

## فرمولاسیون دهان شویه آنتی باکتریال چای سبز و بررسی اثر فرآورده بر کاهش باکتری های هوازی دهان

عبدالحسین مُقبل<sup>۱\*</sup>، احمد فرج زاده<sup>\*\*</sup>، نسرین عاقل<sup>\*\*\*</sup>، نفیسه رئیسی<sup>\*\*\*\*</sup>

### چکیده

زمینه و هدف: چای سبز با نام علمی *Teacea Camellia Sinesis* حاوی آنتی اکسیدان های قوی و مواد ضدباکتریایی است که در سلامت و عمر دندان ها مؤثر بوده است. هدف از این پژوهش تهیه فرمولاسیونی پایدار از عصاره آبی چای سبز و بررسی اثرات ضد میکروبی آن بر روی بار میکروبی دهان می باشد.

روش بررسی: اثر ضد میکروبی عصاره حاوی غلظت های ۰/۲، ۰/۵، و ۱ درصد تانن موجود در گیاه بر روی باکتری های هوازی گونه استرپتوکوکوس موتان و انواع استافیلوکوک های موجود در دهان ۲۵ نفر از دانشجویان دختر داوطلب با محدوده سنی ۲۵-۲۰ سال مورد آزمایش قرار گرفت. به منظور بررسی نقش ویژه الکل از ۱۰ درصد الکل در فرمولاسیون چای سبز حاوی ۱ درصد تانن استفاده شده و در یک آزمایش جداگانه نیز دهان شویه گیاهی حاوی الکل با دهان شویه شیمیایی حاوی ۰/۲ درصد کلرگزیدین تجارتي مورد مقایسه قرار گرفت.

یافته ها: عصاره حاوی ۱ درصد تانن اثر ضد میکروبی بیشتری نسبت به دو غلظت ۰/۲ و ۰/۵ درصد نشان داد ( $P < 0/05$ ). فرمولاسیون حاوی ۱۰ درصد اتیل الکل آنچنان اثر ضد میکروبی قابل توجهی نسبت به دهان شویه بدون الکل نداشت ( $P > 0/05$ ). نتایج مقایسه فرمولاسیون گیاهی چای سبز با کلرگزیدین شیمیایی تجارتي نشان داد که بین این دو فرآورده نیز تفاوت معناداری در کاهش بار میکروبی دهان وجود ندارد ( $P > 0/05$ ).

نتیجه گیری: با توجه به تأثیر مشابه فرمولاسیون ۱ درصد تانن عصاره چای سبز با کلرگزیدین شیمیایی در کاهش باکتری های هوازی دهان، استفاده از این دهان شویه گیاهی به جای دهان شویه های شیمیایی به خصوص در نزد اطفال و زنان باردار ممکن است ایمن تر باشد.

م ع پ ۹:۱۳۸۹ (۴): ۳۳۰-۳۱۷

کلید واژگان: چای سبز، تانن، بار میکروبی، دهان شویه

\*استاد گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز  
\*\*دانشیار گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز  
\*\*\*دانشیار گروه فارماکوتوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز  
\*\*\*\*دکتر داروساز

۱-نویسنده مسوول: Email: drmoghbelt@yahoo.com

## مقدمه

التهاب و بدبوئی دهان اصلی ترین عامل پاتولوژیکی پریدنتال و مخاط دهان می باشد. در دهان حدود ۴۰۰ میکرواورگانسیم وجود دارد. یکسری از باکتری ها اسید ترشح می کنند که این اسید اصلی ترین عامل پوسیدگی دندان است (۱). گروهی دیگر از باکتری ها سبب قرمزی، التهاب و خونریزی از لثه می شوند. علاوه بر آن پلاک های دندانی که لایه ای چسبنده و غیر قابل رویت می باشند از تجمع باکتری ها، بزاق و پلی ساکاریدها بر سطح دندان ها ایجاد می شوند و با افزایش سن، انواع باکتری های موجود در آن وسعت می یابند (۲). برداشتن این لایه عفونی زا در موارد پیش رفته فقط توسط دندانپزشک و با تجهیزات خاص امکان پذیر است. اما برای پیش گیری از ایجاد و پیشروی آن، شستشوی دهان و دندان ها ابتدا با مسواک و سپس دهانشویه های گیاهی راهی برای برون رفت از این عوارض، به خصوص برای زنان باردار و اطفال است که اقشاری آسیب پذیرتر هستند. بر پایه این تفکر تهیه و بررسی یک دهان شویه گیاهی از عصاره قابل تهیه از چای سبز که گزارشات اولیه ای مبنی بر اثرات ضد میکروبی آن بدست آمده (۳) مدنظر قرار گرفت.

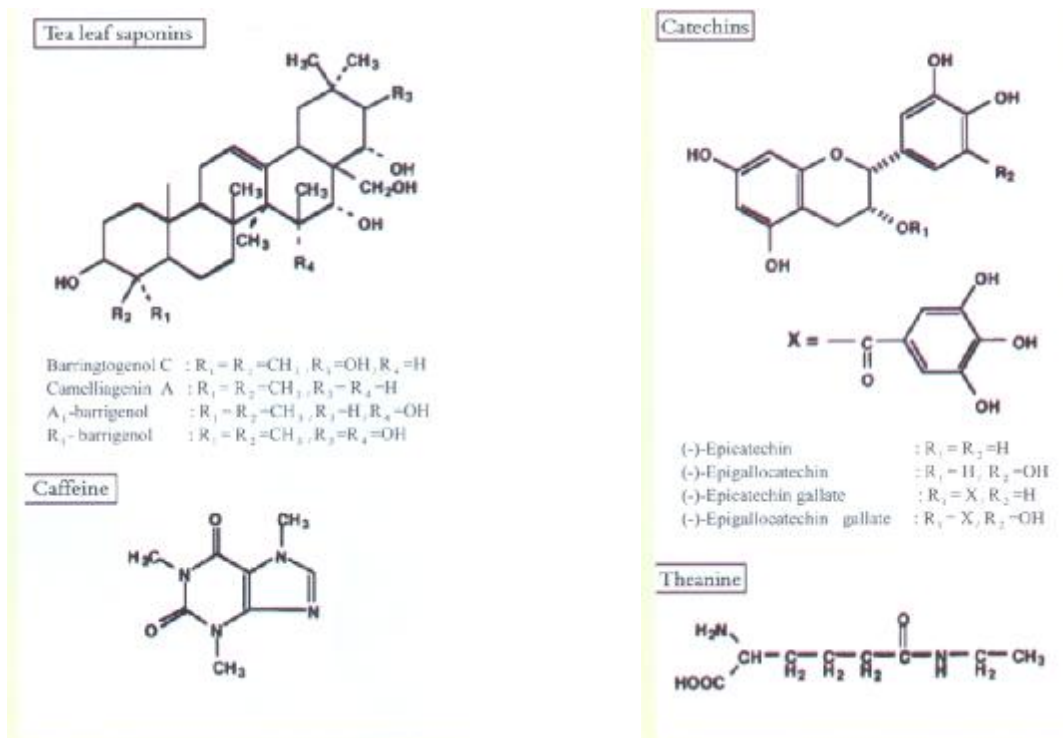
چای سبز با نام علمی *Camellia Sinensis* از خانواده *Theaceae* بوده که گیاهی است بوته ای و

دارای برگ های سبز و چرمی، گل های سفید و معطر می باشد (شکل ۱). این گیاه حاوی یک آنتی اکسیدان قوی (۴)، متابولیت های ثانویه گیاهی پلی فنلی مثل فلاونوئیدها، کاتکین ها، ساپونین ها، کافئین، تیائین (شکل ۲) و مقدار اندکی فلوراید می باشد (۵، ۶). پودر چای سبز که حاصل فرایند خشک کردن و خرد کردن برگ های تازه گیاه است، بدون عبور از مرحله اکسیداسیون و تخمیر (۷) حاصل می شود. در این مرحله گیاه حاوی آنتی اکسیدان ها و مواد ضد میکروبی است که در سلامت و عمر دندان ها مؤثر است. طبق گزارشات منتشره ترکیبات فنلی موجود در عصاره چای سبز موادی مؤثر در جلوگیری از رشد باکتری هائی هستند که موجب پوسیدگی دندان و تشکیل پلاک بر روی سطوح دندان ها می گردند (۸).

لذا با این احتمال که کاربرد دهان شویه چای سبز ممکن است به عنوان یک دهان شویه جدید در جلوگیری از تشکیل پلاک های دندانی مؤثر باشد، پس از تهیه فرمولاسیون پایدار از عصاره آبی چای سبز اثرات ضد میکروبی آن بر روی بار میکروبی دهان و به خصوص گونه *Streptococcus Mutans*، انواع استاف ها و سایر میکروب های موجود در دهان به صورت آزمایشگاهی و بالینی مورد بررسی قرار گرفت.



شکل ۱: برگ تازه چای سبز منطقه لاهیجان



شکل ۲: ساختمان شیمیایی برخی از مواد چای سبز

## روش بررسی

## نحوه خشک کردن برگ تازه و تهیه پودر عصاره:

پس از جمع آوری برگ های سبز چای از مناطق شهر لاهیجان و شناسائی علمی آن توسط مشاور فارماکوتکنوزی، اقدام به خشک نمودن آنها شد. برای تهیه چای سبز، برگ های چای فاقد دمبرگ به روش پن فراید (Pan Fried) خشک شدند، به این ترتیب که برگ ها را در یک ظرف مدور مسی (pan) ریخته و با تنظیم درجه حرارت در  $40^{\circ}\text{C}$  به مدت ۴۵ دقیقه با سشوار مخصوص و تهویه هوای مرطوب، عمل خشک نمودن صورت گرفت. به منظور ایجاد یکنواختی و تعلیق مناسب ذرات در حامل، کاهش اندازه ذره ای بر روی برگ های خشک شده تا حد عبور ذرات از الک ۱۸ مش، به کمک هاون صورت پذیرفت. جهت عصاره گیری، ۲۰۰ گرم از پودر الک شده را به مدت ۵ تا ۱۰ دقیقه در هم حجم خود آب دو بار یون گیری شده نزدیک به جوش ( $80-90^{\circ}\text{C}$ )

خیسانده و پس از دم کشیدن (Infusion) حجم نهائی را با آب مقطر به ۱۰۰۰ میلی لیتر رسانده و به مدت ۳۰ دقیقه روی همزن متحرک الکتریکی (Shaker) قرار داده شد تا عمل استخراج کامل گردد. پس از صاف نمودن مخلوط با صافی پارچه ای، و در زیر یک هود گیرنده میکروپ (Laminar air flow)، عصاره حاصل با روش خشک کنی در سرما (Lyophilization) خشک گردید (۹،۶). مواد شیمیائی بکار رفته در این مرحله و سایر مراحل ساخت از کارخانه مرک آلمان و از نوع تجزیه ای بودند.

روش اندازه گیری تانن: از صفر تا ۱۰ میلی لیتر از محلول اسید تانیک استاندارد به ترتیب در ۱۱ بالن حجمی ۱۰۰ میلی لیتری وارد نموده به هر کدام ۵ میلی لیتر معرف فولین-دنیس (Folin-Denise) و ۱۰ میلی لیتر کربنات سدیم اضافه گردید و سپس با آب مقطر به حجم یکصد میلی لیتر رسانده شد و کاملاً مخلوط گردید. بدین ترتیب

سبز پس از توزین دقیق بطور جداگانه در ظروف درب دار ۱۰۰ میلی لیتری که از قبل در شرایط ۱۲۱ درجه سانتی گراد، فشار ۱۵ پوند به مدت ۲۰ دقیقه در اتوکلاو سترون شده بود، قرار داده شد. سپس هر نمونه با آب دی آیونیز ۵۰ درجه به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد و در نهایت با عبور نمونه های تهیه شده از یک فیلتر غشایی با قطر منفذ ۰/۴۵ میکرون، نسبت به سترونی نمونه ها نیز اقدام گردید. توضیح آنکه وزن معادل از عصاره پودری چای سبز جهت هر غلظت با توجه به محاسبات مندرج در جدول ۱ و با در نظر گرفتن درصد تانن موجود در ۱۰۰ میلی گرم عصاره خشک اندازه گیری شد (۱۰).

#### بررسی قدرت اثر ضد میکروبی عصاره چای سبز

حاوی ۰/۲، ۰/۵ و ۱ درصد تانن: ابتدا از ۲۵ نفر داوطلب دانشجوی دختر بین ۲۵-۲۰ سال خواسته شد تا بعد از مسواک زدن در ساعت ۱۰ صبح، در ساعت ۱۲ ظهر دهان خود را با ۱۰ میلی لیتر آب دی آیونیز به مدت یک دقیقه شستشو داده و محتوای دهان خود را در ظروفی که از قبل در اتوکلاو استریل شده بود بریزند. از هر یک از این نمونه ها در کنار شعله و با رعایت شرایط سترونی یک لوپ با حجم ۰/۰۱ میلی لیتر برداشته شد و در یک میلی لیتر آب دی آیونیز رقیق گردید. سپس یک لوپ از هر یک از این محلول ها روی پلیت هایی که حاوی محیط آگار خون دار بودند کشت سفرد ای داده شدند و در انکوباتور با دمای ۳۷-۳۵ درجه سانتی گراد درون جار حاوی شمع با غلظت ۷-۵ درصد CO<sub>2</sub> به مدت ۲۴ ساعت قرار گرفتند (۱۱).

بعد از گذشت ۲ ساعت از آزمایش اول از داوطلبین خواسته شد تا این بار با ۱۰ میلی لیتر عصاره چای سبز حاوی ۰/۲ درصد تانن به مدت یک دقیقه غرغره نمایند و سپس محتوی دهان خود را در ظروف استریل بریزند. در این مرحله مجدداً یک لوپ استریل با حجم ۰/۰۱ میلی لیتر از هر نمونه با یک میلی لیتر آب رقیق گردید و یک لوپ از آن روی آگار خوندار کشت داده شد و در دمای ۳۷-۳۵ درجه سانتی گراد در

برحسب غلظت اسید تانیک، محلول هائی از آبی روشن تا آبی تیره به دست آمد. در این میان بالون حجمی اول که فاقد اسید تانیک بود و تغییر رنگی نداشت، به عنوان بلانک مورد استفاده قرار گرفت.

نمونه ها به مدت ۳۰ دقیقه تا کامل شدن واکنش رنگی و ایجاد حداکثر شدت رنگ، در دمای اطاق نگهداری گردید. این رنگ به مدت ۳ ساعت پایدار بود. سپس با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV/VIS، فارماسیا مدل 802106 ساخت کشور انگلستان، جذب محلول ها در طول موج ۷۶۰ نانومتر و در حضور بلانک تعیین گردید. پس از حصول نتایج، منحنی استاندارد جذب در مقابل غلظت اسید تانیک (برحسب mg/100 ml) رسم گردید (۱۰،۶). نتایج در نمودار ۱ ارائه شده است.

#### تهیه محلول های نمونه چای سبز و تعیین مقدار

تانن معادل در آنها: برای تهیه محلول های نمونه میزان یک میلی لیتر از عصاره تهیه شده به صورت جداگانه در ۳ بالن حجمی ۱۰۰ میلی لیتری حاوی ۷۵ میلی لیتر آب مقطر وارد گردید. پس از آن ۵ میلی لیتر معرف فولین-دنیس و ۱۰ میلی لیتر محلول کربنات سدیم به هر یک اضافه گردید و هر کدام از بالون ها با آب مقطر به حجم یکصد میلی لیتر رسانده شد. محلول حاصل کاملاً مخلوط گردید و به مدت ۳۰ دقیقه به حال خود گذاشته شد تا حداکثر رنگ ممکن را ایجاد نماید.

با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر UV میزان جذب نمونه ها در طول موج ۷۶۰ نانومتر و با حضور بلانک تعیین شد (۱۰،۶). سپس با استفاده از فرمول منحنی استاندارد غلظت نمونه ها بر اساس میزان اسید تانیک (برحسب mg/100ml)، محاسبه و مقدار تانن موجود در هر نمونه بدست آمد (جدول ۱).

#### تهیه غلظت های ۰/۲، ۰/۵ و ۱ درصد تانن از

عصاره چای سبز با توجه به نتایج مرحله قبل: برای تهیه غلظت های فوق، به ترتیب مقادیر ۳/۲، ۸/۰۲ و ۱۶/۰۵ میلی گرم معادل از پودر خشک شده عصاره گیاه چای

آزمایشگاهی محدود به کار برده می شود. کشت های استافیلوکوک اورئوس دارای آنزیم کواگولاز هستند که با عمل روی فیبرینوژن باعث انعقاد پلاسما می شوند. این آنزیم در سایر استافیلوکوک ها وجود ندارد که به آنها استافیلوکوک های منفی می گویند. در این آزمایش برای تهیه لام نمونه یک قطره نرمال سالین در یک گوشه لام تمیز قرار داده شد و با استفاده از مفتول کشت یک حلقه پر از کشت میکربی در آن به صورت سوسپانسیون پخش شد. در انتهای دیگر لام یک حلقه پلاسما قرار داده شد و از همان کشت به اندازه یک حلقه، پلاسما اضافه گردید و با اختلاط کامل امولسیون لازم تشکیل شد. مخلوط به مدت ۳ دقیقه با استفاده از مفتول کشت به هم زده شد و هنگامی که پلاسما شروع به خشک شدن کرد یک قطره سالین به آن اضافه گردید.

در این بررسی اگر کشت کواگولاز مثبت باشد یک حالت گرانولی در مخلوط پلاسما تشکیل می گردد. این حالت در مخلوط کشت در سالین (لام کنترل) مشاهده نمی شود. بنابراین در صورت منفی بودن تست هیچ گرانولی در هیچکدام از مخلوط ها بوجود نمی آید (۱۱).

**آزمایش اکسیداز:** این تست برای شناسایی باکتری های مشکوک به نایسریا انجام شد. ابتدا محلول ۱ درصد تترامیل پارافنیل آمین دی هیدروکلراید به عنوان معرف با حلال آب مقطر تهیه گردید. یک فیلتر کاغذی در داخل یک پلیت کاملاً تمیز قرار داده شد و چند قطره معرف بر روی فیلتر اضافه گردید. با استفاده از لوپ پلاتینی چندکونی از باکتری های مورد نظر برداشته شد و در قسمت مرطوب فیلتر کاغذی پخش گردید. در صورت مثبت بودن باکتری ها رنگ ارغوانی پررنگ پس از ۱۰ ثانیه ظاهر می شود (۱۱).

#### یافته ها

نتایج میانگین و انحراف معیار حاصل از تعیین مقدار تانن موجود در گیاه چای سبز گیلان با روش فولین

انکوباتور درون جار شمع دار به مدت ۲۴ ساعت انکوبه گردید. پس از آن کلونی های موجود در هر پلیت به طور جداگانه شمارش شد. این فرایند برای عصاره ۰/۵ و ۱ درصد نیز با فاصله زمانی حداقل ۱ روز برای هر غلظت تکرار شده و در نهایت نسبت به شمارش کلونی ها قبل و بعد از مصرف عصاره چای سبز اقدام گردید (نمودار ۲).

**تهیه فرمولاسیون شماره ۱ (دهانشویه چای سبز حاوی یک درصد تانن):** ۱۶/۰۵ میلی گرم از پودر خشک عصاره تهیه شده از چای سبز که حاوی ۱ درصد تانن بود در مقداری آب دی آیونایز با دمای ۵۰ درجه سانتی گراد حل گردید و به میزان ۲۰ میلی گرم سدیم ساخارین به عنوان شیرین کننده به آن اضافه شد. پس از ۱۰ دقیقه به هم زدن حجم آن با آب دی آیونایز به ۷۰ میلی لیتر ارتقاء یافت. پس از اختلاط کامل و عبور از کاغذ صافی در آخر، حجم فرمولاسیون تهیه شده به ۱۰۰ میلی لیتر رسانده شد. اثر ضد میکربی این فرمولاسیون نیز همانند روش ذکر شده برای عصاره ها مورد بررسی قرار گرفت.

**تهیه فرمولاسیون شماره ۲ (دهان شویه چای سبز حاوی یک درصد تانن و ۱۰ درصد الکل):** ساخت و بررسی اثر ضد میکربی این فرمولاسیون نیز مانند فرمولاسیون شماره ۱ بود با این تفاوت که در این فرمولاسیون ۱۰ میلی لیتر اتیل الکل اضافه شد. مقایسه این دو فرمولاسیون در نمودار ۳ نشان داده شده است.

**بررسی و مقایسه اثر ضد میکربی دهان شویه کلرگزیدین شیمیائی با چای سبز گیاهی:** در این آزمایش نیز مانند مراحل قبل عمل شد و علاوه بر دهانشویه چای سبز از دهان شویه شیمیائی کلرگزیدین ۰/۲ درصد تجارتي برای انجام غرغره و شمارش کلونی استفاده شد. در این بررسی اثر فرمولاسیون شماره ۲ (حاوی الکل) و کلرگزیدین تجارتي بطور جداگانه بر روی باکتری های دهان دانشجویان مورد بررسی قرار گرفت.

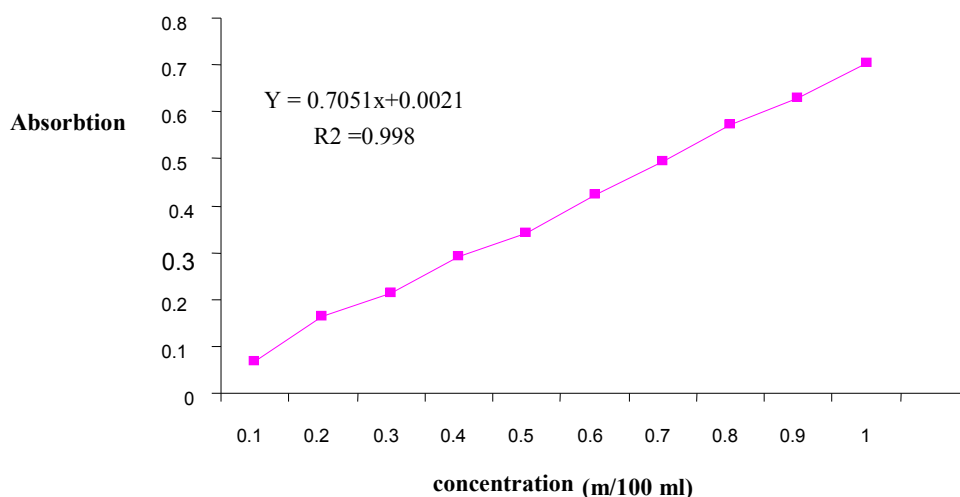
**آزمایش کواگولاز بر روی لام:** این تست برای تشخیص استافیلوکوک بیماریزا یا استافیلوکوک اورئوس از سایر استافیلوکوک های غیربیماری زا در محیط

آمده از قدرت و سنجش کاهش بار میکروبی دهان توسط دهان شویه‌های چای سبز حاوی الکل و همچنین دهان شویه تجارتي کلرهگزیدین نشان داد که هر دو دهان شویه تقریباً به یک اندازه و به میزان حدود ۳۲ درصد در کاهش بار میکروبی مؤثر بوده اند (نمودار ۴).

نتایج حاصل از تست کواگولاز و اکسیداز نشان دادند که تست کواگولاز برای لام نمونه با توجه به عدم تشکیل گرانول از نوع کواگولاز منفی بوده و تست اکسیداز برای اثبات حضور کلونی های نایسریا مثبت بود. رنگ ارغوانی پررنگ حاکی از حضور گونه های نایسریا و آنزیم ایدوفنل اکسیداز بود (۱۰).

- دنیس پس از سه بار آزمایش به میزان  $6/23 \pm 0/19$  میلی گرم تانن در یکصد میلی گرم از پودر خشک عصاره بدست آمد (نمودار و جدول ۱).

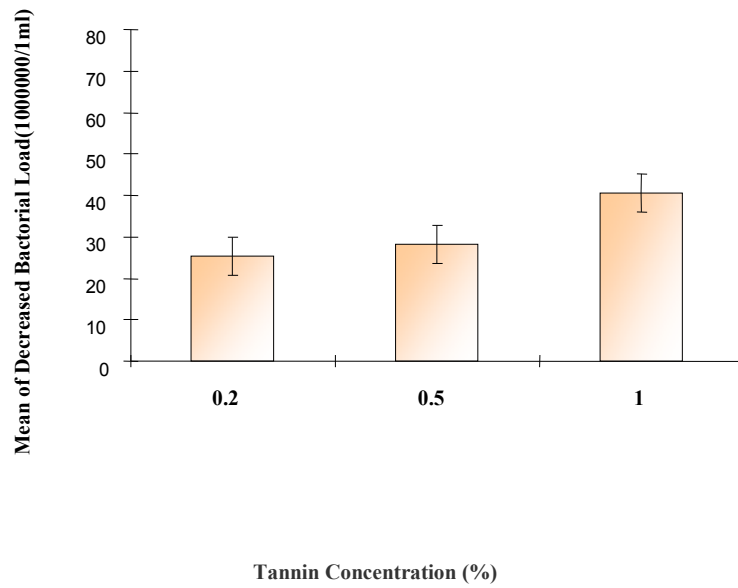
نتایج حاصل از شمارش بار میکروبی دهان دانشجویان مورد آزمایش نشان داد که عصاره چای سبز حاوی ۱ درصد تانن به میزان ۲۶ درصد در کاهش باکتری ها مؤثر بود اما دو عصاره ۰/۲ و ۰/۵ درصد به یک اندازه و تنها حدود ۱۶ درصد مؤثر بودند (نمودار ۲). نتایج مقایسه دو دهان شویه ی گیاهی چای سبز حاوی ۱ درصد تانن تنها و همراه با ۱۰ درصد الکل نیز نشان داد که دهان شویه دارای الکل به میزان ۳۲ درصد در کاهش بار میکروبی دهان مؤثر بوده است (نمودار ۳). نتایج بدست



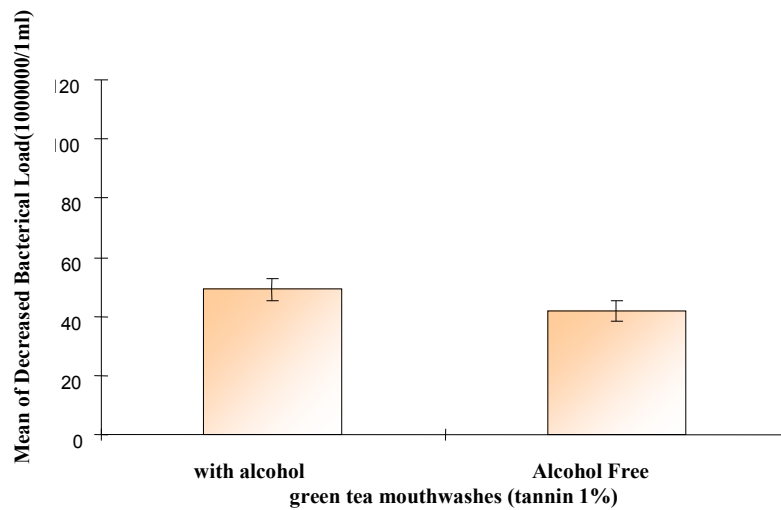
نمودار ۱: منحنی استاندارد حاصل از میزان جذب محلول های استاندارد تهیه شده از غلظت های مختلف اسید تانیک بر حسب میلی گرم در ۱۰۰ میلی لیتر حلال

جدول ۱: نتایج تعیین مقدار تانن موجود در گیاه چای سبز به روش فولین - دنیس (n=۳)

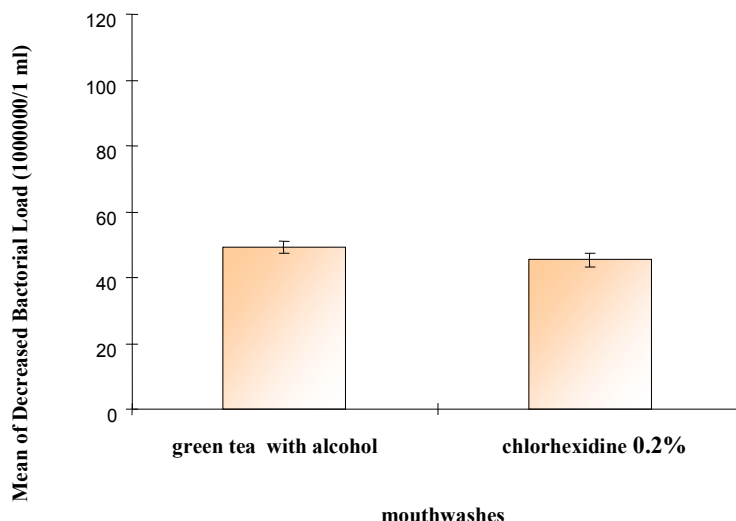
شماره نمونه	وزن عصاره گیاهی چای سبز (mg)	میزان جذب	غلظت تانن	درصد تانن موجود در پودر عصاره چای سبز
۱	۱۴/۲۸	۰/۶۱	۰/۸۶	۶/۰۳۷
۲	۱۴/۲۸	۰/۶۳	۰/۸۹	۶/۲۳
۳	۱۴/۲۸	۰/۶۵	۰/۹۱	۶/۴۳
میانگین	۱۴/۲۸	$0/63 \pm 0/02$	$0/88 \pm 0/025$	$6/23 \pm 0/19$



نمودار ۲: مقایسه تاثیر عصاره های چای سبز حاوی غلظت های مختلف تانن بر روی میانگین کاهش باکتری های هوازی دهان



نمودار ۳: مقایسه تاثیر دهان شویه چای سبز حاوی ۱ درصد تانن بدون الکل و با الکل بر میانگین کاهش تعداد باکتری های هوازی دهان



نمودار ۴: بررسی تاثیر دهان شویه گیاهی چای سبز حاوی ۱ درصد تانن با دهان شویه شیمیایی کلرهگزیدین ۰/۲ درصد

### بحث

(۱۶،۱۵) و جلوگیری از پیری زود رس پوست (۱۷)، پیش گیری بعضی از سرطان ها، کاهش فشار خون، کلسترول، قندخون، درمان امراض قلبی و تنظیم هورمون هایی که در نهایت منجر به تندرستی، سلامت و طول عمر انسان می شوند (۱۸-۲۳). همچنین از جمله اثراتی که تاکنون در هیچ یک از مجلات و مقالات علمی به آن اشاره نشده است، احتمال اثرات ضد خارش و ضد کهیر (urticaria) عصاره چای سبز است که مولف این مقاله در حال بررسی و پژوهش روی آن می باشد و در آینده ای نزدیک نتایج این بررسی ها در مجلات بین المللی منتشر خواهد شد. طبق آخرین گزارشات موجود، از چای سبز اثرات ضد میکروبی و ضدپوسیدگی دندان نیز گزارش شده است (۸) که انجام این تحقیق در جهت اثبات آزمایشگاهی و بالینی آن می باشد.

در مطالعه ای که در سال ۱۹۹۸ توسط یاماموتو و همکاران بر روی چای سبز در آمریکا صورت گرفت مشاهده شد که عصاره حاوی ۰/۵ درصد تانن و ۲ درصد الکل به میزان ۱۵ درصد در کاهش انواع استاف ها مؤثر بوده است (۲۴). چای سبز حاوی فلاونوئیدها، تانن و مقدار اندکی فلوراید و سایر املاح معدنی و حتی برخی

استفاده از یک دهان شویه مناسب فواید ویژه ای دارد که موارد آن را می توان به شرح زیر برشمرد. ضد عفونی کردن محیط دهان و شستن باقیمانده های غذایی از روی لثه و دندان ها، کم کردن باکتری های موجود در دهان، پوشاندن و خنثی کردن بوی بد دهان، ایجاد طعم و بوی مطلوب و خوشایند و احساس تازگی در دهان، از بین بردن پلاک و جرم دندان ها و کمک به افزایش کارایی مسواک زدن، تأمین فلوراید مورد نیاز دندان ها و پیشگیری از پوسیدگی آنها، کمک به پیشگیری و التیام زخم و برخی بیماری های لثه، کاهش ابتلاء به آفت، تاول های دهانی، پیش گیری و رفع کدری یا سیاهی دندان ها و بوی نامطبوع دهان در افراد سیگاری و کمک به حفظ سلامت دندان های شیری و محافظت از دندان های دائمی در کودکان (۲،۱).

انگیزه انتخاب چای سبز برای این تحقیق به دلیل مطالعات وسیعی می باشد که امروزه در تأیید تأثیر چای سبز در پیشگیری و یا درمان برخی از بیماری ها صورت می پذیرد. از جمله این تحقیقات منتشر شده می توان به موارد ذیل اشاره نمود. کاهش و تنظیم وزن (۱۲)، درمان التهاب و ناراحتی های پوستی (۱۳،۱۴)، التیام زخم



میلی گرم تانن در ۱۰۰ میلی گرم پودر خشک شده چای سبز ایران به خصوص با انحراف معیار بسیار پایین نه تنها بیانگر کیفیت بالای محصول بلکه موید پایداری ماده موثره (تانن) در مراحل تهیه و فرمولاسیون دهان شویه نهایی نیز می باشد. اگر چه بدون توجه به حضور الکل در نمونه خارجی که ممکن است موجبات تأثیر بیشتر نمونه خارجی را فراهم نماید، تفاوت موجود معنادار نمی باشد ( $P > 0/05$ ).

اما همچنان که مشاهده می شود مقایسه غلظت ۱ درصد تانن مورد انتخاب این پژوهش با نتایج یاماموتو و همکاران (۲۴) نه تنها به یکباره کاهش بار میکروبی را از ۱۵ درصد به ۲۶ درصد (بدون الکل) و ۳۲ درصد (همراه الکل) ارتقاء داده است بلکه به خوبی ایده انتخاب غلظت مناسب یک درصد را توسط فرمولر نشان می دهد.

نتایج بدست آمده از آزمون مقایسه میانگین های کاهش باکتری توسط دهان شویه های گیاهی چای سبز حاوی یک درصد تانن بدون الکل با نمونه حاوی ۱۰ درصد الکل، نشان داد که علیرغم تفاوت ۶ درصدی در میزان کاهش باکتری، اختلاف آماری معناداری به چشم نمی خورد ( $P > 0/05$ ). باید توجه داشت که بسیاری از منابع معتبر دارویی اثر محافظتی (Preservative) الکل در اشکال دارویی را بین ۲۰-۱۵ درصد و اثر آنتی باکتریال و ضد عفونی کنندگی آن را بین ۶۰ تا ۷۰ درصد گزارش نموده اند (۳۰، ۹). با توجه به توضیحات فوق الذکر و نیازمندی تداوم پایداری برای هر شکل دارویی در مدت مصرف بیمار، بخصوص برای مواقعی که درب شکل دارویی جهت استفاده از آن باز می شود و خطر ورود میکرب از بیرون ظرف (هوا) به داخل آن محتمل می گردد و در نهایت ارتقاء تاریخ انقضاء دهان شویه، تصمیم گرفته شد تا از فرمولاسیون گیاهی چای سبز همراه با الکل به عنوان شکل نهائی استفاده گردد. اگر چه با انتظار مصرف این فراورده در اطفال و خردسالان و همچنین برای دوران حاملگی در زنان باردار و ایام شیردهی مادران و به منظور رعایت ایمنی کامل در این دسته از اقشار

ویتامین ها می باشد. برخی از مواد آنتی اکسیدانی و ضد میکروبی گزارش شده در چای سبز در پیشگیری و سلامت و در نتیجه، افزایش عمر و کارایی دندان ها مؤثر است (۲۵-۲۷). تانن ها ترکیبات بایوسنتزی می باشند که اثر میکرب کشی عمده ای دارند. در پژوهش های دهه اخیر ثابت شده است که استفاده از چای سبز و سیاه مانع از استقرار باکتری ها بر روی دندان ها و تشکیل پلاک های دندانی شده و در نتیجه باعث محدود نمودن ترشح یا تشکیل آمیلاز انسانی، باکتری ها، ممانعت از گلوکوزیل ترانسفراز و در نهایت محدود نمودن بایوسنتز گلوکان چسبیده به دندان می شود. طبق یکی از آخرین تحقیقات منتشر شده مصرف منظم چای سبز شدت پوسیدگی دندانها را در مطالعات انسانی کاهش داده است (۲۸-۳۰). همچنان که از نتایج مصرف دهان شویه گیاهی چای در دانشجویان مشهود است، با مصرف غلظت های مختلف از عصاره چای سبز کاهش متفاوتی در تعداد کلونی ها مشاهده شد. طبق گزارش دانشجویان، هیچگونه عارضه مشهود یا نشانه سمی که بیانگر عوارض حاصل از دارو باشد، گزارش نشد. بررسی و مقایسه کل نتایج نشان می دهد که دهان شویه چای سبز حاوی ۱ درصد تانن بدون الکل، با کاهش ۲۶ درصدی بار میکروبی دهان، تأثیر واضح تر و معنادارتری نسبت به دو غلظت ۰/۲ و ۰/۵ درصد چای تانن دارا می باشد و از نظر آماری تفاوت معناداری بین میانگین های این سه گروه وجود دارد ( $P < 0/05$ ). مقایسه نتیجه این بررسی با پژوهش یاماموتو و همکاران (۲۴) که با دهان شویه حاوی ۰/۵ درصد تانن موجود در چای سبز خارجی و همراهی ۲ درصد الکل موفق به کاهش ۱۵ درصدی در انواع استاف ها شده بودند، نشان می دهد که دهان شویه حاوی چای سبز ایران با غلظت ۰/۵ درصد تانن و بدون الکل توانسته است به میزان ۱۶ درصد بار میکروبی دهان را کاهش دهد. این نتیجه نشان می دهد که چای سبز ایران یا حاوی مقدار تانن بیشتری است و یا از نظر کیفیت دارای تانن مؤثرتری است. قابل توجه آنکه حصول نتیجه کمی  $6/23 \pm 0/19$

ملکولی که اساس آن بر پایه PCR و RNA ریوزومی استوار است معتبر بوده و تنها با انجام تست کواگولاز و اکسیداز نمی توان به هویت دقیق این باکتری ها پی برد. در ارتباط با بررسی های ایمنی در مصارف انسانی و از نقطه نظر سم شناسی، با مصرف دهان شویه چای سبز بین دانشجویان هیچ نوع تظاهرات سمی و آلرژیک مشهود، مثل سوزش مخاط گلو، دهان و زبان، قرمزی و تحریک لب و لثه ها و یا تحریک غدد اشکی مشاهده نشد. اگر چه احساس سوزش در فراورده های حاوی مقداری الکل ممکن است رخ دهد که این پدیده به دلیل واکنش انقباضی بین مولکول های الکل و بزاق، طبیعی و به مرور نیز تحمل پذیر و قابل رفع می باشد. نکته دیگری که در راستای عوارض یا سمیت حاصل از بعضی دهان شویه ها مطرح است مسئله شسته شدن فلور طبیعی و مورد نیاز دهان و آنزیم های بزاقی به همراه میکرواورگانسیم های بیماری زا توسط دهان شویه هاست. اگر چه این مشکل در دهان شویه های شیمیائی از مسیر و با مکانیسم کیلیت شدن (chilate) فلور طبیعی توسط یون ها و ملکول های شیمیائی بیشتر قابل اتفاق است. اما احتمال بروز این اتفاق در دهان شویه های گیاهی هم باید همیشه مورد توجه و یایش قرار گیرد. در مطالعه ای با موضوع مقایسه تأثیر لیستترین (Listerine) و یک نوع دهان شویه مشابه شیمیائی دیگر، بر روی استرپتوکوک ها و فلور طبیعی دهان نشان داده شد که هر دو دهان شویه به یک اندازه تعداد کلونی ها را به صفر رسانده و در کاهش استرپتوکوک های دهان به یک اندازه تأثیر داشته اند اما تأثیر آنها بر روی فلور طبیعی دهان متفاوت بوده است (۳۰). به علاوه یکی از آنها نه تنها فلور طبیعی بیشتری را از دهان خارج نموده، بلکه موجبات تولید رنگ دانه های ناخواسته را روی سطوح دندانی گسترش داده است. نکته عارضه برانگیز و سمیت زای مرتبط با دهان شویه ها مسئله تغییر رنگ دندان ها توسط بعضی دهان شویه ها و به خصوص انواع شیمیائی آنها می باشد. دهان شویه های شیمیائی هم به دلیل شیمیائی بودن و امکان تغییرات pH

آسیب پذیر، می توان در صورت نیاز از فرمولاسیون های بدون الکل آن نیز استفاده نمود. بازنگری فرمولاسیون دهان شویه شیمیائی کلرهگزیدین ۰/۲ درصد که به عنوان کنترل به کار گرفته شد و همچنین دهان شویه تجارتي ساخت انگلستان حاوی ستیل پیریدینیم کلراید موسوم به Oral-B نشان می دهد که اولی حاوی ۱۰ درصد اتانول است و دومی نیز به جای اتانول حاوی گلیسرین بوده که ماهیتاً یک الکل شیرین می باشد. اگر چه در جامعه پزشکی و حتی نزد بیماران هر دو به عنوان دهان شویه های بدون الکل (اتانول) معرفی شده اند! همچنین یکی از شرکت های دارویی، قطره ای گیاهی به نام پرسیکا (persica) را نیز به عنوان یک دهان شویه معرفی نموده که بنابر اظهارات مندرج در برچسب آن دارای عصاره گیاه مسواک (*Salvadora Presica*)، نعنا (*Mentha spicata*) و بومادران (*Achillea millefolium*) می باشد که به احتمال زیاد برای انحلال نعنا در محیط ناچار به استفاده از الکل هم بوده اند.

آزمون مقایسه میانگین های میزان کاهش باکتری در دو گروه استفاده کننده از دهان شویه گیاهی چای سبز حاوی ۱ درصد تانن همراه با ۱۰ درصد الکل و گروه استفاده کننده از دهان شویه شیمیائی حاوی کلرهگزیدین ۰/۲ درصد تجارتي، حاکی از کاهش یکسان باکتری و بار میکروبی در دهان به میزان ۳۲ درصد بوده که از نظر آماری تفاوت معناداری نداشت ( $P > 0/05$ ).

در ارتباط با نتایج حاصل از تست های کواگولاز و اکسیداز در سطح محیط کشت، ۲ نوع مختلف از کلونی ها کاهش بسیار مشهودتری نسبت به سایر کلونی ها از خود نشان دادند. بعد از خالص سازی و شناسائی نمونه ها توسط رنگ آمیزی و انجام تست های اکسیداز و کواگولاز بر روی آنها، نوع باکتری ها از انواع کواگولاز منفی و گونه هایی از نایسریا تشخیص داده شد. اگر چه در مورد نتایج تست های کواگولاز و اکسیداز باید متذکر شد که تعیین هویت باکتری های دهان از طریق تست های متعدد بیوشیمیائی و حتی در صورت لزوم با روش های بیولوژی

فرمول شیمیایی آن، با عوامل دیگری مثل دمای محیط، رقت یا غلظت مایع، ایستایی و زمان تأمل یا تماس با زبان و مخاط دهان، احساس حاصل از بوی دهان شویه، میزان و ترکیب بزاق، طبیعت مزاج انسانی، سالم یا بیمار بودن پرزهای چشایی محیط زبان و بافت دهان نیز مرتبط است (۹). به طور مثال هم به تجربه و هم بر پایه تحقیقات مشخص شده که کودکان طرفدار طعم و مزه کاملاً شیرین، میانسالان علاقه مند به طعم های نسبتاً شیرین و ترش مزه و بزرگسالان تمایل به طعم های تلخ یا کاکائوئی، تند و تیز و محرک دارند (۹). به همین دلیل انتخاب یک طعم مناسب برای دهان شویه ها نیز نیازمند بررسی های ذکر شده جهت اثبات جذابیت در رده های سنی مختلف دارد و محققین دارویی نیز در مسیر تحقیقات پیش فرمولاسیون، توسعه فرمولاسیون های دارویی و انتخاب شکل قابل عرضه دارو، قطعاً این عوامل را مد نظر قرار خواهند داد.

### نتیجه گیری

در مجموع با توجه به جمع بندی حاصل از مراحل مختلف کار، پایداری فرمولاسیون دهان شویه چای سبز و بررسی های ضد میکروبی فرمولاسیون تهیه شده، می توان نتیجه گرفت که چای سبز به دلیل نداشتن مرحله تخمیر و اکسیداسیون در فرایند خشک شدن برگ های اولیه و مراحل تهیه فرمولاسیون انجام شده، منبعی غنی و شگفت انگیز از ترکیبات آنتی اکسیدانی قوی با خواص مفید پزشکی و ضد میکروبی می باشد. بنابراین مصرف به جا و به موقع عصاره چای سبز در اشکال دارویی و یا مصرف روزمره آن به عنوان دهان شویه می تواند مانع از تجمع باکتری ها و تشکیل پلاک بر روی سطوح و پیکره دندانانی شده و در نهایت باعث جلوگیری از پوسیدگی دندان شود.

و یا نیاز به رنگی شدن برای جذابیت بیشتر و یا هم رنگی فیزیولوژیکی، در خطر تغییرات رنگی در دندان ها هستند. اما موارد گیاهی ممکن است که به دلیل محتویات رنگی طبیعی مثل کلروفیل یا مواد دیگر نیازمند مواد افزودنی بیشتر نبوده و به این دلیل احتمال ایمنی بیشتری را دارند. اگرچه با توجه به احتمال رسوب تانن ها در این نوع دهان شویه ها به دلیل عدم تنظیم فرمولاسیون از نقطه نظر مقدار و نوع حلال انتخابی، باید دقت لازم را مبذول داشت. خوشبختانه در این مورد، تاکنون گزارشی دریافت و یا منتشر نشده است و اشاره به آن تنها یک پیش بینی پژوهشی است.

یکی از نکات مثبت و مزایای دهان شویه های گیاهی وجود املاح کافی، مواد معدنی و تأمین فلوراید (ملح سدیم) توسط عصاره چای سبز است (۲۶) که همانند سایر دهان شویه ها، دیگر نیازی به تأمین و افزودن این مواد به منظور غنی سازی دهان شویه یا خمیر دندان های قابل عرضه از آن نمی باشد. بهتر است در یک تحقیق جداگانه، حضور معنادار و مؤثر ترکیبات حاوی فلوراید را در عصاره چای سبز و به خصوص کفایت کمی آن را برای نقش ضد پوسیدگی دندان به اثبات رساند. مسئله دیگر در دهان شویه ها ارزیابی طعم در آنهاست که در جای خود از چند نقطه نظر جای تأمل دارد. اول آن که انتخاب یک طعم مطلوب در رده های سنی مختلف متفاوت است و نیازمند یک ارزشیابی درون تنی در انسان است. دوم آنکه در همین راستا انتخاب یک طعم نباید آن چنان جذاب و محرک باشد که انسان و به خصوص بچه ها را تشویق به بلع مایع دهان و یا دهان شویه نماید. لذا طعم مورد انتخاب تا حدی که ایجاد یک حس خوش و تحمل پذیر را ایجاد نماید، کافی است. بعلاوه احساس طعم یک غذا یا دارو تنها منحصر به مزه یا حس مزه آن نیست بلکه در مجموع دریافت و یا بازخورد مخلوطی از مشخصه های یک ماده می باشد که علاوه بر مزه خاص

منابع

- 1-Lang Np, Lindhe j. Clinical periodontology and ampler dentistry. 5<sup>th</sup> ed, Iowa (USA):Blackwell 2008;183-202.
- 2-Caranza F, Newman M. Clinical Periodontology. 10<sup>th</sup> ed. Philadephia: WB saunders; 2006: 96,447,684,883.
- 3-Rasheed A, Haider M. Antibacterial activity of camellia sinensis extracts against dental caries. Arch pharm Res 1998; 21(3):348-52.
- 4-Mukhtar H, Grupta H, Ahmad N. Inhibition of nuclear transcription factor NFκB by green tea constituent epigallocatechin-3-gallate in human epidermoid carcinoma cells A431. J dermatol sci 1998;16(sup 1):S50.
- 5-David S, Chopra D. The Chopra Center Herbal Handbook. New York: Three Rivers press 2000;103-10.
- 6-Moghbel A, Abbaspour H. A study on the factors affecting the compressibility of green tea leaves powder to make a herbal tablet. SMJ,AJUMS 2010; 8(4):479-90.
- 7-David W, Sifton R. PDR for herbal medicines 4<sup>th</sup> ed. USA:Thomson Healthcare ;2004:408-14.
- 8-Wolinsky LE, Cuomo J, Quesada K, Bato T, Camargo PM. A comparative pilot study of the effects of a dentifrice containing green tea bioflavonoids,sanguinarine or triclosan on oral bacterial biofilm formation. J Clin Dent. 2000;11(2):53-9.
- 9-Tory DB. Remington: The science and practice of pharmacy 21<sup>st</sup> ed. Philadelphia, Lippincott William & Wilkins, 2005: 706-828, 934-937, 1061.
- 10-Waterman PG, Mole S. Analysis of phenolic plant metabolites. 1<sup>st</sup> ed. Oxford: Blackwell scientific Publication 1994:13-83.
- 11-Baron EJ, Bailey WR, Finegold SM. Bailey & Scott's Diagnostic Microbiology. 8<sup>th</sup> ed. St. Louis: C.V. Mosby company; 1990;72-95.
- 12-Westerterp-Plantenga MS, Lejeune MP, Kovacs EM. Body weight loss and weight maintenance in relation to habitual caffeine intake and green tea supplementation. Obes Res 2005; 13(7):1195-204.
- 13-Hsu S. Green tea and the skin. J Am Acad Dermatol 2005; 52(6):1049-59.
- 14-Vayalil PK, Elmetts CA, Katiyar SK. Treatment of green tea polyphenols in hydrophilic cream prevents UVB-induced oxidation of lipids and proteins, depletion of antioxidant enzymes and phosphorylation of MAPK proteins in SKH-1 hairless mouse skin. Carcinogenesis. 2003; 24(5):927-36.
- 15-Rahimzadeh F, Moghbel A, Salimi A, Kalantar A. Formulation of wound healing cream from Iranian green tea extract. A thesis presented for the degree of Pharmacology Doctorate, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz,Iran 2006: 81-92.[Unpublished].
- 16-Rahimzadeh F, Moghbel A. A pilot study of therapeutic effect of water extract (infusion) of Iranian green tea on the healing of full-thickness wound in rabbit, No. 482 approved research project at research deputy of Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz,Iran 2004;20-5.
- 17-Chiu AE, Chan JL, Kern DG, Kohler S, Rehmus WE, Kimball AB. Double-blinded placebo controlled trial of green tea extracts in the clinical and histologic appearance photoaging skin. Dermatol Surg 2005; 31 (7pt.2) 855-60.
- 18-Fukino Y, Shimbo M, Aoki N, Okubo T, Iso H. Randomized controlled trial for an effect of green tea consumption on insulin resistance and inflammation markers. J Nutr Sci Vitamind (Tokyo) 2005; 51(5):335-42.
- 19-Choan E, Segal R, Jonker D, Malone S, Reaume N, Eapen L, et al. A prospective clinical trial of green tea for hormone refractory prostate cancer: an evaluation of the complementary/alternative therapy approach. Urol Oncol 2005; 23(2):108-13.
- 20-Seely D, Milss EJ. Wu P, Verma S, Guyatt GH. The effects of green tea consumption on incidence of breast cancer and recurrence of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. Integr Cancer Ther 2005; 4(2):144-55
- 21-Suzuki Y, Tsubono Y, Nakaya N, Koizumi Y, Tsuji I. Green tea and the risk of breast cancer: pooled analysis of two prospective studies in Japan. Br J Cancer 2004;90(7):1361-3.
- 22-Ishikawa A, Kuriyama S, Tsubono Y, Fukao A, Takahashi H, Tachiya H, et al. Smoking alcohol drinking, green tea consumption and the risk of esophageal cancer in Japanese men. J Epidemiol 2006;16(5):185-92.
- 23-Kuriyama S, Shimazu T, Ohmori K, Kikuchi N, Nakaya N, Nishino Y, et al. Green tea consumption and mortality due to cardiovascular disease ,cancer and all causes in Japan :the ohsaki study .JAMA 2006;296(10) : 1255-66.
- 24-Yamamoto T, Juneja LR, Chu DC, Kim M. Chemistry and application of green tea. USA:CRC press; 1997:8.
- 25-Bérubé-Parent S, Pelletier C, Doré J, Tremblay A. Effects of encapsulated green tea and Guarana extracts containing a mixture of epigallocatechin-3-gallate and caffeine on 24 h energy expenditure and fat oxidation in men. Br j Nutr 2005; 94(3): 432-6.
- 26-Ferrara L, Montesano D, Senatore A. The distribution of minerals and flavonoids in the tea plant (camellia sinensis). Farmacol 2001; 56(5-7):397-401.

- 27-du Toit R, Volsteedt Y, Apostolides Z. Comparison of the antioxidant content of fruits, vegetables and tea measured as vitamin C equivalents. *Toxicology* 2001;166(1-2):63-9.
- 28-Paye M, Maibach HI, Barel AO. *Handbook of cosmetic and technology*. 2<sup>nd</sup> ed. New York: CRC press, 2006;98.
- 29-Serafini M, Ghiselli A, Ferro-Luzzi A. In vivo antioxidant effect of green and black tea in man. *Eur J Clin Nutr* 1996; 50(1):28-32.
- 30-Sweetman SC. *Martindale: The Complete Drug Reference* 36. [CD-ROM] London: Pharmaceutical Press, 2009:2831.

## Formulation and Evaluation of Green Tea Antibacterial Mouthwash Effect on the Aerobic Mouth Bacterial Load

Moghbel A<sup>1\*</sup>, Farajzadeh A<sup>2</sup>, Aghel N<sup>3</sup>, Raisi N<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Pharmaceutics, School of Pharmacy,<sup>2</sup>Department of Microbiology, School of Medicine,  
<sup>3</sup>Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Ahvaz Jundishapur University of Medical  
 Sciences, Ahvaz, Iran

### Abstract

**Backgrounds and Objective:** Green tea (*Camellia sinensis*; *Teacea* family) contains antioxidant and antimicrobial agents, and has a protective effect on the health of teeth. The aim of this study was to make a stable formulation of green tea aqueous extract and to verify its antimicrobial effects on the oral aerobic bacterial load.

**Subjects and Methods:** A total of 25 female volunteer students within the age range of 20 through 25 years were evaluated by using 0.2, 0.5 and 1% plant tannin aqueous solution on their aerobic bacteria streptococcus mutan species and the kinds of staphylococcus living in mouth. In order to evaluate the specific role of alcohol, a green tea mouthwash containing 1% tannin plus 10% alcohol was compared with a same alcohol-free formulation. Also in a separate test, a comparative study was performed between the above alcoholic green tea mouthwash and the commercial chlorhexidine 0.2 % .

**Results:** The aqueous extract containing 1% tannin was more effective than other concentrations ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference between any of the formulations of green tea mouthwashes whether or not alcohol was incorporated ( $P > 0.05$ ). Also, no difference was observed between the herbal and chlorhexidine 0.2% mouthwashes in terms of their antibacterial activities on the aerobic mouth bacterial load.

**Conclusion:** The results of this study suggest that tannin 1% aqueous green tea extract is as effective as chlorhexidine 0.2 % mouthwash in reducing oral aerobic bacteria. The use of this herbal mouthwash may also be safer, especially in children and pregnant women.

*Sci Med J 2010; 9(4):317-330*

**Keyword:** Green tea, Tannin, Bacterial load, Mouthwash.

Received: July 2, 2008

Revised: June 1, 2010

Accepted: June 15, 2010

\*Corresponding author email: drmoghbel@yahoo.com