

## اثر عصاره متانولی گیاه *Plumbago Europaea* بر قارچ کاندیدا آلیکانس

علی صادقیان<sup>۱</sup>، حسن رخشنده<sup>۲</sup>، محمد صادقیان<sup>۳</sup> و حمید صادقیان<sup>۴</sup>

۱- دانشیار میکروبیولوژی، گروه میکروب شناسی، دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد e-mail: sadeghian@nuns.ac.ir

۲- گروه فارماکولوژی، بیمارستان قائم، دانشکده پزشکی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد

۳- دانشجوی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

۴- دانشجوی پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

### چکیده

از قدیم الایام و در طب سنتی از پماد حاصل از ریشه گیاه پلمباگو در درمان کچلی استفاده می شده است که اثری قطعی و سریع در بهبود عفونت داشته است. به علاوه در عفونت های جلدی دیگر مانند جرب نیز با احتیاط مصرف می شده است. با توجه به اینکه اثرات عصاره های گونه های مختلف این گیاه مورد مطالعه قرار گرفته است، در این مطالعه بر آن شدیم تا اثرات ضدقارچی ریشه گونه اروپایی این گیاه را بررسی نماییم. بدین منظور عصاره متانولی ریشه گیاه را به روش سوکسله تهیه و غلظت های مختلف آنرا بر قارچهای مختلف کاندیدای آلیکانس و غیرآلیکانس بیمارستانی و استاندارد به روش سینلدر و رقت آگاربررسی نمودیم. قارچها از نمونه های اعضاء مختلف بدن چون دستگاه ادراری، واژن، حلق، برنش، زخم و نخاع جدا شدند. از کلوتریمازول به عنوان داروی استاندارد و شاهد استفاده شد. نتایج بدست آمده نشان داد که عصاره ۲٪ متانولی ریشه گیاه به طور صد درصد باعث توقف رشد قارچها در محیط کشت شدند و در غلظت های ۱/۵، ۱، ۰/۵ و ۲۵٪ درصد به ترتیب ۷۳، ۷۰ و ۶۱ درصد دچار توقف رشد وجود داشت. نتایج غلظت های مؤثر عصاره بدست آمده در مقایسه با کلوتریمازول عبارت بودند از: کلوتریمازول ۱۰ μg/ml = ۱٪، ۲۰ μg/ml = ۱/۵٪، ۳۰ μg/ml = ۲٪ و ۴۰ μg/ml = ۳٪

واژه های کلیدی: قارچ کاندیدا، گیاه پلمباگو، اثر ضدقارچی گیاه پلمباگو

### مقدمه

افراد به رغم داشتن سیستم ایمنی پیچیده، در برابر عوامل عفونت زا، از جمله قارچها که در همه جا حضور دارند، حساس می باشند (Pfaller, 1996). در میان عفونت های فرصت طلب، کاندیدیازیس از شایعترین عفونت های سطحی و داخلی قارچی (Muller et al., 1999)، به خصوص در بیماران مبتلا به ایدز که از نظر ایمنی دچار ضعف هستند می باشد. عفونتهای توام کاندیدیایی در بیماران مبتلا به ایدز، زنان حامله، بیماران دیابتی، افراد دچار سوختگی و در موارد تروماتیسیم بسیار شایع می باشد. از طرف دیگر مقاومت قارچها از جمله کاندیداها نسبت به داروهای موجود حتی داروهای جدید

مانند آزولها رو به افزایش است. بنابراین تحقیق برای دستیابی به مواد مؤثر جدید یک ضرورت است. با توجه به استفاده از گیاه *Plumbago Europaea* در زمانهای گذشته به منظور درمان بیماریهای قارچی بر آن شدیم تا این مطالعه را انجام دهیم. *Plumbago Europaea* که نام محلی آن علف جوش است، گیاهی است علفی، زیبا به ارتفاع ۱/۲-۰/۳ متر، دارای ساقه های منشعب که به صورت وحشی در نواحی بایر و سواحل خشک اروپا و بعضی مناطق مدیترانه مانند فرانسه و پرتغال، شمال آفریقا و جنوب غربی آسیا از جمله ایران می روید (زرگری، ۱۳۶۵).

مختلف بدن (Emerson et al., 1993) و افزایش روز افزون مقاومت آن نسبت به داروهای ضد قارچی می باشد (Jawetz et al., 2001). در صورت موثر بودن عصاره این گیاه بر قارچ کاندیدا، روند بررسی در مورد قارچهای دیگر پیگیری خواهد شد.

مواد مورد استفاده شامل متانول و محیط های کشت لازم از شرکت مرک و پودر کلوتریمازول از شرکت پارس دارو تهیه گردید.

جدول ۱: نوع نمونه ها بر حسب تعداد و در صد

نمونه ها	ادرار	واژن	حلق	خلط	زخم ها	نخاع	جمع	تعداد
تعداد	۴۶	۳۰	۱۰	۸	۵	۱	۱۰۰	
درصد	۴۱	۳۰	۱۰	۸	۵	۱	۱۰۰	

#### روش عصاره گیری

گیاه مورد نظر از اطراف شهرستان مشهد (عنبران) در اردیبهشت ماه جمع آوری و پس از شناسایی توسط مرکز هرباریوم دانشگاه فردوسی مشهد، در سایه و جریان هوا خشک و ریشه ها توسط آسیا پودر شدند. از پودر تهیه شده برای عصاره گیری به روش سوکسله استفاده شد. بدین صورت که ۵۰ گرم از پودر آماده در کارتوشهایی که از کاغذ صافی معمولی با اندازه مناسب تهیه شده بود ریخته شد. سپس کارتوشها را درون دستگاه سوکسله قرار داده و تقریباً به میزان ۳۰۰ میلی لیتر متانول به عنوان حلال به آن اضافه گردید. عصاره گیری به مدت ۱۲ ساعت ادامه یافت. عصاره بدست آمده به ظرفهای شیشه ای منتقل شده و به مدت ۲۴ ساعت بدون درپوش در آن ۵۰ درجه نگهداری شد تا حلال باقی مانده تا حد امکان تبخیر شود. سپس عصاره تهیه شده برای آزمایشهای کنترل میکربی در یخچال نگهداری شد.

#### روش بررسی اثرات ضد قارچی

برگهای قاعده ساقه آن، بیضوی و بزرگ است ولی سایر برگها، باریک و نوک تیز، موجدار و کوچک می باشند. در راس شاخه های متعدد آن، گلهایی به صورت خوشه های کوتاه به رنگ صورتی یا بنفش با ظاهری زیبا ظاهر می شود. میوه آن پوشینه و بیضوی است که پس از رسیدن سیاه رنگ و حاوی دانه های حنایی رنگ می باشد. ریشه این گیاه حاوی تانن، آمیدون، اسید گالیک و یک ترکیب شیمیایی مجهول به نام پلوم باژین (Plumbagine) می باشد (زرگری، ۱۳۶۵).

ریشه این گیاه دارای اثر تحریک کنندگی، تاول زایی، مسهلی، قی آوری و افزایش ترشحات آب دهان می باشد. مصرف فرآورده های ریشه این گیاه باعث ناراحتی گوارشی می شود. مصرف خارجی فرآورده ریشه آن جهت درمان زگیل، درمان زخم های دیرعلاج (غیر از زخم های سرطانی)، تسکین دردهای روماتیسمی و سیاتیکی (عصبی) و سردردهای شبه میگرنی و درمان کچلی سر و جرب مفید بوده است. ولی به علت تاول زئی آن در تولید فرآورده و مصرف آن باید دقت فراوان نمود. به رغم مصرف این گیاه در گذشته به عنوان درمان قطعی عفونت های جلدی قارچی (کچلی) تا کنون بررسی درباره آن انجام نشده است. هدف از تحقیق حاضر بررسی اثرات ضد کاندیدیایی گیاه مذکور می باشد.

#### مواد و روشها

عصاره متانولی ریشه گیاه به روش سوکسله تهیه و اثر غلظت های مختلف آن بر روی قارچ کاندیدای جدا شده از بیماران بستری در بیمارستان به روش سیلندر و رقت آگار بررسی شد. نمونه های ارسالی به آزمایشگاه شامل نمونه های ادرار، واژن، حلق، خلط، زخم و نخاع بود. (جدول ۱). انتخاب قارچ کاندیدا به دلیل راحتی کشت و بررسی آن و شیوع عفونت آن در قسمت های

۷ سیلندر قرار داده می‌شد که در ۵ سیلندر غلظت های مختلف عصاره در یک سیلندر ۰/۲ میلی لیتر متانول و یک سیلندر هم ۰/۲ میلی لیتر محلول کلوتریمازول با غلظت ۵۰ میکروگرم به عنوان شاهد مثبت ریخته می‌شد.

### نتایج

اثر غلظت های مختلف عصاره ریشه گیاه پلمباگو و داروی کلوتریمازول بر روی ۱۰۰ نمونه قارچ کاندیدای آلبیکانس جدا شده از بیماران به صورت تعداد و درصد در جداول ۲ و ۳ نشان داده شده است.

نتایج بررسی عصاره بر روی قارچ های جدا شده به روش سیلندر در غلظت ۲٪ باعث ایجاد هاله عدم رشد متوسط ۳۴ میلی متر شد که در مقایسه با کلوتریمازول با همین روش معادل غلظت ۳۵ میکروگرم در میلی لیتر کلوتریمازول بود. (جدول ۳)

جدول ۲: اثرمهراری رشد عصاره متانولی گیاه

بر حسب درصد

غلظت عصاره متانولی g/100mil	درصد مهار رشد	درصد رشد
۰/۲۵٪	۶۱	۳۱
۰/۵٪	۷۰	۳۰
۱٪	۷۳	۲۷
۱/۵٪	۹۵	۵
۲٪	۱۰۰	۰

جدول ۳: مقایسه قطر هاله رشد گیاه پلمباگو با کلوتریمازول

قطر هاله عدم رشد بر حسب میلی متر	عصاره گیاه مورد مطالعه بر حسب در صد	کلوتریمازول بر حسب میکروگرام
۱۴	۰/۱۲۵	۰*
۲۵	۰/۲۵	۰
۲۷	۰/۵	۰
۲۸/۵	۱	۱۰
۳۱/۵	۱/۵	۲۰
۳۴	۲	۳۰
۳۶	۳	۴۰
۴۰	۰	۵۰

پس از تهیه محیط کشت مولر هیتون آگار و اتوکلاو کردن آن ۵۰ میلی لیتر از محیط کشت آماده را در حالت گرم در یک ارلن ریخته و یک گرم (۲ درصد) از عصاره تهیه شده که در آب مقطر حل می‌شد به آن اضافه گردید. سپس ۲۵ میلی لیتر از این محیط به ۲۵ میلی لیتر از محیط خالص کشت اضافه گردید (۱درصد). این عمل تا تهیه رقت ۰/۲۵ گرم در صد ادامه یافت. پس از آماده شدن محیط های کشت حاوی رقت های مختلف عصاره گیاهی، جهت استفاده، در پلیت ها ریخته شدند و به مدت ۴۸ ساعت در گرم خانه ۳۷ درجه نگهداری شدند تا از عدم آلودگی آنها اطمینان حاصل شود. سپس آنها را در یخچال گذاشته تا در زمان لازم مورد استفاده قرار گیرند. پس از دریافت نمونه از بیمار و انجام کشت و بررسی و تأیید نوع قارچ با غلظت معینی از قارچ کاندیدا که با محلول نیم مک فارلند استاندارد می شدند با اکوویون روی محیط کشت تلقیح می شدند. پس از ۴۸ ساعت نتیجه بررسی گردید. قابل ذکر است که هر نمونه سه بار به همین طریق بررسی می‌شد.

### روش سیلندر

غلظت های مختلف ۲ درصد تا ۰/۲۵ درصد از عصاره گیاه با استفاده از آب مقطر تهیه و در ظرفهای شیشه ای تمیز و استریل درب دار ریخته شد. همچنین غلظت های مختلف ۱۰-۵۰ میکروگرم در میلی لیتر از داروی کلوتریمازول توسط حلال متانول مرک تهیه گردید.

### بررسی به روش سیلندر

پس از کشت دادن قارچهای کاندیدای تهیه شده از نمونه ها بر روی محیط کشت مولر هیتون، سیلندرهاي استریل به وسیله پنس استریل به فاصله ۱۵ میلی متر از لبه پلیت و ۲۴ میلیمتر جدا از یکدیگر روی پلیت قرار داده شدند. سپس به وسیله سرنگ های انسولین، ۰/۲<sup>cc</sup> از غلظت های مختلف عصاره در سیلندرها ریخته شد. سپس پلیت ها را در گرمخانه ۳۷ درجه قرار داده پس از ۴۸ ساعت قطرهاله عدم رشد بررسی می گردید. در هر پلیت

مورد گونه دیگر این گیاه صورت گرفته است نشان داد که محلول ۱۰٪ آن در درمان زخم های جلدی موثر است که نشا نگر این مطلب است که تفاوت چشمگیری بین مواد موثره این دو گونه وجود دارد (Suresh *et al.*, 2002).

با توجه به نتایج بدست آمده می توان نتیجه گرفت که اثرات ضد قارچی عصاره گیاه مورد مطالعه قابل توجه می باشد. البته اثرات ضد قارچی هر گیاه به زمان و محل جمع آوری گیاه و حتی قسمتی از گیاه که مورد استفاده قرار می گیرد بستگی دارد. چرا که هر کدام از این عوامل می تواند در میزان مواد مؤثر گیاه مؤثر باشد (زرگری، ۱۳۶۵؛ Jawetz *et al.*, 2001). همچنین باید توجه داشت که مشخص نیست که چه جزیی از اجزاء عصاره گیاه دارای اثر ضد قارچی می باشد. بنابراین لازم است که با تحقیقات بعدی فراکسیون های عصاره گیاه تهیه و مطالعه شود. یادآوری می گردد که با توجه به اینکه مقاومت عوامل بیماریزا رو به افزایش بوده و ترکیب داروهای شیمیایی دچار محدودیت می باشد مطالعه در مورد گیاهانی که در دسترس می باشند شاید بتواند به عنوان جانشین داروهای ضد قارچی و میکربی تا حدودی مشکلات را حل نماید.

### منابع مورد استفاده

- زرگری، ع.، ۱۳۶۵. گیاهان دارویی، انتشارات امیر کبیر، تهران، ۹۴۰ صفحه .

- Emerson S. F., Sharada, A.C. and Uma Devi, P., 1993. Toxic effects of crude root extract of *Plumbago rosea* on mice and rats, *Journal of Ethnopharmacology*, 38(1): 79-84.
- Jawetz, E., Melnick, J.L. and Adelberg, E.A., 2001. *Medical Microbiology*. 20<sup>th</sup>. Edition, Lange Medical books / McGraw- Hill, pp 550-551.
- Joklik, W.K. and Willett, H.P., 2002. *Zinsser Microbiology*. Appleton & Lange, USA.
- Lewis, RE., Klepser, ME., 1999. The changing face of the nosocomial candidemia: Epidemiology, resistance, and drug therapy. *American Journal Health system*, 56: 3-6.
- Muller, F.M., Groll, A.H. and Walsh, J., 1999. Current approaches to diagnosis and treatment of fungal

نشانگر این است که مواد موثر در محیط وارد نشده است \*

### بحث

در این پژوهش اثرات ضد کاندیدیایی عصاره متانولی گیاه پلمباگو به روش سیلندر و رقت آگار بر قارچهای کاندیدای جداشده از بیماران بررسی شد. هدف از استفاده از کاندیدای نمونه های مختلف بیماران به دلیل بیماریهای مختلفی است که دراعضاء مختلف ایجاد می کنند ( Joklik & Willett, 2002 ) بود. چون کاندیدیازیس از نظر بالینی دارای اهمیت بوده و ممکنست باعث ضایعاتی در دهان، پوست، واژن، ناخن ها، دستگاه تنفس، دستگاه گوارش و دستگاه ادراری تناسلی شود. حتی می تواند منجر به بیماریهای منتشر شود که گاهی نتیجه آن سپتی سمی می باشد ( Jawetz *et al.*, 2001; Joklik & Willett, 2002; Murray *et al.*, 2002).

بنابراین اگر عصاره این گیاه بر قارچهای جداشده مؤثر باشد شاید بتوان نتیجه گرفت که بر قارچهای دیگر هم مؤثر باشد که نیاز به مطالعات بعدی دارد. چنانکه نتایج نشان داد عصاره متانولی ۲٪ آن بر قارچهای کاندیدای جدا شده از بیماران به طور صددرصد مؤثر بود. بنابر این اگر مطالعه به صورت فراکشن جداشده انجام شود شاید بتوان ترکیبهایی جدا نمود که دارای اثرات بسیار خوب با مقدار کمتر باشد. از نظر سمیت، بررسی ایی که در مورد ریشه گیاه پلمباگو روزاً انجام شده نشان می دهد که مصرف خوراکی ۱۲۵۰mg/kg در خرگوش باعث اسهال می شود (Emerson *et al.*, ۱۹۹۳). در مقایسه عصاره این گیاه با داروی کلوتریمازول بررسیها نشان داد که محلول ۲ گرم در ۱۰۰ سی سی عصاره متانولی آن اثری معادل با ۵ میلی گرم در ۱۰۰ سی سی کلوتریمازول (۵۰ میکروگرم در میلی لیتر) دارد. بررسی ایی که در

- Suresh R.J., Rajeswara R.P. and Reddy, MS., 2002. Effects of Heliotropium indicum, plumbago zeylanicum and acalypha indica in rats. Journal of Ethnopharmacology, 79(2): 249-251
- Strohl, W.A., Rouse, H. and fisher, B.D. 2001. Microbiology. First Edition, LIPPINCOTT WILLIAMS WILKINS, pp: 274-275.
- infections in children infected with HIV, European Journal Pedetritic, 158: 187-189.
- Murray, P.R. and Rosenthal, K.S., 2002. Medical Microbiology, Mosby, 4th Edition, USA, pp: 664-667.
- Pfaller, MA., 1996. Nosocomial candidiasis, Emergency species, reservoirs and modes of transmission. Clinical Infection Disease, 22: 89-91.

## Effect of Methanol Extract of *Plumbago* on *Candida albicans*

A. Sadeghian<sup>1</sup>, H. Rakhshandeh<sup>2</sup>, M. sadeghian<sup>3</sup> and H. sadeghian<sup>4</sup>

1- Microbiology group, Mashhad University of Medical Science, e-mail: sadeghian@nuns.ac.ir

2- Pharmacology group, Mashhad University of Medical Science

3- Student of Mashhad University of Medical Science

4- PhD student of chemistry, Mashhad University

### Abstract

In folk medicine, *Plumbago* has been used because of antifungal property for precaution in treating mite infections. As the extract's effects of different species of *Plumbago* has been studied, in this research the antifungal effects of root of the European species of *Plumbago* was studied. For this reason methanol extract was prepared by soxhlet method and different concentrations of the extract were applied on standard and nosocomial *Candida albicans* and other fungus, by agar dilution and cylinder plate methods. Fungus were taken from blood, feces, spinal fluid, wound, vagina and so on. Clotrimazol was used as positive control drug. The results showed that, among the extracts, methanol extract 2% had significant antifungal activity, and in the other plates with extracts of 1/5%, 1%, 0/5% and 0/25% there was 95%, 73%, 70% and 61% inhibition of growth, respectively. Effects of methanol extract in comparison with *clotrimazol* were as follow; 1mg/100ml of extract was equal to 10µg/ml clotrimazol, 1/5mg/100ml of extract was equal to 20µg/ml clotrimazol, 2mg/100ml of extract was equal to 30µg/ml clotrimazol and 3mg/100ml of extract was equal to 40µg/ml clotrimazol.

**Key words:** *Candida Albicans*, *Plumbago*, antifungal.