

Antibacterial Activities of Gel Containing 5% Hydroalcoholic Extract of *Rhamnus cathartica* L. bark

Sarah Nayyeri¹,
 Mohammad Azadbakht²,
 Aroona Chabra³,
 Hossein Asgarirad⁴,
 Jafar Akbari⁵,
 Ali Davoodi³,
 Ali Farmoudeh⁶,
 Amir Hossein Babaei⁶

¹ Pharmacy Student, Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

² Professor, Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

³ PhD Student in Pharmacognosy, Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁴ Associate Professor, Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁵ Professor, Department of Pharmaceutics, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

⁶ PhD Student in Pharmaceutics, Student Research Committee, Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran

(Received June 16, 2019 ; Accepted December 24, 2019)

Abstract

Background and purpose: Acne is a chronic inflammatory disease of the pilosebaceous glands caused by opportunistic microorganisms. The *Rhamnus cathartica* is known to have biological and antioxidant properties. This research aimed at investigating the in vitro effect of gel containing 5% *R. cathartica* extract on acne vulgaris.

Materials and methods: The gel formulation contained 25g of dried *R. cathartica* bark extract, 0.5 liters distilled water, glycerin 50g, carbopol 940 5g, methyl paraben 0.75g, and propyl paraben 0.5g. After 24 hours, the formulation was put outside the refrigerator. Then, triethanolamine was added to the formulation under stirring with 500 rpm to solidify the gel. The effect of the product was measured against *Cutibacterium acnes*, *Staphylococcus epidermidis*, and *Staphylococcus aureus* and MIC and MBC values were also determined.

Results: Total phenolic content of *R. cathartica* was 351.6±4.5 mgGA/g/DW, total flavonoid content was 23.15±1.355 mgCE/g/DW, and total anthraquinone content was 1.85 ± 0.05 mgAE/g/DW. The pH of the product was 5.5-6. The MIC values of *R. cathartica* 5% gel were 195.3 µg/ml, 24.41 µg/ml, and 97.65 µg/ml against *C. acnes*, *S. epidermidis* and *S. aureus*, respectively. The MBC testing showed 25000 µg/ml, 25000 µg/ml, and 12500 µg/ml against *C. acne*, *S. epidermidis* and *S.aureus*.

Conclusion: *R. cathartica* is believed to contain active ingredients and can act as an antibiotic against acne causing microorganisms.

Keywords: *Rhamnus cathartica*, acne vulgaris, *S. aureus*, MIC, MBC

J Mazandaran Univ Med Sci 2020; 29(182): 106-110 (Persian).

* Corresponding Author: Mohammad Azadbakht - Faculty of Pharmacy, Mazandaran University of Medical Sciences, Sari, Iran (E-mail: azadbakht110@gmail.com)

فعالیت ضد باکتریایی ژل حاوی ۵ درصد عصاره هیدروالکلی پوست گیاه *Rhamnus cathartica* L.

سارا نیری^۱
محمد آزادبخت^۲
آرونا چابرا^۳
حسین عسگری راد^۴
جعفر اکبری^۵
علی داوودی^۳
علی فرموده^۶
امیر حسین بابایی^۶

چکیده

سابقه و هدف: آکنه یک بیماری التهابی مزمن مجاری پیلوسباسه بوده که علت اصلی آن، میکروارگانیزم‌های فرصت طلب پوستی می‌باشد. ترکیبات گیاه *Rhamnus cathartica* L. دارای خواص بیولوژیک و آنتی‌اکسیدانی می‌باشند. هدف از این مطالعه، بررسی تأثیر آنتی باکتریال ژل حاوی ۵ درصد عصاره این گیاه به صورت برون تنی می‌باشد.

مواد و روش‌ها: در این مطالعه آزمایشگاهی، اجزای فرمولاسیون ژل حاوی ۰/۵ لیتر آب مقطر، ۵۰ گرم گلیسرین، ۵ گرم کربوپل ۹۴۰، ۰/۷۵ گرم متیل پارابن و ۰/۵ گرم پروپیل پارابن بود. پس از ۲۴ ساعت فرمولاسیون تولیدی از یخچال خارج شد و زیر همزن با دور ۵۰۰ rpm تری اتانول آمین به محتویات بشر افزوده شد تا ژل مستحکم گردد. سپس اثر فرآورده تهیه شده بر روی باکتری‌های مورد مطالعه ارزیابی و میزان MIC و MBC تعیین شدند.

یافته‌ها: محتوای فنلی در هر صد گرم فرآورده حاصل $351/6 \pm 4/5$ mgGA/g/DW، محتوای فلاونوئید $23/15 \pm 1/355$ mgCE/g/DW و محتوای آنتراکینونی در هر صد گرم فرآورده $0/05 \pm 1/85$ میلی گرم در گرم به دست آمد. فرمولاسیون ژل با میزان ۵ درصد از عصاره خشک گیاه رامنوس کاتارتیکا دارای رنگ قهوه‌ای و دارای بویی ملایم بود. همچنین، pH فرآورده برابر با ۵/۵-۶ بود. نتایج تست MIC ژل حاوی عصاره گیاه رامنوس کاتارتیکا علیه باکتری‌های کوباکتریوم آکنه، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب برابر با ۱۹۵/۳، ۲۴/۴۱ و ۹۷/۶۵ µg/ml بود. نتایج تست MBC ژل پلاسبو علیه باکتری‌های کوباکتریوم آکنه، استافیلوکوکوس اپیدرمیدیس و استافیلوکوکوس اورئوس به ترتیب برابر با ۲۵۰۰۰، ۲۵۰۰۰ و ۱۲۵۰۰ µg/ml بود.

استنتاج: گیاه رامنوس دارای ترکیبات فعالی است که می‌توانند به عنوان آنتی‌بیوتیک علیه پاتوژن‌های دخیل در آکنه عمل کنند.

واژه های کلیدی: رامنوس کاتارتیکا، آکنه، استافیلوکوک اورئوس، MIC، MBC

مقدمه

آکنه یک بیماری التهابی مزمن مجاری پیلوسباسه است که ناشی از برهمکنش چهار عامل بیماری‌زای افزایش کراتینیزه شدن پوست، عامل میکروبی پروپیونی باکتریوم آکنه، التهاب، و افزایش تولید سبوم می‌باشد. اگر چه

E-mail: azadbakht110@gmail.com

مؤلف مسئول: محمد آزادبخت - ساری: کیلومتر ۱۷ جاده دریا، مجتمع پیامبر اعظم (ص)، دانشکده داروسازی

۱. دانشجوی دکتری داروسازی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۲. استاد، گروه فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۳. دانشجوی دکتری تخصصی فارماکوگنوزی، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۴. دانشیار، گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۵. استاد، گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

۶. دانشجوی دکتری تخصصی فارماسیوتیکس، کمیته تحقیقات دانشجویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی مازندران، ساری، ایران

تاریخ دریافت: ۱۳۹۸/۳/۲۶ تاریخ ارجاع جهت اصلاحات: ۱۳۹۸/۳/۲۹ تاریخ تصویب: ۱۳۹۸/۱۰/۳

آکنه معمولاً بیماری جدی تلقی نمی‌شود، اما به علت ایجاد اسکار ناشی از بهبود ضایعات التهابی می‌تواند مشکل زیبایی برای بیماران ایجاد کند. آکنه زمانی رخ می‌دهد که مجرای غدد سباسه مسدود می‌شود و سبوم در فولیکول مو و غدد سباسه تجمع یابد. تجزیه شیمیایی تری گلیسیرید در سبوم در اثر فعالیت باکتری‌ها باعث رها شدن اسیدهای چرب آزاد می‌گردد که منجر به واکنش‌های التهابی می‌شود و ضایعاتی مانند کومدون و آکنه را به وجود می‌آورد. از طرفی نوسان میکروبی در اکوسیستم پوست باعث ایجاد آشفستگی و در نهایت بیماری می‌شود. پروپیونی باکتریوم آکنه پاتوژن اصلی دخیل در ایجاد آکنه محسوب می‌شود که مدیاتورهای التهابی از جمله رادیکال‌های آزاد اکسیژن و سایتوکاین‌های پیش‌التهابی را فعال می‌سازد. با توجه به نقش اساسی میکروارگانیسم‌های فرصت طلب در پاتوژنز بیماری آکنه و مقاومت این عوامل بیماری‌زایه درمان‌های آنتی‌بیوتیکی رایج، تحقیقات برای یافتن منابع آنتی‌بیوتیک جدید در گیاهان رو به افزایش است (۲، ۱). گیاه *Rhamnus cathartica* L. درختی کوتاه و خاردار بوده که در ارتفاعات استان‌های گلستان، مازندران، گیلان و آذربایجان شرقی می‌روید (۳). مشتقات آنتراکینونی از مهم‌ترین ترکیبات این گیاه بوده که روی باکتری‌های گرم مثبت موثر می‌باشند؛ از طرفی ترکیب امودین علیه باکتری گرم منفی اشرشیاکلاهی و استاف اورئوس نیز موثر می‌باشد (۴). هدف از این مطالعه بررسی اثر آنتی‌باکتریال ژل حاوی ۵ درصد (با توجه به مطالعات قبلی) عصاره گیاه *Rhamnus cathartica* می‌باشد (۴).

مواد و روش‌ها

در این مطالعه آزمایشگاهی، پوست گیاه *Rhamnus cathartica* L. از منطقه حفاظت شده هزارجریب شهرستان نکا جمع‌آوری شده و بعد از تهیه نمونه هرباریومی توسط متخصص سیستماتیک گیاهی مورد شناسائی قرار گرفت. سپس خشک و خرد شده و

میزان ۱ کیلوگرم از پوست چوب گیاه در چهار نوبت به روش ماسراسیون با حلال هیدروالکلی ۷۰ درصد (تقطیر خراسان) عصاره‌گیری شد. در نهایت عصاره حاصل تحت خلا تغلیظ و با فریزر = درایر خشک گردید (۱). عصاره تهیه شده بر اساس آنتراکینون تام و فنل و فلاوونوئید تام استانداردسازی شد (۶، ۵). برای این منظور از روش Abo و همکاران برای تعیین مقدار آنتراکینون‌های آزاد و گلیکوزیدی و روش داوودی و همکاران برای تعیین مقدار ترکیبات فنلی و فلاوونوئیدی استفاده شد (۶، ۵). برای تهیه ژل، ۲۵ گرم از عصاره هیدروالکلی با ۵۰ گرم گلیسرین (سیگما-آمریکا) لویگه شده و میزان ۰/۷۵ گرم متیل پارابن (سیگما-آمریکا) و ۰/۵ گرم پروپیل پارابن (سیگما-آمریکا) به عصاره لویگه شده اضافه گردیده و با آب مقطر جوشیده به حجم ۱۰۰ میلی‌لیتر رسانده شد. سپس میزان ۵ گرم کرپوپل ۹۴۰ (مرک-آلمان) روی سطح فرمولاسیون درون بشر اضافه شد برای ۲۴ ساعت در یخچال با دمای ۴ تا ۸ درجه سانتی‌گراد قرار داده شده و پس از ۲۴ ساعت زیر همزن با دور rpm ۵۰۰ تری اتانول آمین (سیگما-آمریکا) به محتویات بشر افزوده شد تا ژل مستحکم گردد. پس از خنثی شدن ژل مورد نظر حاصل گردید. در نهایت شکل ظاهری، pH، کدورت، سینرز و قوام ژل در دماهای ۴، ۲۵ و ۴۰ درجه سانتی‌گراد مورد بررسی قرار گرفت (۷). اثر ژل تهیه شده بر روی باکتری‌های *Staphylococcus aureus* (ATCC: ۳۳۵۹۱)، *Staphylococcus Cutibacterium* (ATCC: ۱۲۲۲۸) و *acnes* (ATCC: ۱۰۵۹) در مقایسه با ژل پلاسبو (بدون عصاره گیاه)، با تست‌های حداقل غلظت مهارکننده رشد (Minimal Inhibitory Concentration: MIC) و حداقل غلظت کشندگی (Minimal Bactericidal Concentration: MBC) سنجش شد (۱).

یافته‌ها و بحث

بر اساس نتایج بررسی فیتوشیمیایی عصاره گیاه

بازده عصاره گیری ۴/۲۴ درصد برآورد شد. همچنین، میزان کل آنتراکینون‌ها، محتوای فنلی و فلاونوئیدی به ترتیب ۱/۸۵، ۳۵۲/۱ و ۲۳/۱۵ میلی گرم در گرم گیاه خشک به دست آمد. فرمولاسیون ژل با میزان ۵ درصد از عصاره خشک گیاه دارای رنگ قهوه‌ای و دارای بویی ملایم بود. همچنین، pH فرآورده برابر با ۵/۵-۶ بود. فرمولاسیون تهیه شده برای استفاده پوستی مناسب بوده و تست ویسکوزیته مناسب برآورد شد. همچنین، فرآورده حاصل پس از گذشت ۷ و ۱۴ روز پس از ساخت در دماهای ۵، ۲۵ و ۴۰ درجه سانتی گراد بررسی گردید و هیچ گونه تغییر رنگ یا سینرژی در آن مشاهده نشد.

جدول شماره ۱: نتایج حاصل از تست MIC و MBC بر روی ژل پایه و فرمولاسیون ژل عصاره

نمونه	سوش باکتریایی	حداقل غلظت مهارتی (µg/ml)	حداقل غلظت کشندگی (µg/ml)
ژل عصاره گیاه	<i>Staphylococcus aureus</i>	۹۷/۶۵	۱۲۵۰۰
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	۲۴/۴۱	۲۵۰۰۰
	<i>Cutibacterium acnes</i>	۱۹۵/۳	۲۵۰۰۰
پایه ژل	<i>Staphylococcus aureus</i>	۳۱۲۵	-
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	۳۱۲۵	-
	<i>Cutibacterium acnes</i>	۶۲۵۰	-

تست محدودیت میکروبی فرآورده دو بار (قبل از ساخت فرمولاسیون ژل جهت ارزیابی میکروبی عصاره و بعد از تهیه ژل) انجام گرفت. نتایج حاکی از عدم وجود میکروارگانیسم‌های خطرناک بود. مطالعات مختلفی در زمینه بررسی آنتی‌باکتریال گیاهان و فرآورده‌های گیاهی انجام شده است.

داوودی و همکاران اثر آنتی‌باکتریال عصاره هیدرواستونی برگ گیاه *Mespilus germanica* L. را

بر روی ۶ سوش انتروباکتر مورد ارزیابی قرار دادند. در این مطالعه مقادیر MIC و MBC بیش از ۴۰۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر محاسبه شد. در مطالعه حاضر این مقادیر کمتر از ۲۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمده که نشان دهنده عملکرد بهتر می‌باشد (۱). در مطالعه‌ای که توسط Franklyne و همکارانش انجام شد، اثرات آنتی‌باکتریال فرمولاسیون نانوامولسیون اسانس دارچین و میخک مورد ارزیابی قرار گرفت. در این مطالعه میزان MIC و MBC بین ۱۵ تا ۲۱ میکروگرم بر میلی لیتر محاسبه شد (۸).

همچنین در مطالعه‌ای که Kuncha و همکارانش در سال ۲۰۱۹ بر روی فرمولاسیون پلی هربال حاوی زیتون تلخ و اکلیپتا انجام دادند، اثرات آنتی باکتریال آن را بر روی چند سوش مقاوم به آنتی‌بیوتیک بررسی کردند که در پایان مطالعه مقدار MIC و MBC بین ۳۱ تا ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر به دست آمد (۹). فرآورده تهیه شده با توجه به اثربخشی برون تنی مناسب و ویژگی‌های فیزیکوشیمیایی و میکروبی مناسب، قابلیت استفاده بر روی پوست را دارد. همچنین، مطالعات کارآزمایی بالینی نیاز بوده تا اثربخشی دقیق آن بر روی آکنه مورد ارزیابی قرار گیرد.

سپاسگزاری

این مقاله حاصل از پایان نامه دکترای عمومی خانم سارا نیری دانشجوی داروسازی بوده که طرح آن با کد اخلاق IR.MAZUMS..REC.1397.1621 به تصویب رسیده است.

References

1. Davoodi A, Ebrahimzadeh MA, Fathalinezhad F, Khoshvishkaie E. Antibacterial Activity of *Mespilus germanica* Leaf Extract. J Mazandaran Univ Med Sci 2017; 26(146): 173-178.
2. Fazly Bazzaz BS, Azadbakht M, Sagheb Doust M. Antibacterial activity of essential oils of Iranian plants (Mazandaran province). Journal of Essential Oil Bearing Plants 2008; 11(4): 436-442.
3. Knight KS, Kurylo JS, Endress AG, Stewart JR, Reich PB. Ecology and ecosystem

- impacts of common buckthorn (*Rhamnus cathartica*): A review. *Biological Invasions* 2007; 9(8): 925-937.
4. Hamed MM, Refahy LA, Abdel-Aziz MS. Evaluation of antimicrobial activity of some compounds isolated from *Rhamnus cathartica* L. *Orient J Chem* 2015; 31(2): 1133-1140.
 5. Akbari F, Azadbakht M, Dashti A, Vahedi L, Davoodi A. Effect of *Prunus Mahaleb* L. Seed Extract on Ethylene glycol-and Ammonium Chloride-Induced Urolithiasis in BALB/c Mice. *Iran J Med Sci* 2019; In Press: 2-7.
 6. Abo KA, Adeyemi AA. Seasonal accumulation of anthraquinones in leaves of cultivated *Cassia podocarpa* Guill et Perr. *Afr J Med Med Sci* 2002; 31(2): 171-173.
 7. Nikpour M, Shirvani MA, Azadbakht M, Zanjani R, Mousavi E. The effect of honey gel on abdominal wound healing in cesarean section: a triple blind randomized clinical trial. *Oman Med J* 2014; 29(4): 255-259.
 8. Franklyne JS, Iyer S, Ebenazer A, Mukherjee A, Chandrasekaran N. Essential oil nanoemulsions: antibacterial activity in contaminated fruit juices. *International Journal of Food Science & Technology* 2019; 54(9): 2802-2810.
 9. Kuncha J, Thirugnanasambantham P, Shanmugam K, Narayanan N. In vitro Antibacterial and Antifungal activity of Hydro-alcoholic extract of Polyherbal Formulation. *J Pharm Sci & Res* 2019; 11(3): 721-725.