بسم الله الرحمن الرحيم

دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی اردبیل
دانشکده داروسازی

پایان نامه ی رساله ی دکتری عمومی داروسازی

عنوان:

ساخت و ارزیابی ضد میکروبی نانوذرات جامد لیپیدی حامل روغن سیاهدانه

اساتید راهنما:

دکتر لیلا رضایی

دکتر زهرا حصاری

استاد مشاور:

مهران نعمت طلب

نگارش:

مهدیس پیامی فرد

سال تحصیلی ۰۳-۱۴۰۲ **شماره پایان نامه: د-۲۰۱**

اهدا پایان نامه

تقدیم به آنان که به ما می آموزند که چگونه علم بیافزاییم

تقدیم به آنان که فهمیدن احساس را به من آموختند

تقدیم به حس زیبای بصیرت داشتن که پروردگار جهان آفرین در وجود ما نهاد و آموزگاران زندگی به ما یاد

دادند تا آن را بیابیم و با آن دوای جان آدمی را بسازیم و آرامش جسم و روان بخشیم.

تقدیر و تشکر

سپاس فراوان از سرکار خانم دکتر لیلا رضایی و سرکار خانوم دکتر زهرا حصاری که در پژوهش و نگارش این پایان نامه از هیچ کمکی دریغ ننموده و همواره راهنمای من بوده اند.

تشکر بی پایان از جناب آقای نعمت طلب، که مسئولیت استاد مشاوری این رساله را به عهده گرفتند ، سرکار خانم صابری، کارشناس آزمایشگاه فارماسیوتیکس و سرکار خانم اقبالی، کارشناس آزمایشگاه فارماکوگنوزی که بدون صبوری و راهنمایی های ایشان پیش بردن این پژوهش ممکن نبود و قدردان خانواده و دوستان عزیز و حامیم هستم که در هر گام از این پژوهش همدل و همراه من بوده اند.

چکیده

مقدمه

Nigella sativa گیاهی علفی یکساله از خانواده Ranunculacea است که بومی جنوب اروپا، شمال آفریقا و آسیای جنوب غربی بوده و در بسیاری از کشورهای جهان از جمله خاورمیانه کشت می شود. با توجه به حجم گسترده داده های علمی، شواهد زیادی وجود دارد که نشان می دهد سیاهدانه دارای خواص ضدمیکروبی مؤثری در برابر بسیاری از قارچ ها، ویروس ها و باکتری ها به ویژه باکتری های گرم مثبت بوده و دارویی ایمن با سابقه طولانی و قابل توجه است. از طرفی در دنیای امروز نانو فرمولاسیون ها سیستم های بسیار ارزشمندی برای کاربردهای مختلف دارورسانی ارائه می دهند و در همین راستا، نانوذرات لیپیدی جامد (SLNs[1]) یکی از سیستم‌های حامل کلوئیدی هستند که دارای مزایای بسیار دارورسانی بوده و با بهبود پایداری و ازادسازی کنترل شده ی دارو، احتمال و خطر سمیت را کاهش می دهند. لذا تهیه نانوذرات لیپیدی جامد حاوی روغن سیاهدانه (BSO[2]) می تواند راهکار مناسبی جهت بهره بری بیشتر از خواص ضد میکروبی این ماده موثره گیاهی در برابر باکتری استافیلوکوکوس اورئوس به عنوان یک نمونه شاخص گرم مثبت باشد.

مواد و روش ها

در این پژوهش، نانو ذرات جامد لیپیدی حامل روغن سیاهدانه با استفاده از روش امولسیون سازی دوگانه تهیه شد. در ادامه متغیر هایی از قبیل درصد بازده کپسولی(EE[3])، درصد بارگذاری دارو (DL[4])، الگوی آزادسازی برون تن ذرات، اندازه ذرات، شاخص پراکندگی (PDI[5]) و پتانسیل زتای (ZP[6]) نانوذرات جامد محاسبه شد. تصویربرداری از نانو ذرات به کمک روش TEM[7] انجام گرفت و نهایتا حداقل غلظت مهاری(MIC[8]) و حداقل غلظت کشندگی (MBC[9]) محاسبه شد.

یافته ها

در این مطالعه درصد بازده کپسولی 1.2 ± 73.22٪ و درصد بارگذاری دارو ۳۰.۴۶٪ به دست آمد؛ درصد آزادسازی ماده موثره طی ۷۲ ساعت برابر 71٪ و اندازه ذره ای نمونه با استفاده از تکنیک پراکندگی نور دینامیکی (DLS[10]) ۱۹۶.۴ نانومتر گزارش شد. شاخص پراکندگی ۰.۶۹ و پتانسیل زتا ۲۸.۹- میلی ولت ثبت گردید و حداقل غلظت مهاری و باکتریوسیدال برای روغن سیاهدانه به ترتیب 480 و 1560 µg/mL و برای فرمولاسیون نانوذره لیپیدی جامد ۲۰۰ و ۸۳۰ µg/mL ثبت گردید.

بحث و نتیجه گیری

نتایج مطالعات حاضر نشان داد که نانوذرات جامد لیپیدی ساخته شده با روغن سیاهدانه دارای اندازه، پتانسیل زتای مناسب و پروفایل آزاد سازی منطقی بوده و نتایج حاصل از MIC و MBC های گزارش شده در محدوده قابل قبولی می باشند.

کلید واژه ها: روغن سیاهدانه، نانوذرات جامد لیپیدی، روش امولسیون سازی دوگانه، استافیلوکوکوس اورئوس

[1] Solid lipid nanoparticles
[2] Black seed oil
[3] Encapsulation Efficiency
[4] Drug loading
[5] Polydispersity index
[6] Zeta potential
[7] Transmission electron microscopy
[8] Minimal Inhibitory Concentration
[9] Minimal Bactericidal Concentration
[10] Dynamic light scattering

فهرست مطالب

فصل ۱-

مقدمه.....

..... ۱

۱-۱-روغن سیاهدانه (BSO)..... ۲

۱-۲- نانوذرات جامد لیپیدی (SLN)..... ۴

۱-۲-۱- مزایای SLNها..... ۵

۱-۲-۱- معایب SLN ها..... ۶

۱-۳- متد های ساخت SLN..... ۶

۱-۳-۱- روش کنتاکتور غشایی..... ۶

۱-۳-۱- روش مایع فوق بحرانی..... ۷

۱-۳-۱-روش خشک کردن با اسپری..... ۷

۱-۳-۱- روش هموژنیزاسیون با فشار بالا..... ۸

۱-۳-۱- روش امولسیفیکاسیون-تبخیر حلال..... ۹

۱-۳-۱- روش میکروامولسیون سازی..... ۱۰

۱-۳-۱- روش تزریق حلال..... ۱۰

۱-۳-۱- روش اولتراسونیکه کردن..... ۱۰

۱-۳-۱-۹- روش کواسرواسیون..... ۱۱

۱-۳-۱-۱۰- روش امولسیون دوتایی..... ۱۱

۱-۳-۱-۱۰-۱- مزیت های تهیه ی SLN با روش امولسیون دوتایی..... ۱۲

۱-۳-۱-۱۰-۲- معایب تهیه ی SLN با روش امولسیون دوتایی..... ۱۲

1-4-استافیلوکوکوس اورئوس..... ۱۲

۱-۵ -ضرورت انجام مطالعه..... ۱۳

۱-۶ - هدف کلی..... ۱۳

۱-۷ - اهداف اختصاصی..... ۱۳

۱-۸- اهداف کاربردی..... ۱۴

۱-۹- فرضیات..... ۱۴

۱-۱۰- زمینه و پیشینه پژوهش..... ۱۴

فصل ۲- مواد، دستگاه‌ها و

روش‌ها..... ۲۱

۲-۱- مواد مصرفی پژوهش..... ۲۲

۲-۲- دستگاه های مورد استفاده در پژوهش..... ۲۲

۲-۳- روش اجرای پژوهش..... ۲۳

۲-۳-۱-به دست آوردن طول موج جذب ماکسیمم روغن سیاهدانه..... ۲۳

۲-۳-۲- رسم منحنی استاندارد روغن بر اساس جذب نوری..... ۲۴

۲-۳-۳-روش ساخت نانوذرات جامد لیپیدی حاوی روغن سیاهدانه..... ۲۴

۲-۳-۴- روش محاسبه ی درصد بازده کپسولی و درصد بارگذاری دارو در نانوذرات جامد لیپیدی..... ۲۵
۲-۳-۵-آزمون رهش ماده موثره از نانوذرات..... ۲۷
۲-۳-۶- اندازه گیری سایز و پتانسیل ذرات..... ۲۸
۲-۳-۷-به دست آوردن شاخص پراکندگی نانوذرات تهیه شده(PDI)..... ۲۸
۲-۳-۸ -تصویربرداری از نانوذرات به وسیله میکروسکوپ الکترونی TEM..... ۲۸
۲-۳-۹- ارزیابی ضدمیکروبی نانوذرات تهیه شده..... ۲۹
۲-۳-۹-۱-ساخت محیط‌های کشت باکتری ۲۹
۲-۳-۹-۲ -کشت باکتری ۳۱
۲-۳-۹-۳ -ارزیابی MIC و MBC..... ۳۲
۲-۳-۱۰- ملاحظات اخلاقی..... ۳۳
۲-۳-۱۱- تجزیه و تحلیل داده ها..... ۳۳
فصل ۳- نتایج
پژوهش.....
۳۴
۳-۱- به دست آوردن طول موج جذب ماکسیمم روغن سیاهدانه بر اساس جذب نوری..... ۳۵
۳-۲- نتایج مربوط به رسم منحنی استاندارد غلظت روغن سیاهدانه بر اساس جذب نوری..... ۳۵
۳-۳- نتایج مربوط به درصد بارگذاری روغن سیاهدانه در فرمولاسیون..... ۳۶
۳-۴- نتایج مربوط به تست رهش ماده موثره..... ۳۶
۳-۴-۱- جذب و غلظت ماده موثره موجود در نمونه ۳۷
۳-۴-۲- نتایج کینتیک ازادسازی روغن سیاهدانه از نانوذرات BSO-SLN..... ۳۷
۳-۵-نتایج مربوط به اندازه نانوذرات..... ۳۸
۳-۶- نتایج مربوط به پتانسیل زتای نانوذرات..... ۳۹
۳-۷- نتایج مربوط به اندازه گیری PDI نانوذرات..... ۴۰
۳-۸-نتایج مربوط به تصویربرداری الکترونی از نانوذرات با استفاده از میکروسکوپ TEM..... ۴۰
۳-۹- نتایج ارزیابی ضد میکروبی..... ۴۱
۳-۹-۱- نتایج حداقل غلظت مهاری (MIC) ۴۱
۳-۹-۲- نتایج حداقل غلظت کشندگی (MBC) ۴۱
فصل ۴- بحث و نتیجه
گیری..... ۴۲
۴-۱- بحث..... ۴۳
۴-۲-نتیجه گیری..... ۴۷
۴-۳- پیشنهادات..... ۴۸
منابع..... ۴۹

فهرست جدول ها

جدول ۲-۱- مواد مصرفی پژوهش ۲۲
جدول ۲-۲- دستگاه های مورد استفاده در پژوهش ۲۲
جدول ۲-۹- باکتری مورداستفاده در این پژوهش ۲۹
جدول۲-۹-۱-میزان پودر محیط کشت جهت آماده‌سازی ۲۹
جدول۲-۳- جذب BS0 بر اساس غلظت استاندارد ۳۶
جدول۳-۳- نمایش درصد بازده کپسولی و درصد بارگذاری BS0 در فرمولاسیون ۳۶
جدول۳-۴-۱- نتایج مربوط به تست آزاد سازی ماده موثره نمونه طی ۷۲ ساعت ۳۷
جدول ۳-۴-۲-مؤلفه های کینتیک آزادسازی ماده موثره از نمونه ۳۸
جدول ۳-۵- اندازه نانوذرات ساخته شده ۳۸
جدول۳-۶- پتانسیل زتای نانوذرات ساخته شده ۳۹
جدول ۳-۷-نتایج مربوط به PDI نانوذرات ساخته شده ۴۰
جدول۳-۹-۲- نمایش مقادیر MIC و MBC ۴۱

فهرست تصویر ها

تصویر۱-۲- دستگاه UV اسپکتروفوتومتری ۲۴
تصویر ۲-۲- دستگاه Probe sonicator ۲۵
تصویر ۲-۳-دستگاه روتاری ۲۵
تصویر ۲-۴ -دستگاه سانتریفیوژ ۲۶
تصویر ۲-۵- دستگاه Shaker-incubator ۲۷
تصویر ۲-۸- میکروسکوپ الکترونی TEM ۲۹
تصویر ۲-۹-۱- دستگاه اتوکلاو ۳۰
تصویر ۲-۹-۲ -دستگاه هیتر استیرر ۳۱
تصویر ۲-۹-۳- میکروپلیت ۹۶خانه ۳۲
تصویر۲-۹-۴- پلیت مولر هینتون آگار ۳۳
تصویر۳-۸- تصویر نانوذرات تهیه شده با BSO توسط میکروسکوپ TEM در مقیاس۱۵۰nm ۴۰

فهرست نمودار ها

نمودار۲-۳- منحنی استاندارد (calibration)غلظت BSO بر اساس جذب نوری..... ۳۵
نمودار۳-۴-نمودار درصد رهش ماده موثره نمونه طی ۷۲ ساعت در مدیوم آب و توین۲٪ حجمی-حجمی....۳۷
نمودار ۳-۵-اندازه نانوذرات ساخته شده..... ۳۹
نمودار۳-۶-پتانسیل زتای نانوذرات ساخته شده..... ۳۹