کلسترول در فرمولاسیون لیپوزوم‌ها و افزایش

جدول ۳- فعالیت ضد میکروبی نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس در مقایسه با اسانس کاکوتی کوهی

نمونه	مقادیر لستین: کلسترول (میلی گرم)	قطر هاله (میلی متر)	حداقل غلظت بازدارندگی ( $\mu\text{g/ml}$ )	حداقل غلظت کشندگی ( $\mu\text{g/ml}$ )
اسانس آزاد	-	۳۳ <sup>a*</sup>	۱۵ <sup>b</sup>	۳۰ <sup>**b</sup>
نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس	۰-۶۰	۳۷ <sup>b</sup>	۱۴ <sup>a</sup>	۱۴ <sup>a</sup>
	۱۰-۵۰	۲۹ <sup>c</sup>	۱۵/۵ <sup>b</sup>	۳۱ <sup>b</sup>
	۲۰-۴۰	۱۹ <sup>d</sup>	۱۷/۵ <sup>c</sup>	۳۵ <sup>c</sup>
	۳۰-۳۰	۸ <sup>e</sup>	۱۸/۵ <sup>d</sup>	۳۷ <sup>d</sup>

\*حروف غیر یکسان در هر ستون، نشان‌دهنده وجود تفاوت معنی‌دار بین آنها در سطح ( $p < 0.05$ ) است.

\*\* در این آزمایش، از دیسک‌های کاغذی استاندارد استریل به قطر ۶ میلی‌متر استفاده شده است.

## نتیجه گیری

تغییر چشمگیر هست. این تحقیق نشان می‌دهد که سیستم نانولیپوزومی حاوی اسانس کاکوتی کوهی ویژگی ضد میکروبی بیشتری دارد تا شکل آزاد آن، که با اضافه شدن کلسترول به غشای دو لایه‌ای این خاصیت به تدریج کاهش می‌یابد. این مطالعه همچنین نشان می‌دهد سیستم نانولیپوزومی حاوی اسانس کاکوتی کوهی فعالیت ضد میکروبی مؤثری علیه باکتری *اشریشیا کلی* دارد و استفاده از این سیستم در مواد غذایی، داروها، لوازم آرایشی و بهداشتی می‌تواند مفید باشد. با توجه به مزایای استفاده از اسانس‌های طبیعی و به منظور کسب اطلاعات بیشتر، در گام بعدی این تحقیق تأثیر فعالیت ضد میکروبی نانولیپوزوم حاوی اسانس کاکوتی کوهی بر سایر میکروارگانیسم‌ها، مخصوصاً باکتری‌های گرم مثبت و در یک ماده غذایی، ارزیابی خواهد شد.

در این تحقیق، اثر غلظت لستین-کلسترول بر ویژگی‌های فیزیکی شیمیایی نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس کاکوتی کوهی تولید شده به روش لایه نازک و امواج فراصوت بررسی شد. نتایج بررسی‌ها نشان داده است که روش مورد استفاده منجر به تشکیل لیپوزوم‌هایی در مقیاس نانو و با شاخص پراکندگی پایین می‌شود. افزودن کلسترول باعث افزایش معنی‌دار اندازه ذرات و شاخص پراکندگی نانولیپوزوم‌های حاوی اسانس می‌شود ولی بر پتانسیل زتا تأثیری ندارد. ارتباط معکوسی بین کارایی درون پوشانی و میزان کلسترول غشا مشاهده شده است. پایداری نانولیپوزوم حاوی اسانس با فرمولاسیون ۵۰ به ۱۰ لستین-کلسترول در مدت دو ماه نگهداری در دمای یخچال مشخص کرد که نمونه تولیدی قادر به حفظ اسانس کاکوتی کوهی بدون

## تعارض منافع

نویسندگان در رابطه با انتشار مقاله ارائه شده به طور کامل از اخلاق نشر تبعیت کرده و از موارد سوء اخلاق از جمله سرقت ادبی، سوء رفتار، جعل داده‌ها و یا ارسال و انتشار دوگانه، پرهیز نموده‌اند و منافعی تجاری در این راستا وجود ندارد.

## مراجع

- Adams, R. P. 1995. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy. 4<sup>th</sup> Edition. Vol. 456. Allured Publishing Co. IL.
- Aisha, A. F. A., Abdul Majid, A. M. S. and Ismail, Z. 2014. Preparation and characterization of nanoliposomes of *Orthosiphon stamineus* ethanolic extract in soybean phospholipids. BMC Biotechnology. 14(23): 1-12.
- Alexander, M., Lopez, A. A., Fang, Y. and Corredig, M. 2012. Incorporation of phytosterols in soy phospholipids nanoliposomes: Encapsulation efficiency and stability. LWT Food Science and Technology. 47(2): 427-436.
- 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 and Technology. 77, 497-502.

- Babakhanloo, P., Mirza, M., Sefidkan, F., Barazandeh, M.M. and Asgari, F. 1998. Chemical Components of Essential Oil of *Ziziphora clinopodioides*. Medical Plants Research Journal. 2, 103-114.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils: a review. Food and Chemical Toxicology. 46(2): 446-475.
- Bang, S. H., Hwang, I. C., Yu, Y. M., Kwon, H. R., Kim, D. H. and Park, H. J. 2011. Influence of chitosan on the liposomal surface on physicochemical properties and the release profile of nanocarrier systems. Journal of Microencapsulation. 28(7): 595-604.
- Bargale, P. C. and Irudayaraj, J. M. 1995. Mechanical strength and rheological behavior of barley kernels. International Journal of Food Science and Technology. 30(5): 609-623.
- Bilia, A. R., Guccione, C., Isacchi, B., Righeschi, C., Firenzuoli, F. and Bergonzi, M. C. 2014. Essential oils loaded in nanosystems: A developing strategy for a successful therapeutic approach. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. Article ID 651593, 14 pages, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/651593>.
- Bouarab, L., Maherani, B., Kheirloom, A., Hasan, M., Aliakbarian, B., Linder, M. and Arab-ehrany, E. 2014. Influence of lecithin-lipid composition on physicochemical properties of nanoliposomes loaded with a hydrophobic molecule. Colloids and surfaces B: Biointerfaces. 115, 197-204.
- Burt, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International journal of food microbiology. 94(3): 223-253.
- Caddeo, C., Teskač, K., Sinico, C. and Kristl, J., 2008. Effect of resveratrol incorporated in liposomes on proliferation and UV-B protection of cells. International Journal of Pharmaceutics. 363(1-2): 183-191.
- Chitsaz, M., Barrton, M.D., Naseri, M., Kamali Nejad, M. and Bazargan, M., 2007. Essential oil composition and antibacterial effects of *Ziziphora clinopodioides* Lam. International Journal of Antimicrobial Agents. 29, 203-205.
- Daferera, D.J., Ziogas, B.N. and Polissiou, M.G., 2000. GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 48(6): 2576-2581.
- Dehghan, Z., Sefidkon, F., Bakhshi Khaniki, Gh. and Kalvandi, R. 2010. Effects of some ecological factors on essential oil content and composition of *Ziziphora clinopodioides* Lam. subsp. *rigida* (Boiss.) Iranian Journal of Medicinal and Aromatic Plants. 26(1): 49-63. (in Persian)
- Espinel-Ingroff, A., Fothergill, A., Peter, J., Rinaldi, M.G. and Walsh, T.J., 2002. Testing conditions for determination of minimum fungicidal concentrations of new and established antifungal agents for *Aspergillus* spp.: NCCLS collaborative study. Journal of Clinical Microbiology. 40(9): 3204-3208.
- European Pharmacopoeia. 1997. 3<sup>rd</sup> Ed. Royal Society of Medicine Press, Strasbourg.

- Gibis, M., Zeeb, B., and Weiss, J. 2014. Formation, characterization, and stability of encapsulated hibiscus extract in multilayered liposomes. *Food Hydrocolloids*. 38, 28-39.
- Hasan, M., Belhaj, N., Benachour, H., Barberi-Heyob, M., Kahn, C.J.F., Jabbari, E., Linder, M. and Arab-Tehrany, E., 2014. Liposome encapsulation of curcumin: Physico-chemical characterizations and effects on MCF7 cancer cell proliferation. *International Journal of Pharmaceutics*. 461(1-2): 519-528.
- Jaafar-Maalej, C., Diab, R., Andrieu, V., Elaissari, A. and Fessi, H., 2010. Ethanol injection method for hydrophilic and lipophilic drug-loaded liposome preparation. *Journal of Liposome Research*. 20(3): 228-243.
- Khatibi, S.A., Misaghi, A., Moosavy, M.H., Basti, A.A., Koochi, M.K., Khosravi, P. and Haghirosadat, F., 2017. Encapsulation of *Zataria multiflora* bioss. Essential oil into nanoliposomes and in vitro antibacterial activity against *escherichia coli* O157: H7. *Journal of Food Processing and Preservation*. 41(3): e12955.
- Kirby, C. and Gregoriadis, G., 1984. Dehydration-rehydration vesicles: a simple method for high yield drug entrapment in liposomes. *Bio/Technology*. 2(11): 979-984.
- Liolios, C. C., Gortzi, O., Lalas, S., Tsaknis, J. and Chinou, I. 2009. Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil of *Origanum dictamnus* L. and in vitro antimicrobial activity. *Food Chemistry*. 112, 77-83.
- Liu, N. and Park, H.J., 2010. Factors effect on the loading efficiency of Vitamin C loaded chitosan-coated nanoliposomes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 76(1): 16-19.
- Lu, Q., Lu, P. M., Piao, J. H., Xu, X. L., Chen, J., Zhu, L. and Jiang, J. G. 2014. Preparation and physicochemical characteristics of an allicin nanoliposome and its release behavior. *LWT Food Science and Technology*. 57(2): 686-695.
- Ma, B. X., Ban, X. Q., He, J. S., Huang, B., Zeng, H., Tian, J., Chen, Y.X. and Wang, Y. W. 2016. Antifungal activity of *Ziziphora clinopodioides* Lam. essential oil against *Sclerotinia sclerotiorum* on rapeseed plants (*Brassica campestris* L.). *Crop Protection*. 89, 289-295.
- Maherani, B., Arab-Tehrany, E., Kheiriloom, A., Geny, D. and Linder, M., 2013. Calcein release behavior from liposomal bilayer; influence of physicochemical/mechanical/structural properties of lipids. *Biochimie*. 95(11): 2018-2033.
- 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. *Biophysical Chemistry*. 41(2): 175-183.
- Mehraban Sangatash, M., Karazhyan, R. and Beiraghi Toosi, S. 2007. In Vitro Antimicrobial Activity of the Extract of *Ziziphora Clinopodioides* on some Food Spoilage and Pathogenic Bacteria. *Journal of Food Science and Technology*. 4(3): 9-14. (in Persian)
- Mohammadi, M., Ghanbarzadeh, B. and Hamishehkar, H. 2014. Formulation of nanoliposomal vitamin D3 for potential application in beverage fortification. *Advanced Pharmaceutical Bulletin*. 4(Suppl 2): 569-575.

- Nasirpour, M., Yavarmanesh, M. and Mohamadisani, A. 2014. Antibacterial effect of aqueous extract of *Artemisia aucheri*, *Artemisia sieberi* and *Hyssopus officinalis* L. on the food borne pathogenic bacteria. *Journal of Food Science and Technology*. 12(46): 73-84. (in Persian)
- National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. 2001. Approved Standards. NCCLS Document M7-A5. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne.
- Ortan, A., Campeanu, G.H., Dinu-Pirvu, C. and Popescu, L., 2009. Studies concerning the entrapment of *Anethum graveolens* essential oil in liposomes. *Roumanian Biotechnological Letters*. 14(3): 4411-4417.
- Rafiee, Z., Barzegar, M., Sahari, M. A. and Maherani, B. 2017. Nanoliposomal carriers for improvement the bioavailability of high – valued phenolic compounds of pistachio green hull extract. *Food Chemistry*. 220, 115-122.
- Sachetelli, S., Khalil, H., Chen, T., Beaulac, C., Sénéchal, S. and Lagacé, J., 2000. Demonstration of a fusion mechanism between a fluid bactericidal liposomal formulation and bacterial cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*. 1463(2): 254-266.
- Salehi, P., Sonboli, A., Eftekhari, F., Nejad-Ebrahimi, S. and Yousefzadi, M., 2005. Essential Oil Composition, Antibacterial and Antioxidant Activity of the Oil and Various Extracts of *Ziziphora clinopodioides* subsp. *rigida* (BOISS.) RECH.f. from Iran. *Biological and Pharmaceutical Bulletin*. 28(10): 1892-1896.
- Salehi, M., Hashemi Karoi, M., Mobini, M. and Asghar Hedari, M., 2015. Antifungal activity of in vitro aqueous and alcoholic extracts of Barije root (*Ferula gummosa*). *Journal of Birjand University of Medical Sciences*. 21(4): 444-450. (in Persian)
- Shahbazi, Y. 2015a. Antilisterial effects of *Ziziphora clinopodioides* essential oil and nisin in milk. *Journal of Pure and Applied Microbiology*. 9(3): 1993-2000.
- Shahbazi, Y., 2015b. Chemical composition and in vitro antibacterial effect of *Ziziphora clinopodioides* essential oil. *Pharmaceutical Sciences*. 21(2): 51-56.
- Shahbazi, Y., Shavisi, N. and Mohebi, E. 2016. Potential application of *Ziziphora clinopodioides* essential oil and nisin as natural preservatives against *Bacillus cereus* and *Escherichia coli* O157:H7 in commercial barley soup. *Journal of Food Safety*. 36(4): 435-441.
- Verdianrizi, M. R., 2008. Composition of the essential oil and biological activity of *Ziziphora clinopodioides* Lam. from Iran. *American-Eurasian Journal of Sustainable Agriculture*. 2(1): 69-71.
- Wink, M. 2010. *Functions and Biotechnology of Plant Secondary Metabolites*. (Second Ed.). UK: Blackwell Publishing Ltd. PP: 433.
- Wu, W., Lu, Y. and Qi, J. 2015. Oral delivery of liposomes. *Therapeutic Delivery*. 6(11):1239–1241.
- Xiao, J., Yu, H. and Yang, J. 2011. Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. *Food Chemistry*. 125, 1267–1272.

- Yi, Z., Nagao, M. and Bossev, D. P. 2009. Bending elasticity of saturated and monounsaturated phospholipid membranes studied by the neutron spin echo technique. *Journal of Physics Condensed Matter*. 21(15): 1-7.
- Zabihi, A., Akhondzadeh Basti, A., Amoabediny, G., Khanjari, A., Tavakkoly Bazzaz, J., Mohammadkhan, F., Hajjar Bargh, A. and Vanaki, E. 2017. Physicochemical characteristics of nanoliposome garlic (*Allium sativum* L.) essential oil and its antibacterial effect on *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Food Quality Hazards Control*. 4(1): 24-28.







Original Research

## Evaluation of Physicochemical and Antimicrobial Properties of Nanoliposomes Containing Kakuti (*Ziziphora Clinopodioides*) Essential Oil

M. Najaf \*, A. Mohammadi-Sani

\* Corresponding Author: Associate professor, Khorasan Razavi Agricultural and Natural Resources Research and Education Center, AREEO, Mashhad, Iran. E-mail: mnajafi.mhd@gmail.com

Received: 17 July 2019, Accepted: 19 February 2020

[http://doi: 10.22092/fooder.2020.127106.1231](http://doi:10.22092/fooder.2020.127106.1231)

### Abstract

The encapsulation of essential oils in nanoliposomes is an effective method for protecting them from light, oxygen and chemical degradation. In this study, nanoliposomes containing kakuti essential oil were prepared from different concentrations of lecithin-cholesterol (60:0, 50:10, 40:20 and 30:30 mg) by thin-layer hydration-sonication method. The GC-Mass spectroscopy method was used to study essential oil composition and the results showed that Pulegone (49.05%) was the main component of essential oil. Particle size, poly dispersity index (PdI), zeta potential, and the encapsulation efficiency were evaluated to determine the physical properties. Antibacterial activity of nanoliposomes against *E. coli* O157H:7 were investigated using a disk diffusion agar method, the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (MBC). The size of particles and PdI were in the range of 88.60-121.97 nm and 0.114-0.169, respectively. The results showed that using the highest concentration of cholesterol for preparing of nanoliposomes containing essential oil increased the size and PdI, but reduced the encapsulation efficiency. Cholesterol concentration did not have a significant effect on zeta potential, and only the sample containing 30 mg of cholesterol had a higher zeta potential. MIC and MBC of cholesterol-free nanoliposomes containing essential oils were 14 and 14 µg/ml and for the control sample (free essential oil) were 15 and 30 µg/ml, respectively. The antimicrobial activity of nanoliposomes decreased with increasing cholesterol levels in the samples. The results of this study showed that nanoliposomes could be a suitable carrier for kakuti essential oil to control the growth of *E. coli*.

**Keywords:** Cholesterol, *E. coli* O157H:7, Encapsulation, Essential oils, Lecithin, Pulegone