

ساخت نانوالیاف انحلال سریع پلی وینیل الکل / تری متوپریم از طریق الکتروریسندگی و ارزیابی آن به عنوان سیستم دارورسانی جدید

اعظم بلوری، علی محمدخواه*
دپارتمان شیمی - دانشکده علوم - دانشگاه گیلان

تاریخ دریافت: ۹۶/۰۲/۲۲ تاریخ تصحیح: ۹۶/۰۳/۲۷ تاریخ پذیرش: ۹۶/۰۴/۰۸

چکیده

حلالیت یکی از عوامل مهم برای رسیدن به غلظت مطلوب دارو در سیستم گردش خون می باشد. بیش از ۴۰ درصد داروهایی که به عنوان مولکول شیمیایی جدید در صنعت داروسازی به مرحله توسعه می رسند، در آب نامحلول هستند. از این رو برای دانشمندان رشته فرمولاسیون دارو، حلالیت به یک چالش مهم تبدیل شده است. در کار پیش رو با استفاده از تکنیک الکتروریسندگی، نانوالیاف پلی وینیل الکل حاوی داروی تری متوپریم ساخته و بعنوان فیلم های انحلال سریع بررسی شد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان داد، الیاف پلیمری حاوی دارو استوانه ای، صاف و یکنواخت شده و ضخامتی کمتر از ۶۰۰ نانومتر دارا می باشند. با روش های FT-IR و آنالیز حرارتی تفاضلی (DTA) مشخص شد، دارو در پلیمر ساختار بلوری خود را از دست داده است. زمان باز شدن نانوالیاف و آزادسازی دارو در محلول بزاق مصنوعی به ترتیب ۳۰ ثانیه و ۹۰ ثانیه بود و طی این مدت درصد آزاد سازی دارو از نانوالیاف بیش از ۹۰ درصد اندازه گیری شد. تست *vitro* مهار باکتری، تایید نمود که در این نوع فرمولاسیون، تری متوپریم خاصیت آنتی باکتریال خود را حفظ کرده است. با نتایج بدست آمده می توان این فیلم های انحلال سریع را کاندیدای مناسبی برای تجویز داروی تری متوپریم معرفی نمود، مخصوصا برای کودکان، سالمندان و بیماران که مشکل بلع دارند.

کلمات کلیدی: الکتروریسندگی، نانوالیاف، پلی وینیل الکل، فیلم های نازک دهانی، تری متوپریم، سیستم دارورسانی انحلال سریع.

۱- مقدمه

در دو دهه گذشته، تقاضا برای عرضه اشکال دارویی که مورد پسند بیمار باشد، بشدت افزایش یافته است. توجه به این مسئله سبب شده در حال حاضر بیش از حدود ۳۵۰ شرکت تولید کننده سیستم های دارورسانی و بیش از ۱۰۰۰ شرکت تجهیزات پزشکی مشغول بکار باشند. طبق گزارش های صنعت، این مهم باعث شده تبادلات مالی هنگفتی را که سالانه رشدی بیش از ۶۰ میلیارد دلار دارد، رقم بزنند. در این بین تجویز دارو بصورت خوراکی همچنان جایگاه ویژه خود را حفظ کرده است. در نسخه پیچی مواد دارویی، اولویت با داروهایی است که از طریق دهان جذب می شوند، مخصوصا اگر بیمار تمایلی برای دریافت دارو از راه های دیگر نداشته باشد. تجویز خوراکی دارو با توجه به سهولت مصرف، اجتناب از درد، تطبیق پذیری، پایین تر بودن هزینه

تهیه دارو به دلیل عدم نیاز به استریل شدن و مهمتر از همه سازگاری با بیمار، رایج ترین مسیر درمان شناخته شده است. اما تهیه اشکال جامد خوراکی دارو به نوبه خود با مشکلاتی روبرو می باشد. از جمله نیاز به بلع و جذب از طریق روده که با توجه به نامحلول بودن بیش از ۶۰ درصد داروهای موجود در آب، دریافت دارو از این طریق سبب کاهش خواص فارماکوکینتیکی دارو و جذب آن خواهد شد. همچنین مدت زمان طولانی از مصرف دارو تا شروع فعالیت درمانی آن در بدن و مشکل بلع برای بیماران پا به سن گذاشته یا بیماران روانی و کودکان از دیگر مشکلات مصرف این نوع داروها برای بیماران است [۱-۳].

اهمیت این نوع فرمولاسیون هنگامی بیشتر نمودار می شود که داروهای خوراکی که از طریق قطره یا شربت تجویز می شوند نیز، معایب قابل توجهی دارند. پایداری این داروها در محیط مایع به طور معمول بسیار کمتر از پایداری همان دارو در شکل جامد می باشد. از طرف دیگر تجویز دز مناسب در فرم مایع خیلی دقیق نیست.

بیشترین تحقیقات محققین در زمینه جایگزینی فرم جامد دارو به جای مایع به ایجاد تکنولوژی تهیه فیلم های نازک دهانی^۱ منجر شده که به نوبه خود زمینه نسبتاً جدیدی را در تحقیقات ساخت و فرمولاسیون داروهای خوراکی فراهم کرده است. فیلم های دهانی، سیستم دارورسانی جدیدی می باشند که در آنها ماده دارویی جامد در قالب یک نوار بسیار نازک فرموله می شود و به محض قرار گرفتن روی زبان و فقط در تماس با بزاق دهان و بدون نیاز به نوشیدن آب، حل شده و محتوی دارویی خود را آزاد می کند. داروی آزاد شده در نهایت از طریق بافت مخاطی دهان جذب شده و بدون گذر از کبد وارد سیستم گردش خون می شود. مزایای استعمال دارو به صورت فیلم های نازک دهانی عبارتند از آزاد سازی سریع دارو و آستانه کوتاه عملکرد آن (بعنوان مثال در درمان میگرن)، تاثیر گذاری مستقیم بر روی موضع بیمار (به عنوان مثال گلو)، جلوگیری از کاهش تاثیر دارو از طریق جذب در دهان و افزایش حضور فعال بیولوژیکی دارو در دهان. مصرف این حامل دارو برای بیمار هایی که مشکل بلع دارند بسیار راحت است (مانند افراد پیر، کودکان، معلولان مغزی و بیماران روحی روانی و غیره)، نیاز به جویدن یا نوشیدن آب ندارد و همچنین شانس تجدید فرمولاسیون و ایجاد رقابت در بازار دارو برای صنایع داروسازی وجود را دارد. همچنین فیلم های نازک دهانی که برای بیماری های داخل دهان تجویز شده اند، می توانند مستقیماً دارو را در محل بیماری آزاد کنند که این به نوبه خود سبب کاهش تجویز دز های مصرف دارو می شود [۴]. روش های مختلفی برای تهیه فیلم های نازک دهانی ابداع شده است از جمله ریخته گری با حلال^۲، ریخته گری با نیمه جامدات^۳، اکستروژن در حالت داغ و مذاب^۴، اکستروژن در حالت پراکندگی فاز جامد^۵ و نورد^۶. که هر یک از این روش ها معایب و مزایای خاصی دارند. استفاده از الیاف نانو برای تهیه فیلم

¹ Oral thin film technology (OTF)

² Solvent casting

³ Semisolid casting

⁴ Hot melted extrusion

⁵ Solid dispersion extrusion

⁶ Rolling

های نازک دهانی با انحلال سریع، راه کار نسبتاً جدیدی می باشد که با توسعه علم نانو تکنولوژی امکان پذیر شده و امروزه مورد توجه خاص صنعت داروسازی قرار گرفته است [۵]. استفاده از این روش ساده، مطمئن و همه پسند می تواند راه حلی برای تجویز داروهای نامحلول در آب از جمله داروهای کلاس II که از فراهمی زیستی خوب ولی انحلال ضعیف برخوردارند باشد و از این طریق و با تغییر فرمولاسیون داروهای جامد، راه کاری مناسب و کارآمد برای فائق آمدن بر مشکل حلالیت در فرمولاسیون داروهای کم محلول یا نامحلول در آب فراهم نمود [۶].

الکتروریسندگی روشی ساده و فراگیر است که از طریق آن می توان با استفاده از جریانی از محلول پلیمری یا پلیمر مذاب، نانوالیافی با قطر بین چند نانومتر تا چند میکرومتر تولید نمود. اولین بار در سال ۲۰۰۲ کناوی^۱ و همکارانش [۷] از روش الکتروریسندگی برای تهیه نانو فیبر در تولید پارچه استفاده کردند. از آن پس این روش توجه محققین بسیاری در حوزه علوم از جمله داروسازی را به خود جلب کرده است. به کمک این روش می توان الیافی با قطر نانو و میکرو تهیه نمود که کاربرد های زیادی، از قبیل هدف درمانی داروها، مهندسی بافت، داربست کشت سلولی و غیره را در دارورسانی دارد [۸]. ژی^۲ و همکارانش در سال ۲۰۰۶ از تکنیک الکتروریسندگی جهت تهیه نانو الیاف با رهایش کنترل شده از داروی پاکلی تاکسل استفاده کردند و نتایج امیدوار کننده ای هم بدست آوردند [۹]. علاوه بر این از الکتروریسندگی در بسیاری از داروهای دیگر از جمله کورتیکواستروئیدها، داروهای ضد سرطان، پروتئین ها و DNA جهت تهیه فرمولاسیون های آهسته رهش و طولانی اثر استفاده شده است [۱۰-۱۲]. در مطالعه ای که یو^۳ و همکارانش در سال ۲۰۰۹ گزارش کرده اند تهیه نانو الیاف ایوپروپوفن در پلی وینیل پیرولیدون موجب افزایش بسیار زیاد رهش دارو شده است [۸]. جستجوی منابع نشان می دهد که تا به حال به خوبی از مزایای الکتروریسندگی در افزایش سرعت انحلال داروهای کم محلول، استفاده نشده است. هم اکنون نانو داروها در خط مقدم تحقیقات دارورسانی قرار دارند و در آینده نزدیک تاثیر زیادی در درمان بیماران و فروش داروها خواهند داشت. تکنیک الکتروریسندگی قطعاً جایگاه مهمی در این بین خواهد داشت چرا که در این روش امکان بارگذاری زیاد دارو وجود داشته و محصول آن نیز پودر خشک و خالص دارو در پلیمر می باشد. در مراجع، پلیمر های مختلفی معرفی شده اند که در تهیه نانوالیاف حاوی دارو با انحلال سریع کاربرد دارند. اولین مشخصه این نوع پلیمر ها حلالیت و سرعت تجزیه و واپاشی آنها می باشد. بدین منظور پلیمر باید در آب که ماده اصلی تشکیل دهنده بزاق است حل شود و زمان انحلال نیز تا حد امکان کم باشد. انتخاب یک پلیمر برای مقاصد دارویی طی مقررات سختگیرانه ای، کنترل و محدود شده است. تعدادی از پلیمرهای محلول در آب عبارتند از متیل سلولز، کربوکسی متیل سلولز، پلی وینیل پیرولیدون، پلی وینیل الکل، پکتین، ژلاتین، سدیم آرژینات و هیدروکسی پروپیل سلولز که

¹ Kenawy

² Xie

³ Yu

در حال حاضر بعنوان روکش قرص ها مورد استفاده قرار میگیرند تا سریع حل شده و ماده فعال دارویی را آزاد نمایند. با توجه به نکات گفته شده، این پلیمرها انتخاب های بسیار مناسبی برای تهیه نانوالیاف حاوی دارو در شکل انحلال سریع می باشند [۱۳]. در بین داروهای مختلف، آنتی بیوتیک ها بخوبی قابلیت فرمولاسیون بصورت فیلم های نازک دهانی را دارا می باشند [۱۴]. تعدادی از این آنتی بیوتیک ها مانند آموکسی سیلین [۱۵]، سفوروکسیم [۱۶] و آزیترومایسین [۱۷] در قرص های انحلال سریع بکار رفته اند. در این بین تری متوپریم (TMP)^۱ یک آنتی بیوتیک باکتریواستاتیک با توانایی تاثیر روی طیف وسیعی از باکتری ها و یک مهار کننده آنزیم دی هیدروفولات ردوکتاز است و از این طریق مانع بیوسنتز برخی از آمینواسیدها و نوکلئوتیدهای ضروری برای باکتری و در نتیجه توقف رشد باکتری می شود. تتراهیدروفولیک اسید کوفاکتور ضروری در ساخت تیمیدین و DNA می باشد. باکتریهایی که فولیک اسید را خودشان تولید می کنند به این دارو حساس هستند و این دارو تکثیر آنها را متوقف میکند. تری متوپریم در درمان عفونت های مجاری ادراری و برونشیت های حاد و مزمن مصرف می شود. همچنین در پروفیلاکسی عفونتهای ادراری، پنوموسیستس کارینی نیز کاربرد دارد. به دلیل حلالیت بسیار پایین تری متوپریم در آب این دارو می تواند کاندیدای مناسبی برای تهیه فیلم های نازک دهانی باشد که سبب افزایش انحلال و در نتیجه افزایش خواص فارماکولوژیکی دارو می گردد. در همین راستا گوپتا^۲ و همکارانش [۱۸] در سال ۱۹۹۱ روش توزیع پودر جامد تری متوپریم در بستر^۳ را پیشنهاد کردند. در این روش آنها با استفاده از پلی اتیلن گلیکول و پلی وینیل پیرولیدون و حلال کلروفرم بستری برای پخش پودر تری متوپریم تهیه کردند و ادعا کردند با این فرمولاسیون هم حلالیت دارو و هم جذب آن افزایش پیدا خواهد کرد. مشکل این روش در وهله اول به دلیل استفاده از کلروفرم است که خارج کردن آن از داروی فرموله شده نهایی به دلیل گرانروی بالای آن بسختی صورت می گیرد و با خشک کردن ساده این حلال خارج نمی شود و در وهله دوم افزایش انحلال دارو شدیداً وابسته به نوع مواد جانبی است که برای فرمولاسیون بکار برده شده است. با توجه به اهمیت درمانی تری متوپریم و کارهای اندکی که در این زمینه انجام شده است، داروی تری متوپریم بعنوان داروی مدل انتخاب شد.

در تحقیق قبلی [۱۹] با استفاده از تکنیک الکتروریسندگی، نانو الیاف پلی وینیل پیرولیدون (PVP) حاوی تری متوپریم تهیه و خواص فارماکولوژی آن بررسی گردید. در آن پژوهش برای تهیه محلول های الکتروریسندگی ناگزیر به استفاده از حلال آلی بودیم. از آنجایی که استفاده از حلال آلی هم سبب مشکلاتی در فرآیند الکتروریسندگی می شود و هم باید آزمایش باقیمانده حلال^۴ در داروی فرموله شده نهایی انجام شود، در تحقیق اخیر سعی شد پلیمر محلول در آب انتخاب شود تا برای تهیه نانوالیاف آن نیازی به استفاده از حلال آلی نباشد. با توجه به مطالعات انجام شده پلی وینیل الکل بعنوان یک پلیمر محلول در آب انتخاب

¹ Trimethoprim

² Gupta

³ Substrate

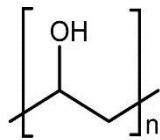
⁴ Residue of solvents

شد و ابتدا امکان تهیه نانو فیلم های انحلال سریع داروی تری متوپریم در آن بررسی گردید و سپس آزادسازی دارو از این بافت و میزان بیواکتیویته دارو در آن مورد بررسی قرار گرفت.

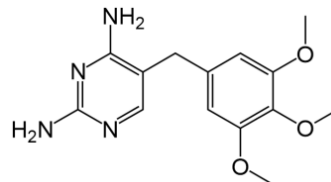
۲-بخش تجربی

۲-۱-مواد

تری متوپریم (شکل ۱) (از کارخانه داروسازی بهداشت کار-ایران دریافت شد)، پلی وینیل الکل (PVA) (وزن مولکولی ۷۲۰۰۰ مرک آلمان) (شکل ۲)، گلاسیال استیک اسید (مرک آلمان)، سدیم استات (مرک آلمان)، *Escherichia coli* (ATCC: 35218) و *Staphylococcus aureus* (ATCC: 33591) (از انستیتو پاستور ایران-تهران خریداری شد). محیط کشت مایع nutrient Broth (مرک آلمان)، محیط کشت جامد Hinton Agar (Quelab)، آب دو بار تقطیر.



شکل ۲- مولکول پلی وینیل الکل



شکل ۱- مولکول تری متوپریم

۲-۲-تهیه نانو الیاف

۲-۲-۱-تهیه محلول های الکتروریسندگی

برای تهیه محلول پلی وینیل الکل در آب مقطر با دمای ۶۰ درجه سانتی گراد حل شد تا ۱۰ میلی لیتر محلول با غلظت ۱۰ گرم بر لیتر تهیه شود. محلول حداقل به مدت ۳ ساعت در این دما با دستگاه همزن مغناطیسی هم زده شد. سپس محلول تا دمای محیط (حدود ۲۴ درجه سانتی گراد) خنک و به مدت ۱ ساعت در حمام اولترا سونیک هوازایی گردید. از این محلول پلیمری ۳ محلول به ترتیب فاقد دارو و حاوی مقادیر ۱۰ و ۲۰ درصد وزنی TMP نسبت به PVA تهیه شد.

۲-۲-۲-اندازه گیری پارامتر های محلول

گرانروی محلول ها با دستگاه DV-E viscometer مدل Brookfield، رسانایی محلول با دستگاه هدایت سنج مدل ۷۱۲ (متروم، سوئیس) و pH با دستگاه pH متر مدل ۶۹۱ (متروم، سوئیس) اندازه گیری شده است. (نتایج میانگین ۳ بار اندازه گیری می باشد).

۲-۲-۳- الکتروریسندگی

برای الکتروریسندگی از منبع ولتاژ بالا (شرکت فن آوری نانو آزما، ایران) با توان ایجاد ولتاژ تا ۲۵ کیلو ولت استفاده گردید. برای محلول های پلی وینیل الکل فاصله ثابت ۱۵ سانتی متر منبع ولتاژ از صفحه آلومینیومی در نظر گرفته شد. محلول های پلی وینیل الکل در ولتاژ ۱۵ کیلوولت رسییده شدند. سرعت جریان محلول پلیمری در حین فرآیند الکتروریسندگی برای پلی وینیل الکل حدود ۰/۸ میلی لیتر در ساعت بود که بوسیله دستگاه پمپ سرنگی (شرکت فن آوری نانومقیاس، ایران) تنظیم می شد. نانو الیاف به دست آمده به مدت ۱ شب در آن خلا با دمای ۶۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا خشک شود. جهت انجام آزمایش نانو الیاف به دست آمده با دقت زیاد از روی صفحه آلومینیومی جدا شده، به ابعاد ۲×۲ بریده، با ترازوی آزمایشگاهی با دقت ۰/۱ میلی گرم (A&D, England) وزن می شد و مورد استفاده قرار می گرفت.

۲-۳- تهیه فیلم

به موازات تهیه نانو الیاف از طریق روش الکتروریسندگی، جهت مقایسه با روش معمول ریخته گری (ساخت فیلم) [۲۰] از محلول های تهیه شده فیلم هم تهیه شد و آزاد سازی دارو در این فیلم ها نیز مورد بررسی قرار گرفت. برای تهیه فیلم، محلول های الکتروریسندگی به ضخامت تقریبی ۲-۳ میلی متر در داخل دیش های شیشه ای آزمایشگاهی به قطر ۸ سانتی متر ریخته شد. پس از ۲ شب ماندن در آزمایشگاه و خشک شدن و تشکیل فیلم، مانند نانوالیاف در داخل آن خلا با دمای ۶۰ درجه سانتی گراد خشک شده و مورد بررسی قرار می گرفت.

۲-۴- اندازه گیری مقدار داروی بارگذاری شده (assay) در نانوالیاف / فیلم ریخته شده

جهت رسم نمودار آزاد سازی تری متوپریم، ابتدا لازم است مقدار کل تری متوپریم بارگذاری شده در فرمولاسیون اندازه گیری شود. بدین منظور مطابق روش فارماکوپه بریتانیا^۱ [۲۱] مقدار دقیقی از نانوالیاف/فیلم ریخته شده حاوی دارو بصورت جداگانه وزن

شد و در گلاسیال استیک اسید حل شد، پس از انجام رقیق سازی های لازم با استفاده از دستگاه اسپکتروفوتومتر UV-VIS (واریان- کری ۵۰) جذب نمونه در ماکزیمم طول موج نمونه (۲۷۱ نانومتر) خوانده شد و محاسبات تعیین مقدار مطابق رفرنس مربوطه انجام شد.

¹ British pharmacopoeia

۲-۵-۵- مشخصه یابی (Characterization)**۲-۵-۱- ریخت شناسی (Morphology)**

ریخت شناسی سطح نانوالیاف و فیلم های بدست آمده با میکروسکوپ الکترونی پیمایشی (SEM) مدل KYKY 3200 Technology, China انجام شد. میانگین قطر های نانو الیاف با اندازه گیری ۲۵ نقطه مختلف و تصادفی از الیاف اندازه گیری شده است.

۲-۵-۲- اسپکتروسکوپی زیر قرمز

طیف های زیرقرمز تبدیل فوریه (FTIR) با دستگاه Spectrum one (Perkin Elmer, USA) بدست آمد. از نمونه بصورت فیلم طیف گیری شد. محدوده پیمایش $450-2000 \text{ cm}^{-1}$ با رزولوشن 1 cm^{-1} بود.

۲-۵-۳- تجزیه گرمایی تفاضلی (DTA)

حالت فیزیکی TMP در نانو الیاف از طریق تجزیه گرمایی تفاضلی مورد بررسی قرار گرفت. دستگاه مورد استفاده PYRIS Diamond TG/DTA (PerkinElmer, USA) بوده، نمونه های آب بندی شده در دمای ۲۰ تا ۳۰۰ درجه سانتی گراد با سرعت ۱۰ درجه بر سانتی گراد در جو نیتروژن با سرعت ۳۵ میلی لیتر بر دقیقه حرارت داده شده است.

۲-۶-۱- خواص فارماکولوژیکی نانوالیاف TMP/PVA**۲-۶-۱-۱- تست تعیین زمان تر شدن و انحلال**

تر شدن نانوالیاف TMP/PVA وقتی روی زبان قرار می گیرد، بصورت زیر شبیه سازی شد. در داخل یک دیش آزمایشگاهی یک عدد کاغذ صافی قرار داده شد. داخل این دیش محلول بزاق مصنوعی [۲۲] ریخته و سپس تمام محلول تخلیه شد بطوریکه تنها کاغذ صافی خیس شده و محلولی داخل دیش باقی نمانده بود. برای تعیین زمان تر شدن یک قطعه از نانوالیاف حاوی دارو به ابعاد ۲ در ۲ سانتی متر با کمک یک پنس روی این کاغذ خیس قرار داده شد و از فرآیند فیلم برداری شد.

۲-۶-۲- تعیین مقدار داروی آزاد شده در شرایط آزمایشگاهی

نانوالیاف الکتروریسیده شده به دقت از روی صفحه آلومینیومی کشیده شدند. نمونه ها به وزن تقریبی ۳۵ میلی گرم با ترازوی آزمایشگاهی توزین شد. نمونه ها جداگانه در ۲۰ میلی لیتر بزاق مصنوعی ریخته شد و بر روی همزن مغناطیسی با ۳۰۰ دور در دقیقه در دمای محیط هم زده می شد. غلظت تری متوپریم در محلول رویی بوسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر UV-VIS (واریان- کری ۵۰)، در طول موج ۲۷۰ نانومتر اندازه گیری می شد. نمونه برداری در زمان های ۰/۵ الی ۱۰ دقیقه (با فواصل

۰/۵ دقیقه ای) و ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه انجام شد. در هر نمونه برداری مقدار ۰/۲ میلی لیتر از محلول برداشته شده و به آن ۴ میلی لیتر آب اضافه کرده و جذب آن توسط اسپکتروفوتومتر در طول موج ماکزیمم ۲۷۰ نانومتر خوانده می شد. همزمان پس از برداشتن ۰/۲ میلی لیتر از محلول ۰/۲ میلی لیتر بزاق مصنوعی اضافه می شد تا حجم محلول اولیه ثابت بماند. مقدار کل داروی نانوالیاف یا فیلم پس از ۲ ساعت اندازه گیری شده است. مقدار تری متوپریم آزاد شده از الیاف رسیده شده و فیلم های ریخته شده بر حسب زمان رسم شده است.

۲-۶-۳ زیست فعالی آنتی بیوتیک (تری متوپریم) آزاد شده

مطالعه زیست فعالی تری متوپریم آزاد شده توسط روش انتشار دیسک آنتی بیوتیک^۱ در محیط کشت مولر هینتون آگار انجام شد [۲۳]. تری متوپریم یک آنتی بیوتیک وسیع الطیف است و در هر دو گروه باکتری های گرم مثبت و گرم منفی اثر باکترواستاتیک دارد، لذا در این تحقیق، باکتری *Escherichia coli* (*E. coli*) گرم منفی و باکتری *Staphylococcus* گرم مثبت به عنوان نماینده هر گروه انتخاب شدند. ابتدا مقداری از هر باکتری توسط سوآپ استریل از محیط کشت جامد به ۲ mL سرم فیزیولوژی استریل منتقل شد. اضافه نمودن باکتری از محیط کشت جامد به سرم تا رسیدن به کدورت نیم مک فارلند ($10^8 \times 1/5$ سلول) ادامه یافت. پس از آن $250 \mu\text{L}$ از سوسپانسیون باکتریایی حاصل، به سطح محیط کشت مولر هینتون آگار انتقال و کشت سفره ای^۲ صورت گرفت. جهت انجام تست آنتی بیوگرام، پلیمر مورد بررسی به قطر ۱۵ میلی متر، در دو حالت حاوی آنتی بیوتیک تری متوپریم و فاقد آن (کنترل منفی)، در دو نقطه متفاوت از هر پلیت، قرار گرفت. قطر هاله عدم رشد، پس از ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از انکوباسیون در دمای 37°C ، با استفاده از نرم افزار ImageJ اندازه گیری شد. نتایج حاصل با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه^۳ بررسی شد.

۳- نتایج و بحث

۳-۱- ریخت شناسی

تصاویر بدست آمده از طریق میکروسکوپ الکترونی (شکل ۳) نشان می دهد نانوالیاف تولید شده استوانه ای، صاف، پیوسته و بدون حفره و گره^۴ می باشند. این مربوط می شود به خواص ویسکوالاستیک پلیمر انتخاب شده (PVA) که بخوبی در دستگاه الکتروریسندگی رسیده شده است. همچنین نشان دهنده این است که غلظت های محلول پلیمری به درستی انتخاب شده اند و از رقت مناسبی برخوردار بودند. رقت بیش از حد باعث می شود در حین رسیده شده در فرآیند الکتروریسندگی حلال (آب)

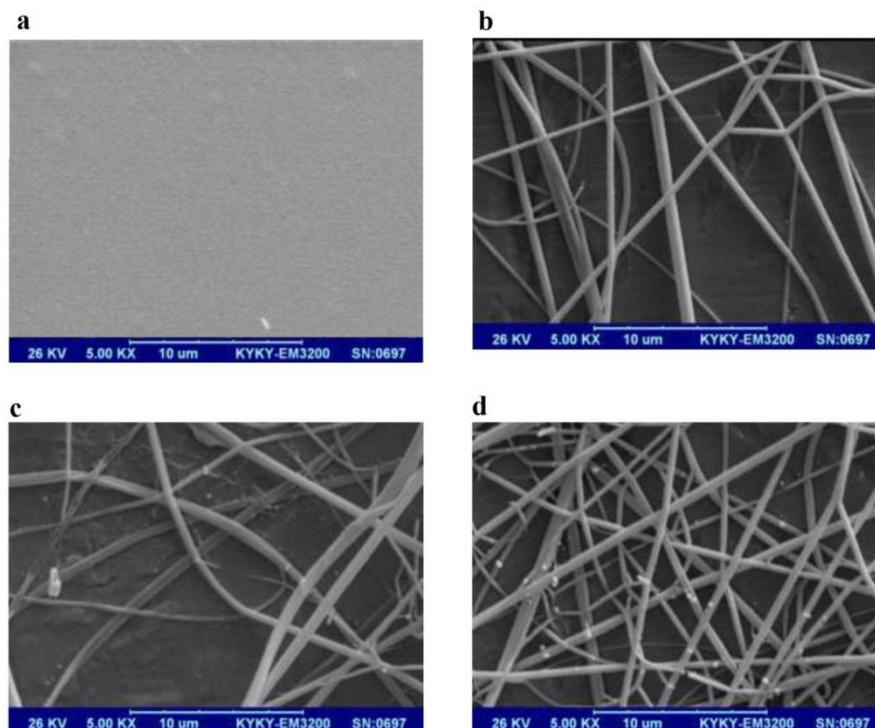
¹ Antibiotic disk diffusion method

² Spread plate

³ One way ANOVA

⁴ Bead

به خوبی حذف نشده و الیاف خیس تولید شود و به دلیل انحلال بالای پلی وینیل الکل در آب، الیاف در آب موجود حل شده و به جای ساختار الیاف مانند به یک فیلم تبدیل شوند. از طرفی غلظت بیش از اندازه هم موجب می شود در حین فرآیند الکتروریسندگی مسیر پاشش سرنگ بسته شود و باعث ایجاد الیاف منقطع، گره دار و ناهموار شود. نتایج نشان می دهد افزایش دارو به محلول پلیمری و همچنین افزایش مقدار آن هم روی پارامترهای محلول وهم روی قطر نانوالیاف بدست آمده تاثیر می گذارد [۲۲]. همانگونه که در جدول ۱ مشاهده می شود گرانی و رسانایی محلول ها با زیاد شدن غلظت دارو نسبتا افزایش یافته اند. گرانی مهمترین عامل در ضخیم شدن نانوالیاف بحساب می آیند زیرا سبب می شود حلال سخت تر از نانوالیاف تولید شده خارج شود و جامد شدن آنها روی صفحه جمع کننده با مشکل مواجه شود. نتایج درج شده در جدول ۱ نیز تاییدی بر همین مدعا است، با افزایش گرانی محلول ها افزایش نسبی در ضخامت الیاف دیده می شود. البته افزایش هدایت و رسانایی محلول های غلیظ تر تا حدی اثر منفی گرانی را در فرآیند الکتروریسندگی خنثی کرده و الیاف علی رغم ضخیم تر شدن همچنان در محدوده اندازه نانوالیاف قرار می گیرد و همانگونه که در تصویر ۳ مشاهده می شود الیافی صاف و مسطح و بدوه مهره تشکیل داده است. در تصویر گرفته شده از فیلم ریخته شده TMP/PVA هم همانگونه که ملاحظه می شود ساختاری لیف مانند دیده نمی شود و فقط فیلم تشکیل شده است.



شکل ۳: تصویر میکروسکوپ الکترونی a- فیلم ریخته شده TMP/PVA ، b- نانو الیاف محلول PVA خالص، c- نانو الیاف TMP/PVA 10 % wt و d- نانو نانو الیاف (ولتاژ ۱۵ kV، فاصله ۱۵ cm و سرعت پمپ ۰/۸ mL/min)

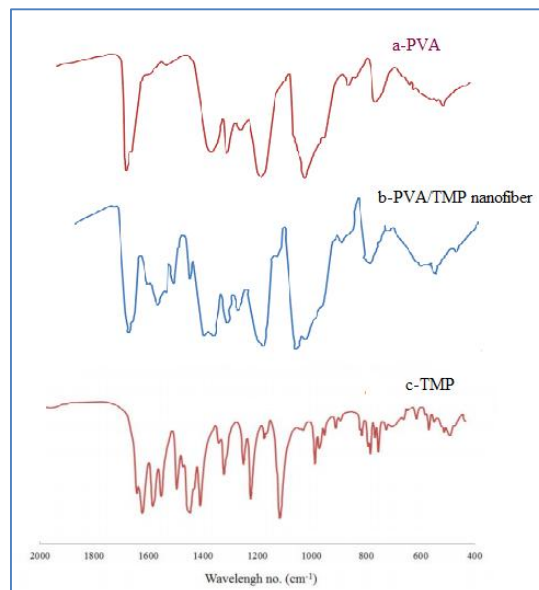
جدول ۱: نتایج اندازه گیری پارامترهای مربوط به محلول الکتروریسندگی و نانو الیاف حاصل

ردیف	محلول	pH	هدایت (mS/cm)	گرانروی (cP)	قطر نانوالیاف (nm)
۱	پلی وینیل الکل ۱۰٪ در آب	$5/68 \pm 0/04$	$0/31 \pm 0/01$	$323/3 \pm 1/5$	380 ± 40
۲	TMP/PVA 10% wt.	$3/63 \pm 0/07$	$2/08 \pm 0/05$	$330/7 \pm 2/1$	458 ± 37
۳	TMP/PVA 20% wt.	$3/64 \pm 0/05$	$2/53 \pm 0/01$	$336/0 \pm 2/0$	584 ± 20

۳-۲- بررسی حالت فیزیکی داروی بارگذاری شده در نانوالیاف

۳-۲-۱- طیف FT-IR

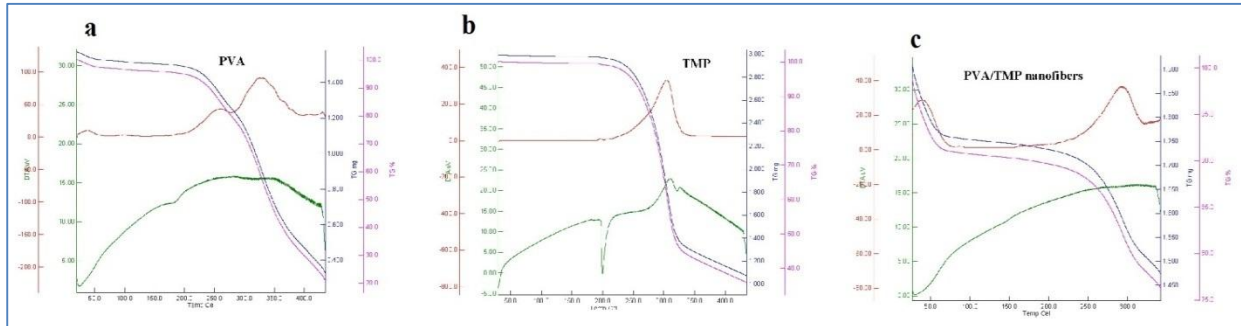
طیف های IR نمونه PVA خالص، TMP خالص و نانوالیاف TMP/PVP در شکل ۴ ارائه شده است. طیف PVA (شکل ۴ قسمت a) شامل ارتعاش کششی CH_2 (1420 cm^{-1}) و ارتعاش کششی C-C (1334 cm^{-1}) و ارتعاش کششی گروه کربونیل (1568 cm^{-1}) و ارتعاش کششی متقارن C-O-C (1095 cm^{-1}) می باشد. در شکل ۴ قسمت c پیک های مشخصه TMP مشاهده می شود: ارتعاش کششی N-H آمینی (1623 cm^{-1})، ارتعاش کششی C=C آروماتیک (1560 cm^{-1})، ارتعاش کششی C-H آلکانی (1475 cm^{-1})، ارتعاش کششی C-N آمینی (1424 cm^{-1})، ارتعاش کششی C-O اتری (1125 cm^{-1})، مربوط به ارتعاش کششی OH الکلی (1095 cm^{-1}) و ارتعاش کششی C-H آروماتیک (780 cm^{-1}). همانگونه که در تصویر ۴ قسمت b مشاهده می شود ارتعاشات شاخص مولکول تری متوپریم در نانوالیاف دیده نمی شود که این امر گواهی است بر از دست رفتن ساختار کریستالی دارو و تبدیل شدن به فرم بی شکل که به نوبه خود تاثیر بسزایی در تغییر رفتار حلالیت این ماده خواهد داشت.



شکل ۴- طیف FT-IR -a پودر کریستالی PVA، b- نانو الیاف TMP/PVA و c- پودر خالص TMP

۳-۲-۲- DTA ترموگرام

همانگونه که در ترموگرام های ارائه شده در شکل ۵ دیده می شود تری متوپریم یک پیک شاخص در دمای ۲۰۳ درجه سانتی گراد دارد که نقطه ذوب این ماده می باشد. در حالیکه در نانوالیاف حاوی دارو این پیک دیده نمی شود و ترموگرام آن تقریباً شبیه ترموگرام PVA می باشد که باز هم گواه دیگری بر این مدعا است که تری متوپریم ساختار بلورین خود را از دست داده است.



شکل ۵- ترموگرام های DTA، a- پلی وینیل الکل خالص، b- تری متوپریم خالص و c- نانوالیاف TMP/PVA

۳-۲-۳- اندازه گیری مقدار داروی بارگذاری شده (Assay) در نانوالیاف / فیلم ریخته شده

مقادیر داروی بارگذاری شده در دو نوع فرمولاسیون فیلم های ریخته شده و نانوالیاف TMP/PVA با دو نسبت ۱۰ و ۲۰ درصد وزنی نسبت به PVA در جدول ۲ آورده شده است. همانگونه که ملاحظه می شود مقدار داروی اندازه گیری شده به مقدار اسمی آن بسیار نزدیک می باشد.

جدول ۲: نتایج تعیین مقادیر (Assay) تری متوپریم بارگذاری شده در فیلم و نانوفایبرهای حاوی ۱۰ درصد و ۲۰ درصد آن.

ردیف	فرمولاسیون	درصد تری متوپریم به نسبت پلی وینیل الکل	مقدار داروی اندازه گیری شده در فرمولاسیون (%)	بازیافت (%)
۱	نانوالیاف	۱۰	$9/68 \pm 1/27$	۹۶/۸
۲	نانوالیاف	۲۰	$19/22 \pm 1/08$	۹۶/۱
۳	فیلم ریخته شده	۱۰	$9/43 \pm 0/89$	۹۴/۳
۴	فیلم ریخته شده	۲۰	$18/91 \pm 1/18$	۹۴/۶

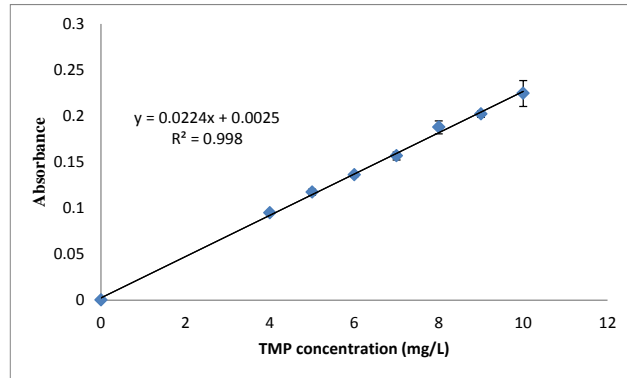
۳-۳- خواص فارماکولوژیکی نانوالیاف TMP/PVA

۳-۳-۱- زمان تر شدن و فروپاشی

نتایج نشان می دهد بافت پلیمری دارو در کمتر از ۳۰ ثانیه از هم پاشیده می شود و ساختار ژلاتینی تشکیل می دهد.

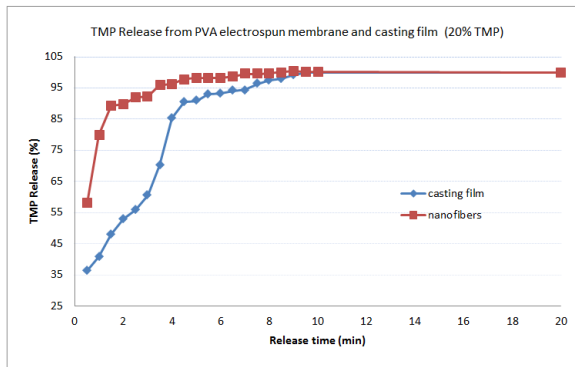
۳-۳-۲- تعیین مقدار داروی آزاد شده در شرایط آزمایشگاهی

برای محاسبه غلظت تری متوپریم، منحنی استاندارد رسم شد. برای رسم منحنی استاندارد محلول 100 mg/L از تری متوپریم در بافر استات که pH آن ۵/۵ بود تهیه و محلول های رقیق تر با غلظت های 4 mg/L الی 10 mg/L از این محلول ساخته شد. جذب هر محلول در طول موج 271 nm اندازه گیری و منحنی مربوطه رسم شد. (نتایج میانگین ۳ بار اندازه گیری می باشد.) (شکل ۶)



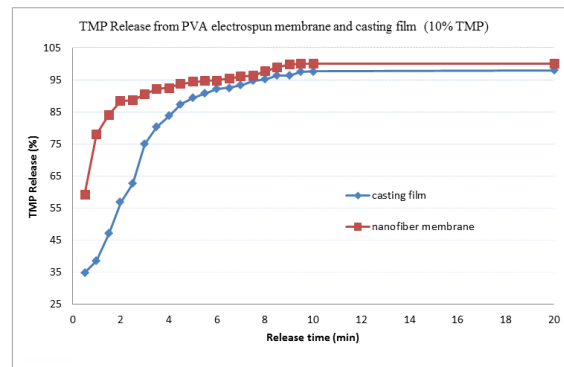
شکل ۶- منحنی کالیبراسیون محلول های استاندارد تری متوپریم.

با توجه به نمودارهای ارائه شده در تصاویر ۷ و ۸ مشاهده می شود آزاد سازی دارو هم در ۱۰ درصد و هم در ۲۰ درصد وزنی TMP نزدیک به ۹۰ درصد TMP در کمتر از ۹۰ ثانیه آزاد شده است. در حالیکه این عدد برای فرمولاسیون مشابه در فیلم ریخته شده حدود ۸ دقیقه می باشد.



شکل ۸- نمودار آزادسازی TMP از نانو الیاف و فیلم

TMP/PVA 20% wt.



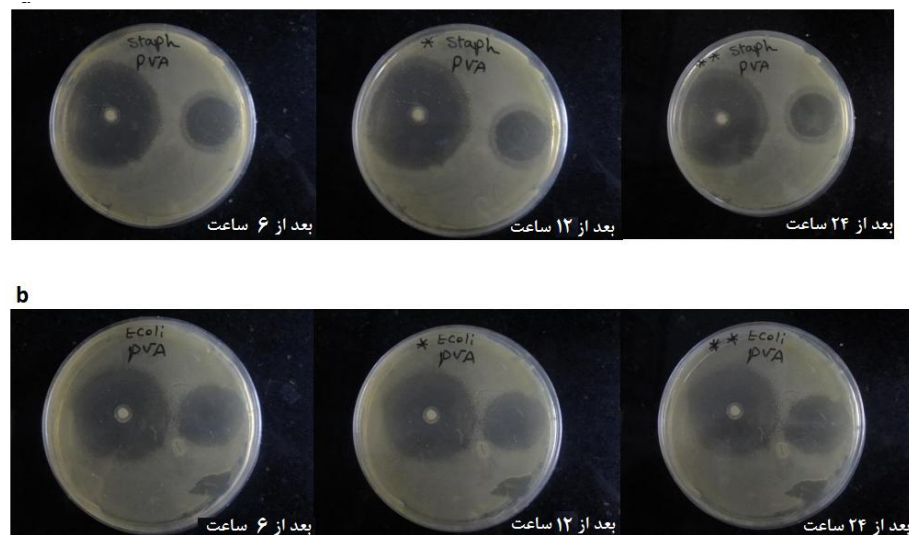
شکل ۷- نمودار آزاد سازی TMP از نانو الیاف و فیلم ریخته شده

ریخته شده

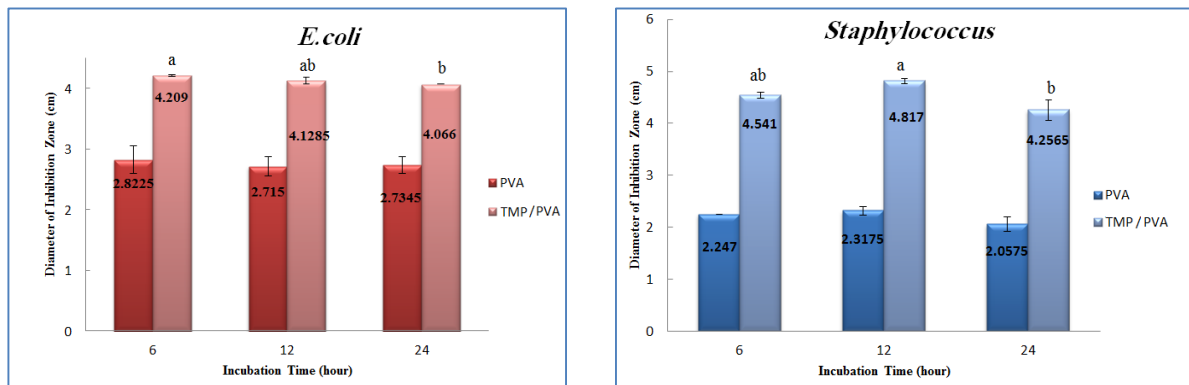
TMP/PVA 10% wt.

۳-۳-۳- بیواکتیویته آنتی بیوتیک (تری متوپریم) آزاد شده

همانگونه که در تصویر ۹ دیده می شود، قطر هاله عدم رشد باکتری در تست آنتی بیوگرام، در نقاطی که نانوالیاف TMP/PVA بارگذاری شده است به طور قابل ملاحظه ای، بزرگتر از منطقه ای است که نانوالیاف PVA کنترل قرار گرفته است. این امر اثبات می کند که TMP بارگذاری شده در نانوالیاف PVA خاصیت آنتی باکتریال خود را حفظ کرده است. از طرفی با توجه به آنالیز واریانس یک طرفه تفاوت معناداری ($P < 0.05$) در قطر هاله رشد در زمان های ۶، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از انکوباسیون در نمونه های کنترل دو باکتری وجود ندارد، اما این تفاوت در نمونه های حاوی تری متوپریم در هر دو گونه باکتری گرم مثبت و گرم منفی قابل مشاهده است. هم چنین نانو الیاف TMP/PVA در هر دو باکتری دارای اثر مهارى بالاتری ($P < 0.05$) نسبت به نانوالیاف PVA است. احتمالاً کاهش قطر هاله رشد پس از ۲۴ ساعت، به علت خاصیت باکتریواستاتیک آنتی بیوتیک تری متوپریم است که باعث مهار رشد باکتری می گردد. با حذف این عامل مهارى، باکتری ها مجدداً شروع به رشد می نمایند. این نتایج نشان می دهد که آزاد سازی دارو در ۶ ساعت اولیه پس از انکوباسیون به پایان رسیده و حداکثر اثر مهارى خود را نشان می دهد. به علت حساسیت بالاتر استافیلوکوکوس به تری متوپریم قطر هاله رشد بیش از باکتری *E. coli* است و پس از ۱۲ ساعت حتی قطر هاله در آن افزایش می یابد و سپس به علت اتمام نیمه عمر آنتی بیوتیک رشد مجدد باکتری آغاز می گردد.



شکل ۹- تصاویر دیجیتال از مناطق مهار رشد *Staphylococcus aureus* -a بعد از ۶ ساعت، ۱۲ ساعت (با یک ستاره مشخص شده) و ۲۴ ساعت (با ۲ ستاره مشخص شده است)، *E. coli* -b بعد از ۶ ساعت، ۱۲ ساعت (با یک ستاره مشخص شده) و ۲۴ ساعت (با ۲ ستاره مشخص شده است).



شکل ۱۰: مقایسه قطر هاله رشد نانوالیاف PVA و TMP/PVA در زمان های ۶ ، ۱۲ و ۲۴ ساعت پس از انکوباسیون در *E. coli* و *staphylococcus*

۴- نتیجه گیری

با توجه به نتایج بدست آمده و بررسی های انجام شده مشخص شد پلی وینیل الکل بعنوان یک پلیمر سازگار با بدن و بی خطر قابلیت بارگذاری داروی تری متوپریم را داشته و می تواند با کنترل شرایط سیستم الکتروریسندگی به نانوالیاف حاوی این دارو تبدیل شود. نانوالیاف بدست آمده در این شرایط غلظت/ولتاژ/پارامترهای محیطی بخوبی ریسیده شده و کاملاً پیوسته بدون شکستگی، گره یا حفره می باشد. تصاویر میکروسکوپ الکترونی نشان داد قطر الیاف حاصله کمتر از ۶۰۰ نانومتر بوده و این ساختار

نانو به آن خواصی مانند خلل و فرج زیاد می دهد که به نوبه خود سبب انحلال خیلی بهتر این الیاف در آب می شود و می تواند داروی بارگذاری شده را سریعتر آزاد نماید. از طرف دیگر نتایج طیف IR و DTA اثبات کرد که اولاً حضور TMP در این ساختار

دستخوش واکنش شیمیایی نشده است و فقط از طریق پیوند هیدروژنی بین گروه عاملی OH پلی وینیل الکل و گروه های NH_3

تری متوپریم در کنار هم حضور دارند و در مرحله دوم TMP ساختار بلورین خود را کاملاً از دست داده و بصورت آمورف در این ساختار بارگذاری شده که خود به انحلال بیشتر TMP در بزاق دهان کمک می کند. مطالعات انجام شده روی زمان تر شدن و آزاد سازی دارو نشان می دهد که همانگونه که انتظار می رفت بافت نانو الیاف TMP/PVA در کمتر از ۳۰ ثانیه دچار از هم پاشیدگی شده و محتوی داروی خود را در کمتر از ۹۰ ثانیه آزاد می کند و در طی این آزاد سازی خواص آنتی باکتریال خود را نیز

حفظ می کند. با توجه به کار قبلی ما در این رابطه که فیلم نازک دهانی تری متوپریم در پلیمر پلی وینیل پیرولیدون تهیه شده بود اینگونه نتیجه گیری می شود که می توان به جای پلی وینیل پیرولیدون از پلی وینیل الکل نیز استفاده کرد و بکار بردن

حلال آلی در حین عملیات الکتروریسندگی و مشکلات ناشی از آن و لزوم انجام تست باقیمانده حلال را حذف نمود. البته نتیجه تحقیقات نشان می دهد آزاد سازی دارو در پلیمر پلی وینیل پیرولیدون در زمان کوتاه تری انجام می شود. نتایج هر دو کار تایید می کند می توان تری متوپریم را از طریق الکتروریسندگی و بدون از دست دادن خواص آنتی باکتریال آن، در نانوالیاف پلیمری بارگذاری نمود و راه تجویز دارو را برای بیماران مخصوصا کودکان و افراد مسن یا بیماران با بیماری های خاص، سهولت بخشید. هم چنین می توان از این فرمولاسیون جدید برای تهیه باندازه های حاوی آنتی بیوتیک تری متوپریم استفاده نمود.

۵- مراجع

- [1] M. D. N. Siddiqui, G. Garg, P. K. Sharma, *Advances in Biological Research*, 5 (2011) 291.
- [2] A. Khazaei, A. Asgari, A. Amini Manesh, *Journal of Applied Chemistry*, 8 (2014) 29.
- [۳] عبدوس، بهناز؛ سجادی، سیده مریم؛ مأمی، لیلا، مجله شیمی کاربردی، سمنان، شماره ۳۵ (۱۳۹۴) ص ۴۵.
- [4] A. R. Patel, D. S. Prajapati, J. A. Raval, *Int.J. Drug Dev. & Res.*, 2 (2010) 232.
- [5] T. Gunasekaran, T. Haile, T. Nigusse, M. D. Dhanaraju, *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 4, Supplement 1 (2014) S1.
- [6] D. Yu, C. Branford-White, K. White, X. Li, L. Zhu, *AAPS PharmSciTech*, 11 (2010) 809.
- [7] E. R. Kenawy, G. L. Bowlin, K. Mansfield, J. Layman, D. G. Simpson, E. H. Sanders, G. E. Wnek, *Journal of Controlled Release*, 81 (2002) 57.
- [8] D. G. Yu, X. F. Zhang, X. X. Shen, C. Brandford-White, L. M. Zhu, *Polymer International Journal of ChemTech Research*, 58 (2009) 1010.
- [9] J. Xie, C. H. Wang, *Pharm Res.*, 23 (2006) 1817.
- [10] A. Balogh, R. Cselkó, B. Démuth, G. Verreck, J. Mensch, G. Marosi, Z. K. Nagy, *International Journal of Pharmaceutics*, 495 (2015) 75.
- [11] M. F. Oliveira, D. Suarez, J. C. B. Rocha, A.V. N. de Carvalho Teixeira, M. E. Cortés, F. B. De Sousa, *Materials Science and Engineering: C*, 54 (2015) 252.
- [12] P. Vashisth, N. Raghuvanshi, A.K. Srivastava, H. Singh, H. Nagar, V. Pruthi, *Materials Science and Engineering: C*, 71 (2017) 611.
- [13] A. Arya, A. Chandra, V. Sharma, K. Path, *International Journal of ChemTech Research*, 2 (2010) 576.
- [14] K. Kavitha, K. Subramaniam, B. J. Hui, K. Santhi, S. Dhanaraj, M. Rupesh Kumar, *Research Journal of Pharmaceutical, Biological and Chemical Sciences*, 4 (2013) 1510.
- [15] S. Kamal, K. Gautam, P. Yash, *International Journal of pharma and bio sciences*, 4 (2013) 254.
- [16] N. Bhandari, N. B. Gupta, *Journal of Drug Discovery and Therapeutics*, 1 (2013) 27.
- [17] S. W. Ravi, S. M. Ravikant, *Pharmacie Globale*, 4(2012) 1.

-
- [18] R. L. Gupta, R. Kumar, A. K. Singla, *Drug Development and Industrial Pharmacy*, 17 (1991) 463.
- [19] A. Bolouri, A. Mohammad-khah, *Bulgarian Chemical Communications*, 48 (2016) 05.
- [20] M. Irfan, S. Rabel, Q. Bukhtar, M. I. Qadir, F. Jabeen, A. Khan, *Saudi Pharmaceutical Journal*, 24 (2016) 537.
- [21] British Pharmacopoeia Commission, 2016. Monograph of Trimethoprim Tablets. In: British Pharmacopoeia Commission. *British Pharmacopoeia 2016: volume III*. London: TSO.
- [22] K. Arvidson, E. G. Johansson, *European Journal of Oral Sciences*, 93 (1985) 467.
- [23] M.K. Das, S. Mandal, *J Infect Dis Preve Med*, 4 (2016) 2.
- [24] V. Beachley, Wen X. , *Materials science & engineering. C, Materials for biological applications*, 29 (2009) 663.