

نانوفرمولاسیون جینجروول و بررسی اثر سایتوتوکسیک آن بر رده‌ی سلولی MCF-7

سیده زینب نوربخش امیری، قاسم نجف پور درزی*، مائده السادات محمدی

گروه بیوتکنولوژی، دانشکده مهندسی شیمی، دانشگاه صنعتی نوشیروانی، بابل، ایران

علی اکبر مقدم نیا

گروه فارماکولوژی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی بابل، بابل، ایران

چکیده: جینجروول‌ها و شوگول‌ها مواد موثر موجود در ریشه زنجبیل می‌باشند که خواص دارویی متعددی را به این ادویه پرکاربرد می‌بخشند. در پژوهش پیش رو، ترکیبات موثر ریشه زنجبیل استخراج و توسط ستون کروماتوگرافی خالص سازی شد. به منظور افزایش فراهمی زیستی و بهبود خواص دارویی، جینجروول حاصل در نانوذره‌های کیتوزان کپسوله شد. بازده انکپسوله شدن ۸۰٪ به دست آمد. آنالیزهای AFM و DLS جهت تعیین اندازه‌ی ذره‌ها و پراکندگی اندازه‌ی آن‌ها انجام شد. اندازه‌ی متوسط نانوذره‌های حاصل ۲۱/۱۱ نانومتر بود. نانوذره‌ها، کروی شکل و با الگوریتم توزیع اندازه ذره‌های مناسب حاصل شدند. در ادامه آنالیز سمیت روی سلول‌های سرطان سینه MCF-7 انجام پذیرفت. نتیجه‌ها حاکی از آن بود که نانوذره‌های کیتوزان حاوی جینجروول، بازدارندگی مناسبی روی رشد سلول‌های سرطانی داشته‌اند. جینجروول کپسوله شده در نانوذره‌ها با غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، سبب از بین رفتن ۹۰ درصد از سلول‌ها طی زمان ۴۸ ساعت شد.

واژه‌های کلیدی: زنجبیل، فراهمی زیستی، جینجروول، کیتوزان، نانوفرمولاسیون

KEYWORDS: Ginger, Bioavailability, Gingerol, Chitosan, Nanoformulation

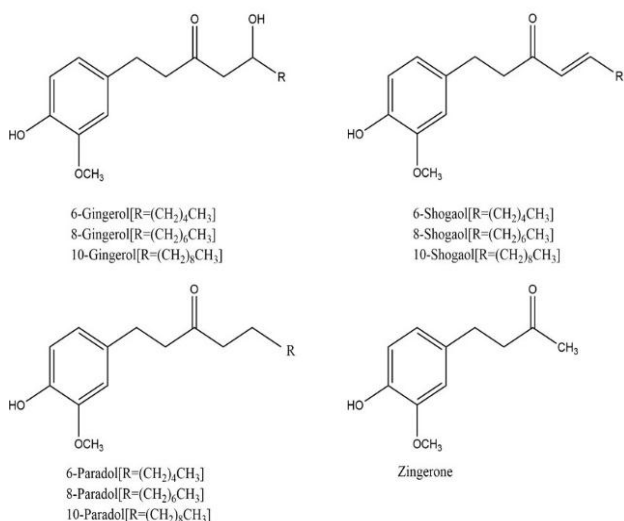
مقدمه

طیف وسیعی از فعالیت‌های بیولوژیکی برای ترکیبات موثر زنجبیل گزارش شده است که از جمله‌ی آن‌ها می‌توان به فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، ضد التهاب [۴]، ضد سرطان [۵]، ضد چاقی [۶]، ضد دیابت [۷] و ... اشاره کرد. اثرات سودمند زنجبیل و مواد موثر آن علیه تومورهای سرطانی ریه، کلیه، کبد، روده، پانکراس، پروستات، سینه، تخمدان، پوست و... توسط پژوهش‌گران به اثبات رسیده است [۸-۱۲].

زنجبیل گیاهی با نام علمی *Zingiber officinale* Roscoe است و متعلق به خانواده‌ی Zingiberaceae می‌باشد. منشا این گیاه، جنوب شرقی آسیا و عمدتاً چین و هند است [۱]. این ادویه از دیرباز به‌عنوان دارو برای سردرد، سرماخوردگی، اسهال، استفراغ، سوء هاضمه، گلودرد، تب، کرم روده، بیماری‌های عفونی، گرفتگی عضلات، ورم مفاصل و ... مورد استفاده قرار می‌گرفته است [۲، ۳].

*E-mail: najafpour@nit.ac.ir

*عهده‌دار مکاتبات



شکل (۱) ساختار ترکیبات اولئورزین موجود در زنجبیل [۱]

تخریب‌های فیزیکی و شیمیایی می‌شود [۲۳]. در یکی از پژوهش‌ها ۶-جینجرول از طریق مایسل‌های پلیمری که از PCL-PEG^{۱۰} و TPGS^{۱۱} تشکیل شده بود، برای بیماری مغزی عصبی استفاده شد. این نانوذره‌ها با سایز ۷۳ نانومتر و با بازده کپسوله کردن ۷۹/۶۸ جینجرول سبب افزایش سه برابری فراهمی زیستی با توزیع مناسب جینجرول در مغز شد [۲۴]. در پژوهشی دیگر فراهمی زیستی ۶-جینجرول با سیستم پرولیپوزوم با سایز ۴۴/۷۷ نانومتر و به ۵ برابر افزایش یافت. ۶-جینجرول در این سیستم اثر ضدتوموری خوبی از خود نشان داد [۲۲]. استفاده از میکروذره‌ها و نانوذره‌ها، از روش‌های نویدبخش و موثر برای انتقال داروست. حامل‌های دارو با ساختار نانو، با سایز و بار سطحی مناسب، می‌توانند از دارو در برابر تخریب محافظت کنند. همچنین سبب نفوذ بهتر دارو از دیواره مخاطی، بهبود سینتیک دارورسانی و کاهش سمیت دارو می‌شوند. طیف وسیعی از مواد از جمله پلیمرهای طبیعی و سنتزی، کربوهیدرات‌ها، چربی‌ها و سورفکتانت‌ها برای تهیه نانو حامل‌ها به کار می‌روند [۲۵]. استفاده از نانوذره‌های پلیمری یکی از روش‌های پرکاربرد در نانوفرمولاسیون است. این نانوذره‌های زیست تخریب پذیر^{۱۱} و زیست سازگار^{۱۲} هستند و روش‌های فرمولاسیون آن‌ها عموماً در دسترس است. همچنین می‌تواند برای طیف وسیعی از داروها به کار گرفته شوند. پلیمرهای کاتیونی از جمله کیتوزان و مشتق‌هایش،

ریشه زنجبیل شامل روغن‌های فرار^۱ و اولئورزین^۲ می‌باشد که به ترتیب مسئول عطر و طعم تند آن می‌باشند. روغن‌های فرار عموماً شامل مونوترپنئید^۳ و هیدروکربن‌های سسکوئیدیترین^۴ است، در حالی که اولئورزین شامل ترکیبات فنولی مانند جینجرول^۵، شوگول^۶، پارادول^۷ و زینگرون^۸ می‌باشد. خواص دارویی زنجبیل عمدتاً از جینجرول‌ها نشأت می‌گیرد. این ترکیبات فنولی به عنوان عمده‌ترین اجزای فعال ریشه‌ی زنجبیل تازه محسوب می‌شوند که ۶-جینجرول (5-hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)decanone) زو غالب آن‌هاست و ۴، ۸، ۱۰ و ۱۲-جینجرول درصد کمتری را به خود اختصاص می‌دهند. این ترکیبات در مقابل حرارت ناپایدار بوده و در دمای بالا به فرم دی‌هیدرات شده‌ی خود یعنی شوگول‌ها تبدیل می‌شوند [۱، ۱۳، ۱۴]. شکل ۱ ساختار شیمیایی ترکیبات موثر ریزوم زنجبیل را نشان می‌دهد.

برای استخراج ترکیبات موثر زنجبیل، روش‌های استخراج گوناگونی ارائه شده است [۱۲، ۱۵، ۱۶]. روش‌های سنتی مانند استخراج غرقابی و سوکسله توسط حلال‌های الی، روش‌هایی با بازده استخراج بالا هستند. روش‌های نوین مانند استخراج توسط التراسونیک و میکروویو و استخراج با آب زیر یحرانی روش‌هایی مناسب برای کاهش مصرف حلال‌های الی می‌باشند. این روش‌ها گرچه ممکن است بازده پایین‌تری داشته باشند، اما از مزیت مهم سبز بودن و کوتاهی زمان استخراج برخوردارند [۱۷]. با وجود اثرات سودمند جینجرول‌ها و شوگول‌ها، کاربرد دارویی این ترکیبات فعال با محدودیت روبه‌روست. انحلال پذیری پایین جینجرول‌ها و شوگول‌ها سبب جذب ضعیف و فراهمی زیستی پایین آن‌ها می‌شود. تحقیقات نشان می‌دهند که این مواد دارای نیمه عمر بسیار کوتاهی می‌باشند، به این صورت که نیمه عمر یک تا سه ساعت در پلاسما برای ۶ و ۸ و ۱۰-جینجرول و ۶-شوگول گزارش شده است. برای افزایش فراهمی زیستی ترکیبات موثر زنجبیل، سیستم‌های نوین دارورسانی مانند لیپوزوم [۱۸]، فیتوزوم [۱۹] و نانوذره‌ها [۲۰، ۲۱] و نانوامولسیون [۲۲] استفاده شده‌اند که نتیجه‌های مطلوبی در پی داشته‌اند. استفاده از دارورسانی نوین سبب افزایش انحلال‌پذیری و فراهمی زیستی، محافظت از سمی شدن، افزایش فعالیت دارویی، افزایش پایداری، رهایش پیوسته و محافظت در برابر

(۱) Essential oils
 (۲) Monoterpenoid
 (۳) Gingerol
 (۴) Paradol
 (۵) Tocopherol
 (۶) Poly(ethylene glycol)-poly(ε-caprolactone)
 (۷) Biodegradable

(۸) Oleoresin
 (۹) Sesquiterpen hydrocarbons
 (۱۰) Shogaol
 (۱۱) Zingerone
 (۱۲) Poly(ethylene glycol)-poly(ε-caprolactone) (PEG-PCL)
 (۱۳) Biocompatible

ذره‌ها با سایزهای یکنواخت جداسازی شد. نمونه‌ها در دمای اتاق و در محیط خشک و بدون نور نگهداری شد. استاندارد نونانوئیک اسید وانیلیل آمید (NVA)^۲ به عنوان استاندارد خارجی برای آنالیز HPLC از شرکت سیگما تهیه شد. همه‌ی حلال‌ها از جمله اتانول، متانول، هگزان، دی اتیل اتر، استونیتریل و استیک اسید از شرکت مرک تهیه شدند. پودر کیتوزان از شرکت سیگما خریداری شد. همچنین سدیم سولفات، سدیم متایسولفیت و گلووتاردهید از شرکت مرک تهیه شدند.

آزمایش‌ها

استخراج و خالص سازی جینجرول

پودر زنجبیل توسط حلال متانول به مدت ۱۴ ساعت با روش غرقایی استخراج شد. سپس به منظور خالص سازی، عصاره‌ی زنجبیل حاصل از استخراج، توسط ستون کروماتوگرافی سیلیکاژل تفکیک شد. پس از نصب ستون کروماتوگرافی، جهت پر کردن^۱ ستون با سیلیکاژل اقدام شد. بدین منظور از روش پر کردن خشک استفاده شد. ابتدا ستون با حلال غیرقطبی هگزان پر شد و سپس ۳۰ گرم سیلیکاژل به آن اضافه شد. در حین افزودن سیلیکاژل برای از بین بردن حباب‌ها و جلوگیری از ایجاد شکاف^۲، به ستون ضربه زده می‌شد. به دلیل این که عصاره به خوبی در سیستم حلال ستون انحلال پذیر نبود، برای بارگزاری عصاره از روش خشک استفاده شد. به ۴۰۰ میلی گرم عصاره که به صورت محلول متانولی در اختیار بود، در حدود ۲۰ برابر یعنی ۸ گرم سیلیکاژل اضافه شد. مخلوط در تبخیر کن دوار، خشک شد و نمونه خشک شده در بالای ستون بارگزاری شد. سیستم حلال مورد استفاده در ستون کروماتوگرافی، هگزان و دی اتیل اتر بودند که با نسبت‌های ۸۰:۲۰، ۵۰:۵۰، ۶۰:۴۰ و ۸۰:۲۰ در طول فرایند اضافه شدند. از هر کدام از نسبت‌های حلال به میزان ۱۰۰ میلی لیتر تهیه شد. همواره در طول فرایند سطح مقدار حلال موجود در ستون، کمی از سیلیکاژل بالاتر بود. جهت تعیین ترکیبات موجود، قسمت‌های گوناگون تفکیک شده در حین فرایند برای آنالیز HPLC آماده شدند^۳.

آنالیز HPLC

غلظت مواد موثر زنجبیل یعنی جینجرول‌ها و شوگول با روش ارائه شده در استاندارد ایزو ۱۳۶۸۵ محاسبه گشت. بدین منظور

موادی هستند که مورد اقبال پژوهشگران زیادی قرار گرفته‌اند [۲۶]. کیتوزان پلی ساکاریدی شبیه به سلولز است که از استیل زدایی کیتین به وجود می‌آید [۲۷]. ساختار این ترکیب به صورت زنجیره‌ای خطی از واحدهای تصادفی ان استیل دی گلوکز آمین و گلوکز آمین می‌باشد که با پیوندهای گلیکوزیدی (بتا ۱ و ۴) به هم متصل شده‌اند. گروه آمین اولیه موجود در ساختار شیمیایی کیتوزان، به آن خواص ویژه‌ای بخشیده که در مصارف دارویی مفید واقع شده است. کیتوزان دارای بار مثبت و مخاط چسب^۱ است و این خاصیت در دارورسانی بسیار حائز اهمیت است. کیتین به دلیل این که از نظر شیمیایی فعال نیست^۲، در مقایسه با کیتوزان کاربرد دارویی محدودتری دارد. فواید متعددی را از جمله توانایی کنترل رهایش دارو. خاصیت مخاط چسبی و افزایش زمان ماند در ناحیه جذب، می‌توان برای کیتوزان برشمرد. هم چنین این پلیمر در حین ساخت نیاز به استفاده از حلال‌های آلی ندارد زیرا در محیط‌های آبی اسیدی انحلال پذیر است. این ترکیب یک پلی آمین خطی است که دارای تعدادی گروه‌های آمین آزاد است که برای اتصال عرضی آماده هستند. کیتین و کیتوزان دارای سمیت پائینی هستند. شاخص LD50^۳ کیتوزان ۱۶ گرم بر کیلوگرم وزن بدن می‌باشد که نزدیک به عدد مربوط به شکر و نمک است. کیتوزان به صورت تجاری با جرم مولکولی ۳۰۰ تا ۲۰۰۰۰ دالتون و درجه استیل زدایی ۶۶٪ تا ۹۵٪ موجود است [۲۶، ۲۸]. کیتوزان در نانوفرمولاسیون داروهای گیاهی گوناگونی مانند کرکومین^۴، کوئرستین^۵ و کاسکین^۶ و ... به کار رفته است [۲۹-۳۱].

در پژوهش پیش رو، برای افزایش انحلال پذیری و فراهمی زیستی جینجرول، نانوذره‌های کیتوزان حاوی جینجرول ساخته شد. ابتدا جینجرول استخراج و توسط ستون کروماتوگرافی سیلیکاژل خالص سازی شد. در ادامه برای افزایش فراهمی زیستی، جینجرول در نانوذره‌های کیتوزان کپسوله شد و اثر سمیت آن روی سلول سرطانی MCF-7 مورد مطالعه قرار گرفت.

بخش تجربی

مواد و وسایل لازم

زنجبیل خشک شده خریداری شده از بازار، با کمک هاون و آسیاب برقی به صورت پودر درآمد. سپس توسط الک با مش‌های ۱۰ تا ۳۰،

(۱) Mucoadhesive

(۳) Lethal dose

(۵) Quarcetin

(۷) Nonanoic acid vanillylamide (NVA)

(۹) Channeling

(۲) Chemically inert

(۴) Curcumine

(۶) Cathecin

(۸) Packing

محلول ۲۰٪ سدیم سولفات به صورت قطره قطره و همراه با همزدن اضافه و نمونه به مدت نیم ساعت دیگر هم زده شد. برای اتصال عرضی، ۰/۲ میلی لیتر گلو تاردهید، اضافه و هم زدن نیم ساعت دیگر ادامه یافت. در انتها ۲ میلی لیتر محلول ۱۰٪ سدیم متایسولفیت اضافه و نمونه نیم ساعت دیگر همزده شد. محلول به مدت ۱۲ ساعت نگهداری شد. سپس در دمای ۴ درجه سلسیوس، با دوبار تعویض در ۲۴ ساعت برابر آب دیالیز شد و یک بار دیگر در برابر نرمال سالین، در دمای ۴ درجه سلسیوس، با دوبار تعویض در ۲۴ ساعت دیالیز شد. سرانجام نمونه دیالیز شده لیوفیلیز شد [۳۴].

جهت محاسبه درصد انکپسوله شدن جینجرول، نانوذره‌های حاصل از فیلتر با کات آف ۳ ۱۲۰۰۰ کیلودالتون عبور داده شدند. غلظت داروی آزاد در محلول رد شده از صافی، توسط HPLC محاسبه و بازده انکپسوله شدن محاسبه طبق رابطه (۷) محاسبه شد.

$$\%E = (1 - \frac{\text{free drug}}{\text{total drug}}) \times 100 \quad (7)$$

آنالیز FT-IR

آنالیز FT-IR روشی توسعه یافته است که جهت تعیین ساختار گونه‌های شیمیایی به کار می‌رود. این طیف سنج می‌تواند گروه‌های عاملی ترکیبات شیمیایی گوناگون را شناسایی کند. جهت بررسی گروه‌های عاملی کیتوزان، جینجرول و نانوذره‌ی تولید شده از آنالیز FT-IR استفاده شد. برای آنالیز دستگاه طیف سنج در محدوده‌ی ۴۰۰-۴۰۰۰ نانومتر به کار گرفته شد. کیتوزان به صورت جامد و جینجرول و نانوذره‌های کیتوزان به صورت محلول در کلروفورم مورد آنالیز قرار گرفتند. نمونه مایع در سل مخصوص و نمونه‌های جامد به صورت قرص آماده شد.

آنالیز AFM

میکروسکوپ نیروی اتمی^۴ یا AFM دستگاهی است که جهت بررسی ساختار سطحی مواد در ابعاد نانومتری به کار می‌رود. در این پروژه از آنالیز AFM برای بررسی توزیع ذره‌ها و ساختار سطحی استفاده شد. بدین منظور، محلول رقیق تهیه شده در آب، مدتی تحت امواج آلتراسونیک قرار گرفت و چند قطره از محلول حاصل روی سطح لام ریخته شد. و با استفاده از AFM تصویر سه بعدی از سطح به دست آمد.

HPLC با ستون C18 با جذب UV ۲۸۰ نانومتر، به کار گرفته شد. فاز متحرک^(۱)، استونیتریل و آب حاوی ۱٪ استیک اسید با نسبت ۶۵:۳۵ بود. نرخ جریان به مقدار یک میلی گرم بر دقیقه تنظیم شد. نونانوئیک اسید وانیلیل آمید (NVA)^(۲) به عنوان استاندارد خارجی استفاده شد. این استاندارد زمان ماند و طیف جذب UV مشابهی با ۶-جینجرول دارد. محلول استاندارد با غلظت ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر، با انحلال NVA در متانول آماده و به HPLC تزریق شد. فاکتور پاسخ برای NVA با استفاده از رابطه (۱) محاسبه و عدد مربوط برای هر کدام از جینجرول‌ها و شوگول به دست آمد [۳۳].

$$K_{NVA} = \frac{C_{NVA} \times 100}{A_{NVA}} \text{ mg/100ml/unit area} \quad (1)$$

$$K_{6\text{-gingerol}} = K_{NVA} \times \frac{\text{MW of 6-gingerol}}{\text{MW of NVA}} \quad (2)$$

$$= K_{NVA} \times 1.003 \text{ mg/100ml/unit area}$$

$$K_{8\text{-gingerol}} = K_{NVA} \times 1.099 \text{ mg/100ml/unit area} \quad (3)$$

$$K_{10\text{-gingerol}} = K_{NVA} \times 1.194 \text{ mg/100ml/unit area} \quad (4)$$

$$K_{6\text{-shogaol}} = K_{NVA} \times 0.942 \text{ mg/100ml/unit area} \quad (5)$$

C_{NVA} نشان دهنده‌ی غلظت NVA بر حسب میلی گرم بر میلی لیتر و A_{NVA} نشان دهنده‌ی سطح زیر قله است. غلظت هر کدام از این ترکیبات در نمونه به صورت زیر محاسبه می‌شود که A و K مربوط به ترکیب مورد نظر می‌باشد.

$$\text{Concentration of each bioactive} = \frac{A \times K}{c} \% \quad (6)$$

نانوفرمولاسیون زنجبیل

محلول ۱۵٪ کیتوزان در استیک اسید رقیق به غلظت ۳۵ میلی مولار، تهیه شد. ۱ میلی لیتر توپین ۸۰ به ۴۰ میلی لیتر از این محلول همراه با همزدن ثابت افزوده شد. نمونه به مدت یک ساعت هم زده شد. ۵۰۰ میکرولیتر محلول ۱۰ میلی گرم بر میلی لیتر جینجرول در کلروفورم، به صورت واحدهای ۲۰ میکرولیتر به آن اضافه شد و نمونه به مدت یک ساعت هم زده شد. یک میلی لیتر

(۱) Mobile phase

(۳) Cutoff

(۲) Nonanoic acid vanillylamide (NVA)

(۴) Atomic force microscope

آنالیز پراکندگی نور دینامیکی^۱ DLS

پراکندگی نور دینامیکی روشی فیزیکی است که برای تعیین توزیع ذره‌های موجود در محلول‌ها و سوسپانسیون استفاده می‌شود. این روش غیرمخرب و سریع برای تعیین اندازه ذره‌ها در محدوده چند نانومتر تا میکرون به کار می‌رود. این روش به برهمکنش نور با ذره بستگی دارد. نور پراکنده شده بوسیله نانوذره‌های موجود در سوسپانسیون با زمان تغییر می‌کند که می‌تواند به قطر ذره ارتباط داده شود. جهت تعیین سایز متوسط و پراکندگی سایز ذره‌ها از آنالیز DLS استفاده شد. بدین منظور محلول آبی نانوذره‌ها تهیه و تحت امواج آلتراسونیک قرار گرفت. سپس جهت آنالیز اقدام شد. ضریب توزیع اندازه ذره‌های PDI^۲ طبق رابطه‌ی (۸) محاسبه شد.

$$PDI = (\text{width}/VMD)^2 \quad (8)$$

^۳ VMD نشان‌دهنده‌ی قطر متوسط می‌باشد.

بعد از اتمام زمان‌های مورد نظر آزمایش MTT انجام گردید. بدین صورت که محیط کشت خارج شده و ۵۰ میکرولیتر از محلول MTT با غلظت ۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به هر خانه افزوده و به مدت ۴ ساعت درون انکوباتور در شرایط استاندارد C ۳۷^o و دی‌اکسید کربن ۵٪ قرار گرفت. در این زمان سلول‌های زنده، محلول MTT را تبدیل به بلورهای آبی نامحلول فورمازان کردند، سلول‌های مرده توانایی این کار را ندارند. پس از ۴ ساعت، به هر خانه مقدار ۱۵۰ میکرولیتر از محلول ۰/۰۴ مولار ایزوپروپانول اسیدی اضافه شد و به مدت ۳۰-۲۰ دقیقه در دمای اتاق قرار گرفت. هنگامی که بلورهای فورمازان به طور کامل حل شدند، جذب نمونه‌ها در طول موج ۵۷۰ نانومتر اندازه‌گیری شد. میزان بقای سلولی توسط رابطه‌ی (۹) به دست آمد.

$$100 \times \frac{\text{جذب نوری تست}}{\text{جذب نوری کنترل}} = \text{میزان بقای سلولی} \quad (9)$$

نتیجه‌ها و بحث**خالص‌سازی جینجرول توسط کروماتوگرافی ستونی**

در طول کروماتوگرافی ستونی، قسمت‌های گوناگونی جمع‌آوری و توسط HPLC مورد آنالیز قرار گرفت. قسمتی که از شسته شدن توسط حلال هگزان و دی‌اتیل اتر با نسبت ۶۰:۴۰ به دست آمد، حاوی جینجرول با خلوص نسبتاً بالا بود. شکل (۲) کروماتوگرام حاصل از آنالیز HPLC این قسمت را نشان می‌دهد. خلوص مجموع ۶-جینجرول و ۸-جینجرول در نمونه حدود ۶۹٪ بود.

نانوفرمولاسیون جینجرول

پس از خشک کردن انجمادی، نانوذره‌های ساخته شده به صورت جامد چسبناک، حاصل شدند و برای آنالیزهای مربوط نگهداری شدند. درصد انکپسوله شدن جینجرول در نانوذره‌های کیتوزان طبق رابطه‌ی (۷) ۸۰٪ به دست آمد.

آنالیز FTIR

شکل (۳) نشان‌دهنده‌ی طیف حاصل از آنالیز FTIR کیتوزان، جینجرول و جینجرول کپسوله شده در نانوذره‌های کیتوزان می‌باشد. در طیف حاصل از کیتوزان، پیک ۳۴۱۰ مربوط به گروه هیدروکسیل (OH-)، گروه عاملی مهم کیتوزان می‌باشد. پیک ۱۶۵۱ مربوط به گروه امید

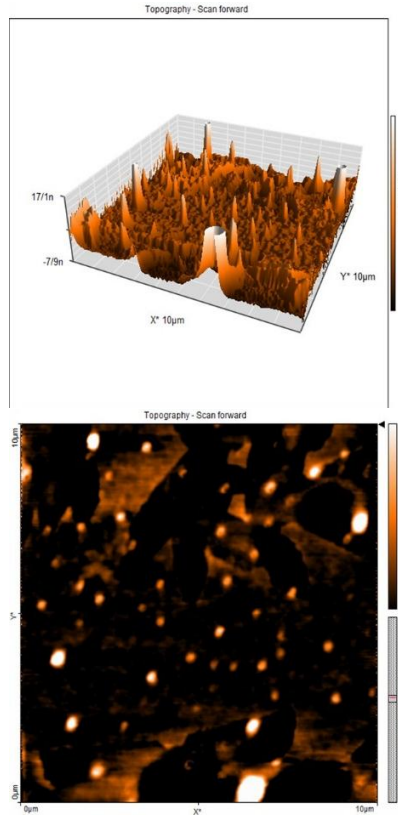
آنالیز سمیت نانوذره‌ها بر رده‌ی سلولی MCF-7

برای بررسی توانایی بازدارندگی نانوذره‌های حاوی جینجرول، آزمایش اثر سمیت سلولی بر روی سلول‌های MCF-7 (سلول‌های سرطان سینه) انجام گردید. بدین منظور روش رنگ سنجی MTT به کار گرفته شد. سلول از بانک سلولی انستیتو پاستور ایران تهیه و در محیط کشت RPMI با ۱۰٪ سرم جنین گاوی (FBS) و ۱٪ آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین^۴/استرپتومایسین^۵ در شرایط استاندارد ۳۷ درجه‌ی سلسیوس و ۵٪ کربن‌دی‌اکسید در انکوباتور نگهداری و هر دو روز یک بار محیط کشتشان تعویض گردید.

مقدار ۲۰۰ میکرولیتر از غلظت‌های گوناگون ۰/۱۲۵، ۰/۲۵، ۰/۵، ۱ و ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از نمونه‌ی نانوذره‌ی بارگذاری شده با جینجرول، در محیط کشت کامل DMEM و RPMI به همراه ۱۰٪ PBS و ۱٪ آنتی‌بیوتیک پنی‌سیلین/استرپتومایسین تهیه شدند. این نمونه‌ها به همراه محیط کشت کامل فاقد نمونه به عنوان گروه کنترل، در پلیت ۹۶ خانه ریخته شد. برای هر غلظت نمونه، سه بار تکرار در نظر گرفته شد. سلول MCF-7 تریپسینه و به صورت سوسپانسیون در آورده شد. به هر خانه از پلیت ۹۶ خانه، ۷×۱۰^۳ سلول اضافه و پلیت‌ها در شرایط استاندارد ۳۷ درجه سلسیوس و دی‌اکسید کربن ۵٪ در انکوباتور به مدت ۴۸ ساعت نگهداری شدند.

(۱) Dynamic light scattering
(۳) Volume medium diameter
(۵) Streptomycin

(۲) Polydispersity index
(۴) Penicillin



شکل (۴) تصویر حاصل از آنالیز AFM

نشان می‌دهد جینجرول به خوبی در نانوذره‌های کیتوزان کپسوله شده است. پیکی که در بازه ۳۰۰۰ تا ۳۵۰۰ وجود دارد، نشان دهنده پیوند هیدروژنی بین گروه O-H جینجرول و گروه N-H کیتوزان می‌باشد.

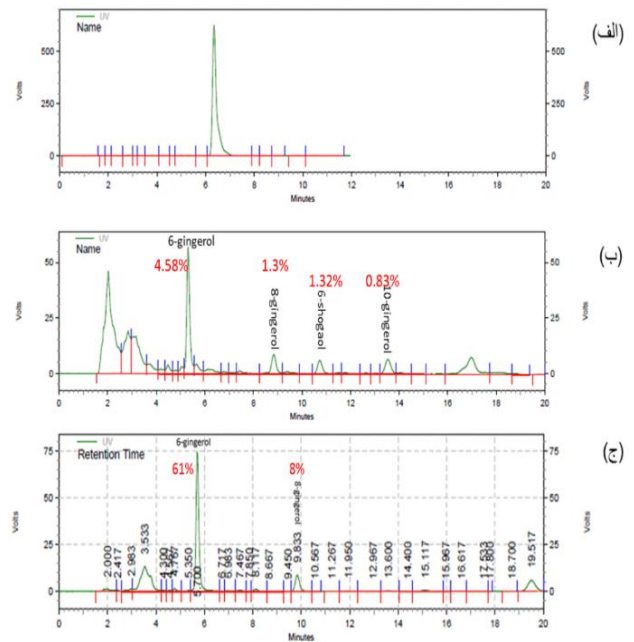
آنالیز AFM

شکل (۴) تصاویر حاصل از آنالیز AFM را نشان می‌دهد. همان‌طور که در تصویر قابل مشاهده است، نانوذره‌ها کروی شکل هستند. قله‌هایی که در تصویر سه بعدی دیده می‌شوند، نانوذره‌ها را نشان می‌دهند. یکسان بودن ارتفاع این قله‌ها، نشان دهنده یکنواخت بودن توزیع اندازه‌ی نانوذره‌ها می‌باشد.

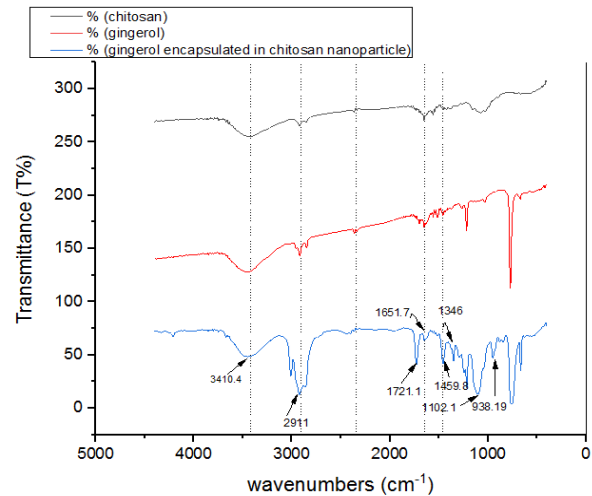
آنالیز DLS

اندازه نانوذره‌ها و توزیع اندازه آن‌ها توسط آنالیز DLS تعیین شد. متوسط اندازه ذره‌ها طبق شکل (۵) ۲۱/۱۱ نانومتر تعیین شد و پراکندگی اندازه نانوذره‌ها عدد پایینی بود. نتیجه حاصل از آنالیز DLS تقریباً مشابه آنالیز AFM بود. شاخص پراکندگی اندازه ذره‌های PDI، ۰/۸۵ به دست آمد. این عدد نشان دهنده‌ی آن است که الگوریتم توزیع به بهترین شکل عمل می‌کند.

علمی - پژوهشی

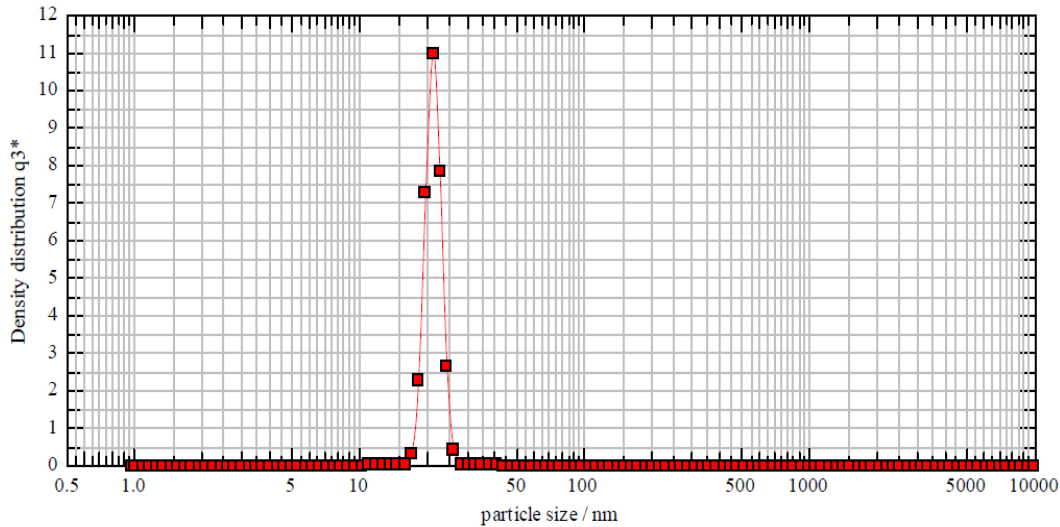


شکل (۲) نمودار HPLC (الف) کروماتوگرام مربوط به استاندارد NVA (ب) کروماتوگرام مربوط به عصاره زنجبیل (ج) کروماتوگرام حاصل از نمونه خالص شده توسط کروماتوگرافی ستونی



شکل (۳) طیف حاصل از آنالیز FTIR کیتوزان، جینجرول و جینجرول کپسوله شده در نانوذره‌های کیتوزان

در طیف حاصل از جینجرول، پیک در بازه ۳۴۱۰-۳۳۱۰ مربوط به گروه هیدروکسیل، پیک ۲۹۱۱ مربوط به نیروی کششی C-H، ۱۳۳۷ مربوط به C-O و پیک ۱۷۲۱ مربوط به گروه کربونیل و کشش C=O موجود در جینجرول می‌باشد. وجود پیک‌های جینجرول در طیف حاصل از جینجرول کپسوله شده در نانوذره‌های کیتوزان،

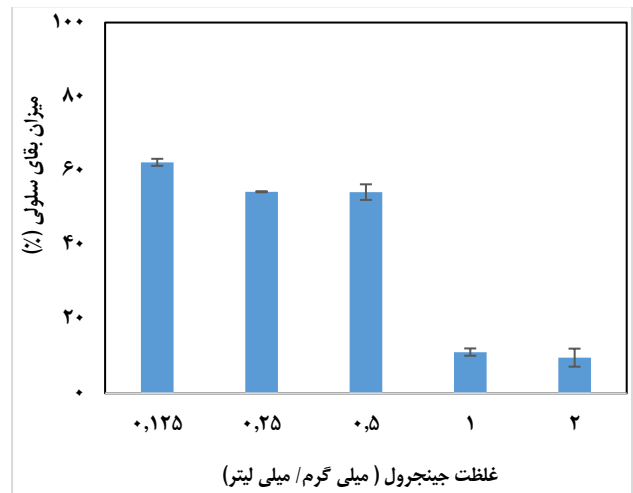


شکل (۵) بررسی سایز نانوذره ها توسط آنالیز DLS

جینجرول کپسوله شده در نانوذره‌های با غلظت ۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر، سبب از بین رفتن ۹۰ درصد از سلول‌ها طی زمان ۴۸ ساعت شد. شاخص IC_{50} به معنای غلظتی از جینجرول است که در حضور آن میزان بقای سلولی ۵۰ درصد است. بنابر این تعریف، شاخص IC_{50} غلظت ۰/۵۵ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر می‌باشد. در پژوهشی دیگر با بررسی اثر سمیت ۶-جینجرول خالص بر رده سلولی MCF-7، شاخص IC_{50} ۹۸۵/۸ میکرومولار معادل ۰/۷ میلی‌گرم بر لیتر گزارش شد [۳۵]. در نتیجه نانوفرمولاسیون سبب افزایش اثر سایتوتوکسیک روی رده سلولی MCF-7 شده است.

مقایسه پژوهش حاضر با پژوهش‌های پیشین

جدول ۱ پژوهش‌های مربوط به نانوفرمولاسیون ترکیبات موثر زنجبیل، روش ساخت، سایز نانوذره، درصد کپسوله کردن و کاربرد آن‌ها را ارائه داده و با پژوهش پیش رو مقایسه می‌کند. در پژوهش حاضر از محلول حاوی ۶-جینجرول و ۸-جینجرول با خلوص ۶۹٪ که در آزمایشگاه تولید شد، برای نانوفرمولاسیون بهره گرفته شد. این در حالی صورت گرفت که در اکثر این تحقیقات از استاندارد جینجرول استفاده شد. نانوذره‌های کیتوزان حامل مناسب، غیر سمی، ارزان قیمت و با قابلیت سنتز آسان است که جینجرول در آن با درصد خوب ۸۰ کپسوله شد. با انجام تحقیقات بیشتر روی رهایش دارو و مطالعات گوناگون *in vivo* و *in vitro* امکان کاربرد دارویی این فرمولاسیون فراهم می‌گردد.



شکل (۶) میزان بقای سلولی سلول‌های MCF-7 پس از ۴۸ ساعت

آنالیز سمیت نانوذره‌ها بر رده‌ی سلولی MCF-7

تست سمیت سلولی جینجرول کپسوله شده در نانوذره‌های کیتوزان، بر روی رده‌ی سلولی MCF-7 انجام گرفت. در غلظت‌های بالاتر جینجرول، میزان جذب کاهش می‌یابد که نشان‌دهنده‌ی مرگ تعداد بیشتری از سلول‌هاست. میزان بقای سلولی طبق رابطه‌ی (۹) به دست آمد و نتیجه‌های حاصل در شکل (۶) ارائه گردید. نتیجه‌ها حاکی از آن است که جینجرول کپسوله شده در نانوذره‌های کیتوزان، اثر بازدارندگی مناسبی روی رشد سلول‌ها داشته‌اند. کاهش میزان بقای سلولی با افزایش غلظت جینجرول، حاکی از این است که از بین رفتن سلول‌های سرطانی به دلیل عملکرد ضد سرطانی جینجرول می‌باشد.

جدول ۱ - پژوهش‌های مربوط به نانوفرمولاسیون ترکیبات موثر زنجبیل

منبع	هدف	فعالیت بیولوژیکی	درصد کپسوله شدن	سایز نانوذره‌ها (نانومتر)	ماده موثر	سیستم دارورسانی
[۳۶]	بهبود رهایش دارو، افزایش هدفمندی دارو برای دارورسانی به مغز	-	۹۵/۱۸	۲۳/۵	۶-شوگول	لیپوزوم
[۱۸]	افزایش فراهمی زیستی خوراکی	ضد تورم	۸۸/۳۵	۴۴/۷۷	۶-جینجروول	پرولیپوزوم
[۱۹]	افزایش اثر ضد تورم و ضد باکتری، رهایش پیوسته	التیام عفونت‌های تنفسی	۸۶/۰۲	۲۴۵	جینجروول	فیتوزوم
[۳۷]	افزایش غلظت دارو در قسمت هدف	التیام بخشی زخم‌های روده بزرگ	۸۲	۲۴۹/۶	۶-شوگول	نانوذره‌های PLGA/PLA-PEG-FA
[۲۱]	افزایش فراهمی زیستی خوراکی	ضد نقرس	۸۷/۶۷	۷۳/۵۶	۶-شوگول	نانوذره‌های لیپیدی جامد
پژوهش حاضر	افزایش سمیت علیه سلول‌های سرطانی، افزایش انحلال پذیری و فراهمی زیستی	ضد سرطان سینه	۸۰	۲۱/۱۱	جینجروول	نانوذره‌های کیتوزان

نتیجه‌گیری

کروی حاصل با اندازه متوسط ۲۱/۱۱ نانومتر، با نسبت توزیع مناسب و درصد انکپسوله شدن ۸۰٪ به دست آمدند. آزمایش سمیت نانوذره‌های حاصل روی سلول MCF-7 با دارندگی مناسب آن‌ها را روی رشد سلول‌های سرطانی به اثبات رساند. هم چنین مقایسه نتیجه‌ها با پژوهش‌های پیشین، نشان دهنده اثربخشی نانوفرمولاسیون در بهبود اثر سائیتوتوکسیک جینجروول می‌باشد.

در این تحقیق، مواد موثر زنجبیل، توسط حلال متانول استخراج و با استفاده از ستون کروماتوگرافی سیلیکاژل تفکیک شدند. نمونه خالص شده با خلوص ۶۹٪، ۶-جینجروول و ۸-جینجروول حاصل گشت. با توجه به پایین بودن انحلال‌پذیری و فراهمی زیستی این ترکیبات موثر، استفاده از نانوذره‌ها به عنوان سیستم‌های دارورسانی نوین در فرمولاسیون دارویی این مواد توصیه می‌شود. در این پژوهش نانوذره‌های کیتوزان حاوی جینجروول ساخته و توسط آنالیزهای DLS و AFM مورد مطالعه قرار گرفتند. نانوذره‌های

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۱/۰۵؛ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۰۱/۱۶

مراجع

- [1] Semwal R.B., Semwal D.K., Combrinck S., Viljoen A.M., [Gingerols and shogaols: Important Nutraceutical Principles from Ginger, *Phytochemistry*, 117: 554-568 \(2015\).](#)
- [2] An K., Zhao D., Wang Z., Wu J., Xu Y., Xiao G., [Comparison of Different Drying Methods on Chinese Ginger \(*Zingiber officinale* Roscoe\): Changes in Volatiles, Chemical Profile, Antioxidant Properties, and Microstructure, *Food Chemistry*, 197: Part B: 1292-1300 \(2016\).](#)
- [3] Jiang Y., Liao Q., Li H., Zou Y., [Ginger: Response to Pathogen-related Diseases, *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 102: 88-94 \(2018\).](#)
- [4] Dugasani S., Pichika M.R., Nadarajah V.D., Balijepalli M.K., Tandra S., Korlakunta J.N., [Comparative Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of \[6\]-gingerol, \[8\]-gingerol, \[10\]-gingerol and \[6\]-shogaol, *Journal of Ethnopharmacology*, 127\(2\): 515-520 \(2010\).](#)
- [5] De Lima R.M.T., Dos Reis A.C., de Menezes A.P.M., Santos J.V.O., Filho J., Ferreira J.R.O., [et al., Protective and Therapeutic Potential of Ginger \(*Zingiber officinale*\) Extract and \[6\]-gingerol in Cancer: A Comprehensive Review, *Phytotherapy Research*, 32\(10\): 1885-1907 \(2018\).](#)

- [6] Ebrahimzadeh Attari V., Malek Mahdavi A., Javadivala Z., Mahluji S., Zununi Vahed S., Ostadrahimi A., [A Systematic Review of the Anti-obesity and Weight lowering Effect of Ginger \(*Zingiber officinale* Roscoe\) and its Mechanisms of Action](#), **32(4)**: 577-585 (2018).
- [7] Khandouzi N., Shidfar F., Rajab A., Rahideh T., Hosseini P., Mir Taheri M., [The effects of Ginger on Fasting Blood Sugar, Hemoglobin a1c, Apolipoprotein B, Apolipoprotein a-I and Malondialdehyde in type 2 Diabetic Patients](#), *Iranian journal of pharmaceutical research : IJPR*, **14(1)**: 131-140 (2015).
- [8] Sahdeo P., Tyagi A.K., [Ginger and Its Constituents: Role in Prevention and Treatment of Gastrointestinal Cancer](#), *Gastroenterology Research and Practice*, (2015).
- [9] Liang T., He Y., Chang Y., Liu X., [6-shogaol a Active Component from Ginger Inhibits Cell Proliferation and Induces Apoptosis through Inhibition of STAT-3 Translocation in Ovarian Cancer Cell Lines \(A2780\)](#), *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, **24(3)**: 560-567 (2019).
- [10] Bernard M.M., McConnery J.R., Hoskin D.W., [\[10\]-Gingerol, a Major Phenolic Constituent of Ginger Root, Induces Cell Cycle Arrest and Apoptosis in Triple-negative Breast Cancer Cells](#), *Experimental and Molecular Pathology*, **102(2)**: 370-376 (2017).
- [11] Homa S., Wentz-Hunter K., [Differential Gene Expression in Pancreatic Cancer When Treated with Ginger Extract](#), *Free Radical Biology and Medicine*, **128(S67)** (2018).
- [12] Hu J., Guo Z., Glasius M., Kristensen K., Xiao L., Xu X., [Pressurized Liquid Extraction of Ginger \(*Zingiber officinale* Roscoe\) with Bioethanol: An Efficient and Sustainable Approach](#), *Journal of Chromatography A*, **1218(34)**: 5765-5773 (2011).
- [13] Nile S.H. Park S.W., [Chromatographic Analysis, Antioxidant, Anti-inflammatory, and Xanthine Oxidase Inhibitory Activities of Ginger Extracts and its Reference Compounds](#), *Industrial Crops and Products*, **70**: 238-244 (2015).
- [14] Shukla Y. Singh M., [Cancer Preventive Properties of Ginger: A Brief Review](#), *Food and Chemical Toxicology*, **45(5)**: 683-690 (2007).
- [15] Nagendra chari K.L., Manasa D., Srinivas P., Sowbhagya H.B., [Enzyme-assisted Extraction of Bioactive Compounds from Ginger \(*Zingiber officinale* Roscoe\)](#), *Food Chemistry*, **139(1-4)**: 509-514 (2013).
- [16] Rahath Kubra I., Kumar D., Rao L.J.M., [Effect of Microwave-assisted Extraction on the Release of Polyphenols from Ginger \(*Zingiber officinale*\)](#), *International Journal of Food Science & Technology*, **48(9)**: 1828-1833 (2013).
- [17] Nourbakhsh Amiri Z., Najafpour G.D., Mohammadi M., Moghadamnia A.A., [Subcritical Water Extraction of Bioactive Compounds from Ginger \(*Zingiber officinale* Roscoe\)](#), *International Journal of Engineering*, **31(12)**: 1991-2000 (2018).
- [18] Wang Q., Wei Q., Yang Q., Cao X., Li Q., Shi F., [et al., A novel Formulation of \[6\]-gingerol: Proliposomes with Enhanced Oral Bioavailability and Antitumor Effect](#), *International Journal of Pharmaceutics*, **535(1-2)**: 308-315 (2018).

- [19] Singh R.P., Gangadharappa H.V., Mruthunjaya K., [Phytosome Complexed with Chitosan for Gingerol Delivery in the Treatment of Respiratory Infection: In vitro and in vivo evaluation](#), *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, **122**: 214-229 (2018).
- [20] Zhang M., Xu C., Liu D., Han M.K., Wang L., Merlin D., [Oral Delivery of Nanoparticles Loaded With Ginger Active Compound, 6-Shogaol, Attenuates Ulcerative Colitis and Promotes Wound Healing in a Murine Model of Ulcerative Colitis](#), *J Crohns Colitis*, **12(2)**: 217-229 (2018).
- [21] Wang Q., Yang Q., Cao X., Wei Q., Firempong C.K., Guo M., [et al.](#), [Enhanced Oral Bioavailability and Anti-gout Activity of \[6\]-shogaol-loaded Solid Lipid Nanoparticles](#), *International Journal of Pharmaceutics*, **550(1)**: 24-34 (2018).
- [22] Zanesco-Fontes I., Silva A.C.L., da Silva P.B., Duarte J.L., Di Filippo L.D., Chorilli M., [et al.](#), [\[10\]-Gingerol-Loaded Nanoemulsion and its Biological Effects on Triple-Negative Breast Cancer Cells](#), *AAPS PharmSciTech*, **22(5)**: 157 (2021).
- [23] Mahomoodally M.F., Aumeeruddy M.Z., Rengasamy K.R.R., Roshan S., Hammad S., Pandohee J., [et al.](#), [Ginger and its Active Compounds in Cancer Therapy: From Folk Uses to Nano-therapeutic Applications](#), *Seminars in Cancer Biology*, **69**: 140-149 (2021).
- [24] Zhen L., Wei Q., Wang Q., Zhang H., Adu-Frimpong M., Kesse Firempong C., [et al.](#), [Preparation and in vitro/in vivo Evaluation of 6-Gingerol TPGS/PEG-PCL Polymeric Micelles](#), *Pharmaceutical Development and Technology*, **25(1)**: 1-8 (2020).
- [25] Rampino A., Borgogna M., Blasi P., Bellich B., Cesàro A., [Chitosan Nanoparticles: Preparation, Size Evolution and Stability](#), *International Journal of Pharmaceutics*, **455(1)**: 219-228 (2013).
- [26] Mohammed M.A., Syeda J.T.M., Wasan K.M., Wasan E.K., [An Overview of Chitosan Nanoparticles and Its Application in Non-Parenteral Drug Delivery](#), *Pharmaceutics*, **9(4)**: (2017).
- [۲۷] نبی تیر، م؛ آقامیری، س ف؛ طلایی خوزانی، م؛ بررسی آزمایشگاهی تأثیر پوشش دهی کیتوسان در کاهش تجمع نانولوله‌های کربنی به‌عنوان حامل داروی ضد سرطان کوئرستین، نشریه شیمی و مهندسی شیمی ایران، ۳۶(۳): ۹۳ تا ۱۰۲ (۱۳۹۶).
- [28] Parhi R., [Drug Delivery Applications of Chitin and Chitosan: A Review](#), *Environmental Chemistry Letters*, **18(3)**: 577-594: (2020).
- [29] Hu Q. Luo Y., [Chitosan-based Nanocarriers for Encapsulation and Delivery of Curcumin: A Review](#), *International Journal of Biological Macromolecules*, **179**: 125-135 (2021).
- [30] Roy S. Rhim J.-W., [Fabrication of Chitosan-based Functional Nanocomposite Films: Effect of Quercetin-loaded Chitosan Nanoparticles](#), *Food Hydrocolloids*, **121**: 107065 (2021).
- [31] Li F., Jin H., Xiao J., Yin X., Liu X., Li D., [et al.](#), [The Simultaneous Loading of Catechin and Quercetin on Chitosan-based Nanoparticles as Effective Antioxidant and Antibacterial Agent](#), *Food Research International*, **111**: 351-360 (2018).

- [32] Swapna Sonale R. Kadimi U.S., Characterization of Gingerol Analogues in Supercritical Carbon Dioxide (SC CO₂) Extract of Ginger (*Zingiber officinale*, R.), *Journal of Food Science and Technology*, **51(11)**: 3383-3389 (2014).
- [33] Ginger and its Oleoresins-determination of the Main Pungent Components(gingerols and shogaols)- method using High Performance Liquid Chromatography," ed. Geneva: International Organization for Standardization, (1997).
- [34] Yadav A., Lomash V., Samim M., Flora S.J., Curcumin Encapsulated in Chitosan Nanoparticles: A Novel Strategy for the Treatment of Arsenic Toxicity, *Chem Biol Interact*, **199(1)**: 49-61 (2012).
- [35] Luna-Dulcey L., Tomasin R., Naves M.A., da Silva J.A., Cominetti M.R., Autophagy-dependent Apoptosis is Triggered by a Semi-Synthetic [6]-Gingerol Analogue in Triple Negative Breast Cancer Cells, *Oncotarget*, **9(5)**: 30787-30804 (2018)
- [36] Bao R., Wang Q.-L., Li R., Adu-Frimpong M., Torennyazov E., Ji H., *et al.*, Improved Oral Bioavailability and Target Delivery of 6-Shogaol via Vitamin E TPGS-modified Liposomes: Preparation, in-vitro and in-vivo Characterizations, *Journal of Drug Delivery Science and Technology*, **59**: 101842 (2020).
- [37] Zhang M., Xu C., Liu D., Han M.K., Wang L., Merlin D., Oral Delivery of Nanoparticles Loaded With Ginger Active Compound, 6-Shogaol, Attenuates Ulcerative Colitis and Promotes Wound Healing in a Murine Model of Ulcerative Colitis, *Journal of Crohn's and Colitis*, **12(2)**: 217-229 (2018).