دانشگاه علوم پزشکی کرمان

دانشکده داروسازی و علوم دارویی

پایان نامه مقطع دکترای تخصصی (Ph.D)

عنوان:

کنترل کمی و کیفی تعیین اثرات آنتی اکسیدانت و هپاتوپروتکتیو ادویه مرکبه زرشک صغیر و فرمولاسیون دارویی تهیه شده از آن

توسط:

زرین سرحدی نژاد

استاد راهنما

دکتر فریبا شریفی فر

دکتر عباس پرداختی

دکتر علی ماندگاری

استاد مشاور

دکتر سلیمان افشاری پور

سال تحصیلی: ۹۶-۱۳۹۵شماره پایان نامه: ۸۹۳

چکیده

مقدمه و اهداف:

کنترل کیفیت و استاندارد سازی فراورده های سنتی منجر به تجویز کارا و منطقی آنها میگردد. زرشک صغیر، ادویه مرکبه سنتی، در طب سنتی ایرانی جهت درمان انواعی از اختلالات کبدی (سوء مزاج گرم کبدی) توصیه می گردد. ارزیابی فیزیکوشیمیایی، فیتوشیمیایی و استاندارد سازی فراورده زرشک صغیر، ارزیابی اثرات برون تنی و درون تنی فراورده، وبررسی اثرات هپاتوپروتکتیو زرشک صغیر در مدل سمیت کبدی با تتراکلرید کربن، و نهایتاً تهیه شکل دارویی سوسپانسیون از فراورده سنتی و انجاممطالعات فارماسیوتیکس بر روی سوسپانسیون زرشک صغیر از جملهاهداف این مطالعه بودند.

روشها:

پارامترهای مورد مطالعه در حیطه فارماکوگنوزی عبارت بودند ازانجام مطالعات میکروسکوپی و ماکروسکوپی، تعیین خاکستر، تعیین مقدار رطوبت، تعیین ماده قابل استخراج، آزمایش مقدماتی تعیین متابولیت های ثانویه، ارزیابی کروماتوگرافی لایه نازک و تعیین آلودگی میکروبی. همچنین محتوی ترکیبات فنلی و امودین فراورده سنتی با روش اسپکتوفتومتری. به منظور بررسی اثرات آنتی اکسیدانی برون تنی فراورده سنتی دو متد-2 ,2 (DPPH) Diphenyl-1-picrylhydrazylو Ferric reducing ability of plasma(FRAP) نیزبکار برده شدند.

در مطالعات فارماکولوژیکی، جهت بررسی دوز کشندهLD_{50} فراورده سنتی از موش های نر NMARI استفاده گردید. همچنین سمیت حاد اندامی زرشک صغیر در دوزهای ۷۵۰ و ۱۵۰۰میلی گرم/ کیلوگرم، به مدت پانزده روز از طریق تجویز خوارکی (گاواژ) در رت مورد مطالعه قرار گرفت. پارامترهای مورد مطالعه در سمیت حاد اندامی شامل شمارش سلول های خونی، تعیین سطح سرمی آنزیم های کبدی، کراتینین و بررسی پارامترهای استرس اکسیداتیو در سرم و مطالعات بافت شناسی بودند. علاوه بر این، جهت ارزیابی اثرات هپاتوپروتکتیو زرشک صغیر از مدل سمیت تتراکلریدکربن استفاده شد. در این ارزیابی حیوانات به چهار گروه تقسیم شدند، دوزهای دریافتی در هر گروه ۱۵۰۰و ۷۵۰،۵۰۰،۲۵۰ میلی گرم/کیلوگرم به مدت پانزده روز و از طریق گاواژ بود. در روز شانزدهم حیوانات ۱ میلی

لیتر/کیلوگرم تتراکلرید کربن به صورت تزریق داخل صفاقی دریافت کردند. چهل وهشت ساعت پس از دریافت دوز تتراکلریدکربن، نمونه خونی و کبد از حیوانات پس از بیهوشی جمع آوری گشت. آنزیم های کبدی، پارامترهای استرس اکسیداتیودر سرم اندازه گیری شد. همچنین بر روی نمونه های کبدی مطالعات بافت شناسی انجام گشت.

جهت انجام مطالعات پارامترهای فارماسیوتیکس شکل دارویی سوسپانسیون با افزودن سکنجبین به عنوان حامل به مخلوط پودر اجزا اولیه زرشک صغیر تهیه گردید. در ابتدا تعیین اندازه ذره ای اجزا فراورده و همچنین فراورده نهایی به روشStatic laser light scatteringانجام گرفت، همچنین میزان جریان یابی پودر با استفاده از روش angle of reposeو ایندکس های Hausner ratio (HR) و Carr's compressibility index (CI)تعیین گشت. سپس ویسیکوزیته و رفتار رئولوژیکی سوسپانسیون نیز مشخص گشت. از جمله مطالعات انجام شده دیگر بررسی پایداری فیزیکی فراورده با استفاده از تستهای تعیین اندازه ذره ای و اندازه گیری کاهش وزن در طی مدت نگهداری (۱۲ماهه) ، بررسی حجم رسوب و سدیمانتاسیون و تغییر رفتار رئولوژیکی فراورده پس از انجام تست Freeze-thaw cycle بود. ارزیابی پایداری شیمیایی فراورده در طی مدت ۱۲ماه و در دمای اتاق ۲±۳۰درجه سانتیگراد با استفاده از تعیین ترکیبات فنلی تام فراورده و روش فولین سیو کالتو انجام گرفت. در آخر، تست کارایی محافظ میکربی و تعیین pH فراورده نیز انجام گرفت.

یافته ها:

مقادیر مربوط به ارزیابی های فیزیکوشیمیایی اجزا زرشکصغیر (خاکستر، رطوبت، ماده قابل استخراج) تعیین گردید. مطالعات فیتوشیمیایی اولیه حضور تانن را در کلیه اجزا زرشک صغیر نشان داد. همچنین فیتوکمیکال هایی نظیر ترپنوئئد، استروئیدو آلکالوئید در اکثر اجزاء زرشک صغیر نشان داده شد.از لحاظ آلودگی میکربی مواد اولیه گیاهی پاتوژنهایی نظیر *E. coli* و*Salmonella* در نمونه هاوجود نداشت. محتوی امودینو ترکیبات فنلییک معادل اسید گالیک فراورده سنتی مقادیر۴۵۷میکروگرم /۱۰۰گرم فراورده زرشک صغیر و ۳۸۱,۵میلی گرم /۱۰۰گرم فراورده زرشک صغیر گزارش شد.

نتایج حاصل از مطالعات فارماکولوژیک زرشک صغیر نشان داد که تجویز خوراکی این فراورده تا دوز ۲۰۰۰ میلی گرم / کیلوگرم سمیت و مرگ و میر درحیوانات آزمایشگاهی ایجادنکرد. در ضمن استفاده طولانی مدت (پانزده روزه) از

فراورده سنتی در دوزاژ ۷۵۰و ۱۵۰۰میلی گرم/کیلوگرم علایمی از سمیت خونی یا کبدی در حیوانات آزمایشگاهی نشان نداد. ارزیابی اثرات هپاتوپروتکتیو فراورده نیز در دوزهای ۲۵۰، ۵۰۰و ۷۵۰میلی گرم/ کیلوگرم فراورده منجر به کاهش آنزیم های کبدی گشت که این نتایج با یافته های بافت شناسی نیز مطابقت داشتند.

نتایج حاصل از مطالعات فارماسیوتیکس انجام شده بر روی اجزا و سوسپانسیون زرشک صغیرنشان داد که مقدار حاصل از تعیین میانه اندازه ذره ای (Dv 0.5) برای فراورده تهیه شده ۱۵۳٫۸میکرومتر بود. همچنین مقدار زاویه تماس۲۹٫۴ درجه و مقادیر مربوط به کارزایندکس ۱۲٫۵% و۱٫۱=HR گزارش گردید که حاکی از جریان یابی مناسب پودر می باشد. ویسکوزیته فرمولاسیون نیز ۴٫۱ سانتی پواز گزارش گشت و همچنین رفتار تیکسوتروپی از سوسپانسیون مشاهده گردید. ارزیابی های فیزیکی فراورده در مدت ۱۲ ماه نگهداری نتایج قابل قبولی را نشان داد و نتایج حاصل از پایداری شیمیایی نشان داد که عمر قفسه ای فراورده بر اساس محتوی ترکیبات فنلی ۱۱۱ روز می باشد. pHفراورده نیز ۳٫۰۷ گزارش گشت.

نتیجه گیری:

مجموعه مطالعات فارماکوگنوزی، فارماسیوتیکس و فارماکولوژِی با محوریت کنترل کیفیت، استاندارد سازی، پایداری فراورده ، اثبات کارایی و ایمنی فراورده زرشک صغیر میتواند به عنوان مونوگراف استاندارد دارویی در نظر گرفته شود. همچنین احتمالاً این مطالعات راه را برای تولید فراورده زرشک صغیر در صنعت هموارتر می سازد.

کلید واژه:

طب سنتی ایرانی، کنترل کیفیت، استاندارد سازی، سمیت کبدی با تتراکلرید کربن، اثرات هپاتوپروتکتیو، تعیین اندازه ذره ای، ویسکوزیته، پایداری فیزیکی و شیمیایی،

ENGLISH ABSTRACT

Background and Objective: Quality control and standardization of traditional preparations ensure their safe, pure and efficient prescription. Zereshk-e-Saghir (ZES), a folk remedy and handmade polyherbal preparation has been recommended as a hepatoprotective agent in Traditional Persian medicine (TPM). The present study aimed at the evaluation of the physicochemical and phytochemical characterization, standardization of ZES and its ingredients. Also *in vitro* and *in vivo* antioxidant capacity and hepatoprotective effects of ZES against CCl_4-induced hepatotoxicity were carried out. Finally, the suspension of ZES as a novel preparation was prepared to evaluate the pharmaceutical parameters of its.

Methods: Some qualitative and quantitative controls were performed like microscopic examination, ash value, moisture content, extractable matter, phytochemical screening, TLC fingerprint and microbial contamination. Total phenolic and emodin contents of ZES were measured by spectrophotometric method to standardize this preparation. Also, *in vitro* radical scavenging activity of ZES and its ingredients were determined using 2, 2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) assay and Ferric reducing ability of plasma assay. In pharmacological studies, the lethality of ZES was determined in male NMRI mice. Acute organ toxicity of ZES (750 and 1500 mg/kg for 15 days, orally) was evaluated by measuring the cell blood count, liver marker enzymes, creatinine, antioxidant status and histopathological examinations in rats. CCl_4-induced liver toxicity was used to examine the hepatoprotective effects of the preparation. The rats were pretreated with 250, 500, 750 and 1500 mg/kg ZES by gavage for 15 days. At day 16, the rats were intraperitoneally injected 1 ml/kg CCl_4 in olive oil. Forty-eight hours after CCl_4 injection, the animals were sacrificed and their liver samples and blood were collected for determination of alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase and alkaline phosphatase (ALT, AST, and ALP), histopathological examinations and antioxidant status. In pharmaceutical studies, the particle size distribution of ZES ingredients and flow properties of mixing powdered ingredients by two indexes Hausner ratio (HR) and the Carr's compressibility (CI) index were measured. Moreover, after preparing of ZES suspension, the rheological behavior of prepared suspension, chemical and physical stability, pH and preservative challenge test were carried out.

Results: Regarding the physicochemical evaluation, the amount of each parameter (ash value, moisture content, and extractable value) was determined as documented

characteristics for ZES components. Phytochemical screening of ZES ingredients indicated the presence of tannins in all the samples and the presence of alkaloids, steroids and terpenoids in a majority of the samples. Meanwhile, ZES exhibited no pathogenic contamination. The emodin and total phenolic contents (TPC) of ZES were reported 457.0 µg emodin/100g and 381.5mg gallic acid equivalents (GAE)/100g of ZES, respectively.Treatment of the mice with a single dose of ZES up to 2g/kg did not cause mortality. Treatment of the rats with doses of 750 and 1500 mg/kg for 15 days showed no significant hematotoxicity and hepatotoxicity. Treatment of the rats with ZES reduced the increased serum levels of ALT, AST, and ALP induced by CCl_4 at the doses of 250, 500, and 750 mg/kg. This was almost confirmed by histopathological examinations. In pharmaceutical studies, the value of Dv 0.5 for prepared suspension was 153.8± 1.0 µm. the obtained results from angle of repose, HR=1.1 and the CI=12.5% exhibited a good manner in flow. Physical stability of formulation was suitable during 1 year although the shelf life of the formulation was estimated 111 days.

Conclusion: All the obtained results from pharmacognostical, pharmacological, and pharmaceutical studies concerning about the quality control, standardization, and efficacy of ZES, could be proposed as an efficient monograph with reproducible and diagnostic characteristics. And these findings are encouraged to use the standardized ZES preparation in industry for different therapeutic purposes in future.

Keywords: Traditional Persian medicine; quality control; standardization; CCl_4-induced liver damage, Hepatoprotective effect, Oxidative stress, particle size distribution, Viscosity, physico- chemical stability.