

Original Article

Design and Standardization of a Solid Oral Polyherbal Hypnotic Formulation Based on Traditional Persian Medicine

Mohammad Ali Farboodniay Jahromi¹, PhD; Zohreh Abolhassanzadeh¹, PhD; Amirhossein Dadbakhsh², PharmD; Mohammad Mehdi Zarshenas^{1,2*}, PhD

¹Medicinal Plants Processing Research Center, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

²Department of Phytopharmaceuticals (Traditional Pharmacy), School of Pharmacy, Shiraz University of Medical Sciences, Shiraz, Iran

Article Information

Article History:

Received: July 29, 2025

Accepted: September 12, 2025

*Corresponding Author:

Mohammad Mehdi Zarshenas, PhD;
Medicinal Plants Processing Research
Center, Shiraz University of Medical
Sciences, Shiraz, Iran

Email: zarm@sums.ac.ir

Abstract

Introduction: Insomnia is a prevalent global sleep disorder that adversely affects health, occupational performance, and emotional well-being. Conventional pharmacological treatments are often associated with limited efficacy, adverse effects, and risks of dependency. Consequently, there is growing interest in safer alternative approaches, particularly those derived from traditional medicine, for managing inadequate sleep quality and insomnia.

Methods: This study investigated traditional Persian medicinal approaches to insomnia by reviewing major classical texts, including *Qarabadin-e Salehi*, *Qarabadin-e Azam*, *Qarabadin-e Ghaderi*, *Eksir-e Azam*, the *Canon of Avicenna*, *Mo'alajat-e Aghili*, and *Tibb-e Akbari*. A commonly used traditional formulation known as "*Monavvem*" powder was selected for further development and analysis. Four medicinal plants, including *Lavandula stoechas* (lavender), *Melissa officinalis* (lemon balm), *Echium amoenum* (borage), and *Valeriana officinalis* (valerian), were processed into powder for use in herbal infusions (tea bags). Macroscopic and microscopic evaluations were conducted for botanical authentication. Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS) and Gas Chromatography with Flame Ionization Detection (GC/FID) were employed to identify and quantify key essential oil components.

Results: Borneol (14.88%) and thymol (8.39%) were identified as the major essential oil components of *Monavvem* powder. The analytical methods were validated using standard analytical protocols. Additional fingerprinting was performed via Fourier-Transform Infrared Spectroscopy (FT/IR). Spectrophotometric analysis determined the total phenolic and flavonoid contents of the final product to be 6.91 mg/g and 1.5 mg/g, respectively. The formulation was assessed for microbial and heavy metal contamination, and all quality control parameters were met.

Conclusion: The manufacturing procedures and quality control tests for the final tea bag product were successfully documented. This standardized product paves the way for a natural therapeutic aid in managing sleep disorders, pending future clinical evaluations.

Keywords: Insomnia, Teas, Herbal, Lavandula, Borage, Valerian, Lemon balm

Please cite this article as:

Farboodniay Jahromi MA, Abolhassanzadeh Z, Dadbakhsh AH, Zarshenas MM. Design and Standardization of a Solid Oral Polyherbal Hypnotic Formulation Based on Traditional Persian Medicine. *Sadra Med. Sci. J.* 2025; 13(4): doi:660-685. doi:10.30476/smsj.2025.108006.1671.



مجله علوم پزشکی صدرا

<https://smsj.sums.ac.ir/>



مقاله پژوهشی

تهیه یک فرمولاسیون خوراکی ترکیبی جامد خواب‌آور از داروسازی سنتی ایران

محمد علی فریبندی^۱، زهره ابوالحسن‌زاده^۱، امیرحسین دادبخش^۲، محمد مهدی زرنشاس^۳ 

^۱ مرکز تحقیقات فرآوری گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
^۲ گروه داروسازی سنتی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران

چکیده

مقدمه: بی‌خوابی از شایع‌ترین اختلالات خواب با اثرات منفی بر سلامت، عملکرد شغلی و بهداشت روانی-عاطفی است. با وجود درمان‌های دارویی، داروهای فعلی اغلب با عوارض جانبی و وابستگی همراه هستند. در نتیجه، گرایش به رویکردهای جایگزین، به ویژه درمان‌های مبتنی بر طب سنتی در حال افزایش است. **مواد و روش‌ها:** در این مطالعه، رویکردهای دارویی طب سنتی ایران در درمان بی‌خوابی بررسی شد و با مرور متون، فرمولاسیون‌های گیاهی مؤثر در بهبود خواب شناسایی شدند. از میان آن‌ها فرمولاسیونی به نام «پودر منوم» از قریابادین کبیر انتخاب و آنالیزهای آزمایشگاهی و کیفی آن انجام پذیرفت. چهار گیاه دارویی شامل اسطوخدوس، بادرنجبویه، گاوزبان و سنبل‌الطیب به صورت پودر فرآوری شد و برای استفاده در دمنوش گیاهی به صورت تی‌بگ آماده شدند. برای تأیید اصالت، خرده‌نگاری و ارزیابی‌های میکروسکوپی و میکروسکوپی انجام پذیرفت. جهت شناسایی و تعیین مقدار ترکیبات اسانس، به ترتیب از کروماتوگرافی گازی/طیف‌سنجی جرمی (GC/MS)^۱ و کروماتوگرافی گازی/آشکارساز یونش شعله‌ای (GC/FID)^۲ استفاده شد. **یافته‌ها:** دو ترکیب اصلی اسانس پودر منوم، بورنئول (۱۴/۸۸٪) و تیمول (۸/۳۹٪) شناسایی و کمی‌سازی شدند. طیف‌سنجی مادون قرمز با تبدیل فوریه (FTIR)^۳ نیز برای تهیه فینگرپرینت انجام شد. میزان فنول و فلاونوئید تام به ترتیب ۱۳/۸۲ و ۳ میلی‌گرم در هر تی‌بگ اندازه‌گیری شدند. کنترل کیفیت فرآورده نهایی شد و ارزیابی آلودگی‌های میکروبی و فلزات سنگین برای اطمینان از ایمنی محصول نهایی انجام گرفت و مراحل تولید دمنوش به صورت تی‌بگ نیز مستندسازی و گزارش گردید. **نتیجه‌گیری:** فرآورده فوق می‌تواند مسیر دستیابی به فرآورده طبیعی استاندارد در کمک به کنترل اختلالات خواب یا درمان بی‌خوابی بعد از ارزیابی بالینی را هموار نماید.

کلمات کلیدی: بی‌خوابی، دمنوش، اسطوخدوس، گل گاوزبان، سنبل‌الطیب، بادرنجبویه

اطلاعات مقاله

تاریخچه مقاله:

تاریخ دریافت: ۱۴۰۴/۰۵/۰۷

تاریخ پذیرش: ۱۴۰۴/۰۶/۲۱

نویسنده مسئول:

محمد مهدی زرنشاس
مرکز تحقیقات فرآوری گیاهان دارویی، دانشگاه علوم پزشکی شیراز، شیراز، ایران
پست الکترونیکی: zarm@sumsacir

1. Gas Chromatography/Mass Spectrometry
2. Gas Chromatography with Flame Ionization Detection
3. Fourier-Transform Infrared Spectroscopy

لطفاً این مقاله را به این صورت استناد کنید:

فریبندی‌ای جهرمی م، ابوالحسن‌زاده ز، دادبخش اح، زرنشاس م. تهیه یک فرمولاسیون خوراکی ترکیبی جامد خواب‌آور از داروسازی سنتی ایران. مجله علوم پزشکی صدرا. دوره ۱۳، شماره ۴، پاییز و زمستان ۱۴۰۴، ۶۶۰-۶۸۵.

دارویی؛ بیماران و محققان را واداشته تا رویکردهای مشاوره و رفتار درمانی را بیش از گذشته مورد توجه قرار دهند (۱۲، ۱۳)

اگرچه رفتار درمانی و مشاوره‌های مداوم توانسته پیشرفت قابل توجهی در بهبود طولانی مدت وضعیت مبتلایان به بی خوابی ایجاد کند و این درمان بیش از دارودرمانی مورد پذیرش بیماران قرار گرفته است؛ اما در دسترس نبودن امکانات و افراد متخصص و هزینه‌های نسبتاً بالای این درمان، بیماران و محققان را به جست‌وجوی رویکردهای درمانی موفق‌تر دیگر واداشته است (۱۴) که از این میان می‌توان به استفاده از گیاهان دارویی و طب سنتی و مکمل‌های گیاهی همچون ایران و چین و هند و یونان اشاره نمود (۱۵). طب و داروسازی سنتی ایران یکی از مکاتب پزشکی کهن در دنیا است که راهکارهای دارویی و درمانی متعددی را برای بیماری‌های مختلف ارائه داده است. در منابع طب سنتی ایران، به کرات از بی خوابی با عنوان «سَهَر»، به معنای کاهش در کیفیت و کمبود خواب در درجات متفاوت، یاد شده است (۱۶). همچنین فرمولاسیون‌های مفرد و مرکب بسیاری در اشکال مختلف جامد و مایع و نیمه جامد در درمان بی خوابی مطرح شده‌اند (۱۷). «مَنوم»^۷ به ترجمه لفظی فارسی خواب‌آور، را می‌توان مهم‌ترین لفظ استناد شده به خواب‌آورهای کتب طب سنتی ایران دانست. از میان فرمولاسیون‌های جامد طب سنتی ایرانی، پودرهای خوراکی به علت قدمت و سهولت در تولید و مصرف مورد توجه بوده‌اند. انواع پودر منوم موجود در این کتب هم به صورت مصرف جامد و هم به صورت جوشانده از گذشته مورد استفاده قرار می‌گرفته‌اند.

از جمله مفرداتی که به دفعات در کتب طب سنتی به عنوان منوم نام برده شده است می‌توان به گاوزبان^۸، اسطوخدوس^۹، بادنجبویه^{۱۰} و سنبل الطیب^{۱۱} اشاره کرد. گاوزبان با نام علمی *Echium amoenum* Fisch. & C.A.Mey از خانواده گاوزبانیان^{۱۲} است. برگ و گل گونه ایرانی گاوزبان همواره از مهم‌ترین و پرکاربردترین گیاهان سنتی این سرزمین به شمار می‌آمده که بیشتر در نواحی شمال ایران رویش دارد (۱۸). گاما لینولییک اسید^{۱۳}، آلفالینولییک اسید^{۱۴}

بی خوابی^۱ از شایع‌ترین اختلالات خواب است (۱) که حدود ۳۵ تا ۴۰ درصد جمعیت کل جهان و بیشتر افراد مسن با آن دست‌وپنجه نرم می‌کنند (۲، ۳). طبق آمار حدود ۳۰ درصد از مردم در طول زندگی حداقل یک مرتبه بی خوابی را تجربه کرده‌اند (۴). جالب است که در مطالعات آماری زنان در مقایسه با مردان بیشتر به بی خوابی مزمن مبتلا بوده‌اند (۵).

از مهم‌ترین علائم بی خوابی می‌توان به دشواری در به خواب رفتن، عدم وجود خواب پیوسته و از خواب پریدن‌های مکرر، صبح خیلی زود بیدار شدن و چرت‌های آزاردهنده روزانه و نارضایتی مبتلایان از کیفیت خواب، اشاره کرد (۱) و طبق برخی پژوهش‌ها مبتلایان به دنبال این مشکلات، از خستگی، عدم تمرکز و کمبود انرژی، اختلال در روابط زناشویی، رفتارهای خشونت‌آمیز و حساسیت بیش از حد در زندگی روزمره، افسردگی و اعتیاد به الکل نیز رنج می‌برند (۶، ۷). این اختلال در بسیاری افراد می‌تواند به صورت مستمر و مزمن یا حتی عودکننده وجود داشته باشد و فرد را به مدت طولانی درگیر کند (۸)؛ بنابراین چندان دور از ذهن نخواهد بود که زندگی شخصی و اجتماعی مبتلایان تحت تأثیر قرار بگیرد و هزینه‌های گزاف بسیاری چه از جنبه اجتماعی و اقتصادی و چه از جنبه دارودرمانی‌های ناموفق بر اقتصاد کشورها وارد آید. طبق مطالعات انجام شده تنها در آمریکا سالانه حدود ۱۰ میلیارد دلار خسارت ناشی از این بیماری بر اقتصاد کشور وارد می‌شود (۹). درمان این عارضه عمده‌تاً در دو حوزه دارودرمانی و رفتار درمانی طبقه‌بندی می‌شود. اگرچه درمان‌های مکمل دیگری همچون طب سوزنی، طب فشاری، یوگا^۲، ماساژ درمانی، آروماتراپی^۳، تای چی^۴ و هومیوپاتی^۵ نیز در کنترل بی خوابی کم و بیش مؤثر شناخته شده‌اند (۱۰، ۱۱). بنزودیازپین‌ها^۶ را می‌توان مهم‌ترین دسته دارویی مورد استفاده در درمان کوتاه مدت بی خوابی دانست، لکن عدم توفیق این دسته در درمان بلندمدت، عوارض جانبی قابل توجه همچون خستگی و بی حالی، اختلالات شناختی، محدودیت مصرف این دسته در بارداری و بیماری‌های کبدی و کلیوی و ریوی، و مهم‌تر از همه وابستگی به این دسته

7. Monavvem

8. Echium amoneum

9. Lavandula osteochas

10. Melissa officinalis

11. Nardostachys jatamansi

12. Boraginaceae

13. γ-Linoleic acid

14. α-Linoleic acid

1. Insomnia

2. Yoga

3. Aromatherapy

4. Tai-chi

5. Homeopathy

6. Benzodiazepine

آکتینیدین^{۳۹} و کاتینین^{۴۰} می‌توان به‌عنوان مهم‌ترین ترکیبات مؤثر سنبل‌الطیب اشاره نمود (۳۵-۳۲).

بادرنجبویه با نام علمی *Melissa officinalis* L. از خانواده Lamiaceae است. سیترونال^{۴۱}، سیترولول^{۴۲}، لینالول^{۴۳}، ترپینن^{۴۴}، فلاوگلوکوزیدها^{۴۵} و ژرانیول^{۴۶} از مهم‌ترین ترکیبات مؤثر بادرنبویه به شمار می‌آیند. خواص آرام‌بخشی، خواب‌آوری، ضد اسپاسم، ضد نفخ و تقویت‌کننده حافظه (۳۶) ضدافسردگی (۳۷) و آنتی‌اکسیدانی و ضد میکروبی (۳۹، ۳۸) را نیز بخشی از خواص مطالعه شده بادرنبویه دانسته‌اند.

این تحقیق بر آن است تا یک فرمولاسیون جامد مؤثر جدید از ترکیب ۴ مفرد گیاهی فوق بر اساس اصولی که در متون طب سنتی ایران ذکر شده است و همچنین مقالات و مطالعات انجام شده امروزی جهت بهبود این مشکل فراگیر در قالب فرمولاسیون دمنوش معرفی نماید.

مواد و روش‌ها

گیاهان مورد مطالعه

گاوزبان، سنبل‌الطیب، بادرنبویه و اسطوخدوس از بازار گیاهان دارویی شهر شیراز خریداری شد و جهت شناسایی و تخصیص شماره شناسایی هرباریوم^{۴۷} به گروه داروسازی سنتی دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی شیراز منتقل گردید. این گیاهان در دمای محیط و دور از نور آفتاب و در ظروف سربسته نگهداری شدند. برخی از آزمون‌ها در این طرح در آزمایشگاه مرجع غذا و دارو دانشگاه علوم پزشکی شیراز به انجام رسید (جدول ۱).

خرده‌نگاری اجزای فراورده

مقدار ۱۰ گرم از نمونه گل گاوزبان، اسطوخدوس، بادرنبویه و سنبل‌الطیب توسط هاون پودر شدند و از الک با مش^{۴۸} ۳۵ عبور داده شدند. سپس این مواد در لوله‌های آزمایش ریخته شد و به آن مقداری کلرال هیدراته^{۴۹} ۶۰ درصد اضافه گردید.

39. Chatinine
40. Cathinine
41. Citronellal
42. Citronellol
43. Linalool
44. Terpinene
45. Flavoglucoside
46. Geraniol
47. Herbarium
48. Mesh
49. Chloral hydrate

آلکالوئیدهای پیرولیزیدین^{۱۵}، موسیلاژ^{۱۶}، رزین^{۱۷}، پتاسیم نیترات^{۱۸}، کلسیم^{۱۹} و اسیدهای معدنی را مهم‌ترین مواد مؤثره این گونه می‌دانند (۱۹). از جمله خواص بسیار زیادی که برای گاوزبان شناخته شده است، می‌توان به اثرات آنتی‌اکسیدانی، ضد باکتریایی، ضد ویروس، ضد اضطراب و ضد افسردگی آن اشاره کرد (۲۵-۲۰).

اسطوخدوس یا لاوند^{۲۰} با نام علمی *Lavandula stoechas* L. از خانواده نعنائیان^{۲۱} است. آنتوسیانین^{۲۲}، فیتواسترولها^{۲۳}، کوماریک اسید^{۲۴}، گلیکولیک اسید^{۲۵}، والریک اسید^{۲۶}، اورسولیک اسید^{۲۷}، کومارین^{۲۸} و تانن‌ها^{۲۹} را مهم‌ترین ترکیبات مؤثره این گونه می‌دانند (۲۶). گل، جوانه و برگ اسطوخدوس از دیرباز به عنوان آرام‌بخش، ضدافسردگی، ضد اضطراب و ضد درد (۲۷)، ضد باکتری (۲۸) و به‌صورت بسیار وسیع در صنعت عطرسازی، لوازم آرایشی و بهداشتی کاربرد داشته است.

سنبل‌الطیب با نام علمی *Nardostachys jatamansi* (D.Don) DC از خانواده آقطیان^{۳۰} است. سنبل‌الطیب همواره در درمان بیماری‌های اعصاب به‌عنوان خواب‌آور، آرام‌بخش و ضد اضطراب (۲۹)، ضد اسپاسم و ضدافسردگی (۳۲-۳۰) و درمان بی‌قراری (۳۳) مورد توجه بسیار بوده است. شایان ذکر است که اثرات مثبت این گیاه بر قلب و درمان فشار خون آریتمی^{۳۱} نیز مورد بررسی قرار گرفته است (۳۴). به ترکیباتی همچون والترات^{۳۲} و مشتقات آن از جمله ایزووالرات^{۳۳}، والرنیک^{۳۴}، والریک^{۳۵}، ایزووالریک^{۳۶}، ترکیبات استوکسی والرنیک اسید^{۳۷} و آلکالوئیدهایی همچون والریانین^{۳۸}،

15. Pyrrolizidine alkaloid
16. Mucilage
17. Resin
18. Potassium nitrate
19. Calcium
20. Lavender
21. Boraginaceae
22. Anthocyanin
23. Phytosterol
24. Coumaric acid
25. Glycholic acid
26. Valeric acid
27. Ursolic acid
28. Coumarin
29. Tannin
30. Caprifoliaceae
31. Cardiac arrhythmia
32. Valtrate
33. Isovelerate
34. Valarenic acid
35. Valeric acid
36. Isovaleric acid
37. Acetoxyvalerenic acid
38. Actinidine

جدول ۱. گیاهان مورد استفاده در این مطالعه

نام گیاه	نام علمی	Voucher Number	اندام
گاوزبان	<i>Echium amoenum</i> Fisch. & C.A.Mey.	PM 1280	گل
سنبل الطیب	<i>Nardostachys jatamansi</i> (D.Don) DC.	PM 1313	ریشه
بادرنجبویه	<i>Melissa officinalis</i> L.	PM 1318	برگ
اسطوخدوس	<i>Lavandula stoechas</i> L.	PM 775	اندام هوایی

۲ سانتی متری از صفحه و عمود بر آن قرار داده شد. سپس پودر مخلوط چهار گیاه به آرامی از درون قیف، روی صفحه زیرین ریخته شد. این کار تا زمانی ادامه پیدا کرد که ارتفاع قله مخروط حاصل از پودرها به نوک دهانه قیف رسید. سپس قطر دایره تشکیل شده اندازه گیری شد. این فرآیند سه بار تکرار گردید. در نهایت با استفاده از معادله زیر میزان زاویه سکون محاسبه گردید:

$$\tan \theta = H/D$$

H ارتفاع پودر و D قطر دایره

تست اندازه ذره‌ای با استفاده از الک

۵۰ گرم از مخلوط پودر دمنوش چهار گیاه سنبل الطیب و گاوزبان و بادرنجبویه و اسطوخدوس توزین شد. الک با شماره‌های ۱۰، ۲۰، ۳۰، ۴۰، ۵۰، ۶۰، ۷۰، ۸۰ به ترتیب از مش شماره کمتر تا بیشتر از بالا به پایین قرار گرفت و ۵۰ گرم از پودر برای مدت ۱۰ دقیقه با سرعت ۱۰ rpm الک شد. پس از پایان زمان الک شدن، وزن پودر روی هر الک اندازه گیری گردید.

تعیین انحراف وزن

تعداد ۲۰ تی بگ نهایی به صورت تصادفی انتخاب و به صورت جداگانه با استفاده از ترازوی دیجیتال با حساسیت ۰/۰۰۰۱ گرم توزین شدند. میانگین وزن تی بگ‌ها، انحراف معیار و درصد ضریب تغییرات برای تی بگ‌ها محاسبه شد.

اندازه گیری ابعاد

تعداد ۱۰ تی بگ نهایی به صورت تصادفی انتخاب و به صورت جداگانه، طول و عرض آن‌ها توسط خط کش محاسبه گردید. میانگین طول و عرض، انحراف معیار و درصد ضریب تغییرات نیز برای تی بگ‌ها بررسی شد.

آزمون سنجش میکروبی

آزمایش شمارش میکروب و قارچ بر اساس روش

لوله‌های آزمایش روی حرارت شعله قرار گرفت و محتویات آن‌ها جوشانده شد. پس از تشکیل رسوب، مقداری از رنگ فلوروگلوکوسینول-اسید هیدروکلریک به آن اضافه شد و پروسه خردنگاری زیر میکروسکوپ الکترونی و روی هر یک از اجزای فرآورده انجام شد. عکس برداری از اندام‌ها توسط دوربین دیجیتال که روی میکروسکوپ الکترونی نصب شده بود به صورت دقیق و جزئی انجام شد.

روش تهیه محلول فلوروگلوکوسینول هیدروکلریک اسید

مقدار ۹۳ گرم فلوروگلوکوسینول در ۲۵ میلی لیتر اتانول ۹۵ درصد حل شد و ۱۰ میلی لیتر اسید هیدروکلریک^{۵۰} غلیظ به آن اضافه گردید. با توجه به پایداری کم این محلول، بلافاصله پس از آماده سازی فرآیند خردنگاری انجام شد.

آماده سازی تی بگ^{۵۱}

هر چهار گیاه به نسبت مساوی با آسیاب برقی پودر شد تا یک پودر یک دست از مخلوط چهار گیاه به دست آید، سپس همه پودرها با هم مخلوط و هم زده شد تا یکنواخت شود. برای مراحل آماده سازی تی بگ از دستگاه پرس دستی استفاده شد و مخلوط پودر گیاه به صورت دستی برای هر تی بگ به میزان ۲ گرم از پودر داخل کاغذهای مخصوص تی بگ ریخته و از چهار طرف پرس شد. سپس به منظور تهیه تی بگ از مخلوط تهیه شده، از دستگاه تی بگ زن برای پر کردن اتوماتیک تی بگ‌ها استفاده گردید و تنظیمات دستگاه به صورتی انجام شد که تی بگ‌هایی با اندازه وزنی یکسان و پرس شده، تحویل دهد.

اندازه گیری زاویه سکون پودر

جهت اندازه گیری زاویه سکون از روش قیف ثابت استفاده گردید. به این صورت که ابتدا قیف با قطر انتهایی ۰/۳ سانتی متر روی یک گیره فلزی در ارتفاع

50. Hydrochloric acid

51. Tea bag

USP^{۵۲} مطابق دستورالعمل زیر روی پودر نهایی حاوی چهار گیاه انجام گرفت. برای شمارش کلی میکروب‌های هوازی ۱ میلی‌لیتر با رقت ۰/۱ گرم بر میلی‌لیتر از نمونه را به دو پتری دیش^{۵۳} افزوده ۱۵ تا ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت Soybean - Casein Digest Agar به آن اضافه شد، سپس به مدت ۴۸ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. در پایان کلنی‌ها مشاهده و شمرده شدند. در تمام بررسی‌ها، یک پلیت حاوی محیط کشت بدون باکتری به‌عنوان کنترل منفی و یک پلیت حاوی محیط کشت و باکتری اختصاصی آن به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شدند.

برای باکتری اشریشیا کلای^{۵۴} از محیط کشت‌های MacConkey Agar و EMB Agar، برای باکتری سالمونلا^{۵۵} از محیط کشت XLD Agar^{۵۶} و در پایان پلیت‌ها برای مدت ۲۴ ساعت در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در دستگاه انکوباتور^{۵۷} قرار داده شدند. برای کشت و شمارش مخمر و قارچ در دو پلیت استریل، مقدار ۱ میلی‌لیتر از هر نمونه با رقت ۰/۱ گرم بر میلی‌لیتر افزوده و بعد ۱۵ تا ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت YGC Agar به آن‌ها اضافه شد. پلیت‌ها به مدت ۳ روز در دمای ۳۷ درجه سانتی‌گراد در دستگاه انکوباتور انکوبه شدند. سپس کلنی‌های کپک و مخمر شمارش شد.

آزمون فلزات سنگین

برای انجام این آزمون از هضم با روش استاندارد^{۵۸} متداول استفاده شد (۴۰-۸۰). ابتدا ۱/۵ گرم از پودر دمنوش وزن و در آون^{۵۹} ۷۰ درجه سانتی‌گراد به مدت ۳ ساعت قرار داده شد. نمونه در فواصل منظم توزین شد و پس از خروج کامل رطوبت و ثابت شدن وزن، نمونه به ظرف در بسته منتقل گردید.

در آزمون سنجش فلزات سنگین به روش Metrohm به ۲۵۰ میلی‌گرم از نمونه در ارلن^{۶۰}، به ترتیب ۴ میلی‌لیتر اسید نیتریک^{۶۱}، ۰/۵ میلی‌لیتر، اسید هیپوکلریک^{۶۲}، ۱/۰ میلی‌لیتر اسیدسولفوریک^{۶۳}،

52. US Pharmacopoeia

53. Petri dish

54. Escherichia coli

55. Salmonella

56. Xylose Lysine Deoxycholate

57. Incubator

58. Metrohm

59. Oven

60. Erlenmeyer flask

61. Nitric acid

62. Hypochloric acid

63. Sulfuric acid

و هیدروژن پراکسید^{۶۴} (۳۰٪)، ۱/۰ میلی‌لیتر اضافه شد. مخلوط درون ارلن با استفاده از هیتر^{۶۵} در دمای ۲۰۰ درجه سانتی‌گراد تا زمان خشک شدن کامل محتویات آن حرارت داده شد. پس از خشک شدن محتوای ارلن، ۱ میلی‌لیتر H₂O₂ اضافه و مجدداً حرارت داده شد. پس از خشک شدن، این مرحله بار دیگر تکرار و پس از خشک شدن کامل، ۱۰ میلی‌لیتر آب مقطر به ارلن اضافه و با استفاده از مگنتیک استیرر^{۶۶} به مدت ۵ دقیقه هم زده و از کاغذ صافی عبور داده شد. مایع شفاف حاصل از صاف کردن هر نمونه در لوله آزمایش جدا جمع‌آوری گردید. مقدار ۱۰ میلی‌لیتر از مایع به دستگاه پلاروگراف^{۶۷} وارد شد و پس از آنالیز، نمودار نمونه از سیستم متصل به دستگاه دریافت گردید. طی این روش میزان محتوای چهار فلز کادمیم^{۶۸}، مس، روی و سرب در نمونه پودر حاوی چهار گیاه گاوزبان، بادرنجبویه، سنبل‌الطیب و اسطوخدوس تعیین شد.

تهیه اسانس

استخراج اسانس از پودر دمنوش مخلوط گاوزبان، سنبل‌الطیب، بادرنجبویه و اسطوخدوس با استفاده از روش تقطیر با آب و توسط دستگاه کلونجر^{۶۹} به مدت ۴ ساعت انجام شد. ۲۰۰ گرم از پودر نهایی توسط ترازوی دیجیتالی با دقت ۰/۰۰۱ وزن شد و با مقدار معینی آب (تقریباً نصف حجم بالن) مقطر درون بالن دستگاه کلونجر ریخته شد. بعد از اتمام پروسه، اسانس حاصله جمع‌آوری و در لوله‌های آزمایش با درب پیچ‌دار ریخته شد. جهت آماده‌سازی برای تزریق به دستگاه جی سی مس^{۷۰}، آبیگری از اسانس‌ها با استفاده از سدیم سولفات آنیدروز^{۷۱} انجام شد. بازده اسانس‌گیری با تقسیم حجم اسانس بر وزن نمونه به دست آمد. اسانس‌ها تا زمان تزریق به دستگاه جی سی مس و تعیین پروفایل اسانس در فریزر ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

آماده‌سازی اسانس جهت تزریق به دستگاه جی سی مس

نمونه قبل از تزریق به دستگاه جی سی مس توسط دی‌کلرومتان^{۷۲} به نسبت ۱ به ۵ رقیق شد.

64. Hydrogen peroxide

65. Heater

66. Magnetic stirrer

67. Polarograph

68. Cadmium

69. Clevenger

70. Gas Chromatography (GC-MASS)

71. Sodium sulphate anhydrous

72. Dichloromethane

جهت اطمینان از عدم وجود آب در نمونه‌ها، مراحل آگیری یک‌بار دیگر توسط سدیم سولفات انیدروز انجام شد و مقدار یک میکرولیتر از اسانس آگیری شده به دستگاه جی سی مس تزریق و ترکیبات آن آنالیز شد. برای تجزیه و شناسایی ترکیبات موجود در اسانس از دستگاه جی سی مس محصول کمپانی Agilent^{۷۳} آمریکا استفاده شد. برای تهیه پروفایل جی سی و تعیین میزان فراوانی اجزاء، ابتدا با تزریق‌های متعدد به دستگاه جی سی مس بهترین روش تزریق که در آن پیک‌های مربوط به ترکیبات از هم جدا باشند، انتخاب می‌شوند و بعد نمونه به دستگاه تزریق می‌گردد. دستگاه جی سی مس از دو بخش کروماتوگراف گازی^{۷۴} و طیف‌سنج جرمی^{۷۵} تشکیل شده است. ابتدا ترکیبات توسط قسمت کروماتوگراف گازی از یکدیگر جدا می‌شوند و با یک فاصله مشخص، از ستون گروماتوگرافی خارج و سپس وارد قسمت طیف‌سنج جرمی می‌شوند. ترکیبات اسانس توسط این طیف‌سنج جرمی آنالیز می‌شود و مورد شناسایی قرار می‌گیرد. رایانه متصل به دستگاه با استفاده از بانک اطلاعاتی طیف‌های موجود در حافظه خود، بر اساس طیف هر یک از ترکیبات جداسازی شده، چندین ترکیب با احتمالات مختلف معرفی می‌کند. روند شناسایی نمایی ترکیبات از طریق اندازه‌گیری طیف جرمی آن‌ها و مقایسه اندیس بازداری^{۷۶} و اندیس کوانتس^{۷۷} ترکیبات با کتاب آدامز^{۷۸} ۱۹۹۵، کتابخانه nI۷^{۷۹} و مقالات انجام شده قبلی انجام گرفت (۴۰). برای محاسبه اندیس کوانتس، آلکان نرمال^{۸۰} به صورت هیدروکربن‌های خطی^{۸۱} با ۹ تا ۲۴ اتم کربن در شرایط معینی به دستگاه جی سی مس تزریق و قله حاصل از هر طیف رسم شد (۴۱).

تعیین مقدار مارکرهای اختصاصی در پودر دمنوش- بورنئول^{۸۲} و تیمول^{۸۳}

پس از تجزیه و شناسایی ترکیبات موجود در پودر دمنوش توسط دستگاه جی سی مس و آنالیز آن‌ها، استانداردسازی فرآورده توسط دستگاه GC/

FID^{۸۴} محصول کمپانی Agilent^{۸۵} آمریکا انجام شد (مدل A۷۸۹۰). بدین منظور گاز نیتروژن با جریان ۱ میلی‌لیتر در دقیقه به‌عنوان گاز حامل انتخاب شد. درصد خلوص این گاز ۹۹/۹۹۹ (Grade ۵) است. از آنجا که در این دستگاه آشکارساز FID بکار رفته است، به دو گاز هیدروژن و اکسیژن نیاز است که نسبت ۱۰ به ۱ آن بهترین شعله را ایجاد کند. محل تزریق نمونه^{۸۶} از نوع Split/Splitless است یعنی دو حالت با شکافتگی و بدون شکافتگی دارد که جهت نمونه‌های غلیظ و رقیق استفاده می‌شود. مقدار یک میکرولیتر از نمونه از طریق inlet به دستگاه تزریق می‌شود. دمای اتاق تزریق ۲۲۰°C است و به محض تزریق، نمونه در فاز بخار قرار می‌گیرد. برای نمونه، Split به صورت ۱ به ۵۰ تنظیم می‌شود که یک قسمت وارد ستون دستگاه و بقیه خارج می‌شود. نوع ستون دستگاه HP-5MS است که طول آن ۳۰ متر و قطر آن ۰/۲۵ میلی‌متر است. جنس فاز ثابت درون ستون از فنیل متیل سیلوکسان^{۸۷} با قطر ۰/۲۵ میکرومتر است. دمای آشکارساز ۳۰۰°C است درحالی‌که دمای ستون از ۶۰-۲۲۰°C (۵/۵ دقیقه)^{۸۸} برنامه‌ریزی شد و به طوری که به مدت ۱۰ دقیقه در دمای ۲۲۰°C قرار گیرد. نمونه فرارتر سریع‌تر از ستون خارج می‌شود و به سمت آشکارساز می‌رود، درحالی‌که نمونه‌ای که کربن بیشتری دارد و به عبارتی سنگین‌تر است دیرتر به آشکارساز می‌رسد، لذا در این سیستم از گاز حامل استفاده می‌شود تا شفافیت آنالیز نمونه‌ها را افزایش دهد. اجزای نمونه از جلوی شعله عبور داده شده و یونیزه می‌شود و این یون‌های باردار توسط سیستم جمع‌کننده یون‌ها جمع‌آوری می‌شود و اجزایی که فراوانی بالاتری دارند پیک بلندتری از خود نشان می‌دهند. از محلول بورنئول و تیمول ۹۹/۵ درصد نیز جداگانه به‌عنوان رفرنس استفاده می‌شود و غلظت‌های مختلف آن‌ها به ترتیب (۱۲۵۰، ۶۲۵، ۱۵۶، ۵۳۱۲/۲۵) و ۲۵۰۰ و ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر (برای بورنئول) و (۱۰۰۰۰، ۵۰۰۰، ۲۵۰۰ و ۱۲۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر) با حل کردن در متانول به‌وسیله رقت‌سازی‌های متوالی آماده شدند. جهت بررسی تکرارپذیری، برای هر غلظت از مارکرهای استاندارد^{۸۹}، ۳ بار تزریق انجام می‌شود و منحنی استاندارد به‌وسیله میانگین سه تزریق برای هر ترکیب استاندارد (تیمول و بورنئول)

84. Flame ionization detector

85. Agilent

86. Inlet

87. Phenylmethylsiloxane

88. Column temperature

89. Standard markers

73. Agilent Co.USA

74. Gas Chromatograph

75. Mass spectrometer

76. Retention index

77. Kovats index

78. Adams

79. nI7 device library

80. Normal alkane

81. Linear hydrocarbon

82. Borneol

83. Thymol

گرم گیاه خشک، (GAE/g dry plant).

رقیق سازی فولین-سیوکالتو

محلول فولین-سیوکالتو را به نسبت ۱ به ۱۰ با آب مقطر رقیق شد و در محیطی تاریک قرار داده شد. تهیه محلول کربنات سدیم برای تهیه محلول کربنات سدیم^{۱۰۰}، ۱۸/۷۵ گرم کربنات سدیم در ۲۵۰ سی سی آب مقطر تهیه شد. تهیه محلول اسید گالیک محلول متانولی اسید گالیک با غلظت های ۳/۱، ۶/۲۵، ۱۲/۵، ۲۵، ۵۰، ۱۰۰ و ۲۰۰ میکروگرم/ میلی لیتر تهیه و به عنوان استاندارد و تهیه منحنی کالبراسیون^{۱۰۱} در اندازه گیری فنول تام عصاره ها استفاده شد.

تهیه غلظت عصاره

مقدار ۵ میلی گرم عصاره هیدروالکلی به دست آمده در ۲۰ میلی لیتر متانول حل شد تا غلظت ۲۵۰ میکروگرم/میلی لیتر حاصل گردد.

روش اندازه گیری میزان فنول تام عصاره

میزان ۰/۵ میلی لیتر از غلظت های مختلف اسید گالیک با ۲/۵ میلی لیتر از فولین سیوکالتو رقیق شده و ۲ میلی لیتر کربنات سدیم ۷۵ گرم/لیتر مخلوط شد و ۳۰ دقیقه در تاریکی در دمای ۲۰ درجه سانتی گراد باقی ماند و سپس جذب در ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. این تست برای هر غلظت از محصول متانولی اسید گالیک سه بار انجام شد. سپس ۰/۵ میلی لیتر از غلظت های تهیه شده از هر نمونه با ۲/۵ میلی لیتر از معرف فولین-سیوکالتو رقیق شده و ۲ میلی لیتر کربنات سدیم (۷۵ گرم/لیتر) مخلوط و پس از ۳۰ دقیقه نگهداری در تاریکی، جذب آن ها در ۷۶۵ نانومتر به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر^{۱۰۲} فرابنفش خوانده شد. همچنین از آب مقطر به عنوان بلانک استفاده شد. سپس نمودار جذب- غلظت به وسیله نرم افزار اکسل رسم شد و معادله خط محاسبه گردید (۴۳، ۴۲).

میزان محتوای فنولی طبق فرمول زیر محاسبه گردید:

$$Cp = (Cg \times v) / M$$

Cp: محتوای فنولی عصاره (میلی گرم/میلی لیتر)

Cg: غلظت معادل اسید گالیک که از منحنی استاندارد

به دست آمده (میلی گرم/میلی لیتر)

V: حجمی از عصاره که با آن آزمایش انجام گرفت

M: میزان عصاره خشک بر حسب گرم (g)

رسم می شوند. پس از رسم نمودار استاندارد نمونه فراورده با غلظت های مشخص به دستگاه تزریق شد و پروسه تعیین مقدار انجام پذیرفت. پس از آن تعیین مقدار در یک تی بگ محاسبه و ثبت گردید.

عصاره گیری

جهت انجام این قسمت، عصاره گیری به نسبت ۱ به ۱۰ انجام گرفت. بدین صورت که ۵۰ گرم از پودر دمنوش مورد نظر برداشته شد و به همراه ۵۰۰ سی سی محلول هیدروالکلی^{۹۰} ۸۰ درصد در ارلن ریخته شد و به مدت ۱۵ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد در دستگاه سونیکاتور^{۹۱} قرار گرفت. در ادامه عصاره به دست آمده توسط کاغذ صافی جدا گردید. این عمل سه بار تکرار شد و سپس از مواد باقی مانده روی کاغذ صافی جهت عصاره گیری با استفاده از حلال قطبی^{۹۲} استفاده شد. در ادامه عصاره های حاصل از هر دو قسمت با استفاده از دستگاه روتاری^{۹۳} تغلیظ شدند و پس از آن عصاره ها به فالکون^{۹۴} منتقل شدند و در دستگاه اسپید و کیوم قرار گرفتند. پس از این مرحله، عصاره های حاصل جهت خشک شدن نهایی به دستگاه فریز درایر^{۹۵} منتقل شدند و در دمای ۵۰ درجه سانتی گراد به صورت کامل خشک گردیدند و وزن عصاره های حاصل جهت محاسبه راندمان عصاره گیری اندازه گیری شد.

تعیین محتوای فنولی عصاره ها

ترکیبات فنولی و پلی فنولی دسته عمده ضد اکسیدان های طبیعی موجود در گیاهان را تشکیل می دهند و به وسیله معرف فولین-سیوکالتو^{۹۶} و با استفاده از روش رنگ سنجی به وسیله دستگاه اسپکتروفوتومتر^{۹۷} UV اندازه گیری می شود. در این روش اکسیدهای فلزی به وسیله ضد اکسیدان های پلی فنولی مثل اسید گالیک^{۹۸} و کاتچین^{۹۹} کاهش می یابند و باعث ایجاد یک محلول آبی رنگ با حداکثر جذب ۷۶۵ نانومتر می شوند (۴۱).

در این آزمایش اسید گالیک به عنوان استاندارد استفاده شد و میزان کلی فنول بر حسب میلی گرم/گرم اسید گالیک گزارش گردید. (میلی گرم گالیک اسید /

90. Hydroalcoholic

91. Sonicator

92. Polar solvent

93. Rotary evaporator

94. Falcon tube

95. Freeze dryer

96. Folin-ciocalteu

97. Spectrophotometer

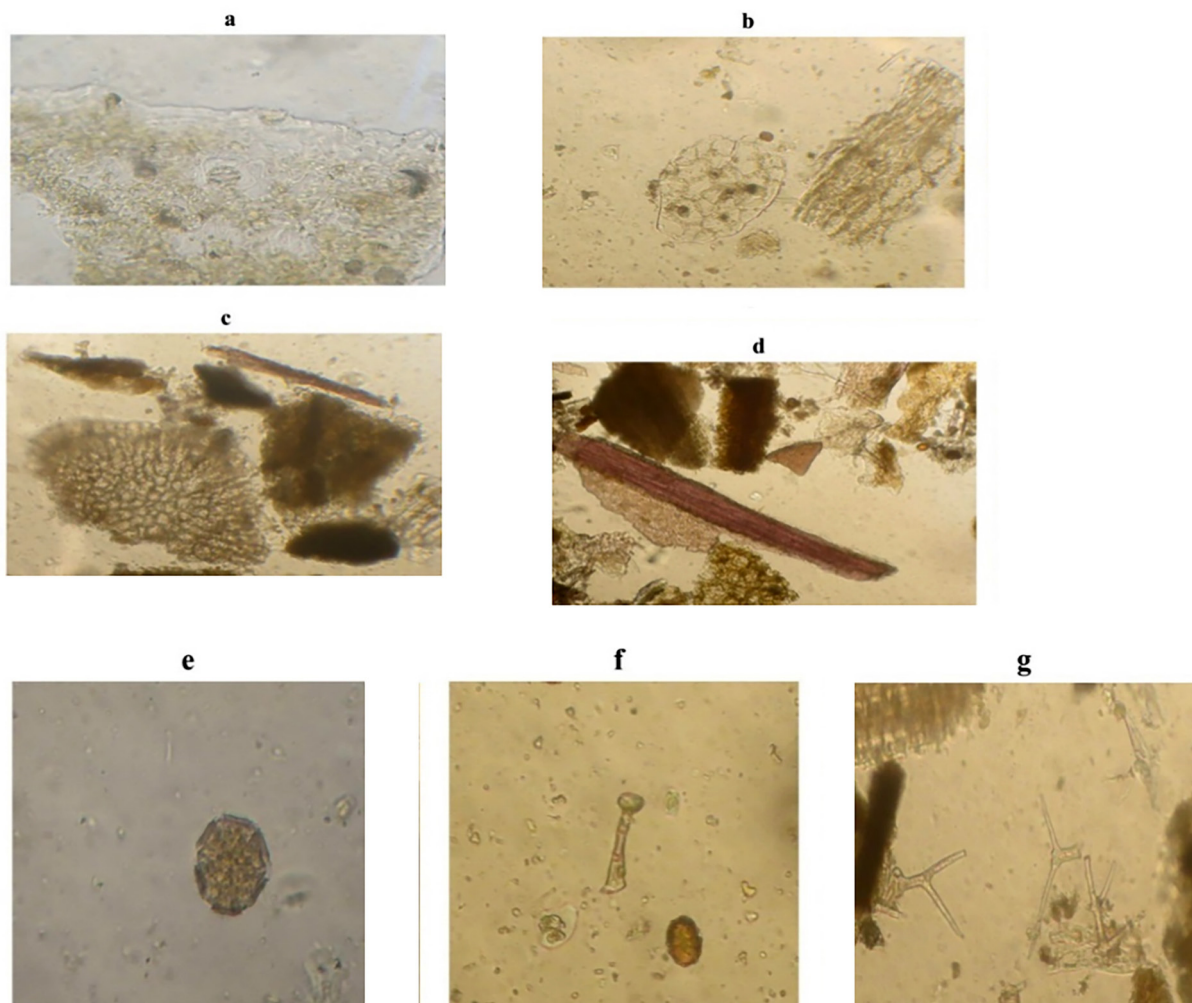
98. Gallic acid

99. Catechin

100. Sodium carbonate

101. Calibration

102. Spectrophotometer



شکل ۱. خردنگاری گیاه اسطوخدوس. (a) اپیدرم فوقانی برگ. (b) اپیدرم تحتانی و روزنه‌های آنوموسیستیک. (c) پارانشیم گلبرگ. (d) آوندها. (e) دانه‌های گرده شش‌ضلعی. (f) کرک‌های غده‌ای. (g) کرک‌های منشعب.

برای خواندن جذب از آب مقطر به‌عنوان بلانک استفاده شد (۱۵۴ - ۴۱).

تعیین میزان فلاونوئید در عصاره

به‌منظور اندازه‌گیری میزان فلاونوئید در عصاره‌ها از روش داود^{۱۰۳} استفاده گردید. ابتدا منحنی استاندارد کالیبراسیون رسم شد. غلظت‌های مختلف از ۰ تا ۱۰۰ میکروگرم/میلی‌لیتر از کورستین^{۱۰۴} در متانول تهیه و ۵ میلی‌لیتر از هر یک از غلظت‌ها، با ۵ میلی‌لیتر محلول آلومینیوم کلراید ۲ درصد (۲ گرم آلومینیوم کلرید/ ۱۰۰ میلی‌لیتر آب مقطر) مخلوط و ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه گردید. سپس جذب به وسیله اسپکتروفتومتر فرابنفش در طول موج ۴۱۵ نانومتر اندازه‌گیری شد و منحنی کالیبراسیون رسم شد. سپس ۵ میلی‌گرم از عصاره هیدروالکلی در ۲۰ میلی‌لیتر متانول حل و ۳ میلی‌لیتر در هر لوله آزمایش ریخته شد و سپس ۳ میلی‌لیتر محلول آلومینیوم کلرید ۲ درصد به هر لوله آزمایش اضافه

گردید و ۱۰ دقیقه در دمای ۲۵ درجه سانتی‌گراد انکوبه شد و جذب در طول موج ۴۱۵ نانومتر اندازه‌گیری گردید. میزان فلاونوئید بر حسب میلی‌گرم کورستین/ گرم گیاه خشک (QE/g dry plant)^{۱۰۵} گزارش شد. غلظت‌های مختلف کورستین به میزان ۵۰ - ۳/۱۲۵ میکروگرم/میلی‌لیتر در متانول به‌عنوان استاندارد تهیه و منحنی کالیبراسیون حاصل از آن‌ها در اندازه‌گیری فلاونوئید ها استفاده شد (۴۲).

طیف‌سنجی مادون قرمز با تبدیل فوریر

حدود ۱۵ میلی‌گرم از نمونه را با حدود ۴۰۰ میلی‌گرم برمور پتاسیم^{۱۰۶} خالص و خشک مخلوط و به‌صورت پودر نرم و یکنواخت با فشار زیاد از آن یک قرص نازک و شفاف ساخته شد. برمور پتاسیم در طول موج ۲/۵ تا ۲۵ میکرون جذبی ندارد و امکان می‌دهد که از نمونه طیف کاملی به دست آید. برای کالیبره کردن دستگاه از فیلم‌های پلی‌اتیلن^{۱۰۷} یا پلی استایرن^{۱۰۸} استفاده شد.

105. Quercetin Equivalent

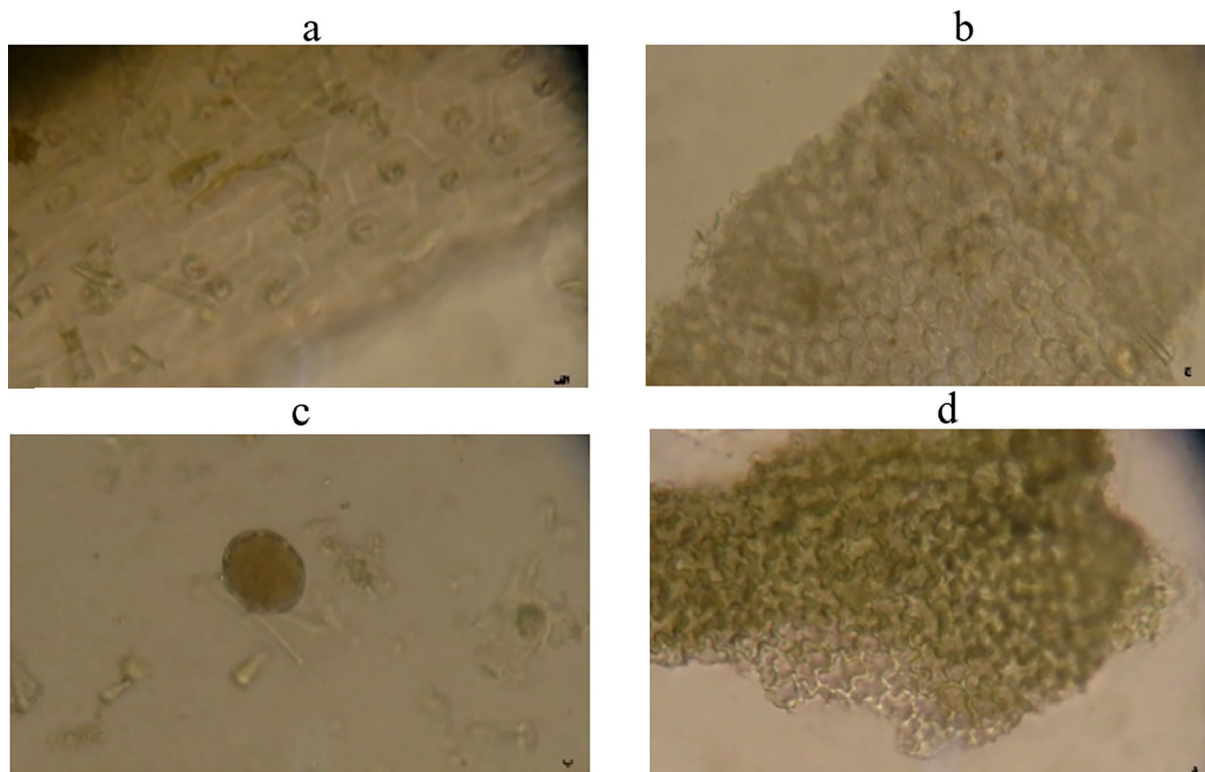
106. Potassium bromide

107. Polyethylene film

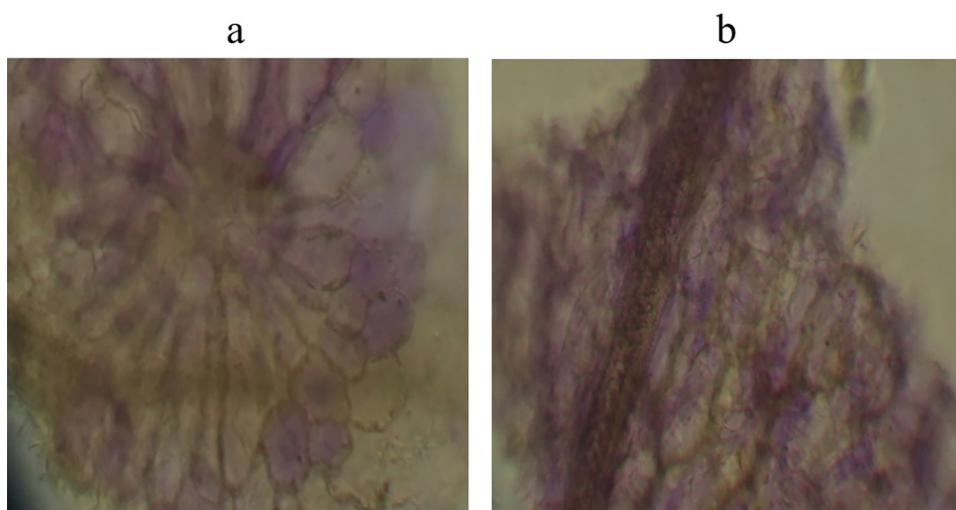
108. Polystyrene film

103. Dowd method

104. Quercetin



شکل ۲. خرده‌نگاری گیاه بادرنجبویه. (a) اپیدرم پایینی همراه با روزنه (b) دانه گرده (c) قسمتی از بافت گلبرگ همراه با آوند چوبی (d) بافت روپوست (اپیدرم) برگ.



شکل ۳. خرده‌نگاری گیاه گل گاوزبان. (a)، گلبرگ (خرده‌نگاری با آب)، (b) محل اتصال کرک به گلبرگ (خرده‌نگاری با آب)

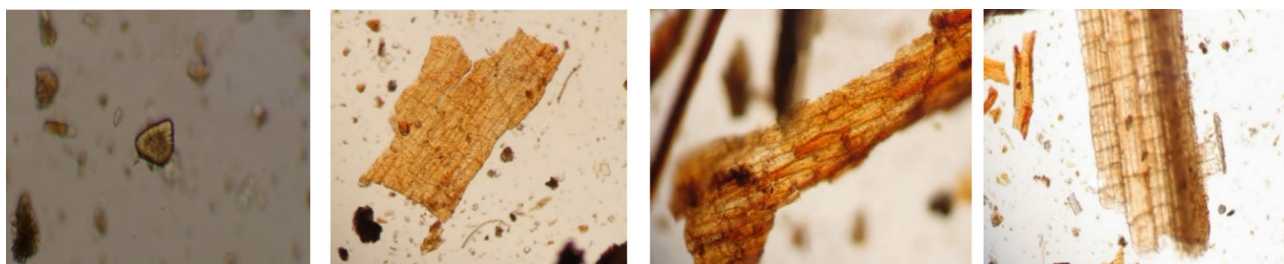
یافته‌ها

خرده‌نگاری

در این مطالعه، پروسه خرده‌نگاری^{۱۰۹} گل گاوزبان، برگ بادرنجبویه و اندام هوایی اسطوخودوس و ریشه سنبل‌الطیب زیر میکروسکوپ الکترونی انجام شد و عکس‌برداری از اندام‌ها به صورت دقیق و جزئی توسط دوربین متصل به میکروسکوپ صورت پذیرفت (شکل ۱-۴)

ملاحظات اخلاقی

- آزمون‌های انجام شده در شرایط برون تنی انجام شده و از پروتوکول‌های استاندارد رایج آزمایشگاهی استفاده گردیده است.
- این مقاله برگرفته از نتایج به دست آمده از پایان‌نامه امیرحسین دادبخش جهت اخذ درجه دکترای عمومی داروسازی است که از کمیته اخلاق دانشگاه علوم پزشکی شیراز کد تأیید اخلاق با شماره IR.SUMS.REC.1399.621 دریافت نموده است.



شکل ۴. خرده‌نگاری گیاه سنبل‌الطیّب. (a و b) بافت چوب‌پنبه اپیدرم، (c) پارانشیم پوست، (d) بافت اسکلرانسیم

جدول ۲. نتایج اندازه‌گیری زاویه سکون

پودر	دمنش سنبل‌الطیّب، گاوزبان، بادرنجبویه و اسطوخدوس
زاویه سکون ۱	۳۳/۲۵°
زاویه سکون ۲	۳۲/۸۳°
زاویه سکون ۳	۳۴/۵۹°
میانگین ± انحراف معیار	۳۳/۵۵ ± ۰/۹۱

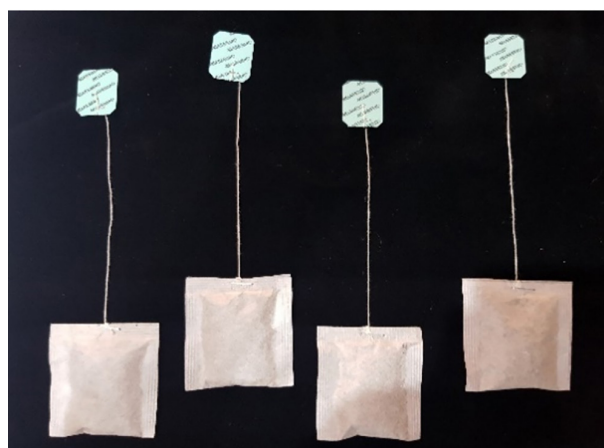
قسمت مورد استفاده گیاه بادرنجبویه اندام‌های هوایی گیاه بود. روزنه و بافت‌های اپیدرم برگ و دانه گرده گیاه مورد مطالعه قرار گرفت. تصاویر خرده‌نگاری در بادرنجبویه در زیر مشاهده می‌گردد.

محصول نهایی

با توجه به اینکه معمولاً تی‌بگ‌ها حاوی ۲ گرم از فراورده هستند، تی‌بگ‌های تولیدشده در این مطالعه نیز با محتوای ۲ گرم از پودر مخلوط چهار گیاه سنبل‌الطیّب و گاوزبان، اسطوخدوس و بادرنجبویه در نظر گرفته شدند. (شکل ۵)

نتایج اندازه‌گیری زاویه سکون

نتایج محاسبه اندازه‌گیری زاویه سکون برای پودر دمنوش در (جدول ۲) ارائه شده است.



شکل ۵. تی‌بگ‌های نهایی تولیدشده

نتایج تست اندازه ذره‌ای

نتایج آزمون‌های اندازه ذره برای پودر دمنوش در جدول ۳ ارائه شده است.

نتایج تعیین انحراف وزن

میانگین وزنی به دست آمده برای ۲۰ تی‌بگ نهایی ۲/۱۵ گرم تعیین شد. هم‌چنین انحراف معیار و درصد تغییرات وزنی به ترتیب برابر با ۰/۰۴ و ۱/۶۲ درصد محاسبه گردید.

نتایج اندازه‌گیری ابعاد

میانگین طول اندازه‌گیری ۱۰ تی‌بگ تصادفی برابر با ۶/۲۰ سانتی‌متر و میانگین عرض آن‌ها برابر با ۵/۹۵ سانتی‌متر اندازه‌گیری شد. انحراف معیار طول تی‌بگ‌ها برابر با ۰/۰۱ و انحراف معیار عرض تی‌بگ‌ها برابر با ۰/۰۲ و درصد تغییرات طول و عرض تی‌بگ‌ها به ترتیب برابر با ۰/۰۰۰۱۷۹ و ۰/۰۰۰۳ اندازه‌گیری شد.

نتایج کنترل میکروبی

آزمایشگاه کنترل مواد غذایی، بهداشتی و آرایشی دانشگاه علوم پزشکی شیراز تعداد کلی قارچ‌های هوازی و باکتری‌های هوازی و گونه‌های مختلف سالمونلا^{۱۱۰} و اشریشیا کلی^{۱۱۱} موجود در نمونه پودر دمنوش را مورد ارزیابی قرار داد که در (جدول ۴) نشان داده شده است.

110. Salmonella typhimurium

111. Escherichia coli

جدول ۳. نتایج اندازه ذره‌ای

درصد تجمعی	درصد وزنی پودر	وزن پودر (g)	اندازه روزه الک (میکرون)	شماره مش
۰	۰	۰	۲۰۰	۱۰
۰/۴	۰/۴	۰/۲	۸۵۰	۲۰
۴۵/۱۸	۴۴/۷۸	۲۲/۲۹	۶۰۰	۳۰
۵۰/۷۴	۵/۵۶	۲/۷۸	۴۲۰	۴۰
۸۳/۶۴	۳۲/۹	۱۶/۴۵	۳۰۰	۵۰
۸۴/۵۴	۰/۹	۰/۴۵	۲۵۰	۶۰
۸۸,۵۴	۴	۲	۲۱۲	۷۰
۸۸,۵۴	۰	۰	۱۸۰	۸۰

جدول ۴. نتایج آزمایش‌های کنترل میکروبی

ردیف	آزمایش‌های انجام شده	نتایج آزمایش	حدود قابل قبول	واحد
۱	شمارش کلی قارچ‌های هوازی (کپک و مخمر)	کمتر از ۱۰۰	کمتر از ۱۰۰۰	cfu/g
۲	شمارش کلی باکتری‌های هوازی	کمتر از ۱۰۰	کمتر از ۱۰۰۰۰۰	cfu/g
۳	شناسایی گونه‌های مختلف سالمونلا	منفی	منفی	—
۴	شناسایی اشیریشیا کلی	منفی	منفی	—

جدول ۵. نتایج آزمون فلزات سنگین

ردیف	آزمایش‌های انجام شده	نتایج آزمایش	حدود قابل قبول	واحد
۱	تعیین مقدار کادمیوم	کمتر از ۰/۰۰۲	فاقد محدوده مجاز	ppm
۲	تعیین مقدار سرب	کمتر از ۰/۰۰۴۸	فاقد محدوده مجاز	ppm
۳	تعیین مقدار آرسنیک	کمتر از ۰/۰۵	فاقد محدوده مجاز	ppm

جدول ۶. نتایج اندازه‌گیری بازده اسانس

راندمان (v/w%)	میزان استحصال (ml)	وزن نمونه	نام نمونه
۰/۲ درصد	۰/۴ میلی‌لیتر	۲۰۰ گرم	پودر دمنوش

نتایج آزمون فلزات سنگین

آزمایشگاه کنترل مواد غذایی، بهداشتی و آرایشی دانشگاه علوم پزشکی شیراز مقدار کلی فلزات کادمیوم و سرب و آرسنیک موجود در نمونه دمنوش را مورد ارزیابی قرار داد که نتایج آن در (جدول ۵) نشان داده شده است.

بازده اسانس‌گیری

استخراج اسانس با استفاده از روش تقطیر با آب و توسط دستگاه کلونجر به مدت ۴ ساعت انجام شد و راندمان محاسبه گردید (جدول ۶).

آنالیز نمونه‌های اسانس

ترکیبات اسانس فراورده با روش کروماتوگرافی

گازی/طیف‌سنجی جرمی^{۱۱۲} آنالیز و شناسایی شدند. پس از آبگیری و رقیق‌سازی اسانس به دست آمده از دمنوش بادرنجبویه و اسطوخدوس، گل گاوزبان و سنبل‌الطیب، مقدار یک میکرولیتر از آن به دستگاه جی سی مس تزریق و آنالیز نمونه انجام شد. نتایج در (شکل ۶) و (جدول ۷) ارائه شده است.

پس از بررسی طیف حاصل از نمونه‌های اسانس، شناسایی نهایی ترکیبات از طریق اندازه‌گیری طیف جرمی آن‌ها و مقایسه اندیس بازداری^{۱۱۳} و اندیس کواتس^{۱۱۴} آن‌ها با کتاب آدامز ۱۹۹۷، کتابخانه n17 و مقالات مرتبط انجام گرفت.

112. Gas chromatography/Mass spectrometry

113. Retention Index (RI)

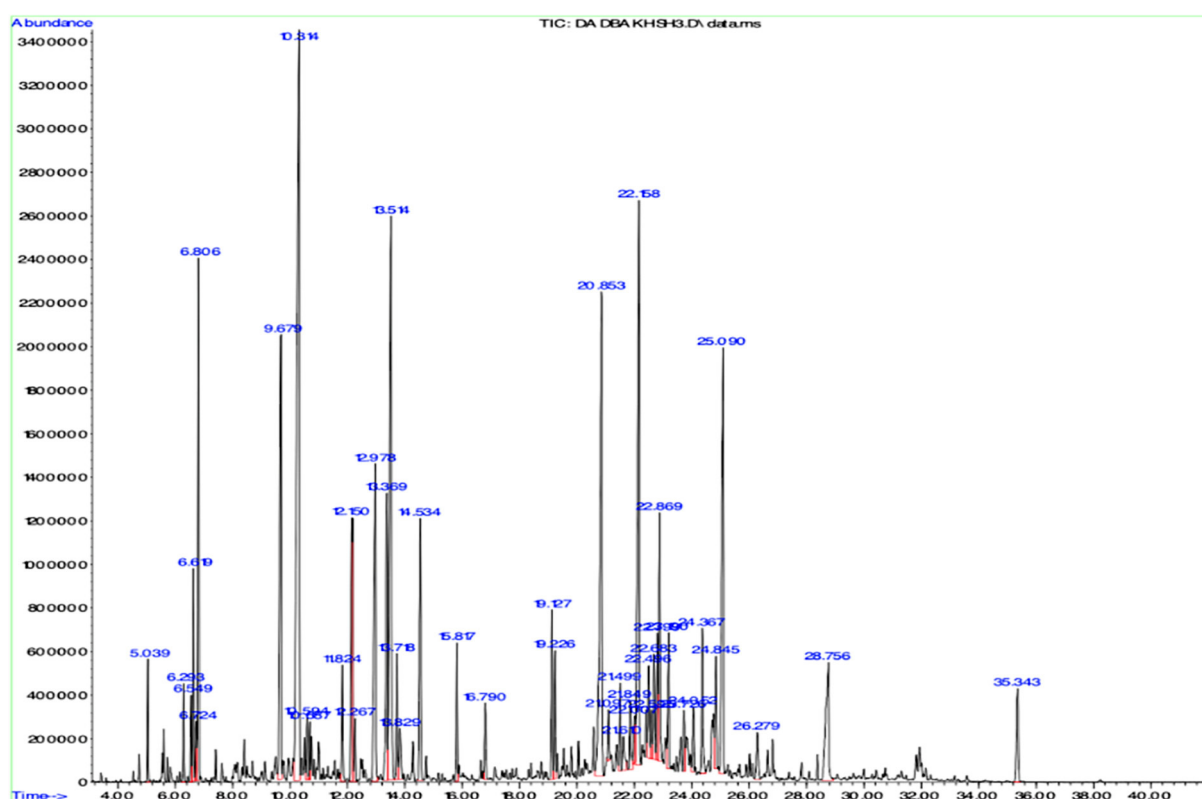
114. Kovats Index (KI)

جدول ۷. آنالیز ترکیبات اسانس با GC/MS

No.	Component	Retention time	Area (%)	KI _{Cal}	KI _{Ref}
۱	Camphene	۵/۰۳۹	۰/۶۹	۹۴۹/۵۳	۹۵۰
۲	Carene	۶/۲۹۳	۰/۶۱	۱۰۱۱/۷۲	۱۰۱۲
۳	p-cymene	۶/۵۴۹	۰/۶۰	۱۰۲۲/۴۴	۱۰۲۳
۴	Limonene	۶/۷۲۴	۰/۵۶	۱۰۳۰/۹۹	۱۰۳۱
۵	Eucalyptol	۶/۸۰۶	۳/۸۲	۱۰۳۳/۱۹	۱۰۳۳
۶	Camphor	۹/۶۷۹	۵/۳۸	۱۱۴۹/۰۰	۱۱۴۹
۷	Borneol	۱۰/۳۱۴	۱۴/۸۸	۱۱۷۳/۳۷	۱۱۷۲
۸	p-cymene-8-ol	۱۰/۵۹۴	۰/۵۷	۱۱۸۴/۱۱	۱۱۸۴
۹	o-cymene-8-ol	۱۰/۶۸۷	۰/۴۷	۱۱۸۷/۶۸	۱۱۸۸
۱۰	Unknown	۱۱/۸۲۴	۱/۰۳	۱۲۳۰/۹۸	-
۱۱	Propanal, 2-methyl-3-phenyl	۱۲/۱۵	۲/۶۹	۱۲۴۳/۳۶	۱۲۴۴
۱۲	Carvone	۱۲/۲۶۷	۰/۵۵	۱۲۴۷/۸۰	۱۲۴۹
۱۳	Citral	۱۲/۹۷۸	۴/۴۶	۱۲۷۴/۸۰	۱۲۷۶
۱۴	Endobornyl acetate	۱۳/۳۶۹	۳/۱	۱۲۸۹/۶۴	۱۲۹۰
۱۵	Thymol	۱۳/۵۱۴	۸/۳۹	۱۲۹۵/۱۴	۱۲۹۶
۱۶	Carvacrol	۱۳/۷۱۸	۱/۸	۱۳۰۲/۹۶	۱۳۰۲
۱۷	Unknown	۱۴/۵۳۴	۲/۸۸	۱۲۹۳/۴۶	-
۱۸	Geranyl Acetate	۱۵/۸۱۷	۱/۱۱	۱۳۸۴/۷۸	۱۳۸۵
۱۹	Unknown	۱۶/۷۹	۰/۸۷	۱۴۲۳/۶۴	-
۲۰	Naphthalene	۱۹/۱۲۷	۱/۴۲	۱۵۱۹/۳۴	-
۲۱	Unkonwn	۱۹/۲۲۶	۱/۱۸	۱۵۲۳/۵۵	-
۲۲	Caryophyllene Oxide	۲۰/۸۵۳	۸/۱۷	۱۵۹۲/۸۵	۱۵۹۳
۲۳	Unknown	۲۱/۰۹۷	۰/۴۸	۱۶۰۳/۳۹	-
۲۴	Tau-Cadinol	۲۱/۴۹۹	۰/۷۸	۱۶۲۱/۳۵	۱۶۲۳
۲۵	Unkonwn	۲۱/۶۱	۰/۵۳	۱۶۲۶/۳۱	-
۲۶	Unkonwn	۲۱/۸۴۹	۰/۷۲	۱۶۳۶/۹۸	-
۲۷	Caryophylladienol	۲۲/۰۰۷	۰/۵۴	۱۶۴۴/۰۳	۱۶۴۴
۲۸	Alpha-Cadinol	۲۲/۱۵۸	۸/۰۴	۱۶۵۰/۷۸	۱۶۵۱
۲۹	Beta-Selinene	۲۲/۴۹۶	۰/۹۳	۱۶۶۵/۸۸	۱۶۷۰
۳۰	Unknown	۲۲/۵۹۵	۰/۴۵	۱۶۷۰/۳۰	-
۳۱	Unknown	۲۲/۶۸۳	۱/۰۱	۱۶۷۴/۲۳	-
۳۲	Unknown	۲۲/۷۹۹	۱/۱۴	۱۶۷۹/۴۱	-
۳۳	Jatamansone	۲۲/۸۶۹	۲/۴۶	۱۶۸۲/۵۴	۱۶۸۴
۳۴	14-Norcadin-5-en-4-one	۲۳/۱۹	۱/۲۸	۱۶۹۶/۸۷	۱۶۹۶
۳۵	Unknown	۲۳/۷۲۶	۰/۶۴	۱۷۲۱/۹۱	-
۳۶	Unknown	۲۴/۰۵۲	۰/۶۶	۱۷۳۷/۲۴	-

No.	Component	Retention time	Area (%)	KI _{Cal}	KI _{Ref}
۳۷	Cadina-4,10(15)-dien-3-one	۲۴/۳۶۷	۱/۵۸	۱۷۵۲/۰۴۵	۱۷۴۳
۳۸	Unknown	۲۴/۸۴۵	۱/۴۳	۱۷۷۴/۵۱۸	-
۳۹	Unknown	۲۵/۰۹	۵/۹۲	۱۷۸۵/۳۹۸	-
۴۰	Unknown	۲۶/۲۷۹	۰/۶۶	۱۸۴۳/۸۴۵	-
۴۱	Hexadecanoic acid	۲۸/۷۵۶	۲/۷۹	۱۹۶۸/۷۸	۱۹۶۹
۴۲	Unknown	۳۵/۳۴۳	۱/۲۷	۲۲۹۹/۷۸	-

Retention time= زمان بازداری، Area= سطح زیر پیک، اندیس کواتس گزارش شده= KI_{Ref}، اندیس کواتس محاسبه شده= KI_{Cal}



شکل ۶. طیف گاز کروماتوگراف جرمی (GC/MS) نمونه اسانس پودر دمنوش

در یک میزان مشخص از فرآورده تعیین می‌گردد. در این روش از استوک اولیه تیمول، غلظت‌های سریالی ۱۰۰۰، ۵۰۰، ۲۵۰ و ۱۲۵ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه و پس از تزریق به دستگاه، به دفعات منحنی استاندارد تهیه شد که بهترین آن جهت انجام محاسبات در نظر گرفته شد. منحنی استاندارد تیمول خالص در شکل ۷ ارائه شده است (جدول ۸). قبل از تکمیل مراحل استانداردسازی تیمول در فرآورده، مطابق با برنامه دمایی اعمال شده در نرم‌افزار دستگاه گاز کروماتوگراف^{۱۱۵}، به دنبال تزریق نمونه اسانس فرآورده، نمونه استاندارد تیمول نیز تزریق گردید تا از یکسان بودن نتایج هر دو، اطمینان حاصل گردد (۴۴). (شکل ۸) و (شکل ۹) کروماتوگرام‌های به دست آمده از آنالیز تیمول خالص

115. Gas chromatograph

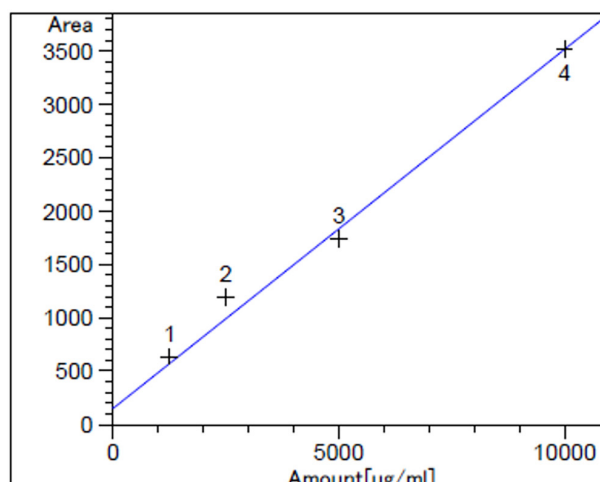
لازم به ذکر است، در صورتی که اندیس کواتس محاسبه شده برای ترکیب، با اختلاف کمتر از ± 5 واحد نسبت به اندیس کواتس ذکر شده در رفرنس بود، در آن صورت مطابقت شناسایی ترکیب، قابل استناد و تأیید شده است (رفرنس CNC). در جدول ۷ هریک از ترکیبات موجود در نمونه‌های اسانس فرآورده به همراه اندیس کواتس آن‌ها ارائه شده است.

ابتدا از نمونه خالص تیمول، بعد از تهیه نمونه استوک، غلظت‌های سریالی با حل کردن در متانول تهیه شد و پس از رسم منحنی استاندارد، مقدار مجهول در نمونه بر اساس معادله خط به دست آمده از منحنی، تعیین مقدار گردید. مقداری که از این ترکیب از محاسبه دستگاه به دست می‌آید، بر اساس حجم تزریق است که مقدار آن

(با در نظر گرفتن چگالی واحد معادل با آب برای اسانس مستخرج از مخلوط گیاهان) معادل با $2223/25 \pm 451/49$ میکروگرم بوده که با توجه به راندمان اسانس و در نظر گرفتن میزان اسانس حاصل از محتوای یک تی‌بگ (۰/۲ درصد یا ۴/۳ میکرولیتر)، مقدار نهایی و عددی تیمول در یک تی‌بگ حاوی ۲/۱۵ گرم برابر با $9/56 \pm 1/94$ میکروگرم است.

تعیین مقدار بورنئول^{۱۱۶} با استفاده از روش GC/FID

ابتدا از نمونه خالص بورنئول، محلول استوک تهیه گردید و سپس غلظت‌های سریالی آن در متانول تهیه شد و پس از رسم نمودار استاندارد، مقدار بورنئول در نمونه بر اساس معادله خط به دست آمده از نمودار، تعیین گردید. مقداری که از این ترکیب از محاسبه دستگاه به دست

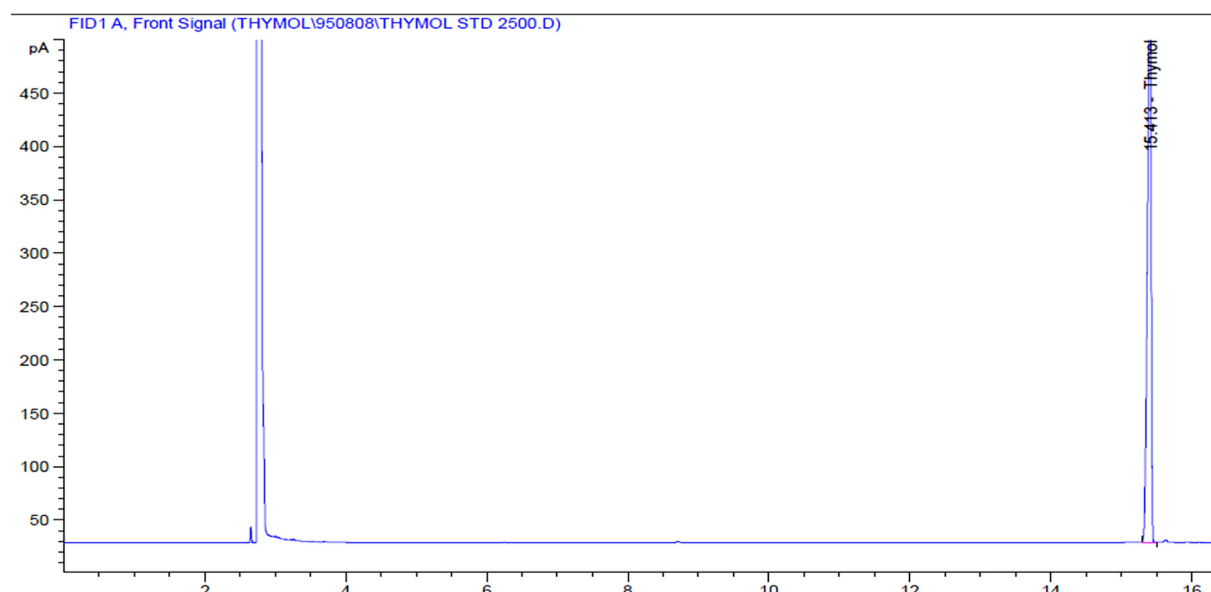


شکل ۷. نمودار استاندارد تیمول

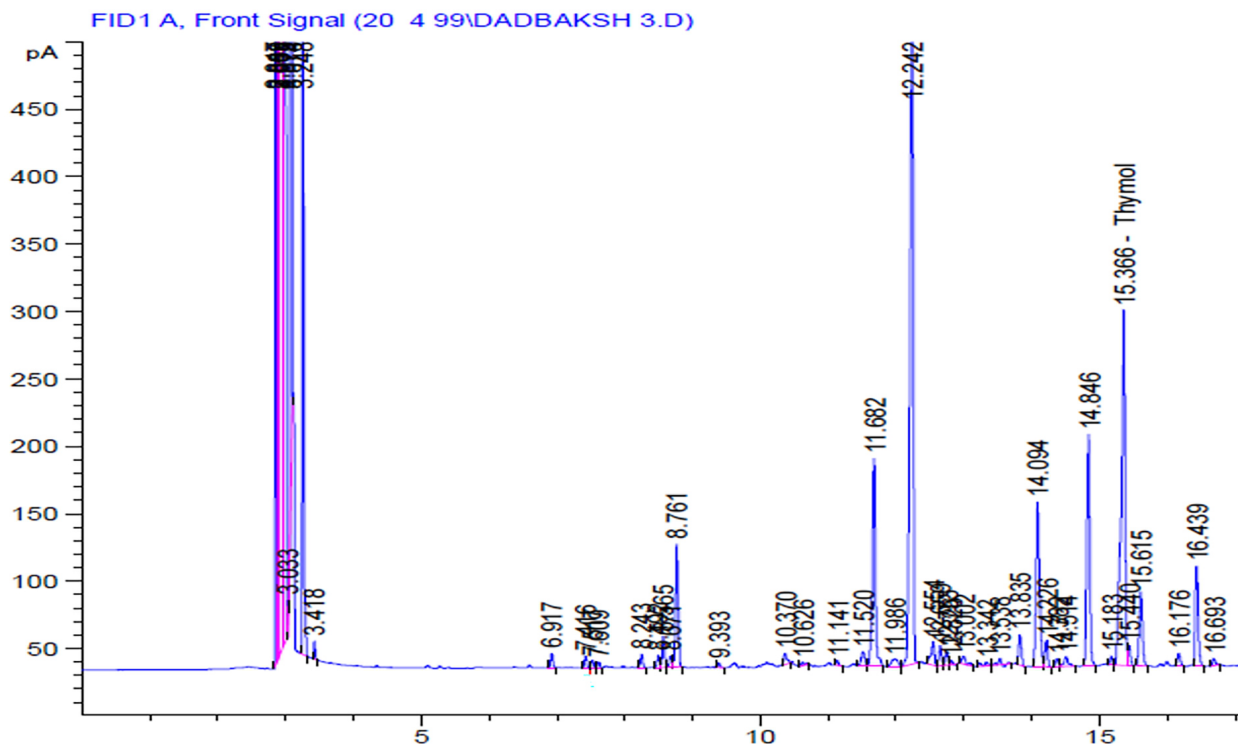
(جدول ۹) و اسانس فراورده (جدول ۱۰) تزریق شده به دستگاه را نشان می‌دهند. بنا بر آنچه در (جدول ۱۰) آمده است میزان تیمول در ۱ میلی‌لیتر اسانس

جدول ۸. کالبراسیون تیمول

غلظت (μg/ml)	تکرار	Area	میانگین ± انحراف معیار	RSD/%
۱۲۵۰	۱	۶۳۳/۶۳	۶۴۵/۶۲ ± ۱۱/۰۰	۱/۷
	۲	۶۴۷/۹۸		
	۳	۶۵۵/۲۵		
۲۵۰۰	۱	۱۱۸۹/۷۴	۱۱۷۷/۹۳ ± ۵۰/۶۱	۴/۲۹
	۲	۱۲۲۱/۵۹		
	۳	۱۱۲۲/۴۶		
۵۰۰۰	۱	۱۷۳۷/۶۰	۱۶۴۹/۵۶ ± ۸۵/۹۵	۵/۲۱
	۲	۱۶۴۵/۲۲		
	۳	۱۵۶۵/۸۷		
۱۰۰۰۰	۱	۳۵۱۴/۹۴	۳۴۸۶/۶۴ ± ۱۲۹/۵۵	۳/۷۱
	۲	۳۵۹۹/۶۸		
	۳	۳۳۴۵/۲۹		



شکل ۸. کروماتوگرام تیمول استاندارد



شکل ۹. کروماتوگرام اسانس حاصل از فراورده و زمان بازداری تیمول

جدول ۹. محاسبه تفاوت‌های درون روزی و بین روزی برای تیمول

روز	Area			میانگین $\pm$ انحراف معیار (intra-day)	RSD% (intra-day)	RSD% (inter-day)
	A ۱	A ۲	A ۳			
۱	۶۳۳/۶۳	۶۴۷/۹۸	۶۵۵/۲۵	۶۴۵/۶۲ $\pm$ ۱۱/۰۰	۱/۷۱	۱/۴۷
۲	۶۵۰/۲۳	۶۴۵/۸۷	۶۳۹/۲۵	۶۴۵/۱۲ $\pm$ ۵/۵۳	۰/۸۶	
۳	۶۳۵/۱۴	۶۵۵/۲۳	۶۶۰/۸۹	۶۵۰/۴۲ $\pm$ ۱۳/۵۳	۳/۷۰	

RSD% (Intra-day) = درصد انحراف معیار نسبی درون روز؛ Intra-day = درون روزی؛ Inter-day = بین روزی

جدول ۱۰. محاسبه میزان مارکر تیمول در نمونه پودر مخلوط نهایی (دمنوش)

شماره تزریق	Area	غلظت ($\mu\text{g/ml}$)	میانگین $\pm$ انحراف معیار (intra-day) ($\mu\text{g/ml}$)	LOD ($\mu\text{g/ml}$)	LOQ ($\mu\text{g/ml}$)
۱	۱۰۴۳/۶۱	۲۶۴۷/۷۶	۲۲۲۳/۲۵ $\pm$ ۴۵۱/۴۹	۶	۲۰
۲	۹۱۷/۳۰	۲۲۷۳/۰۸			
۳	۷۴۰/۶۰	۱۷۴۸/۹۱			

Intra-day = درون روزی، LOD= Limit of Detection, LOQ= Limit of Quantification

قبل از تکمیل مراحل استانداردسازی بورتول در فراورده، مطابق با برنامه دمایی انتخاب‌شده در نرم‌افزار دستگاه جی سی مس، به دنبال تزریق نمونه اسانس فراورده، نمونه استاندارد بورتول نیز تزریق گردید تا از یکسان بودن هر دو اطمینان حاصل گردد (۴۵). (شکل ۱۱) و (شکل ۱۲) شامل کروماتوگرام‌های حاصل از اسانس به دست آمده از فراورده و بورتول خالص تزریق‌شده به دستگاه است.

می‌آید، بر اساس حجم تزریق است که این مقدار در یک میزان مشخص از فراورده تعیین می‌گردد. در این روش از استوک اولیه بورتول، غلظت‌های سریالی ۱۵۶/۲۵، ۳۱۲/۵، ۶۲۵، ۱۲۵۰، ۲۵۰۰ و ۵۰۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد و پس از تزریق به دستگاه، به تکرار منحنی استاندارد تهیه شد و جهت انجام محاسبات تعیین مقدار مورد استفاده قرار گرفت (جدول ۱۱). منحنی بدست آمده خطی بوده و در شکل ۱۰ ارائه شده است (جدول ۱۲).

جدول ۱۱. کالیبراسیون بورنتول

غلظت (µg/ml)	تکرار	Area	میانگین $\pm$ انحراف معیار (intra-day)	RSD/%
۱۵۶/۲۵	۱	۷۵/۸۶	۷۷/۸۵ $\pm$ ۲/۳۵	۳/۰۱
	۲	۷۷/۲۵		
	۳	۸۰/۴۵		
۳۱۲/۵	۱	۱۵۰/۴۶	۱۵۹/۶۰ $\pm$ ۸/۲۳	۵/۱۵
	۲	۱۶۱/۹۶		
	۳	۱۶۶/۴۰		
۰/۱	۱	۲۸۳/۰۶	۲۶۲/۱۷ $\pm$ ۳۰/۰۹	۱۱/۱۸
	۲	۲۲۷/۶۸		
	۳	۲۷۵/۷۸		
۰/۲	۱	۵۵۳/۲۷	۵۴۱/۱۴ $\pm$ ۱۱/۶۹	۲/۱۶
	۲	۵۴۰/۱۹		
	۳	۵۲۹/۹۵		
۰/۵	۱	۱۱۶۵/۶۳	۱۱۸۳/۱۱ $\pm$ ۱۶/۸۵	۱/۴۲
	۲	۱۱۹۹/۲۵		
	۳	۱۱۸۴/۴۶		
۱	۱	۲۲۵۵/۷۴	۲۲۵۰/۶۸ $\pm$ ۴۷/۳۸	۲/۱۱
	۲	۲۲۹۵/۳۴		
	۳	۲۲۰۰/۹۸		

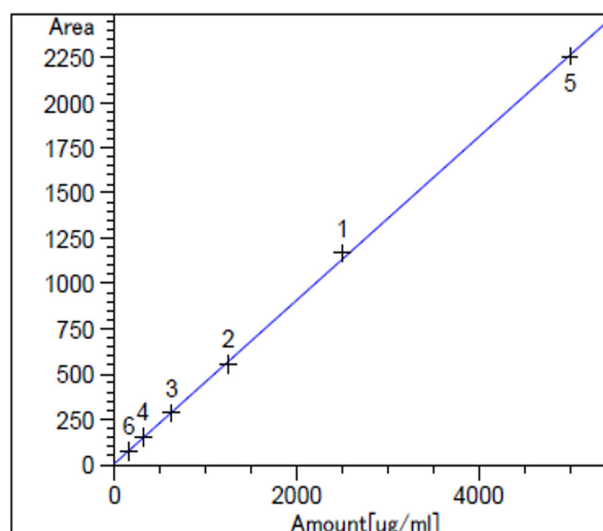
RSD/% = درصد انحراف معیار نسبی، Intra-day = درون روزی

جدول ۱۲. محاسبه تفاوت آنالیزهای درون روزی و بین روزی برای بورنتول

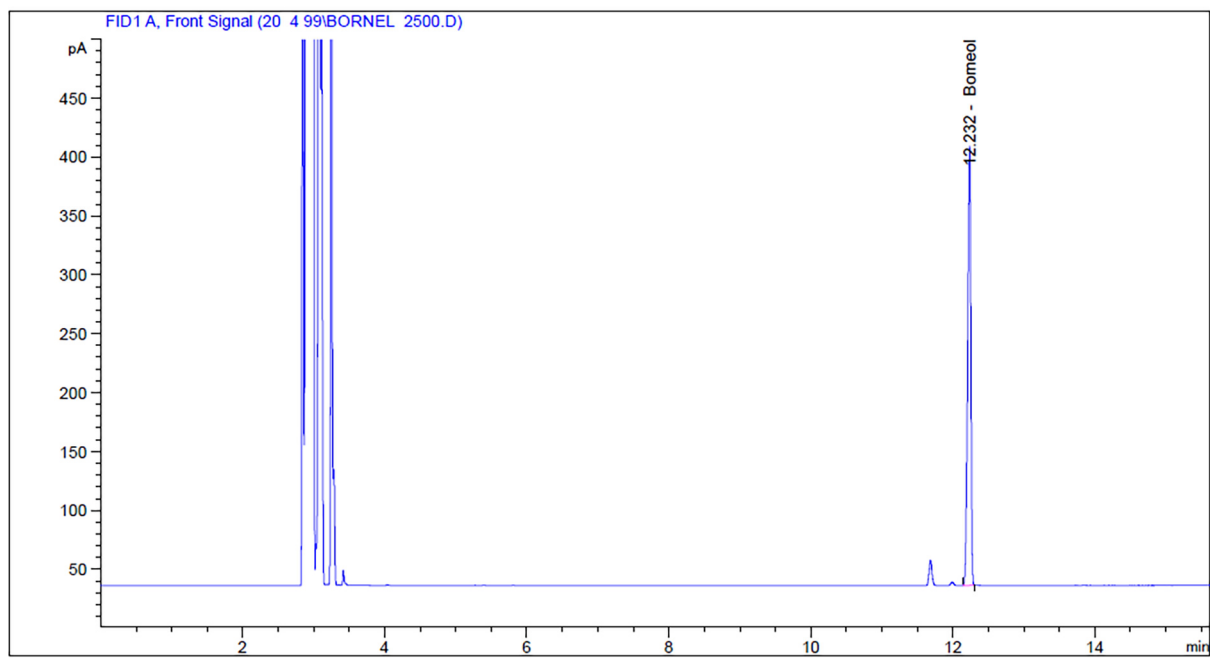
روز	Area		میانگین $\pm$ انحراف معیار (intra-day)	RSD/% (intra-day)	RSD/% (inter-day)
	۱A	۲A			
۱	۲۲۵۵/۷۴	۲۲۹۵/۳۴	۲۲۵۰/۶۸ $\pm$ ۴۷/۳۸	۲/۱۱	۱/۸۵
۲	۲۲۹۹/۴۶	۲۳۲۲/۱۲	۲۳۱۰/۸۱ $\pm$ ۱۱/۳۳	۰/۴۹	
۳	۲۲۱۴/۶۵	۲۲۵۴/۹۸	۲۲۴۶/۷۳ $\pm$ ۲۸/۸۵	۱/۲۸	

RSD/% (Intra-day) = درصد انحراف معیار نسبی درون روز، RSD/% (Inter-day) = درصد انحراف معیار نسبی بین روز

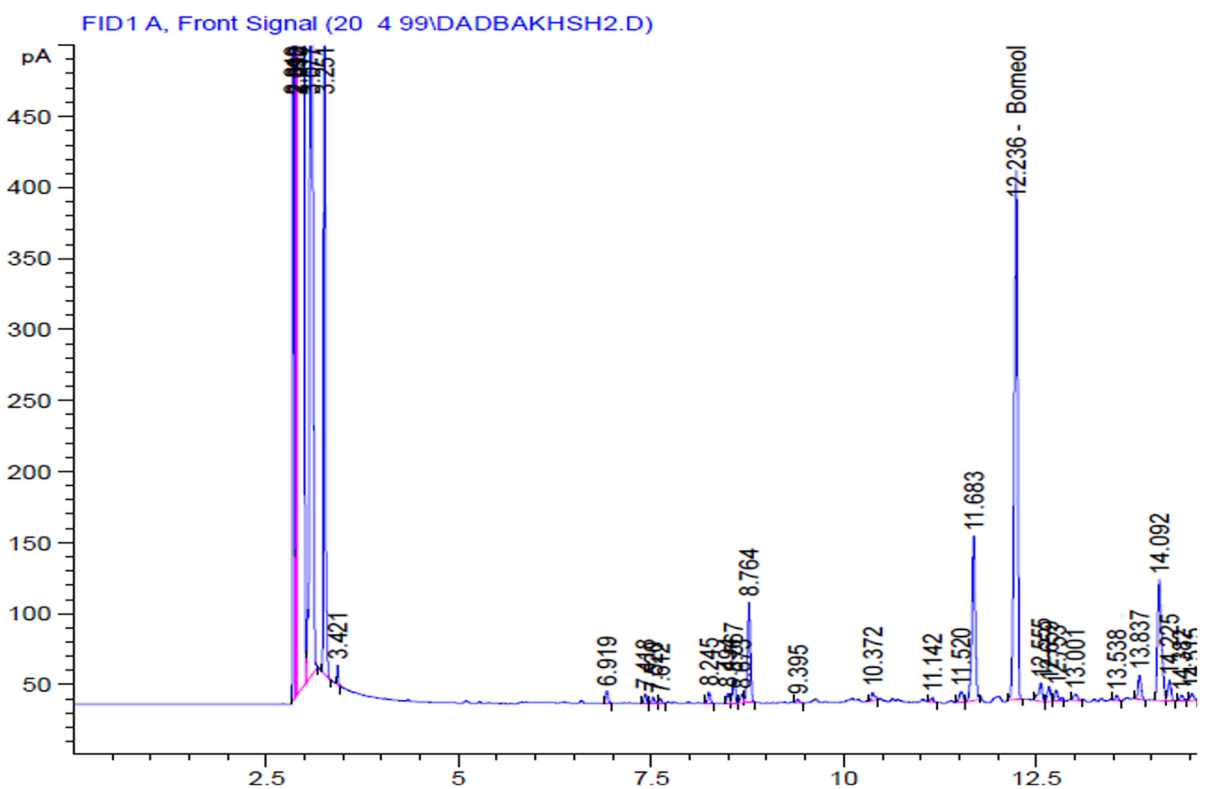
بنا بر آنچه در (جدول ۱۳) آمده است میزان بورنتول در ۱ میلی لیتر اسانس (با در نظر گرفتن چگالی واحد معادل با آب برای اسانس استخراج شده از مخلوط گیاهان) معادل با $۳۱۰۷/۵۷ \pm ۵۳۸/۵۸$ میکروگرم بوده که با توجه به راندمان اسانس و در نظر گرفتن میزان اسانس حاصل از محتوای یک تی بگ (۰/۲ درصد یا ۴/۳ میکرولیتر)، مقدار نهایی و عددی تیمول در یک تی بگ حاوی ۲/۱۵ گرم برابر با $۱۳/۳۶ \pm ۲/۳۲$ میکروگرم است. لازم به ذکر است که در تمام محاسبات تعیین مقدار هر دو مارکر تیمول و بورنتول، خلوص مارکرها بیش از ۹۵ درصد بود که در این مورد خلوص معادل ۱۰۰ در نظر گرفته شد.



شکل ۱۰. نمودار کالیبراسیون بورنتول



شکل ۱۱. گازکروماتوگرام بورنتول استاندارد



شکل ۱۲. گاز کروماتوگرام اسانس حاصل از فراورده با جانیابی بورنتول بر آن

جدول ۱۳. محاسبه میزان مارکر بورنتول در پودر مخلوط نهایی (دمنش نهایی)

شماره تزریق	Area	غلظت (µg/ml)	میانگین ± انحراف معیار (µg/ml)	LOD (µg/ml)	LOQ (µg/ml)
۱	۱۶۳۴/۸۴	۳۶۰۳/۸۴	۳۱۰۷/۵۷ ± ۵۳۸/۵۸	۶	۲۰
۲	۱۴۴۴/۹۰	۳۱۸۴/۰۳			
۳	۱۱۵۱/۱۹	۲۵۳۴/۸۵			

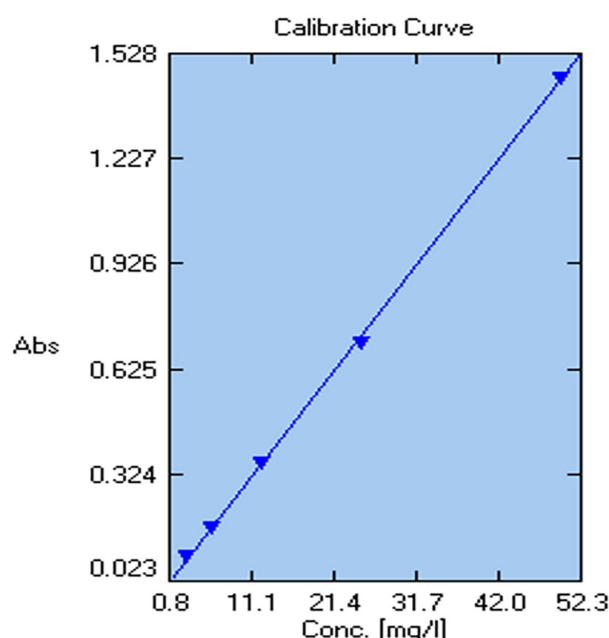
LOD= Limit of Detection, LOQ= Limit of Quantification

جدول ۱۴. محاسبه راندمان عصاره گیری

راندمان (%)	میزان استحصال (g)	وزن نمونه	نام نمونه
۶/۶۲	۳/۳۱	۵۰ گرم	مخلوط پودر چهار گیاه

جدول ۱۵. میزان جذب فرابنفش غلظت‌های مختلف استاندارد اسید گالیک

استاندارد	غلظت (mg/L)	جذب فرابنفش
اسید گالیک	۶/۲۵	۰/۰۳۷
اسید گالیک	۱۲/۵	۰/۰۵۹
اسید گالیک	۲۵	۰/۱۳۴
اسید گالیک	۵۰	۰/۲۴۲
اسید گالیک	۱۰۰	۰/۴۶۸
اسید گالیک	۲۰۰	۰/۹۴۸

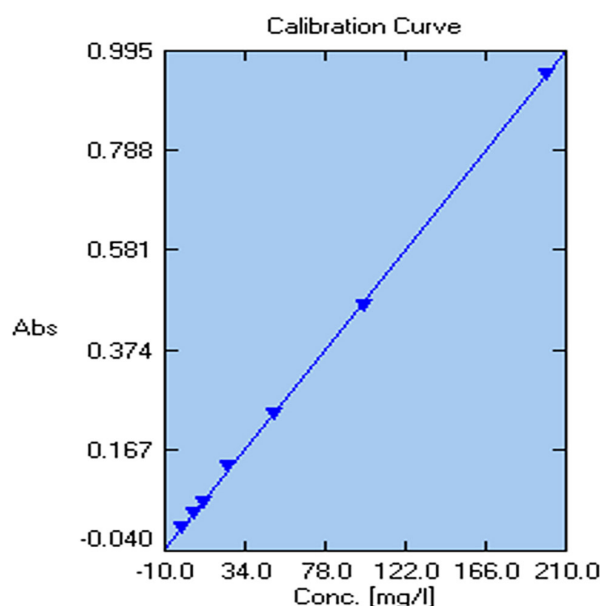


$$\text{Abs} = K_1 \times (\text{Conc.}) + K_0$$

$$K_0 = -0.00953$$

$$K_1 = 0.02922 \quad R^2 = 0.9998$$

شکل ۱۴. نمودار استاندارد کوئرستین



$$\text{Abs} = K_1 \times (\text{Conc.}) + K_0$$

$$K_0 = 0.00706$$

$$K_1 = 0.00469$$

$$R^2 = 0.9998$$

شکل ۱۳. نمودار استاندارد گالیک اسید

دمای ۵۰ درجه سانتی‌گراد به‌صورت کامل خشک گردیدند (جدول ۱۴).

میزان فنول تام در عصاره هیدروالکلی

در اندازه‌گیری میزان فنول از اسید گالیک به‌عنوان استاندارد فنول استفاده شد و میزان جذب فرابنفش آن در غلظت‌های سریالی تعیین و نمودار کالیبراسیون آن تهیه شد (شکل ۱۳)، (جدول ۱۵). طبق محاسبات هر

محاسبه بازده عصاره گیری

عصاره گیری با حلال هیدروالکلی در سه مرحله ۱۵ دقیقه‌ای توسط دستگاه سونیکاتور از ۵۰ گرم از پودر دمنوش انجام شد و عصاره‌های حاصل از هر سه مرتبه با استفاده از دستگاه روتاری تغلیظ شدند و پس از آن عصاره‌ها به فالکون منتقل شدند و در دستگاه اسپید وکیوم قرار گرفتند. پس از تغلیظ جهت خشک شدن نهایی به دستگاه فریز درایر منتقل شدند و در

جدول ۱۶. میزان فنول تام عصاره و تی‌بگ برحسب mg/g نسبت به گالیک اسید

نمونه	غلظت محلول استوک (mg/L)	میزان فنول تام در محلول استوک (mg/L)			میزان فنول تام در عصاره (mg/g)	میانگین $\pm$ انحراف معیار
		تکرار ۱	تکرار ۲	تکرار ۳		
عصاره تام	۵۰۰	۵۴/۸۰	۵۰/۹۶	۵۰/۹۶	۱۰۱/۹۲	۱۰۴/۴۸ $\pm$ ۴/۴۳

جدول ۱۷. میزان جذب فرابنفش غلظت‌های سریالی کورستین

استاندارد	غلظت (mg/L)	جذب فرابنفش
کورستین	۳/۱۲۵	۰/۰۹۱
کورستین	۶/۲۵	۰/۱۷۲
کورستین	۱۲/۵	۰/۳۵۷
کورستین	۲۵	۰/۷۰۳
کورستین	۵۰	۱/۴۶

جدول ۱۸. میزان فلاونوئید تام عصاره و تی‌بگ برحسب mg/g نسبت به کورستین

نمونه	غلظت محلول استوک (mg/L)	میزان فلاونوئید تام در محلول استوک (mg/L)			میزان فلاونوئید تام در عصاره (mg/g)	میانگین $\pm$ انحراف معیار
		تکرار ۱	تکرار ۲	تکرار ۳		
عصاره تام	۵۰۰	۱۱/۵۱	۱۱/۲۴	۱۱/۳۱	۲۲/۶۲	۲۲/۷۵ $\pm$ ۰/۲۸

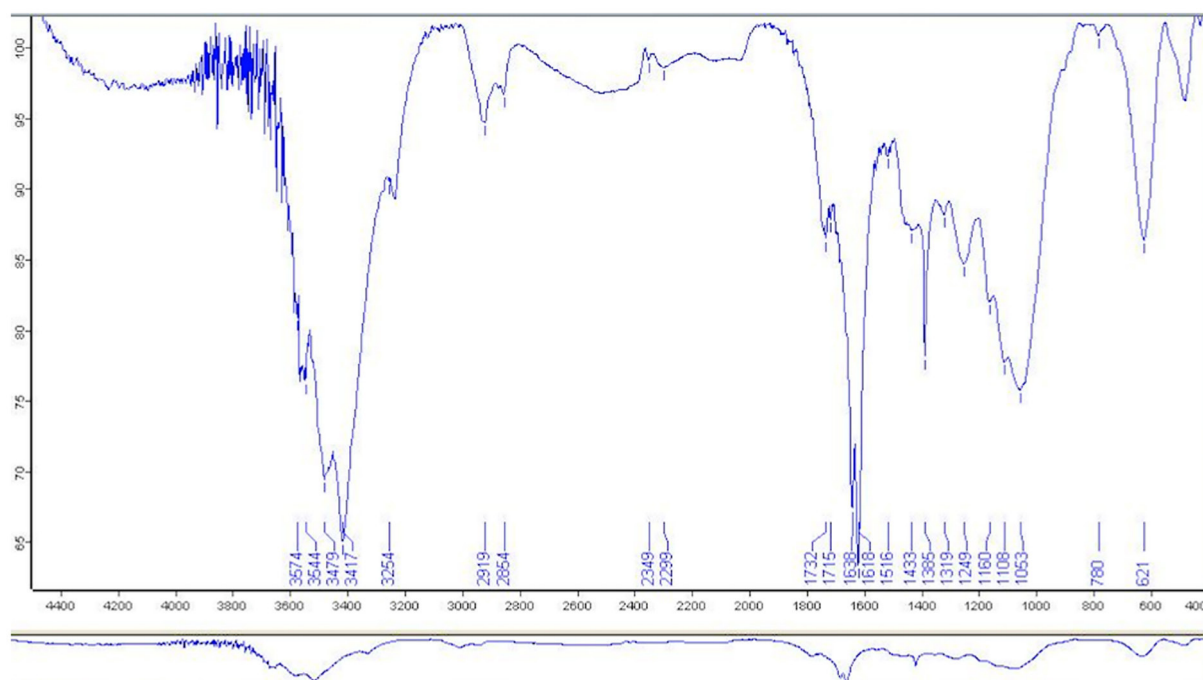
گرم از عصاره دمنوش $۱۰۴/۴۸ \pm ۴/۴۳$ میلی گرم فنول دارد (جدول ۱۶). حال با توجه به اینکه میزان عصاره به دست آمده از ۵۰ گرم گیاه ۳/۳۱ گرم محاسبه شد، میزان عصاره موجود در ۲ گرم پودر درون هر تی‌بگ ۰/۱۳ گرم به دست آمد و بر این اساس میزان فنول تام موجود در هر تی‌بگ $۱۳/۸۱۲ \pm ۰/۵۸۵$ میلی گرم محاسبه گردید.

میزان فلاونوئید تام در عصاره هیدروالکلی

در تعیین میزان فلاونوئیدها از کورستین به عنوان استاندارد فلاونوئید استفاده و میزان جذب فرابنفش آن در غلظت‌های سریالی تعیین و نمودار کالیبراسیون آن تهیه شد (جدول ۱۷، شکل ۱۴). طبق محاسبات و نتایج حاصل از اسپکتروفتومتری هر گرم از عصاره دمنوش $۲۲/۷ \pm ۰/۲۸$ میلی گرم فلاونوئید دارد (جدول ۱۸). حال با توجه به اینکه میزان عصاره به دست آمده از ۵۰ گرم گیاه ۳/۳۱ گرم محاسبه شد، میزان عصاره موجود در ۲ گرم پودر درون هر تی‌بگ ۰/۱۳ گرم است و در نتیجه میزان فلاونوئید تام موجود در هر تی‌بگ $۳/۰۰ \pm ۰/۳۷$ میلی گرم محاسبه می‌شود.

نتیجه طیف‌سنجی مادون قرمز با تبدیل فوریر^{۱۱۷}
طیف‌سنجی مادون قرمز با تبدیل فوریر (FTIR) نیز برای تهیه فینگرپرینت ترکیبات نهایی انجام شد. طیف مادون قرمز، در اثر تابش مادون قرمز با طول موج خاص و تغییر سطح انرژی ارتعاشی مولکول‌های ماده مورد آنالیز، حاصل می‌گردد. نمونه در معرض تابش مادون قرمز با طول موج خاص قرار می‌گیرد که منجر به تغییر در گشتاور دوقطبی مولکول‌های درون نمونه می‌شود و در نتیجه سطح انرژی ارتعاشی مولکول‌های نمونه از حالت پایه در حالت برانگیخته قرار می‌گیرند. بدیهی است که طیف مادون قرمز هر مولکول درون نمونه منحصر آن مولکول خاص است که در اثر جذب مادون قرمز به میزان معین و در طول موج مشخص و بر اساس گروه‌های عاملی در ساختار شیمیایی هر ترکیب به دست می‌آید و بر این اساس اطلاعات ساختاری در خصوص گروه‌های شیمیایی در نمونه مورد آزمایش در دسترس قرار می‌دهد. در این مطالعه نیز طیف مادون قرمز به دست آمده به طور خاص روند تغییرات ناشی از جذب و کشش و خمش‌های مولکولی ناشی از تابش مادون

117. Fourier-transform infrared spectroscopy (FTIR)



شکل ۱۵. طیف‌سنجی مادون قرمز پودر دمنوش

قرمز به صورت پیک‌های مشخص در طول موج‌های مشخص به صورت قله‌ها و فرورفتگی‌هایی در طیف ظاهر شده‌اند که حضور گروه‌های شیمیایی خاص در ترکیبات فراورده خواب‌آور مورد آزمایش از جمله تیمول و بورنئول را نشان می‌دهد (شکل ۱۵).

بحث

مطالعه حاضر با هدف ساخت، کنترل و استانداردسازی یک شکل دارویی پرتیرداز در میان مردم عامه که کمتر مورد توجه منابع طب سنتی قرار گرفته است، جهت بهبود یکی از مشکلات بسیار رایج جوامع کنونی که تعداد کثیری از افراد با آن دست‌وپنجه نرم می‌کنند، یعنی «بی‌خوابی»، انجام شد. گفتنی است که تمایل جوامع کنونی به مصرف داروهای شیمیایی که اکثراً یا ناکارآمد هستند یا وابستگی‌های شدید جسمی و روانی ایجاد می‌کنند، بسیار کمتر از گذشته شده است؛ بنابراین توجه به متون سنتی و تمایلات مردم، در جهت ارائه یک شکل دارویی نوین از مفردات مؤثر بر بی‌خوابی موجود در متون سنتی و همچنین در مقاله‌های جدید می‌تواند امیدوارکننده باشد. در تمامی مطالعاتی که با کنترل و استانداردسازی فراورده‌های سنتی مرتبط هستند، شناخت و تعیین جنس و گونه اصلی و صحیح هر کدام از اجزای تشکیل‌دهنده بسیار اهمیت دارد. با در نظر گرفتن این نکته که گیاهان دارویی از تنوع بسیار بالایی برخوردار هستند،

و این تنوع می‌تواند منجر به تولید دارویی متفاوت از داروی اصلی و در نتیجه عدم رضایت از دارو و ایجاد عوارض جانبی شود، اهمیت شناسایی صحیح اجزای تشکیل‌دهنده بیشتر مشخص می‌شود. برای شناسایی گیاهان دارویی یا اجزای اولیه یک فرمولاسیون مرکبه سنتی، علاوه بر آنچه در متون به‌عنوان ماهیت یا همان خصوصیات گیاه‌شناسی یک گیاه ذکر می‌شود، روش‌های شناسایی مرتبط با گیاه‌شناسی در ابعاد گسترده‌اش مورد نظر است. باید توجه داشت که گیاهانی که با نام اختصاصی خود در کتب داروسازی سنتی همچون مخزن الادویه، قانون ابن‌سینا و تحفه حکیم مؤمن به‌عنوان داروی مفرد ذکر شده است، در رابطه با خصوصیات گیاه‌شناسی مربوط به آن یک توصیف دارد. باید توجه داشت که ارزیابی مشخصات ماکروسکوپی مواد گیاهی نیز بر اساس شکل، رنگ، بافت، شکنندگی، مزه، بو و ظاهر تعیین می‌گردد. ارزیابی میکروسکوپی مواد گیاهی بر اساس شناسایی بافت و سلول‌های گیاهی انجام می‌شود که به وسیله میکروسکوپ الکترونی به دست می‌آید (۴۴).

- در قدم اول باید به این نتیجه رسید که آیا ترکیب یا مفرده‌ای که در متون داروسازی سنتی به ذکر خصوصیات گیاه‌شناسی آن پرداخته شده است با آنچه امروزه در عطاری‌ها و مراکز فروش گیاهان دارویی وجود دارد یکسان است یا خیر.
- در قدم دوم، شناسایی با استفاده از کلید گیاه‌شناسی و روش‌های خرده‌نگاری مد نظر است.

چوب پنبه اپیدرم و پارانشیم پوست، بافت اسکلرانسیم^{۱۲۲} و همچنین آوند چوبی با تزنینات شبکه‌ای رؤیت گردید. علاوه بر خرده نگاری، در این مطالعه از روش‌های دستگاهی شناسایی یا فینگرپرینت نیز برای نمونه‌ها استفاده شد که یکی از ساده‌ترین آن‌ها تهیه نمونه مادون قرمز با تبدیل فوریراز پودر نهایی بود که به‌عنوان یک داده شناسایی دیگر ارائه گردید.

در این مطالعه همچنین اسانس پودر نهایی از مخلوط چهار گیاه مطابق با روش‌های اسانس‌گیری از گیاهان تهیه شد و بعد از تزریق به دستگاه جی سی مس طیف حاصل از آن در شناسایی ترکیبات و تعیین فراوانی آن‌ها مورد استفاده قرار گرفت. علاوه بر این، طیف به دست آمده می‌تواند به‌عنوان الگویی برای استفاده و ارزیابی نمونه‌های بازار مورد استفاده قرار گیرد. طیف ترکیبات اسانس پودر منوم حاوی چهار گیاه واجد ۱۴/۸۸ درصد بورئول به‌عنوان ماده اصلی بود. تیمول با فراوانی ۸/۳۹ درصد به‌عنوان مارکر دوم تعیین گردید.

علاوه بر تکنیک‌های فینگرپرینت، تعیین مقدار مارکر یا مارکرهای اختصاصی و همچنین غیر اختصاصی حاضر در فرآورده نهایی نیز به‌عنوان معیار مهم و قدم اصلی در استانداردسازی فرآورده است. با استفاده از تکنیک GC/FID و حضور ترکیبات اصلی (بورئول و تیمول) اسانس حاصل از فرآورده مورد ارزیابی قرار گرفت و میزان ترکیبات اصلی تعیین مقدار شد. به‌این ترتیب این دو مارکر موجود در دمنوش منوم به‌عنوان یک فرآورده داروسازی سنتی ایران با تکنیک گروماتوگرافی گازی تعیین مقدار شدند. در روش‌های دستگاهی متفاوت استانداردسازی فرآورده‌های گیاهی و سنتی، فاکتورهای متعددی جهت تکرارپذیر شدن آن روش در نظر گرفته می‌شود. در تمام روش‌ها یک ماده شاخص (اعم از اینکه این ماده از نظر فارماکولوژیکی مسئول تأثیرگذاری فرآورده است یا به‌عنوان ترکیب شاخص دیده شده است) در روند استانداردسازی مورد استفاده قرار می‌گیرد (۴۷).

در رابطه با اعتبار و کارا بودن روش اسانس‌گیری، ارزیابی و تعیین مقدار با کروماتوگرافی گازی، پارامترهایی مطابق با کنفرانس بین‌المللی ICH^{۱۲۳} باید در نظر گرفته شود. این پارامترها شامل فاکتورهای اعتبار سنجی، شامل خطی بودن نمودار کالیبراسیون، LOD و LOQ، تکرارپذیری و بازتولید پذیری است.

بنا بر مطالعات فارماکوگنوزیک^{۱۱۸}، روش‌های پیشرفته دستگاهی در قدم‌های بعدی می‌تواند به شناسایی و مقایسه اجزا و شرایط فرمولاسیون کمک بسزایی نماید. باید توجه داشت علاوه بر شناسایی و استاندارد نمودن یک گیاه با فرمولاسیون یک یا چند جزء گیاهی، تعیین مقدار یک یا چند ماده مؤثره درون آن فرمول با هدف یکسان‌سازی اثرات درمانی یا همسان نمودن خصوصیات فارماکوگنوزیکی آن نیز بسیار حائز اهمیت است. این فرایند از جمله پیچیده‌ترین روش‌های ارزیابی فیتوشیمیایی^{۱۱۹} است (۴۶).

در این مطالعه شکل دارویی دمنوش مخلوط چهار گیاه گاوزبان و سنبل‌الطیب و بادرنجبویه و اسطوخدوس به ترتیب با نام‌های علمی *Echium amoenum* و *Nardostachys jatamansi* و *Melissa officinalis* و *Lavandula stoechas* به‌عنوان یک شکل دارویی نوین و البته پرترفدار و با نسبت مساوی و به مقدار ذکر شده ارائه گردید و سپس از جهات متعددی مورد ارزیابی فیتوشیمیایی قرار گرفت. خصوصیات گیاه‌شناسی هرکدام از اجزا به‌صورت جداگانه و در ترکیب با یکدیگر ارزیابی شد و مراحل شناسایی انجام گرفت. با استفاده از روش خرده‌نگاری که از روش‌های شناسایی مرتبط و کاربردی در این زمینه است و می‌تواند احتمال ایجاد تقلب در یک فرآورده گیاهی سنتی را از طریق شناسایی اجزای شیمیایی و حضور گیاهان غیر مرتبط تا حد قابل قبولی روشن نماید، شناسایی اجزای موجود در این داروی مرکب طب سنتی انجام شد. در شکل دارویی مورد بررسی در این مطالعه، اجزای اسطوخدوس، بادرنجبویه، گاوزبان و سنبل‌الطیب توسط روش خرده‌نگاری ارزیابی شد. اسلایدهای تهیه‌شده از اجزای پایه وجود اپیدرم فوقانی برگ، اپیدرم تحتانی و روزنه‌های آنوموسیتیک^{۱۲۰}، پارانشیم^{۱۲۱} گلبرگ و آوندها و دانه‌های گرده شش‌ضلعی و کرک‌های غده‌ای و منشعب را در گیاه اسطوخدوس نشان داد. در خرده‌نگاری اجزای بادرنجبویه اپیدرم پایینی همراه با روزنه و ساختار دانه گرده و بافت گلبرگ همراه با آوند چوبی و بافت اپیدرم برگ نمایان شد.

در خرده‌نگاری گل گاوزبان، گلبرگ و محل اتصال کرک‌ها به آن و ساختار دانه گرده همراه با کرک و همچنین ساختار کاسبرگ دیده شد. در اسلایدهای تهیه‌شده در خرده‌نگاری گیاه سنبل‌الطیب نیز بافت

118. Pharmacognosy studies

119. Phytochemical

120. Anemocytic stomata

121. Parenchyma

122. Sclerenchyma tissue

123. International Council for Harmonization of Technical Requirements for Pharmaceuticals for Human Use

در رابطه با خطی بودن، در تمام روش‌ها یک ماده شاخص^{۱۲۴} در روند استانداردسازی مورد استفاده قرار می‌گیرد.

بنابراین در ابتدا می‌بایست بعد از تعیین غلظت استوک اولیه، غلظت‌های متعدد کم شونده از آن محلول تهیه و یک منحنی استاندارد از آن غلظت‌ها ترسیم شود. در مطالعه حاضر غلظت‌های کم شونده از بورنئول و تیمول خالص بعد از تعیین غلظت استوک به دستگاه تزریق شد و حاصل تزریق، ترسیم یک منحنی کالیبراسیون برای هر کدام از استانداردها بود. تکرارپذیری یک روش با استفاده از تزریقات درون روزی (هر کدام از غلظت‌ها در یک روز خاص، سه بار تزریق شدند) و بین روزی (در سه روز متوالی هر کدام از غلظت‌ها هر روز سه مرتبه تزریق شدند) مشخص شد. دقت مطالعه با اندازه‌گیری فاکتور دیگری که در اعتبار سنجی در نظر گرفته می‌شود، تأیید می‌گردد. این فاکتور ضریب تغییرات یا انحراف معیار نسبی است. با توجه به نتایج حاصل از تزریقات بین روزی و درون روزی، میزان محاسبه‌شده RSD برای هر دو مارکر (برای یک غلظت از غلظت‌های استاندارد آن‌ها) در محدوده قابل قبول (کمتر از ۱۰ درصد) به دست آمد که می‌تواند نشان‌دهنده تکرارپذیر بودن روش مورد ارزیابی و معتبر بودن آن باشد.

از دیگر فاکتورهای مورد ارزیابی در اعتبار سنجی یک روش دستگاهی می‌توان به حساسیت یا حد تشخیص^{۱۲۵} و حد تعیین مقدار^{۱۲۶} اشاره کرد. کمترین غلظتی که در یک نمونه قابل تشخیص است اما به دقت قابل اندازه‌گیری نیست LOD و کمترین غلظتی که با دقت و صحت قابل قبول، قابل اندازه‌گیری است به‌عنوان LOQ شناخته می‌شود. برای تعیین LOD و LOQ از نسبت سیگنال به نویز استفاده می‌شود. نسبت ۱ به ۳ برای تعیین LOD و نسبت ۱۰ به ۱ برای تعیین LOQ به کار می‌رود (۴۸، ۴۹). اما نکته محدودکننده مطالعه روند اسانس‌گیری است که این ممکن است تحت تأثیر نوع کلونجر و دمای مبرد و دیگر شرایط محیطی تغییر نماید. به‌هرروی روش GC/FID می‌تواند به‌عنوان یک روش ساده جهت تعیین مقدار ترکیب یا ترکیبات اصلی موجود در اسانس یا فرآورده طبیعی طب سنتی استفاده شود.

ترکیبات فنولی و پلی فنولی دسته عمده ضد اکسیدان‌های طبیعی موجود در گیاهان را تشکیل

124. یعنی این ماده از نظر فارماکولوژیکی مسئول تأثیرگذاری فرآورده است یا به‌عنوان ترکیب شاخص دیده شده است.

125. Limit of Detection

126. Limit of Quantification

می‌دهند و به وسیله Folin-Ciocalteu و با استفاده از روش رنگ سنجی به وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر UV اندازه‌گیری می‌شود. در بخش دیگر مراحل اجرایی این پایان‌نامه، به‌منظور سنجش میزان تام فنول و فلاونوئید موجود در گیاهان مورد مطالعه، عصاره هیدروالکلی گیاه از نظر محتوای فنولی و فلاونوئیدی مورد ارزیابی قرار گرفت. در تعیین مقدار فنول تام، اسید گالیک به‌عنوان استاندارد استفاده شد و میزان کلی فنول برحسب mg/g گالیک اسید گزارش گردید و در نهایت میزان فنول تام موجود در هر تی‌بگ دو گرمی $0.585 \pm 13/812$ میلی‌گرم محاسبه شد. به‌منظور اندازه‌گیری میزان فلاونوئید در عصاره‌ها از روش داود استفاده شد و در نهایت میزان فلاونوئید تام موجود در هر تی‌بگ دو گرمی، $3/00 \pm 0/37$ میلی‌گرم محاسبه گردید.

اجزای گیاهی مورد استفاده در فرآورده‌ها ممکن است در زمان کاشت و آبیاری با آب‌هایی که ممکن است آلوده به فلزات سنگین باشند یا هنگام برداشت و نگهداری آلوده شوند و می‌بایست از حیث مقدار مجاز این فلزات ارزیابی شوند. پودر نهایی از جهت وجود فلزات سنگین آرسنیک، سرب و کادمیوم مورد بررسی قرار گرفته و آنالیزهای دستگاهی برای به دست آوردن مقادیر کمی و ناچیز فلزات به کار گرفته می‌شوند. یکی از روش‌های معمول استفاده از اسپکترومتری جذب اتمی^{۱۲۷} است (۴۷). در بررسی نتایج مشخص شد میزان فلزات سنگین در فرمولاسیون نهایی از حداقل میزان مجاز به مراتب کمتر بود. در مورد کادمیم می‌توان این نکته را متذکر شد که در صورت استفاده از پساب‌های شهری برای آبیاری و نزدیک بودن محل رشد گیاه به معادن آلودگی، کادمیم موجود در خاک و گیاه افزایش پیدا می‌کند (۵۱، ۵۰).

در انتها، فرآورده به آزمایشگاه کنترل دانشگاه علوم پزشکی شیراز ارسال و مطابق با استاندارد ملی ایران نمونه‌گیری از آن به انجام رسید و مورد ارزیابی میکروبی تام قرار گرفت (۵۲). طبق نتایج گزارش شده توسط آزمایشگاه کنترل مواد غذایی، بهداشتی و آرایشی دانشگاه علوم پزشکی شیراز، تعداد کلی باکتری‌های هوازی و قارچ‌های هوازی نمونه کمتر از ۱۰۰ عدد به ازای یک گرم نمونه بوده است. همچنین، نمونه فاقد اشرشیا کلای و سالمونلا اعلام شد. همچنین در این مطالعه به‌منظور مطابقت سازی هر چه بیشتر فرآورده نهایی با استانداردهای سنتی و جهانی، تست‌های

127. Atomic absorption spectrometry

شده نتایج جالب توجهی را آشکار ساخته است که می‌تواند مسیر را در دستیابی به فراورده طبیعی استاندارد در کمک به کنترل اختلالات خواب یا درمان بی‌خوابی هموار نماید.

تشکر و قدردانی

از معاونت محترم پژوهش و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شیراز برای تأمین هزینه‌های مالی تشکر و قدردانی می‌شود. این مقاله در معاونت پژوهش و فناوری دانشگاه علوم پزشکی شیراز به شماره طرح ۹۹-۷۰-۰۱-۲۳۲۴۵ ثبت شده است

تعارض منافع

هیچ‌گونه تضاد منافی وجود ندارد.

فارماسیوتیکس^{۱۲۸} ممکن همچون زاویه سکون پودر، اندازه ذره‌ای، انحراف وزن و انحراف سایز تی‌بگ‌ها انجام و نتایج ارائه گردید.

نتیجه‌گیری

فراورده خواب‌آور تهیه شده و اجزای گیاهی آن در برابر آزمون‌های انجام شده نتایج جالب توجهی را در این مطالعه آشکار ساخته است. سه مورد از آن‌ها فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی را به‌صورت معنی‌داری نشان دادند و بادرنجبویه مؤثرترین جزء فراورده خوراکی تهیه شده بود. بررسی محتوای ترکیبات شاخص در اسانس با روش‌های آنالیز دستگاهی دانش قابل توجهی در دستیابی به ترکیبات و تولید فراورده استاندارد مؤثر در کمک به جلوگیری از اختلالات خواب یا درمان بی‌خوابی ارائه می‌نماید.

فراورده خواب‌آور تهیه شده در آزمون‌های انجام

128. Pharmaceutics

منابع

- Ohayon MM. Epidemiology of insomnia: what we know and what we still need to learn. *Sleep Med Rev.* 2002;6(2):97-111.
- Morphy H, Dunn KM, Lewis M, Boardman HF, Croft PR. Epidemiology of insomnia: a longitudinal study in a UK population. *Sleep.* 2007;30(3):274-80.
- Quan SF, Katz R, Olson J, Bonekat W, Enright PL, Young T, et al. Factors associated with incidence and persistence of symptoms of disturbed sleep in an elderly cohort: the Cardiovascular Health Study. *Am J Med Sci.* 2005;329(4):163-72.
- Saddichha S. Diagnosis and treatment of chronic insomnia. *Ann Indian Acad Neurol.* 2010;13(2):94-102.
- LeBlanc M, Merette C, Savard J, Ivers H, Baillargeon L, Morin CM. Incidence and risk factors of insomnia in a population-based sample. *Sleep.* 2009;32(8):1027-37.
- Scott GW, Scott HM, O'Keeffe KM, Gander PH. Insomnia - treatment pathways, costs and quality of life. *Cost Eff Resour Alloc.* 2011;9:10.
- Taylor DJ, Mallory LJ, Lichstein KL, Durrence HH, Riedel BW, Bush AJ. Comorbidity of chronic insomnia with medical problems. *Sleep.* 2007;30(2):213-8.
- Thorpy MJ. Classification of sleep disorders. *J Clin Neurophysiol.* 1990;7(1):67-81.
- Stoller MK. Economic effects of insomnia. *Clinical therapeutics.* 1994;16(5):873-97.
- Antoniades J, Jones K, Hassed C, Piterman L. Sleep... naturally: a review of the efficacy of herbal remedies for managing insomnia. *Alternative and complementary therapies.* 2012;18(3):136-40.
- Sarris J, Byrne GJ. A systematic review of insomnia and complementary medicine. *Sleep Med Rev.* 2011;15(2):99-106.
- Zlott DA, Byrne M. Mechanisms by which pharmacologic agents may contribute to fatigue. *PM R.* 2010;2(5):451-5.
- Blais D, Petit L. Benzodiazepines: dependence and a therapeutic approach to gradual withdrawal. *Canadian Family Physician.* 1990;36:1779.
- Morin CM, Benca R. Chronic insomnia. *Lancet.* 2012;379(9821):1129-41.
- Gooneratne NS. Complementary and alternative medicine for sleep disturbances in older adults. *Clin Geriatr Med.* 2008;24(1):121-38, viii.
- Smith RD. Avicenna and the Canon of Medicine: a millennial tribute. *Western Journal of Medicine.* 1980;133(4):367.

17. Feyzabadi Z, Aliasl F, Qaraaty M, Aliasl J. Effective materia medica in treatment of insomnia in Iranian traditional medicine. *J Res Hist Med*. 2015;7(23):51-68. Persian.
18. Abed A, Vaseghi G, Jafari E, Fattahian E, Babhadiashar N, Abed M. *Echium Amoenum* Fisch. Et Mey: A review on its pharmacological and medicinal properties. *Asian J Med Pharm Res*. 2014;4(1):21-3.
19. Mehrabani M, Ghassemi N, Sajjadi E, Ghanadi A, Shams AM. Main phenolic compound of petals of *Echium amoenum* Fisch. and C.A. Mey., a famous medicinal plant of Iran. *DARU J Pharm Sci*. 2005;13(2):65-9.
20. Ranjbar A, Khorami S, Safarabadi M, Shahmoradi A, Malekirad AA, Vakilian K, et al. Antioxidant Activity of Iranian *Echium amoenum* Fisch & C.A. Mey Flower Decoction in Humans: A cross-sectional Before/After Clinical Trial. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2006;3(4):469-73.
21. Abolhassani M. Antibacterial effect of borage (*Echium amoenum*) on *Staphylococcus aureus*. *Braz J Infect Dis*. 2004;8(5):382-5.
22. Abolhassani M. Antiviral activity of borage (*Echium amoenum*). *Archives of Medical Science*. 2010;6(3):366-9.
23. Andalib S, Vaseghi A, Vaseghi G, Naeini AM. Sedative and hypnotic effects of Iranian traditional medicinal herbs used for treatment of insomnia. *EXCLI journal*. 2011;10:192.
24. Rabbani M, Vaseghi G, Sajjadi S, Amin B. Persian herbal medicines with anxiolytic properties. *Journal of Medicinal Plants*. 2011;10(39):7-11.
25. Heidari MR, Azad EM, Mehrabani M. Evaluation of the analgesic effect of *Echium amoenum* Fisch & C.A. Mey. extract in mice: possible mechanism involved. *J Ethnopharmacol*. 2006;103(3):345-9.
26. Góra J, Lis A, Gibka J, Wołoszyn A. *Najcenniejsze olejki eteryczne*: Wydawnictwo Uniwersytetu Mikołaja Kopernika; 2005.
27. Akhondzadeh S, Kashani L, Fotouhi A, Jarvandi S, Mobaseri M, Moin M, et al. Comparison of *Lavandula angustifolia* Mill. tincture and imipramine in the treatment of mild to moderate depression: a double-blind, randomized trial. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003;27(1):123-7.
28. Soković M, Marin PD, Brkić D, Van Griensven L. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils of ten aromatic plants against human pathogenic bacteria. *Food*. 2007;1(2):220-6.
29. Sakamoto T, Mitani Y, Nakajima K. Psychotropic effects of Japanese valerian root extract. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*. 1992;40(3):758-61.
30. Hikino H, Hikino Y, Takeshita Y, Kato H, Takemoto. [Constituents of wild Japanese valerian root. (1)]. *Yakugaku Zasshi*. 1965;85(2):179-80.
31. Nathan M, Scholten R. The complete German Commission E monographs: therapeutic guide to herbal medicines. *Ann Intern Med*. 1999;130(5):459.
32. Petkov V. Plants and hypotensive, antiatheromatous and coronarodilatating action. *Am J Chin Med*. 1979;7(3):197-236.
33. Petkov V. Plants and hypotensive, antiatheromatous and coronarodilatating action. *Am J Chin Med*. 1979;7(3):197-236.
34. Franck B, Petersen U, Huper F. Valerianie, a tertiary monoterpene alkaloid from valerian (1). *Angew Chem Int Ed Engl*. 1970;9(11):891.
35. Janot M, Guilhem J, Contz O, Venera G, Cionga E. Contribution to the study of valerian alkaloids (*Valeriana officinalis*, L.): actinidine and naphthyridylmethylketone, a new alkaloid. *Ann Pharm Fr*. 1979;37(5):413-20.
36. Tagashira M, Ohtake Y. A new antioxidative 1, 3-benzodioxole from *Melissa officinalis*. *Planta medica*. 1998;64(06):555-8.
37. Tagashira M, Ohtake Y. A new antioxidative 1,3-benzodioxole from *Melissa officinalis*. *Planta Med*. 1998;64(6):555-8.
38. Marongiu B, Porcedda S, Piras A, Rosa A, Deiana M, Dessi MA. Antioxidant activity of supercritical extract of *Melissa officinalis* subsp. *officinalis* and *Melissa officinalis* subsp. *inodora*. *Phytother Res*. 2004;18(10):789-92.
39. Kuhn MA, Winston D. Herbal therapy and supplements: a scientific and traditional approach. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000.
40. Commission BP. *British Pharmacopoeia*. London: British Pharmacopoeia; 2015.
41. Jahromi MAF, Etemadfar H, Zebarjad Z. Chemical Characterization and Antimicrobial Activity of Essential oil from the Leaves of *Bienertia cycloptera*. *Chemistry of Natural Compounds*. 2016;52(5):936-8.

42. Farboodniay J, Moein M, Ahmadi S. In vitro free radical scavenging activity and total phenolic and flavonoid content of spathe extracts from 10 cultivar varieties of *Phoenix dactylifera* L. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*. 2016;8(9):1481-6.
43. Derakhshan Z, Ferrante M, Tadi M, Ansari F, Heydari A, Hosseini MS, et al. Antioxidant activity and total phenolic content of ethanolic extract of pomegranate peels, juice and seeds. *Food Chem Toxicol*. 2018;114:108-11.
44. Morteza-Semnani K, Saeedi M. Essential oil composition of *Echium amoenum* Fisch. & CA Mey. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*. 2005;8(1):61-4.
45. Pokajewicz K, Bialon M, Svydenko L, Fedin R, Hudz N. Chemical Composition of the Essential Oil of the New Cultivars of *Lavandula angustifolia* Mill. Bred in Ukraine. *Molecules*. 2021;26(18).
46. WHO. *Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials*. Geneva; World Health Organization: 1998.
47. Karamipour Esfahani M, Abedi M. Standardization of medicinal plants and their herbal products and functional foods. *Innovative Food Technologies*. 2016;3(2):65-76.
48. Aghajani S. Analysis and identification of volatile compounds and determination of the amount of two specific markers present in the traditional product of Javaresh Kamuni [PharmD thesis]. Shiraz: Shiraz University of Medical Sciences; 2023.
49. Rozet E, Ceccato A, Hubert C, Ziemons E, Oprean R, Rudaz S, et al. Analysis of recent pharmaceutical regulatory documents on analytical method validation. *J Chromatogr A*. 2007;1158(1-2):111-25.
50. Jia S, Kang YP, Park JH, Lee J, Kwon SW. Simultaneous determination of 23 amino acids and 7 biogenic amines in fermented food samples by liquid chromatography/quadrupole time-of-flight mass spectrometry. *J Chromatogr A*. 2011;1218(51):9174-82.
51. Ekka NR, Namdeo KP, Samal PK. Standardization strategies for herbal drugs-An overview. *Research Journal of Pharmacy and Technology*. 2008;1(4):310-2.
52. Isiri F. Feed-maximum Limit of Heavy Metals. *The Institute of Standards and Industrial Research of Iran*. 2010;12968:15.