مجله علوم پایه پزشکی ایران، جلد ۱۰، شماره۱، بهار ۱۴،۱۳۸۶ - ۸
تاریخ دریافت: ۸۵/۲/۲۴- تاریخ پذیرش: ۸۶/۵/۱۱

فرمولاسیون کرم ضد در ماتوفیت از عصاره هیدروالکلی گیاه آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Boiss.)

*[۱] اسکندر مقیمی پور، [۲] نسرین عاقل، [۳] مهندس عبدالغنی عامری، [۴] افروز سعادت زاده

چکیده

هدف

آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Boiss.) از گیاهان بومی ایران، پاکستان و افغانستان است که ترکیبات عمدهٔ موجود در اسانس و عصاره اندام هوایی آن، کارواکرول و تیمول، از دسته فنول‌های فرار است که اثرات ضدمیکروبی آنها قبلاً به اثبات رسیده است. به همین دلیل در این تحقیق تلاش شده است تا ضمن بررسی اثر ضدقارچی و تعیین حداقل غلظت بازدارنده آن، با استفاده از یک پایه مناسب نسبت به تهیه و فرمولاسیون کرم ضد درماتوفیت از عصاره هیدروالکلی گیاه مذکور اقدام گردد.

مواد و روش کار

در ابتدا، اندام هوایی گیاه خشک شدهٔ آویشن شیرازی، تهیه و به صورت پودر درآمد. برای عصاره‌گیری از پودرها، از روش خیساندن و حلال هیدروالکلی استفاده شد و سپس عصاره، به روش مناسب تغلیظ گردید. جهت تعیین غلظت مؤثر ضد درماتوفیت از عصاره، ویال‌های حاوی قارچ‌های درماتوفیت استاندارد، با کشت بر محیط‌های استاندارد، فعال شدند. سپس سوسپانسیونی با غلظت معلوم از هرکدام از قارچ‌ها تهیه و به محیط‌های کشت استریل حاوی غلظت‌های مختلف عصاره، تلقیح شد. برای طراحی فرمولاسیون، فرمول عمومی یک کرم پاک کننده، شامل موم زنبور عسل، اسپرماستی، پارافین مایع و بوراکس به عنوان مبنا قرارگرفت و سپس با تصحیح و تعدیل مقادیر مواد مورد نیاز، فرمولاسیون‌های مختلفی با پایه امولسیونی آب در روغن ساخته شد و بهترین فرمولاسیون با توجه به یکنواختی، قوام و جذابیت ظاهری انتخاب گردید. در مرحلهٔ بعد، کرم‌های ۱، ۲و ۳ درصد عصاره، ساخته شد.

نتایج

با بررسی رشد یا عدم رشد قارچ‌ها و اندازه گیری قطر کلنی‌های قارچ، حداقل غلظت مهارکنندهٔ رشد (MIC) عصاره بر درماتوفیت‌های مورد بررسی، تعیین شد. مناسب ترین فرمول حاوی ۲ درصد عصاره تعیین شد.

نتیجه گیری

پس از انجام آزمایش های مختلف فیزیکوشیمیایی و کنترل میکروبی، پایداری و کیفیت آن، مورد تأیید قرار گرفت. به این ترتیب شکل دارویی کرم، با اثر ضد درماتوفیتی مطلوب، نرم کنندگی، درخشندگی، یکنواختی فازی و ذره‌ای و دوام مناسب بدست آمد.

کلمات کلیدی: درماتوفیت، آویشن شیرازی، کرم.

۱- استادیار گروه فارماسیوتیکس دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
*نویسنده مسئول: moghimipour@yahoo.com، تلفن ۳۳۴۲۱۹۷، فاکس ۳۳۴۰۹۸۸
۲- استادیار گروه فارماکوگنوزی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
۳ - مربی گروه آبشناسی و مواد خوراکی دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور اهواز
۴ - دستیار تخصصی فارماسیوتیکس دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تهران

Archive of SID
www.SID.ir

مقدمه

تهاجم قارچ به بافت‌های بدن انسان تقریباً از اوایل سال ۱۸۰۰ میلادی شناخته شده بود و از سال۱۹۰۰ میلادی به بعد گزارشهای فراوانی از بیماریهای قارچی، عوامل بیماری زای مربوطه، انتشار جغرافیایی و شیوع آنها وجود داشته است. درماتوفیتوز، عارضه قارچی بافت‌های کراتینیزه شده مو، ناخن و لایه‌های شاخی پوست است که در نتیجه جایگزین شدن درماتوفیت‌ها در این نسوج حاصل می گردد.

عفونت در بچه‌ها شایع‌تر و در بزرگسالان نیز در اثر تماس با گربه و سگ‌های آلوده دیده می‌شود (۱). شیوع عفونت این درماتوفیت در ایران نسبتاً زیاد است. تریکوفیتون روبروم عامل کچلی پا و ناخن می‌باشد و به ندرت در ایجاد کچلی سر نیز دخالت دارد. تریکوفیتون وروکوزوم در انسان عفونت‌های شدید التهابی در سر، بدن و ناخن ایجاد می کند (۲).

بسیاری از داروهایی که اکنون در طب نوین در درمان بیماریها استفاده می‌شوند، از گیاهان تهیه شده‌اند. گیاه درمانی دانش کهنسالی است که ریشه در اعماق تاریخ دارد. با توجه به غنی بودن کشور ما از نظر گیاهان دارویی، تحقیق بیشتر خواص و اثرات درمانی این گیاهان و شناخت دقیق مواد مؤثره آنها و احتمالاً کاربرد صنعتی آنها از اهمیت فوق‌العاده‌ای برخوردار است.

گونه آویشن شیرازی گیاهی بوته‌ای و دارای ساقه‌های متعدد متعلق به خانوادهٔ نعناع (Labiateae) است. این گیاه در ایران، افغانستان و پاکستان می روید. اندام دارویی این گیاه، برگها و گل های آن است و از ترکیبات اصلی موجود در اسانس گیاه بومی ایران، کارواکرول و تیمول و همچنین لینالول و پاراسیمن بوده که اثرات ضد میکروبی آنها قبلا به اثبات رسیده است (۳ – ۵).

هدف از این تحقیق تعیین اثر ضدقارچی گیاه آویشن شیرازی *Zataria multiflora* Boiss. به روش برون تن بوده و سپس با استفاده از یک پایه مناسب، نسبت به فرمولاسیون شکل دارویی کرم موضعی از عصاره هیدروالکلی آن اقدام گردیده است.

مواد و روش کار

عصاره‌گیری از گیاه

ابتدا اندام هوایی گیاه، خشک و از پودر آن به روش خیساندن (Maceration) با حلال هیدروالکلی (اتانول ۸۰ درجه)، عصاره خام تهیه شد. پس از اتمام عصاره گیری، جهت حذف حلال وتغلیظ عصاره از دستگاه دوار تقطیر در خلا استفاده شد. سپس خاکستر تام و خاکستر نامحلول در اسید و درصد عصاره طبق روشهای استاندارد تعیین شد (۶). همچنین با استفاده از pH سنج ودردمای ۳۵ درجه سانتی گراد، pH محلول ۲ درصد عصاره در آب تعیین گردید.

بررسی اثرات ضدقارچی

ابتدا نمونه قارچهای استاندارد (میکروسپورم ژیپسئوم PTCC ۵۰۷۰، میکروسپورم کانیس PTCC ۵۰۶۹، تریکوفیتون روبروم PTCC ۵۱۴۳ و تریکوفیتون وروکوزوم PTCC ۵۰۵۶) در محیط سابورودکستروز آگار کشت داده شد. سپس کلنی های قارچ از محیط جدا شده و سوسپانسیون آنها در آب مقطر استریل حاوی توین ۸۰ تهیه گردید.

جهت رقیق سازی سوسپانسیون قارچی با استفاده از دستگاه اسپکتروفتومتر و طول موج ۵۸۰ نانومتر سوسپانسیونی با ۹۰ درصد عبور تهیه شد و غلظتی در حدود 1×10^{6} cfu/ml به دست آمد (۷).

محیط های کشت قارچی مورد استفاده عبارت بودند از، محیط سابورو دکستروز آگار (Merck, Germany) و محیط مایکو بیوتیک آگار (Scharlau, Spain) که هر کدام طبق دستور شرکت تولید کننده ساخته شد و در اتوکلاو استریل گردید.

جهت تعیین غلظت‌های لازم از عصاره در محیط کشت برای بررسی اثر ضد قارچی گیاه، ابتدا از غلظت‌های بالاتر

Archive of SID

www.SID.ir

استفاده شد. بعد از تأیید اثر ضدقارچی گیاه، حداقل غلظت موثر عصاره برای هر قارچ تعیین گردید. برای این منظور رقت های متوالی ۰/۵، ۰/۲۵، ۰/۱ و ۰/۰۵ گرم عصاره در صد میلی لیتر محیط کشت استفاده گردید.

در کلیهٔ مراحل ساخت محیط‌های کشت، بعد از اتوکلاو و بعد از این که دمای محیط به حدود ۴۵ درجه سانتی‌گراد رسید، محلول عصاره‌ها به آن اضافه شد تا اثر حرارت بر عصاره حذف شود. محیط‌های کشت مربوط به میکروسپورم ژیپسئوم و کانیس و تریکوفیتون روبروم در دمای معمولی آزمایشگاه نگهداری شد و محیط‌های آغشته به تریکوفیتون وروکوزوم درون انکوباتور دمای ۳۷ درجه سانتی گراد قرار داده شد تا سرعت رشد قارچ‌ها بیشترشود (۷). پلیت‌ها پس از ۷ و ۱۴ روز از نظر رشد قارچ ها یا عدم رشد بررسی گردید و در صورت مشاهده رشد، قطر کلنی دقیقاً اندازه‌گیری گردید.

طراحی فرمولاسیون فرآورده

با وجود این که امولسیون‌های روغن در آب (o/w) به عنوان متداول ترین پایه قابل شستشو با آب در تهیه کرم ها به کار می‌روند، ولی شکل امولسیون آب در روغن (w/o) به دلیل خاصیت پاک‌کنندگی بیشتر و نرم‌کنندگی مناسب برای فرآورده موردنظر انتخاب شد (۸). به این ترتیب، به عنوان الگویی برای انتخاب پایهٔ مناسب، فرمولاسیون عمومی مندرج در جدول ۱ مورد نظر قرار گرفت.

جدول ۱: مواد به کار رفته در فرمولاسیون عمومی کرم.

شماره	ماده به کار رفته	مقدار بر حسب درصد
۱	موم زنبور عسل	۸
۲	پارافین مایع	٦۳
۳	اسپرماستی	٤
٤	بوراکس	۱/۵
۵	آب	۲۳/۵

سپس، فرمولهایی با غلظت‌های مختلف این مواد و مواد جایگزین دیگر تهیه شد وتغییرات ایجاد شده در فرمولاسیون های تهیه شده مورد بررسی قرار گرفت. به طور کلی سه متغیر اصلی میزان فاز روغنی، میزان قوام و ویسکوزیته فرآورده و میزان ماده امولسیون کننده در فرمولاسیون فرآورده در نظر گرفته شد (۹). با توجه به این متغیرها، ساخت فرمول‌های با غلظت های مختلف از مواد مربوطه انجام شد.

از میان تمام فرمولاسیون‌های ساخته شده، فرمول برتر از نظر یکنواختی فازی و ذره‌ای، نرم‌کنندگی، قوام، جذابیت ظاهری و شفافیت در مقایسه با سایر فرمولاسیون‌ها، انتخاب شد. سپس با توجه به مقادیر مورد نیاز از عصاره آویشن شیرازی جهت تأمین اثر ضددرماتوفیت، فرمولاسیون با بهترین شرایط، مطابق جدول ۲ تهیه گردید.

جدول۲: نوع و مقدار مواد بکار رفته در فرمولاسیون کرم ضددرماتوفیت گیاهی به تفکیک فازهای آبی و روغنی.

	شماره	مواد به کار رفته	مقدار (درصد)
فاز روغنی	۱	موم زنبور عسل	۱۰
	۲	پارافین مایع	۵۸/۸
	۳	پارافین جامد	۱/۲
	٤	اسپرماستی	۵
	۵	پروپیل پارابن	۰/۰۵
	٦	بوراکس	۱
	۷	توئین ۸۰	۱/٤
فاز آبی	۸	متیل پارابن	۰/۱۵
	۹	اسیدلاکتیک	۰/۱۵
	۱۰	عصاره	۳- ۱
	۱۱	آب به مقدار کافی تا	۱۰۰

پس از بررسی‌های لازم، مقدار عصاره به کار رفته در فرمولاسیون، انتخاب شد. سپس فرمولاسیون مطلوب پس از رسیدن به تعادل (۴۸ ساعت پس از ساخت)، مورد آزمایش های کنترل قرار گرفت.

بررسی های فیزیکی و شیمیایی

الف- بررسی یکنواختی

۰/۵ گرم از نمونه های ساخته شده روی لام تمیزی گسترده شد

Archive of SID
www.SID.ir

و پس از قراردادن لامل تمیز روی آن، با میکروسکوپ نوری با بزرگنمایی ۱۰ و ۴۰ یکنواختی آن بررسی شد (۱۰).

ب- کرمینگ و کوالسانس

نمونه ۱۰گرمی فرآورده در بشر ریخته شد و پس از گذشت یک هفته، یک ماه و سه ماه از تاریخ ساخت که در شرایط محیط معمولی نگهداری شدند، کیفیت ظاهری آنها از نظر جدایی فازها و الحاق قطرات فاز داخلی ارزیابی شد و با نتایج حاصل از زمان ۴۸ ساعت پس از ساخت مورد مقایسه قرار گرفت (۱۱).

ج- آزمایش سانتریفوژ

نمونه درون لوله‌ای به شعاع ۱ سانتی متر ریخته شد و به مدت ۵، ۱۵، ۳۰ و ۶۰ دقیقه با سرعت ۲۰۰۰ دور در دقیقه سانتریفوژ شد. پس از این زمان نمونه‌ها از جهت دو فازی شدن و رسوب ذرات مورد بررسی قرار گرفت (۱۲).

د-آزمایش سیکل حرارتی

نمونه به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۵ درجه سانتی گراد (یخچال) و ۴۸ ساعت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد (دمای معمولی آزمایشگاه) قرار داده شد. این عمل شش مرتبه تکرار و سپس کیفیت ظاهری فرآورده‌ها بررسی شد (۱۲).

ه-آزمایش تغییرات دما

۳ نمونه ۲۰ گرمی از فرآورده و پایهٔ به تعادل رسیده، تهیه شد و یک نمونه در دمای۴ تا ۶ درجه سانتی گراد (دمای یخچال) و یک نمونه در دمای ۲۵ درجه‌سانتی‌گراد (دمای اتاق) و یک نمونه در دمای ۴۵ تا۵۰ درجه سانتی گراد (درون آون) قرار گرفت و پس از ۲۴ ساعت، یک ماه و سه ماه کیفیت نمونه ها بررسی شد (۱۲).

و-آزمایش سرد و گرم شدن

یک نمونهٔ ۲۰ گرمی از فرآورده و پایه به تعادل رسیده در ۶ دوره متوالی هر یک ۴۸ ساعت در دمای ۴۵ تا۵۰ درجه سانتی گراد و سپس ۴۸ ساعت در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد تحت تأثیر تغییرات دمایی قرار گرفتند و سپس، نمونه ها از نظر کیفیت ظاهری بررسی شدند (۱۲).

ز- تعیین pH فرآورده

پس از تهیه یک سوسپانسیون از فرآورده درحامل مناسب نیترات پتاسیم ۱درصد با استفاده از pH سنج تعیین شد. ضمن کار یک همزن مغناطیسی جهت ایجاد محیط یکنواخت پیرامون الکترود pH سنج در آن جای گرفت. pH فرآورده و پایه در فواصل زمانی ۴۸ ساعت، یک هفته، یک ماه و سه ماه پس از ساخت در شرایط ذکر شده، اندازه گیری شد. هر آزمایش سه بار تکرار گردید (۱۲، ۱۳).

ح- بررسی رئولوژی فرآورده

با استفاده از ویسکومتر بروکفیلد مدل DV-I و اسپیندل شماره ۶ رفتار رئولوژیک فرآورده بررسی شد. ابتدا نمونه در محفظه قرار گرفته و سرعت از کمترین مقدار تنش شروع و به تدریج افزایش داده شد. ویسکوزیته نمونه برحسب سانتی پواز در سرعتهای ۰/۳، ۰/۶، ۳، ۶ و۶۰ دور در دقیقه (rpm) اندازه گیری شد.

کنترل میکروبی نمونه ها

کفایت اثر محافظ ضد میکروبی به کاررفته در فرمولاسیون بر اساس روش استاندارد در فارماکوپه امریکا و انگلیس بررسی شد (۱۳، ۱۴).

تجزیه و تحلیل آماری

جهت مقایسهٔ نتایج حاصل، از آزمون آماری آنالیز واریانس تک متغیره یا مدل خطی عمومی استفاده شد و سپس در صورت وجود اختلاف بین گروه‌ها، آزمون توکی (Tukey test) انجام پذیرفت. در تمامی آزمایشهای مذکور، از هر غلظت سه نمونه تهیه و هر نمونه دوبار مورد آزمایش قرار گرفت و ارزش p کمتر از ۰/۰۵ به عنوان اختلاف معنی دار تلقی شد (۱۵).

نتایج

نتایج حاصل از بررسی ویژگیهای عصاره

درصد خاکستر تام ۰/۰۷ ± ۱۱/۷۵، درصد خاکستر نامحلول در اسید، ۰/۶ ± ۲/۸۹، pH محلول ۲ درصد عصاره ۰/۰۴ ± ۵/۷۶ تعیین شد.

Archive of SID
www.SID.ir

تعیین MIC عصاره

نتایج مربوط به تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره بر رشد قارچ‌های درماتوفیت و تعیین MIC عصاره در جداول ۳ و ۴ آمده است.

جدول ۳ : تأثیر غلظت‌های مختلف عصاره برحسب گرم در ۱۰۰ میلی‌لیتر محیط کشت بر رشد کلنی قارچ‌های درماتوفیت مورد بررسی در محیط کشت SCC پس از یک و دو هفته (n= ۳).

نام قارچ	غلظت عصاره	میانگین قطرکلنی قارچی(mm) پس از ۷ روز	پس از ۱٤ روز
Trichophyton rubrum	شاهد (فاقد عصاره)	۳/۱ ± ۰/۰۵	٤/۹ ± ۰/۰٤
	۰/۰۵	۲/۹ ± ۰/۰٤	٤/۵ ± ۰/۱٦
	۰/۱	۱/۹ ± ۰/۰٤	۳/۹ ± ۰/۰٤
	۰/۲۵	۰/۸ ± ۰/۰۳	۲/٤ ± ۰/۰۲
	۰/۵	۰	۰
	۰/۷۵	۰	۰
	۱	۰	۰
Trichophyton verrucosum	شاهد	۰/۸ ± ۰/۰۷	۰/۵ ± ۰/۰٦
	۰/۰۵	۰/۷ ± ۰/۰۰٤	۰/٤ ± ۰/۰۰
	۰/۱	۰/۵ ± ۰/۰۳	۰/۳ ± ۰/۰۱
	۰/۲۵	۰	۰
	۰/۵	۰	۰
	۰/۷۵	۰	۰
	۱	۰	۰
Microsporum canis	شاهد	۳/۷ ± ۰/۰۲	٦/٤ ± ۰/۰۵
	۰/۰۵	۲/۹ ± ۰/۰٤	۵/۵ ± ۰/۰٤
	۰/۱	۲/۵ ± ۰/۱	۵/۲ ± ۰/۰٤
	۰/۲۵	۰/٤ ± ۰/۱۳	۱/۹ ± ۰/۰۱
	۰/۵	۰	۰
	۰/۷۵	۰	۰
	۱	۰	۰
Microsporum gypseum	شاهد	۳/۷ ± ۰/۰۲	٦/۷ ± ۰/۰۷
	۰/۰۵	۳/٦ ± ۰/۱	۵/۳ ± ۰/۰۲
	۰/۱	۲/۹ ± ۰/۰٤	٤/۸ ± ۰/۰٤
	۰/۲۵	۱/۸ ± ۰/۰۲	۱/٤ ± ۰/۰۳
	۰/۵	۰	۰
	۰/۷۵	۰	۰
	۱	۰	۰

نتایج آزمایش های پایداری فرآورده

آزمایش های کنترلی و تعیین پایداری فرآورده، بعد از ۴۸ ساعت از زمان ساخت مطابق روشهای استاندارد انجام شد.

فرآورده و پایه تهیه شده از نظر یکنواختی، ظاهر، عدم ایجاد کرمینگ و کوالسانس در یک دورهٔ سه ماهه در حد مطلوب باقی ماندند. در طی آزمایشهای پایداری شامل سانتریفوژ، تغییرات دما، سرد و گرم شدن، انجماد و ذوب، فرآورده و پایه، پایداری فیزیکی و کیفیت ظاهری خود را حفظ نمودند. pH فرآورده نیز در طول مدت نگهداری دستخوش تغییر آماری معنی داری نگردید. همچنین هیچ گونه تغییر معنی داری در ویسکوزیته نمونه ها در دوره سه ماهه بررسی مشاهده نگردید (جدول ۵).

جدول ٤ : MIC بدست آمده برحسب درصد عصاره در مورد هر قارچ پس از ١٤ روز (n=۵).

Fungi	MIC (g/100ml)
Trichophyton rubrum	٪۰/۵
Trichophyton verrucosum	٪۰/۲۵
Microsporum canis	٪۰/۵
Microsporum gypseum	٪۰/۵

جدول ۵: نتایج مربوط به تغییرات ویسکوزیته فرآورده با استفاده از سرعت های مختلف در یک دوره سه ماهه (n= ۳).

سرعت	ویسکوزیته فرآورده بر حسب CPS (در زمانهای مختلف پس از ساخت)			
	٤٨ ساعت	یک هفته	یک ماه	سه ماه
۰/۳	۳۸۱ ± ۰/۰۵	٤۰۰±۰/۰۱	۳۹۱/٤±۰/۰۲	۳۸۹/۲±۰/۰۰
۰/٦	۱۳۹/۸±۰/۰۲	۱٤۰/۱±۰/۰۱	۱٤۳/۲±۰/۰۰	۱٤۱/۲±۰/۵۸
۳	۷/۹±۰/۰۱	۸/۱±۰/۰۱	۹/۱±۰/۰۰	۸/۲±۰/۰۰
٦	۲/۵۸±۰/۰۰	۲/۷۸±۰/۰۰	۲/۱٤±۰/۰۱	۳/۰۰±۰/۰۰
٦۰	۰/۰٤±۰/۰۰	۰/۰٤±۰/۰۰	۰/۰٤±۰/۰۰	۰۰/۰۳±۰/۰۰
۰/۳	۰/۰٤±۰/۰۰	۰/۰٤±۰/۰۰	۰/۰٤±۰/۰۰	۰۰/۰۳±۰/۰۰

بر اساس نتایج بدست آمده از آزمایش کفایت محافظ ضدمیکروبی، مادهٔ محافظ قدرت جلوگیری از رشد میکروارگانیسم ها را، به خوبی از خود نشان داد. یعنی ماده محافظ به کار رفته دارای قدرت اثر مطلوب است. برای ساخت

Archive of SID
www.SID.ir

فرمولاسیون‌های مختلف این پروژه، از یک فرمولاسیون پایه (جدول ۱)، شامل ۸ درصد موم زنبور عسل، ۶۳ درصد پارافین مایع، ۴ درصد اسپرماستی، ۱/۵ درصد بوراکس و ۲۳/۵ درصد آب استفاده شد. سپس با افزودن مواد دیگر و ایجاد تغییراتی در فرمول پایه، سایر فرمولاسیون ها تهیه گردید. اشکالاتی که در فرمول پایه وجود داشت، چربی زیاده از حد، قوام و شفافیت بسیار کم و ظاهر دانه دانه بود. بنابراین با ایجاد تغییراتی در فرمول، سعی شد این اشکالات برطرف شود؛ به این ترتیب که سه متغیر اصلی (میزان فاز روغنی، میزان قوام و میزان امولسیفایر) مورد بررسی قرار گرفت. در ابتدا به منظور دستیابی به بهترین میزان فاز روغنی با بیشترین اثر نرم‌کنندگی و پایداری، اقدام به ساخت فرمولهایی با نسبت‌های متفاوت از موم زنبور عسل و پارافین مایع شد. تغییرات انجام شده در فرمولاسیون اولیه برای رسیدن به وضعیت مطلوب و نتایج بررسی برخی از ویژگیهای این نمونه ها در جداول ۶ و ۷ مشاهده می شود.

جدول ٦: مقادیر مواد به کار برده شده در فرمولاسیون های ۱ تا ۱۲ برحسب گرم* و نتایج مربوط به تعیین pH و پایداری آنها (n= ۳).

مواد	شماره فرمولاسیون											
	پایه	۱	۲	۳	٤	٥	٦	۷	۸	۹	۱۰	۱۱	۱۲
موم زنبور عسل	۸	۸	۹	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰
پارفین مایع	٦۳	٦۲	٦۱	٦۰	٥۹/٤	٥۹/۱	٥۸/۸	٥۸/٥	٥۸/۸	٥۸/۸	٥۸/۸	٥۸/۸	٥۸/۸
پارافین جامد	–	–	–	–	۰/٦	۰/۹	۱/۲	۱/٥	۱/۲	۱/۲	۱/۲	۱/۲	۱/۲
اسپرماستی	٤	٤	٤	٤	٤	٤	٤	٤	٤	٤	٤	٤	٤
بوراکس	۱/٥	۱/٥	۱/٥	۱/٥	۱/٥	۱/٥	۱/٥	۱/٥	۱/۲	۱	۰/۹	۰/۷	۱
توین ۸۰	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	–	۱
میانگین pH	–	–	–	–	–	–	–	۸/۲٥	۸/۲۲	۸/۱٥	۸/۱۰	۸/۰٥	۷/٥۰
نتیجه قوام	روان	روان	روان	متوسط	روان	روان	متوسط	سفت	سفت	متوسط	متوسط	متوسط	متوسط
دوام	ناپایدار	ناپایدار	ناپایدار	ناپایدار	ناپایدار	ناپایدار	ناپایدار	ناپایدار	ناپایدار	ناپایدار	ناپایدار	ناپایدار	ناپایدار

* به همه فرمولاسیون ها تا حجم ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر افزوده شده است.

جدول ۷ : مقادیر مواد بکار برده شده در فرمولاسیون های ۱۲ تا ۲۵ برحسب گرم* و نتایج مربوط به تعیین pH و پایداری آنها (n= ۳).

مواد	شماره فرمولاسیون											
	۱۳	۱٤	۱٥	۱٦	۱۷	۱۸	۱۹	۲۰	۲۱	۲۲	۲۳	۲٤	۲٥
موم زنبور عسل	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰	۱۰
پارفین مایع	٥۸/۸	٥۸/۸	٥۸/۸	٥۸/۸	٥۸/۸	٥۸/۸	٥۸/۸	٥۸/۸	٥۸/۸	٥۸/۸	٥۸/۸	٥۸/۸	٥۸/۸
پارافین جامد	۱/۲	۱/۲	۱/۲	۱/۲	۱/۲	۱/۲	۱/۲	۱/۲	۱/۲	۱/۲	۱/۲	۱/۲	۱/۲
اسپرماستی	٤	٤	٤	٤	٤	۳	٤/٥	٤/٥	٤/٥	٥	٥	٦	۷
بوراکس	۱	۱	۰/۹	۰/۹	۰/۹	۱	۱	۱	۰/۹	۱	۰/۹	۱	۱
توین ۸۰	۱/۲	۱/٤	۱	۱/۲	۱/٤	۱/٤	۱/٤	۱/۲	۱	۱/٤	۱	۱/٤	۱/٤
میانگین pH	۷/۳٥	۷/۲۸	۷/۲۸	۷/۲۲	۷/۰۰	۷/۱۰	۷/٤۲	۷/۳۲	۷/۲٥	٦/٤۰	٦/۷۰	٦/۳٥	٦/۲۸
نتیجه قوام	متوسط	متوسط	متوسط	متوسط	متوسط	متوسط	متوسط	متوسط	مطلوب	مطلوب	نرم	نرم	نرم
دوام	ناپایدار	پایدار	پایدار	ناپایدار	ناپایدار	ناپایدار	ناپایدار	ناپایدار	پایدار	پایدار	پایدار	پایدار	پایدار

* به همه فرمولاسیون ها تا حجم ۱۰۰ میلی لیتر آب مقطر افزوده شده است.

Archive of SID

www.SID.ir

مجله علوم پایه پزشکی ایران، جلد ۱۰، شماره۱، بهار ۱۳۸۶، ۱۴ - ۸
تاریخ دریافت: ۸۵/۲/۲۴- تاریخ پذیرش: ۸۶/۵/۱۱

فرمول‌های ۱ و۲ بسیار نرم و روان بودند و فرمول ۳ قوام بهتری داشت ولی هر سه، خصوصاً فرمول‌های ۱ و ۲ خیلی چرب بود و ۴۸ ساعت پس از تهیه دو فاز گردید. در مرحله دوم، از پارافین جامد به منظور ایجاد قوام و سفتی بهتر در فرمول استفاده شد (۱۶). پارافین جامد با مقادیر مختلف، به کار رفت و تأثیر این مقادیر بر خصوصیات کرم بررسی شد. در فرمولاسیون‌های ۴ تا ۷، با افزایش مقدار پارافین جامد، قوام و سفتی کرم افزایش یافت. در غلظت کمتر از ۱/۲ درصد پارافین جامد، فرآورده روان بود و قوام بسیار کمی داشت و در غلظت بیشتر از آن سفت بود. از این رو، غلظت ۱/۲ درصد برای پارافین جامد انتخاب شد. البته امولسیون‌ها، همگی ناپایدار بود و پس از تست‌های سانتریفوژ و حرارتی، شکست فازها اتفاق می‌افتاد بنابراین در مرحله بعدی از بوراکس، جهت افزایش پایداری امولسیون استفاده شد.

فرمولاسیون ۸، سفت بود و ظاهری ناصاف و کدر داشت. فرمول۹، قوام بهتری نسبت به فرمول ۸ داشت این امولسیونها ۴۸ ساعت پس از ساخت پایدار بود ولی بعد از تست سانتریفوژ و حرارتی، دچار شکست فازها شد. در فرمول۱۰، قوام و ظاهر کرم نسبتاً مطلوب بود و امولسیون تا ۴۸ ساعت پس از ساخت پایدار بود ولی در فرمول ۱۱، به دلیل مقدار ناکافی بوراکس، کرم تیره و دانه دانه و ناپایدار بود. به این ترتیب، مقادیر به کار رفته بوراکس، در فرمول‌های ۹ و۱۰، کافی و مناسب به نظر می‌رسید. در ادامه کار، برای ایجاد پایداری بیشتر در امولسیون و جلوگیری از تغییرات pH فرآورده، از توئین ۸۰ ، همزمان با بوراکس استفاده شد و مقادیر متفاوت توئین ۸۰ ، قطره قطره به فرمول‌های ۹ و۱۰ افزوده شد و تأثیر آن، بر فرمولاسیون‌ها بررسی گردید.

فرمول‌های ۱۲ تا ۱۷، همگی قوام مطلوبی داشتند و امولسیون ها ۲ روز پس از ساخت پایدار بودند. پس از تست پایداری حرارتی در فرمولاسیون های ۱۲ و ۱۳ جدایی فاز مشاهده شد و در نمونه های F_{16} و F_{17} پس از تست سانتریفیوژ رسوب تشکیل شد. فرمولهای ۱۴ و ۱۵، امولسیون‌های مطلوبی را ایجاد کردند که پس از تست‌های سانتریفوژ و سیکل حرارتی، پایداری خود را حفظ نمودند. البته این فرمولها از نظر، شفافیت و جذابیت ظاهری تا حدودی نامطلوب بودند، به همین دلیل، از مقادیر متفاوت اسپرماستی در آن‌ها استفاده شد. اسپرماستی را می‌توان با غلظت ۱ تا ۱۲/۵ درصد در کلدکرم ها به عنوان تعدیل کننده ویسکوزیته، نرم‌کننده و درخشان کننده به کار برد (۱۷). لذا، این ماده در فرمولاسیون‌های ۱۸ تا ۲۵ با غلظت‌های متغیر از ۳ تا ۷ درصد به کار رفت و تأثیر این تغییرات بر فرمولاسیون بررسی شد به طوری که فقط فرمول‌های ۲۱ و ۲۲ از نظر قوام و نرمی مطلوب بود ولی فرمولاسیون ۲۲، یکنواختی فازی و ذره‌ای، شفافیت و درخشندگی ظاهری بهتری داشت به همین دلیل، از میان ۲۵ فرمولاسیون برتر شناخته شد. سپس، جهت تعیین غلظت عصاره در فرمول با اثر ضد درماتوفیتی مناسب، اقدام شد. نظر به این که حداقل غلظت عصاره در مهار رشد قارچ‌های مورد بررسی (جدول ۴)، ۰/۵ درصد تعیین شده بود، فرآورده به سه فرم۱، ۲ و ۳ درصد از عصاره تهیه شد و از میان آنها فرمولاسیون حاوی ۲ درصد عصاره به عنوان فرآوردۀ نهایی، انتخاب شد.

از آن جایی که pH پوست طبیعی بین ۴/۲ تا ۵/۳ است، (۶،۱۱) pH برابر ۵/۳ برای نمونه ها در نظر گرفته شد. با توجه به نتایج بدست آمده برای نمونه های F_7 تا F_{25} معلوم شد که با کاهش میزان بوراکس و افزایش درصد توین ۸۰، pH نمونه ها کاهش می یابد و ..... مقادیر بوراکس و توین به طور دلخواه، به دلیل اثرات نامطلوب در فرمولاسیون میسر نیست. از این رو جهت تنظیم pH فرآورده از اسید لاکتیک استفاده شد تا pH نهایی به میزان ۵/۳ برسد.

نظر به این که، کرم‌ها و سایر فرآورده‌های موضعی، محتوی آب و سایر مواد قابل تجزیه به وسیله میکروارگانیسم‌ها می‌باشند، بنابراین باید این فرآورده‌ها، در مقابل خطر آلودگی میکروبی محافظت گردند (۱۸،۹).

در USP(2002)، افزودن محافظ‌ها به فرمولاسیون کرم‌ها، امولسیون‌ها و فرآورده‌های خوراکی توصیه شده است

Archive of SID
www.SID.ir

(۱۳). لذا، از استرهای متیل و پروپیل اسید پاراهیدروکسی بنزوییک اسید به عنوان مادهٔ محافظ در فرمولاسیون استفاده شد. نتایج بررسی پایداری میکروبی فرآورده نهایی، نشان دهنده عدم رشد میکروارگانیسم ها در طول مدت نگهداری است.

بحث و نتیجه‌گیری

با توجه به نتایج بدست آمده، اثر بخشی عصاره هیدروالکلی گیاه .*Zataria multiflora* Boiss در مهار رشد چهار قارچ درماتوفیت که عامل انواع کچلی‌ها است، به خوبی به اثبات رسید. لازم به ذکر است که عصاره این گیاه نسبت به عصاره سایر گیاهانی که تاکنون اثر ضدقارچی آنها مورد بررسی قرارگرفته، بسیار مؤثرتر است.

چکیده ای از کارهایی که تاکنون بر اثرات ضد درماتوفیتی گیاهان مختلف صورت گرفته است در جدول ۸ مشاهده می گردد.

جدول ۸: مقایسه MIC تعیین شده در مورد عصاره گیاه آویشن شیرازی با MIC سایر گیاهانی که اثر آنها بر قارچ‌های درماتوفیت بررسی شده است (۲۰،۱۹،۱۵)

MIC تعیین شده بر حسب گرم بر صد میلی لیتر / گیاه مورد بررسی	اندام مورد بررسی	قارچ های درماتوفیت مورد بررسی			
		میکروسپوروم کانیس	میکروسپورم ژیپسئوم	تریکوفیتون روبروم	تریکوفیتون وروکوزوم
Zataria multiflora	اندام هوایی	۰/۵	۰/۵	۰/۵	۰/۲۵
حنا *Lawsonia inermis*	برگ	۱۲/۵	۱۵	۱۵	۱۲/۵
سیر(عصاره آبی) *Allium sativum*	پیاز	۷/۵	۷/۵	۵	۵
گردو *Juglans regia*	برگ	۲۰	۱۵	۲۲/۵	۱۰
گل سرخ *Rosa damascena*	گلبرگ	۱۲/۵	۱۵	۱۲/۵	۱۰
زرد چوبه *Curcuma longa*	ریزوم	۱۲/۵	۱۲/۵	۳۰	۶۰
شنبلیله *Trigonella foenum*	دانه	۱۵	۲۵	۲۰	۸
Azadirachta indica	برگ	-*	۲۵	۲۵	۱۲/۵
Psoralea corylifolia	دانه	۶/۲۵	۶/۲۵	۱۲/۵	۱۲/۵
Piper betle,	برگ	۱۱/۵	۱۱/۹	-*	-*
Alpinia galanga	ریزوم	۲/۶	۳/۲	-*	-*
Allium ascalonicum	پیاز	۷	۷/۳	-*	-*

* بررسی نشده است.

با استفاده از داده های موجود در این جدول، می توان به اثر قابل توجه عصاره هیدروالکلی گیاه آویشن شیرازی بر مهار رشد قارچ‌های درماتوفیت پی برد. با یک مقایسه ساده میان نتایج بررسی اثر ضد قارچی حنا و آویشن شیرازی، مشاهده می‌شود که آویشن شیرازی بر این قارچ‌ها، بسیار مؤثرتر است. در مورد میکروسپورم کانیس و تریکوفیتون وروکوزوم مقدار MIC تعیین شده از عصاره آویشن شیرازی به ترتیب ۰/۵ درصد و ۰/۲۵ درصد و از عصارهٔ هیدروالکلی حنا ۱۲/۵ درصد

Archive of SID
www.SID.ir

تعیین شده است و اثربخشی عصاره آویشن شیرازی بر قارچ تریکوفیتون روبروم،۳۰ برابر بیشتر از اثر عصاره هیدروالکلی حنا بر روی این قارچ است.

همچنین بر اساس نتایج بدست آمده برای گیاهان *Piper betle* و *Allium ascalonicum*، میزان MIC آنها در محدوده بیش از ۷ درصد تعیین گردیده است که به مراتب بیش از عدد مربوط به گیاه آویشن شیرازی است. حتی در مورد گیاه *Alpinia galangal* که بهترین اثرات ضدقارچی را داشته است مقدار MIC بدست آمده بیش از ۵ برابر گیاه آویشن شیرازی است (۱۵،۱۹،۲۰).

با توجه به این که در حال حاضر، استفاده از داروهای طبیعی و به کارگیری عصاره‌های گیاهی و اسانس‌های روغنی در زمینه بهداشت پوست خصوصاً درمان عفونت‌های میکروبی و قارچی پوستی گسترش فراوان یافته است، لذا در این پروژه سعی گردید که عصاره هیدروالکلی آویشن شیرازی با اثر درمان کننده عفونت‌های درماتوفیتی در یک فرمولاسیون موضعی مناسب و سازگار به کار برده شود.

لازم به ذکر است که میزان عصاره مورد استفاده در فرآورده های گیاهی اغلب بسیار بیش از ۲ درصد است و به عنوان مثال در تهیه کرم ضد درماتوفیت با استفاده از برگ های گیاه *P. betle*، از ۱۰ درصد عصاره اتانلی آن استفاده شده است (۱۵).

با توجه به بررسی های صورت گرفته و نتایج بدست آمده، در نهایت فرآوردهٔ موضعی با فرمولاسیون انتخابی شامل۱۰ درصد موم زنبور عسل، ۵۸/۸ درصد پارافین مایع، ۱/۲ درصد پارافین جامد، ۵ درصد اسپرماستی، ۱ درصد بوراکس، ۱/۴ درصد توین۸۰، ۰/۱۵ درصد اسید لاکتیک، ۰/۱۵ درصد متیل پارابن، ۰/۰۵ درصد پروپیل پارابن، به مقدار کافی آب مقطر و ۲ درصد عصاره با اثر ضد درماتوفیتی مطلوب و کیفیت و پایداری مناسب تهیه گردید.

با توجه به اثر شایان توجه گیاه آویشن شیرازی برقارچ های درماتوفیت پیشنهاد می شود که ابتدا اثر بخشی فرآورده در محیط *in vivo* نیز مورد ارزیابی قرار گرفته و سپس با انجام مطالعات بالینی، اثرات سمی، فارماکولوژیکی و عوارض جانبی آن نیز بررسی گردد و همچنین از آن جهت تهیه اشکال مناسب دارویی دیگر نیز اقدام گردد.

تشکر و قدردانی

بدین وسیله از شرکت گل دارو به خاطر اهدای اندام های هوایی گیاه آویشن شیرازی جهت انجام این تحقیق قدردانی می گردد.

References

1. Jawetz E, Melnick JL, Adelbecrg EA. Review of Medical Microbiology, 17th ed.California :Appleton & Lange; 1987. 320-323.
2. Freg D, Oldfield JR, Bridger CR. Color Atlas of phathogenic Fungi.Chicago; Year Book Medical Fub;1979. 27, 33, 52, 77.
3. Sardari S, Amin G, Micetich RG. Phytopharmaceuticals, part 1. Antifungal Activity of selected Iranian and Canadian plant . Pharmaceu Biol 1998; 36: 180-188.
4. Shafiee A, et. al. Volatile constituents and antimicrobial activity of Zataria multiflora. J chem. & chem Eng 1999; 1:75-80.
5. Farooq MO, Gupta GS. Essential oil of Zataria multiflora. Perfum Essenti oil Record 1954; 45; 287-289.
6. Duke JA. CRC Handbook of Medicinal Herbs. Florida : CRC press;1984. 483-486, 567.
7. Koneman EW, Roberts GD. Pictorial Laboratoary Mycology, 3rd ed. William & Wilkins;1985. 44-45,89, 100.
8. Paul B. Encyclopedia of Emulsion Thechnology, USA: Thieme;1993; .1: 131, 213, 405, 425.
9. Gennuro AR. Remingtion's Pharmacetical Science, 21st ed. London: Mack Publishing Co;2002. 760-763.

Archive of SID
www.SID.ir

10. Buhse L, Kolinski R, Westenberger B. et al. Topical drug classification. Inte J Pharmaceu 2005; 295(1-2): 101-112.
11. Aulthon ME. Pharmaceutices, The Science of Dosage Form Design, 2nd ed. NewYork: Churchill-Livingstone; 2002. 294 –297.
12. Lachman L, Lieberman HA, Kanig JL. Theory and practice of Industrial Pharmacy, 3rd ed. Philadelphia: LEA & FEBIGER;1989. 526-530.
13. The United States Pharmacopeia, 25th ed.Washington:USA convention INC; 2002. 296-298, 1869-1883.
14. Knoblock K, Weis N. Mechanism of Antimicrobial Activity of Essential Oils. Planta Medica 1986; 556.
15. Trakranrungsie N, Chatchawanchonteera A, Khunkitti W. Ethnoveterinary study for antidermatophytic activity of Piper betle, Alpinia galanga and Allium ascalonicum extracts in vitro. Res Vet Sci doi 2007;10.1016/j.rvsc.03.006.
16. Poucher WA. Poucher's Perfumes, Cosmetic & Soaps. 9th ed. London: Chapman & Hall; 3: 553-554.
17. Bugay DE, Findlay WP. Pharmaceutical Excipients. USA: Marcel Decker Inc; 1999. 94: 681- 682.
18. British Pharmacopeia Codex., London; 1992,2: 722-730.
19. Natarajan V, Venugopal PV, Menon T. Effect of Azadirachta indica on the growth pattern of dermatophytes. Indian J Medi Microbiology 2003; 21(2): 98-101.
20. Rajendra Prasad N, Anandi C, Balasubramanian S, Pugalendi KV. Antidermatophytic activity of extracts from Psoralea corylifolia (Fabaceae) correlated with the presence of a flavonoid compound. J Ethnopharmacol; 2004; 91: 21–24.

Archive of SID

www.SID.ir