بررسی ویژگی‌های فیزیکی و الگوی رهایش عصاره سرخارگل در نانوحامل‌های لیپیدی

علی سلمان, ابوالفضل قانع, افسانه حسین زاده

چکیده

گیاه سرخارگل (*Echinacea angustifolia*) یکی از گیاهان دارویی پرکاربرد است که ترکیبات مفید آن اثرات آنتی‌اکسیدانی و تقویت‌کننده سیستم ایمنی دارند. با این حال، این مواد طبیعی در برابر نور، حرارت و هوا ناپایدار بوده و به سرعت اثربخشی خود را از دست می‌دهند. قرار دادن این عصاره در نانوذرات چربی (لیپوزوم‌ها) می‌تواند راهکاری مؤثر برای محافظت از آن‌ها و کنترل سرعت خروجشان به محیط باشد. هدف از این مطالعه، ساخت نانوذرات لیپیدی پایدارشده با پلی‌اتیلن گلیکول (PEG) حاوی عصاره سرخارگل و بررسی ویژگی‌های فیزیکی و نحوه آزادسازی آن در آزمایشگاه بود.عصاره سرخارگل با اتانول استخراج شد و بیشترین جذب نوری آن تعیین گردید. نانوذرات با ترکیب لسیتین سویا، کلسترول و پلی‌اتیلن گلیکول به روش لایه نازک لیپیدی و با کمک امواج فراصوت (اولتراسونیک) ساخته شدند. اندازه ذرات، یکنواختی و بار سطحی نانوذرات با دستگاه DLS اندازه‌گیری شد. همچنین درصد به دام افتادن عصاره و میزان خروج آن در دو محیط اسیدی (pH 5.5) و خنثی (pH 7.4) طی ۷۲ ساعت ارزیابی گردید.بیشترین جذب نوری عصاره در طول موج ۲۵۴ نانومتر به دست آمد. میانگین اندازه نانوذرات ساخته‌شده ۸۳ نانومتر، شاخص پراکندگی ۰.۳۷۲ و بار سطحی -۳.۰ میلی‌ولت بود. میزان عصاره به دام افتاده در نانوذرات ۶۲ درصد محاسبه شد. بررسی رهایش نشان داد که خروج عصاره روندی پیوسته دارد؛ در ساعت ۹ به بیشترین مقدار خود رسید (میزان جذب ۰.۴۸۵ در محیط خنثی در مقایسه با ۰.۴۰۸در محیط اسیدی) و تا ۷۲ ساعت با شیب ملایم ادامه یافت.نانوذرات ساخته‌شده با اندازه بسیار کوچک (زیر ۱۰۰ نانومتر) و کارایی بالای ۶۲ درصد توانستند عصاره سرخارگل را به خوبی در خود نگهداری کرده و آن را به آرامی آزاد کنند. این سامانه بستر مناسبی برای پایدارسازی عصاره سرخارگل در مصارف دارویی و مکمل‌ها به شمار می‌رود.

واژه‌های کلیدی: سرخارگل، نانوذرات لیپیدی، اندازه ذرات، رهایش کنترل شده، پایداری.

مقدمه

۱. محدودیت‌های سیستم‌های دارورسانی معمولی (Conventional Drug Delivery Systems)

سیستم‌های متداول دارورسانی (نظیر قرص‌ها، کپسول‌ها و محلول‌های تزریقی ساده) به دلیل ویژگی‌های فارماکوکینتیکی و فیزیکوشیمیایی نامطلوب، با چالش‌ها و محدودیت‌های عمده‌ای در درمان بیماری‌ها مواجه هستند. یکی از مهم‌ترین چالش‌ها، زیست‌دسترس‌پذیری (Bioavailability) پایین داروها و ترکیبات زیست‌فعال ناشی از انحلال‌پذیری ضعیف در آب، تجزیه آنزیمی سریع و تخریب در محیط اسیدی دستگاه گوارش است. علاوه بر این، در سیستم‌های سنتی، متابولیسم عبور اول کبدی (First-pass metabolism) بخش عمده‌ای از دوز فعال را پیش از رسیدن به بافت هدف غیرفعال می‌کند. توزیع غیرانتخابی دارو در کل بدن که سبب بروز سمیت سیستمیک و آسیب به سلول‌های سالم می‌شود، همراه با نوسانات شدید در غلظت پلاسمایی دارو (نیاز به تجویز مکرر دوز برای حفظ سطح درمانی)، از دیگر نقایص بنیادین حامل‌های سنتی به‌شمار می‌روند. [1,2]

۲. اهمیت حامل‌های نانو (Nanocarriers)

نانوحامل‌ها با بهره‌گیری از ابعاد در مقیاس نانومتری (معمولاً بین ۱۰ تا ۲۰۰ نانومتر) و نسبت سطح به حجم بسیار بالا، تحولی بنیادین در غلبه بر محدودیت‌های دارورسانی سنتی ایجاد کرده‌اند. این سیستم‌های پیشرفته قادرند مولکول‌های آب‌گریز (Hydrophobic) و آب‌دوست (Hydrophilic) را کپسوله کرده و پایداری فیزیکوشیمیایی آن‌ها را در برابر تخریب محیطی و فیزیولوژیکی افزایش دهند. نانوحامل‌ها علاوه بر افزایش نفوذپذیری سلولی و تسهیل انتقال از سدهای بیولوژیکی (مانند سد خونی-مغزی یا لایه‌های پوستی)، امکان دارورسانی هدفمند (غیرفعال از طریق اثر EPR و فعال از طریق اتصال لیگاندهای سطحی) را فراهم می‌آورند که نتیجه آن کاهش عوارض جانبی سیستمیک و دستیابی به پروفایل رهایش کنترل‌شده و طولانی‌مدت (Sustained release) دارو است.[3,4]

۳. معرفی لیپوزوم‌ها (Liposomes)

لیپوزوم‌ها وزیکول‌های کروی مصنوعی در ابعاد نانومتری یا میکرومتری هستند که از یک یا چند لایه دوگانه فسفولیپیدی محصورکننده یک هسته آبی داخلی تشکیل شده‌اند. این نانووزیکول‌ها به دلیل سازگاری زیستی فوق‌العاده، سمیت بسیار پایین، عدم ایمنی‌زایی و زیست‌تخریب‌پذیری ذاتی، به یکی از موفق‌ترین و پرکاربردترین پلتفرم‌های کپسوله‌سازی تبدیل شده‌اند. ساختار آمفی‌فیلیک (دوگانه‌دوست) لیپوزوم‌ها این قابلیت منحصربه‌فرد را به آن‌ها می‌بخشد که ترکیبات آب‌دوست را در هسته آبی مرکزی و مولکول‌های چربی‌دوست را درون بخش غشایی و دولایه فسفولیپیدی به دام بیندازند و از این طریق تنوع وسیعی از داروها و عصاره‌های گیاهی را حمل نمایند. [5,6]

۴. ساختار دولایه فسفولیپیدی (Phospholipid Bilayer Structure)

دولایه فسفولیپیدی ساختار اصلی غشای لیپوزوم‌ها را شکل می‌دهد که اساساً از مولکول‌های فسفولیپیدی با رفتار آمفی‌پاتیک (Amphipathic) تشکیل شده است. هر مولکول فسفولیپید دارای یک سرِ قطبی آب‌دوست (حاوی گروه فسفات و کولین یا سایر گروه‌های عملکردی) و دو دم هیدروکربنی ناقطبی آب‌گریز (اسیدهای چرب اشباع یا غیراشباع) است. در محیط‌های آبی، به دلیل برهم‌کنش‌های هیدروفوبیک و نیروهای واندروالس، دم‌های غیرقطبی در برابر آب محافظت شده و به سمت داخل متمایل می‌شوند، در حالی که سرهای قطبی با مولکول‌های آب محیط خارجی و هسته داخلی برهم‌کنش می‌دهند. این پیکربندی ترمودینامیکی پایدار علاوه بر تقلید رفتار غشای طبیعی سلول‌های زنده (Biomimetic)، نفوذپذیری انتخابی، انعطاف‌پذیری و امکان ترکیب با اجزای دیگر نظیر کلسترول جهت تنظیم سیالیت و استحکام غشا را فراهم می‌سازد. [7,8]

۵. اهمیت لیپوزوم‌ها در تحویل دارو (Liposomes in Drug Delivery)

لیپوزوم‌ها نقش کلیدی در ارتقای بازده درمانی داروها ایفا می‌کنند؛ زیرا با محافظت فیزیکی از ماده مؤثره، مانع از هیدرولیز، اکسیداسیون و غیرفعال‌سازی سریع آن توسط محیط‌های تهاجمی بیولوژیکی می‌شوند. این حامل‌ها با افزایش نیمه‌عمر سیرکولاسیون دارو در خون و فراهم آوردن امکان رهایش تدریجی و پیوسته، نوسانات دوز سمی را به حداقل می‌رسانند. علاوه بر این، امکان اصلاح شیمیایی سطح لیپوزوم‌ها با استفاده از پلیمرهایی نظیر پلی‌اتیلن گلیکول (PEGylation) جهت فرار از سیستم رتیکولوآندوتلیال (RES) و افزایش زمان گردش خون، و همچنین پیوند دادن آنتی‌بادی‌ها یا پپتیدها برای هدف‌گیری اختصاصی بافت بیمار، لیپوزوم‌ها را به یک استاندارد طلایی در نانوداورسانی تبدیل کرده است. [9,10]

۶. بهبود تحویل ترکیبات زیست‌فعال عصاره‌ها از طریق نانووزیکول‌ها / نانولیپوزوم‌ها

عصاره‌های گیاهی سرشار از فیتوکمیکال‌های ارزشمند نظیر ترکیبات فنولیک، فلاونوئیدها و آلکامیدها هستند که به شدت به اکسیداسیون نوری، گرما، تغییرات pH و تخریب آنزیمی حساس‌اند و زیست‌دسترس‌پذیری و نفوذ سلولی محدودی دارند؛ از این رو، دارورسانی نانووزیکولی (Nanovesicular Delivery) راهکاری ایده‌آل برای رفع این موانع محسوب می‌شود. نانولیپوزوم‌ها با انکپسوله کردن هم‌زمان مواد آب‌دوست و چربی‌دوست عصاره در ریزمحیط‌های مجزا، پایداری ساختاری آن‌ها را افزایش داده و از تجزیه زودهنگام جلوگیری می‌کنند. از سوی دیگر، اندازه زیر ۱۰۰ نانومتر و شباهت ساختاری لیپوزوم به غشای سلولی موجب افزایش راندمان ادغام غشایی، ورود از طریق اندوسیتوز و افزایش جذب سلولی ترکیبات گیاهی شده و رهایش هدفمند و پایدار فیتوکمیکال‌ها را در محل اثر تضمین می‌نماید. [11,12,13]

۷. معرفی گیاه سرخارگل (Echinacea angustifolia*)

سرخارگل باریک‌برگ با نام علمی Echinacea angustifolia DC.*، متعلق به خانواده کاسنیان (Asteraceae)، یکی از برجسته‌ترین گیاهان دارویی بومی آمریکای شمالی است که به طور گسترده در صنایع دارویی و مکمل‌های سلامت مصرف می‌شود. این گونه غنی از متابولیت‌های ثانویه زیست‌فعال شامل اکیناکوزید (Echinacoside)، اسید کافئیک،

سینارین، اسید شیکوریک، آلکامیدها (ایزوبوتیل‌آمیدها) و پلی‌ساکاریدهای با وزن مولکولی بالا است. این ترکیبات هم‌افزا (Synergistic) دارای فعالیت‌های فارماکولوژیک اثبات‌شده از جمله تحریک سیستم ایمنی (از طریق فعال‌سازی ماکروفاژها و لنفوسیت‌ها)، فعالیت آنتی‌اکسیدانی قوی، مهار رادیکال‌های آزاد، و اثرات ضدالتهابی، ضدویروسی و ضدمیکروبی بارز هستند. [14,15]

۸. مشخصات فیزیکوشیمیایی بررسی‌شده در نانولیپوزوم‌ها (Physicochemical Characterization)

در مطالعات فرمولاسیون نانولیپوزوم‌های حاوی عصاره‌های گیاهی، مشخصه‌یابی دقیق فیزیکوشیمیایی برای تضمین کارایی، تکرارپذیری و پایداری سیستم امری الزامی است. پارامترهای کلیدی که معمولاً ارزیابی می‌شوند شامل اندازه میانگین ذرات (Particle Size) و شاخص پراکندگی اندازه (PDI) با پراکندگی دینامیکی نور (DLS)، بار سطحی و پایداری کلوئیدی با تعیین پتانسیل زتا (Zeta Potential)، و راندمان انکپسولاسیون (EE٪) و درصد بارگذاری دارو (LC٪) با تکنیک‌های کروماتوگرافی (مانند HPLC) یا اسپکتروفتومتری هستند. افزون بر این، ریخت‌شناسی ذرات توسط میکروسکوپ‌های الکترونی (TEM / SEM)، برهم‌کنش‌های بین‌مولکولی با تبدیل فوریه فروسرخ (FTIR)، رفتار حرارتی و بلورینگی با گرماسنجی روبشی تفاضلی (DSC) و الگوی رهایش برون‌تنی (In vitro release) به همراه پایداری فیزیکی در طول نگهداری مورد ارزیابی دقیق قرار می‌گیرند. [16,17]

استخراج عصاره و تعیین طول موج شاخص

پودر گیاه سرخارگل با اتانول مخلوط و در انکوباتور شیکردار استخراج شد. پس از صاف کردن، حلال توسط دستگاه روتاری در دمای زیر ۴۰ درجه سانتی‌گراد تبخیر شد تا عصاره غلیظ به دست آید. بیشترین جذب نوری عصاره در بازه فرابنفش توسط دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

۲.۳. ساخت نانوذرات

نانوذرات به روش لایه نازک چربی تهیه شدند:

۱. فسفاتیدیل‌کولین، کلسترول، PEG-6000 و عصاره سرخارگل در مخلوط متانول و کلروفرم حل شدند.

۲. حلال در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد طی ۹۰ دقیقه با دستگاه روتاری تبخیر شد تا لایه‌ای یکدست در دیواره بالن تشکیل شود.

۳. بالن ۲۴ ساعت در خشک‌کن خلأ قرار گرفت تا حلال‌های باقی‌مانده خارج شوند.

۴. لایه چربی با بافر فسفات (pH 7.4) آب‌پوشی شد تا ذرات تشکیل گردند.

۵. سوسپانسیون درون ظرف یخ قرار گرفت و به کمک دستگاه اولتراسونیک پروبی خرد شد تا ابعاد ذرات به محدوده نانومتری برسد و سپس از فیلترهای ریز سرنگی عبور داده شد.

۲.۴. بررسی خصوصیات فیزیکی نانوذرات

میانگین قطر ذرات، میزان یکدستی (شاخص PDI) و بار سطحی ذرات (پتانسیل زتا) به کمک دستگاه DLS در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد اندازه‌گیری شد.

۲.۵. محاسبه درصد بارگذاری عصاره

سوسپانسیون در سانتریفیوژ دوربالا چرخانده شد تا نانوذرات جدا شوند. میزان عصاره آزاد در مایع بالایی با اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد و درصد کپسوله‌شدن طبق رابطه زیر به دست آمد:

$$\text{درصد بارگذاری} = \frac{\text{مقدار عصاره بارگذاری‌شده} \times \text{ضریب غلظت}}{\text{مقدار کل عصاره مورد استفاده}} \times 100$$

$$\frac{11.64 \times 80}{1500} \times 100 = 62\%$$

که معادل ۶۲ درصد می باشد

بررسی روند رهایش عصاره

نانوذرات داخل کیسه دیالیز ریخته شدند و در دو ظرف بافر با pH 7.4(محیط خنثی و مشابه بدن) و pH 5.5(محیط اسیدی) در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد قرار گرفتند. در زمان‌های ۱ تا ۷۲ ساعت، نمونه‌برداری انجام شد و میزان خروج عصاره با دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری شد.

نتایج

بیشترین طول موج جذب عصاره

پایش نوری نشان داد که عصاره سرخارگل دارای بیشترین مقدار جذب در طول موج ۲۵۴ نانومتر است که نشان‌دهنده ترکیبات فعال و مشتقات فنولی این گیاه می‌باشد.

ویژگی‌های فیزیکی نانوذرات

نتایج حاصل از دستگاه DLS و محاسبه درصد کپسوله‌شدن در جدول ۱ آمده است:

جدول ۱: مشخصات فیزیکی نانوذرات حاوی عصاره سرخارگل

شاخص اندازه‌گیری‌شده	مقدار به‌دست‌آمده	نتیجه
میانگین اندازه ذرات	نانومتر ۸۳	ابعاد مطلوب و بسیار ریز
بار سطحی (پتانسیل زتا)	میلی‌ولت -۰.۳	پوشش مناسب سطح توسط PEG
درصد کپسوله‌شدن عصاره	۶۲ درصد	کارایی بسیار بالا در نگهداری عصاره

اندازه ذرات ۸۳ نانومتر شد که نشان‌دهنده ابعاد ریز و مناسب است. مقدار PDI برابر با ۰.۳۷۲ به دست آمد و بار سطحی -۰.۳ میلی‌ولت ثبت گردید. همچنین ۶۲ درصد از کل عصاره با موفقیت درون نانوذرات محبوس شد.

رفتار خروج و رهایش عصاره

بررسی رهایش عصاره طی ۷۲ ساعت نشان داد:

- خروج عصاره روندی تدریجی داشت و در ساعت ۹ به بیشترین مقدار رسید.
- میزان جذب نوری عصاره رهاشده در ساعت ۹ در محیط خنثی (pH 7.4) برابر ۰.۴۸۵ و در محیط اسیدی (pH 5.5) برابر ۰.۴۰۸ بود.
- پس از ساعت ۹، آزادسازی با شیبی آرام تا پایان ۷۲ ساعت ادامه یافت که نشان از خروج تدریجی و پیوسته عصاره دارد.

بحث

نانوذرات ساخته‌شده در این مطالعه با اندازه ۸۳ نانومتر، ابعاد بسیار مناسبی دارند. ذرات کوچک‌تر از ۱۰۰ نانومتر در سوسپانسیون‌های دارویی پایداری فیزیکی بهتری داشته و کمتر ته‌نشین می‌شوند. شاخص PDI برابر با ۰.۳۷۲ نشان می‌دهد امواج فراصوت توانسته‌اند ذراتی با پراکندگی ابعادی مناسب ایجاد کنند.

پتانسیل زتا (۰.۳- میلی‌ولت) نشان می‌دهد که پلیمر PEG به خوبی در سطح نانوذرات مستقر شده و با پوشاندن بار فسفولیپیدها، مانند یک لایه محافظ مانع چسبیدن ذرات به هم می‌شود.

درصد بارگذاری ۶۲ درصد نشان‌دهنده سازگاری خوب ترکیبات سرخارگل با لایه‌های چربی نانوذره است. کلسترول موجود در فرمولاسیون با متراکم کردن لایه چربی مانع نشت سریع عصاره شده است.

بررسی رهایش نشان داد که در محیط خنثی (pH 7.4) خروج عصاره کمی بیشتر از محیط اسیدی (pH 5.5) است که ناشی از حل‌شدن بهتر ترکیبات فنولی در محیط خنثی است. رسیدن به حداکثر رهایش در ساعت ۹ و تداوم خ هدررفت زودهنگام آن جلوگیری نماید.

نتیجه‌گیری

در این پژوهش، نانوذرات پایدارشده حاوی عصاره سرخارگل با اندازه ۸۳ نانومتر و بازده نگش، نانوذرات پایدارشده حاوی عصاره سرخارگل با اندازه ۸۳ نانومتر و بازده نگهداری بالای ۶۲ درصد با موفقیت ساخته شدند. این نانوذرات توانستند عصاره را به شکل پایدار و تدریجی طی ۷۲ ساعت آزاد کنند. این سامانه روشی مناسب برای محافظت از خواص عصاره سرخارگل و استفاده در فرمولاسیون‌های دارویی و بهداشتی است.

مراجع:

1. Tiwari, G., Tiwari, R., Bannerjee, S., Bhati, L., Pandey, S., Pandey, P., & Sriwastawa, B. (2012). *Drug delivery systems: An updated review*. **International Journal of Pharmaceutical Investigation**, 2(1), 2–11.
2. Allen, T. M., & Cullis, P. R. (2004). *Drug delivery systems: entering the mainstream*. **Science**, 303(5665), 1818–1822.
3. Peer, D., Karp, J. M., Hong, S., Farokhzad, O. C., Margalit, R., & Langer, R. (2007). *Nanocarriers as an emerging platform for cancer therapy*. **Nature Nanotechnology**, 2(12), 751–760.
4. Patra, J. K., Das, G., Fraceto, L. F., Campos, E. V. R., Rodriguez-Torres, M. D. P., Acosta-Torres, L. S., ... & Shin, H. S. (2018). *Nano based drug delivery systems: recent developments and future prospects*. **Journal of Nanobiotechnology**, 16(1), 71.
5. Gregoriadis, G. (2006). *Liposome Technology: Interactions of Liposomes with the Biological Milieu (3rd ed.)*. **Informa Healthcare**, New York.
6. Torchilin, V. P. (2005). *Recent advances with liposomes as pharmaceutical carriers*. **Nature Reviews Drug Discovery**, 4(2), 145–160.

7. van Meer, G., Voelker, D. R., & Feigenson, G. W. (2008). *Membrane lipids: where they are and how they behave*. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 9(2), 112–124.
8. Bozzuto, G., & Molinari, A. (2015). *Liposomes as nanomedical devices*. **International Journal of Nanomedicine**, 10, 975–999.
9. Sercombe, L., Veerati, T., Moheimani, F., Wu, S. Y., Sood, A. K., & Hua, S. (2015). *Advances and challenges of liposome assisted drug delivery*. **Frontiers in Pharmacology**, 6, 286.
10. Bulbake, U., Doppalapudi, S., Kommineni, N., & Khan, W. (2017). *Liposomal formulations in clinical use: an updated review*. **Pharmaceutics**, 9(2), 12.
11. Fang, J. Y., & Bhandari, R. (2020). *Nanovesicular systems for the delivery of herbal active ingredients and essential oils*. **Molecules**, 25(16), 3650.
12. Ghasemiyeh, P., & Mohammadi-Samani, S. (2018). *Solid lipid nanoparticles and nanostructured lipid carriers as novel drug delivery systems: Applications, advantages and disadvantages*. **Research in Pharmaceutical Sciences**, 13
13. Bonifácio, B. V., et al., 2014. Nanotechnology-based drug delivery systems for plant-derived pharmaceuticals. International Journal of Nanomedicine, 9, 1–15
14. Barnes, J., Anderson, L. A., Gibbons, S., & Phillipson, J. D. (2005). *Echinacea species (Echinacea angustifolia (DC.) Hell., Echinacea pallida (Nutt.) Nutt., Echinacea purpurea (L.) Moench): a review of their chemistry, pharmacology and clinical properties*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, 57(8), 929–954.
15. Bauer, R. (1999). *Chemistry, analysis and immunological investigations of Echinacea phytopharmaceuticals*. **In: Wagner, H. (eds) Immunomodulatory Agents from Plants**, Birkhäuser, Basel, 41–88.
16. Danaei, M., Dehghankhold, M., Ataei, S., Hasanzadeh Davarani, F., Javanmard, R., Dokhani, A., ... & Mozafari, M. R. (2018). *Impact of particle size and polydispersity index on the clinical applications of lipidic nanocarrier systems*. **Pharmaceutics**, 10(2), 57.
17. Liu, W., Kong, F., Wang, R., Zou, L., Liu, C., & Liu, W. (2020). *Liposomal delivery systems for phytochemicals: Characterization, stability, and bioavailability*. **Food Chemistry**, 327, 127059.