Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences and Health Services
Vol. 36, No.5, Dec. – Jan. 2014, Pages: 40-47

Formulation and Evaluation of an Herbal Cream from Dry Extract of *Glycyrrhiza Globra* and *Fumaria Parviflora*

Amir Siahpush[1], Maryam Sadaat Moravej[2*], Behzad Sharif Makhmalzadeh[3]

[1]Medical Sciences Research Center, Herbs and Natural Compounds, Pharmacy Department, Ahvaz Jundishapur University Medical Science, Ahvaz, Iran
[2] Pharmacy Department, Ahvaz Jundishapur University Medical Science, Ahvaz, Iran
[3]Pharmaceutics Department, Ahvaz Jundishapur University of Medical Sciences, Ahvaz, Iran

Received: 10 Oct, 2013 Accepted: 8 Jan, 2014

Abstract

Background and Objectives: *Fumaria parviflora* is a species of flowering plant native to Europe, Asia, and Africa, but it is common and widely distributed in many other parts of the world. *F.parviflora* is a weak tonic, slightly diaphoretic, diuretic, aperients and valuable in all visceral obstructions, particularly those of the liver, Liquorice is the root of *Glycyrrhiza glabra* from which a sweet flavor can be extracted. The liquorice plant is native to southern Europe and parts of Asia. Modern research has shown it to have effects uponliver, the endocrine system and other organs. It is tonic, diuretic, demulcent, expectorant, emenagogueand Laxative.

Material and Methods: The plants were extracted using maceration method. The extract were incorporated in absorption base and in the best formulation physicochemical tests such as content uniformity, creaming and coalescence, pH changing and microbial Challenge test were determined.

Results: After concentration of extract and freeze-dried them, weight from every 100gram extract of *Glycyrrhiza* were 16.6g and for *Fumaria* were 13.8gr. The pH of formulation after 3 month was in the range of 5.7-6.7. The prepared formulation appropriate physicochemical characteristics with respect to appearance, consistency, viscosity, content uniformity and stability parameters.

Conclusion: The prepared formulation was stable in the experimental condition and this formulation can be selected for the clinical trial on skin disorders.

Keywords: *Fumaria Parviflora*, *Glycyrrhiza Glabra*, Cream

*Corresponding author:
E-mail:ms.moravej@yahoo.com

مقاله پژوهشی

فرمولاسیون و ارزیابی فیزیکوشیمیایی کرم تهیه شده از عصاره خشک شده گیاهان شیرین بیان و شاهتره

امیر سیاهپوش[۱]، مریم السادات مروج[۲*]، بهزاد شریف مخمل زاده[۳]

[۱]مرکز تحقیقات گیاهان دارویی و ترکیبات طبیعی ، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، اهواز، ایران
[۲] دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، اهواز، ایران
[۳]گروه فارماسیوتیکس، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی جندی شاپور، اهواز، ایران

دریافت: ۹۲/۷/۱۸ پذیرش: ۹۲/۱۰/۱۸

چکیده

زمینه و اهداف:گیاه شاهتره (*Fumaria parviflora*) گیاهی علفی با خواص تصفیه کننده خون، تب بر، منظم کننده کار کبد و کلیه، صفرا آور و مقوی است.گیاه شیرین بیان (*Glycyrrhiza glabra* L) دارای خواص ضدالتهاب، ضدسرفه، ضدزخم معده، ملین و آنتی هیستامین است.

مواد و روش‌ها:از این مطالعه بررسی خصوصیات و پایداری فرمولاسیونی است که در صورت مناسب بودن برای ورود به بالین انتخاب شود.بعد از جمع آوری گیاهان از رویشگاه طبیعی خود و خشک کردن در سایه و آسیاب کردن گیاهان، عصاره‌گیری به کمک حلال هیدروالکلی انجام شد و با کمک دستگاه روتاری و فریزدرایر تغلیظ شد و درصد ماده خشک عصاره ها تعیین گردید.

برای یافتن بهترین فرمولاسیون کرم، پایه های مختلفی از امولسیون آب در روغن ساخته و نهایتا روی بهترین محصول تست‌های مختلفی مانند پایداری فیزیکی، pH، میکروبی و آزادسازی انجام شد.

یافته‌ها:از هر ۱۰۰ گرم پودر گیاه بعد از عصاره‌گیری و خشک کردن میزان ۱۶٫۶گرم شیرین‌بیان و ۱۳٫۸گرم شاهتره به صورت پودر لیوفیلیزه به دست آمد. نتایج حاصل از این پژوهش حاکی از آن است که کرم حاوی ۲٪ شیرین بیان و ۲٪ شاه تره مقدار قابل توجهی ترکیبات موثر آزاد می کند.

نتیجه‌گیری:این کرم در شرایط آزمایشگاهی پایداری خود را حفظ نمود و می‌توان جهت درمان بیماری‌های التهابی پوستی مانند پسوریازیس از آن استفاده کرد.

کلید واژه‌ها:شیرین بیان، شاهتره، کرم، فرمولاسیون

***ایمیل نویسنده رابط:**ms.moravej@yahoo.com

مقدمه

معرفی شیرین بیان و کاربرد درمانی آن:شیرین‌بیان (*Glycyrrhizaglabra* L)گیاهی است از شاخه گیاهان دانه‌دار، زیرشاخه نهاندانگان، رده دولپه‌ای‌ها، زیررده جداگلبرگها، راسته گل سرخ، خانواده نخود(Fabaceae(Leguminosaeو زیرخانواده پروانه‌داران Papilionoideae(۲-۱).شیرین‌بیان به واسطه دارابودن ترکیبات دارویی و غذایی مهم در ریشه و ریزوم آن در دنیا حایز اهمیت بوده و مورد توجه صنایع دارویی، غذایی و حتی دخانیات قرار گرفته است(۳).مصرف

عصاره آبی شیرین بیان به عنوان استعمال خارجی بر روی التهاب‌ها و تاول‌های پوستی اثری شبیه به کورتیزون دارد با این تفاوت که سمیت آن کمتر از کورتیزون است(۴).شیرین-بیان حاوی ماده‌ای است که وقتی روی پوست مالیده می‌شود اثری مشابه با داروی کورتیزون در معالجه اگزما، ورم جلدی تماسی و حساسیتی و پسوریازیس دارد. پماد جلدی انوکسولون که از گیاه شیرین بیان به دست می‌آید در درمان قرمزی پوست نوزادان ناشی از ادرارسوختگی، آفتاب سوختگی، اگزمای خفیف در سطح صورت، پلک‌ها و اطراف دهان و خارش ناشی از نیش حشرات کاربرد دارد.همچنین برای درمان تحریکات پوستی مانند التهاب پوست و اگزما مفید است(۵).این گیاه حاوی گلیسریزین است که این ماده از دسته ساپونین‌هاست و مهمترین ترکیب گیاه شیرین‌بیان محسوب می‌شود که ۵۰بار از شکر شیرین‌تر است(۶).گلیسریزین به عنوان حامل برای انواع داروهایی که به صورت موضعی مصرف می‌شوند به کار می‌رود. در این گونه موارد گلیسریزین نه تنها اثر ضد التهاب و ضد ویروسی دارد بلکه نفوذ پوستی دارو را نیز بالا می‌برد. گلیسیرینیک اسید ضد التهاب می‌باشد. این ماده به طور غیرمستقیم مانع حذف کامل کبدی هیدروکورتیزون می‌گردد، یعنی باعث مهار حذف زنجیره جانبی کربن ۱۷ هورمون‌های غدد فوق کلیه می‌شود(۷).در مطالعه‌ای که توسط دکتر سجادی و همکاران برای پیدا کردن فرمولاسیون موضعی مناسب از شیرین‌بیان برای بیماری پسوریازیس صورت گرفت روی چند فرآورده تست‌های فیزیکوشیمیایی مختلفی انجام شد و این چنین استنباط شد که پایه‌های امولسیونی آب در روغن مناسب‌ترین پایه برای فرآورده‌های حاوی گلیسریزین هستند. این پایه‌ها از پایداری بسیار خوبی برخوردار بوده، به نحوی که کلیه تست-های فیزیکوشیمیایی انجام شده بر روی فرآورده‌ها به خوبی تحمل شده و سایر خصوصیات لازم از جمله خواص رئولوژیکی مناسب را نیز دارا است. بنابراین مطالعه فرآورده-های تهیه شده در پایه‌های آب در روغن به عنوان فرآورده-های انتخابی برای مطالعات بالینی پیشنهاد می‌گردند(۸). که ما نیز در این فرمولاسیون کرم‌های آب در روغن تهیه کردیم و علاوه بر این جهت اطمینان از مناسب بودن فرآورده تست-های مختلفی روی آن انجام دادیم.

معرفی گیاه شاهتره و آثار فارماکولوژیکی آن: شاه تره گل ریز *(Fumariaparviflora)*، گیاهی است از شاخه گیاهان دانه-دار، زیرشاخه نهاندانگان، رده دولپه‌ای‌ها ،زیررده جداگلبرگها، راسته پاپاورالس و خانواده شاهتره(۹).

قسمت هوایی این گیاه حاوی آلکالوییدها، فلاونویید، املاح پتاسیم و فنل بوده که آثار فارماکولوژیکی آن مربوط به این دسته از مواد می‌باشد(۱۰).ترکیبات فنلی آن دارای خاصیت رفع خارش‌های جلدی و اگزما بوده و وجود املاح باعث خاصیت مدری شاهتره است(۱۱).

مواد و روش‌ها

ریشه گیاه شیرین‌بیان از مراکز تحقیقات منابع طبیعی استان اصفهان و گیاه شاهتره از رویشگاه طبیعی آن از دزفول جمع‌آوری گردید. در این بررسی از روش خیساندن و از حلال هیدروالکلی جهت عصاره‌گیری استفاده شد و بعد عمل صاف کردن روی عصاره ها انجام شد(۱۲) و محلول صاف شده با کمک دستگاه روتاری تغلیظ شد و توسط فریز دراير کاملا خشک شد و به شکل پودر درامد. برای تهیه کرم از این پودر خشک شده استفاده گردید. این مراحل به طور جداگانه در مورد دو گیاه انجام گردید.

جهتبررسی وجود فلاونوئید در گیاهان: تهیه محلول نمونه به شرح ذیل انجام شد. ۰/۵گرم پودر گیاهی با ۱۰ میلی‌لیتر متانول به مدت ۱۰ دقیقه رفلاکس شد و بعد از آن محلول داغ با فیلتر کاغذی صاف گردید. محلول توسط ۱۰ میلی‌لیتر آب رقیق و پس از سرد شدن محلول با ۵ میلی لیتر پترولیوم اتر دکانته شد. فاز آبی محلول با متانول جدا و در دمای ۲۰ درجه سانتی‌گراد در خلا تغلیظ شد. حاصل تغلیظ در ۵ میلی لیتر اتیل استات حل و محلول صاف شد(۱۳).آزمایش ویلسون-تابوک: ۱میلی لیتر از محلول نمونه تهیه شده در مرحله قبل کاملا تغلیظ و سپس چند قطره استون به آن اضافه شد، سپس به آن مقدار کمتر از یک سر اسپاتول اسید بوریک و اسید اگزالیک افزوده، مجددا با حرارت دادن بر روی بن ماری تغلیظ شده بعد از سرد شدن در ۱۰ میلی لیتر اتر حل گردید. در صورت موجود بودن فلاونوئیدها در محلول به دست آمده، می توان آنها را توسط لامپ ماوراءبنفش در طول موج ۳۶۵ نانومتر شناسایی نمود. این ترکیبات در مقابل لامپ ماوراء بنفش به رنگ زرد مایل به سبز در می آیند(۱۳). این مراحل برای ۲ گیاه به صورت مجزا انجام گردید. به منظور بررسی وجود آلکالوئیدها در گیاه شاه ترهبه ۰/۵ گرم پودر گیاه شاه‌تره ۱ میلی‌لیتر اسیدکلریدریک ۲ نرمال و ۹ میلی‌لیتر آب مقطر اضافه گردید و برای مدت ۲ تا ۵ دقیقه روی بن ماری جوشان حرارت داده شد و بعد از سرد شدن و صاف کردن، ۲ تا ۳ قطره از محلول بر روی شیشه ساعت ریخته و به آن ۲ قطره معرف ید یا مایر اضافه، و سپس با هم مخلوط گردید. ایجاد کدورت یا رسوب بیانگر وجود آلکالوئیدها می-باشد که در آزمایش با معرف ید رنگ رسوب قهوه ای مایل به سیاه و در آزمایش با معرف مایر رنگ سفید مایل به زرد دارد (۱۳). جهت شناسایی اسید فوماریک در عصاره هیدروالکلی شاه ترهحدود ۱۰ میلی لیتر از عصاره هیدروالکلی گیاه برداشته و به آن حدود ۲۰ میلی لیتر سولفات مس (۱ به ۵) افزوده شد سپس ۸ میلی لیتر پیریدین به محلول فوق اضافه شد. نمایان شدن رسوب آبی دال بر وجود اسید فوماریک است(۱۴).۰/۵ گرم پودر از گیاه شیرین بیان را در یک لوله آزمایش ریخته و حدود ۱۰ میلی لیتر آب جوش به آن اضافه شد و پس از سرد شدن به مدت ۱۰ ثانیه به خوبی تکان داده شد. ایجاد کف پایدار به ارتفاع ۱ تا ۱۰

سانتی متر که به مدت ۱۰ دقیقه پایدار بماند و با افزودن چند قطره اسید کلریدریک پایداری خود را حفظ کند، نشانگر وجود ساپونین‌ها می‌باشد(۱۳). برای تهیه غلظت‌های مختلف اسید تانیک و عصاره‌ها:در این روش از تانیک اسید به عنوان استاندارد استفاده شد(۱۵). در بالن ژوژه۱۰۰ میلی‌لیتری،۱۰ میلی‌گرم از تانیک اسید را توسط متانول حل و به حجم رسانده تا غلظت ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر به دست آید. سپس با روش رقیق‌سازی، غلظت‌های ۰/۰۸، ۰/۰۴، ۰/۰۲ و ۰/۰۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر تهیه شد.

سپس با همین روش غلظت‌های متانولی ۱/۶ و ۰/۰۸، ۰/۰۴، ۰/۰۲ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از پودرهای لیوفیلیزه شده دو گیاه تهیه شد(۱۶).

با تست فولین سیکالتو:به ۰/۵ میلی‌گرم از نمونه (عصاره‌ها یا استاندارد)، ۲/۵ میلی‌لیتر واکنشگر فولین سیکالتوی رقیق شده با آب به نسبت ۱ به ۱۰ اضافه شد. به مخلوط حاصل پس از هم زدن و ماندن به مدت ۵ دقیقه در دمای اتاق، ۲ میلی‌لیتر ۷/۵٪ Na_2CO_3 (۷/۵ گرم در ۱۰۰میلی‌لیتر) افزوده و به مدت ۲ساعت در دمای اتاق در تاریکی نگه‌داری شد(۱۶). دستگاه UV در طول موج ۷۶۵ نانومتر تنظیم و با بلانک (مخلوط ۲/۵ میلی‌لیتر آب و ۰/۵ میلی‌لیتر متانول) صفر شد و سپس جذب نمونه‌ها خوانده و ثبت گردید. این آزمایش برای هر عصاره سه بار تکرار شد. سپس با استفاده از منحنی استاندارد تانیک اسید مقادیر کل ترکیبات فنولی برای هر عصاره بر حسب معادل میلی‌گرم تانیک اسید در یک گرم از عصاره خشک گیاه گزارش گردید(نمودار شماره ۱).براساس مطالعات پیش فرمولاسیون انجام شده و بررسی مقالات مرتبط چند فرمولاسیون تهیه شد(۱۷) وپس از تعیین متغیرهای موثر بر ویژگی‌های فرمولاسیون‌ها، رابطه بین این متغیرها با ویژگی-های فرمولاسیون مورد بررسی قرار گرفت و سپس بر اساس خصوصیات ظاهری، گسترش پذیری، پایداری و آزادسازی ماده موثره بهترین فرمولاسیون انتخاب شد(جدول شماره ۱).به دلیل جامد بودن ستیل الکل ابتدا ستیل الکل توزین شده در بن ماری در دمای ۸۰ درجه سانتی گراد مایع شد و سپس سایر مقادیر انتخابی از فاز روغنی شامل پارافین مایع، توین ۸۰ و اسپن ۲۰ توزین و درون یک بشر ریخته شد و به ستیل الکل اضافه شد و کل فاز روغنی توسط بن ماری به دمای ۸۰ درجه رسید. فاز آبی شامل کربومر، سپی ژل، پروپیلن گلیکول، متیل پارابن، پروپیل پارابن و عصاره‌ها بود. با توجه به اینکه بیشترین خاصیت ژله‌ای و ویسکوزیته کربومر در pH=5/5-6ایجاد می‌شود، به همین منظور بعد از پراکنده کردن کربومر در مقداری از آب فرمول pH آن با NaOH ۰/۱ مولار تنظیم و سپس سپی ژل به آن اضافه شد. عصاره گیاهان ابتدا با پروپیلن گلیکول لویگه شد و سپس بقیه آب فرمول به آن اضافه شد و با مخلوط کربومر و سپی ژل ترکیب شد، سپس مخلوط آبی در بن ماری به دمای ۸۰ درجه سانتی گراد رسید و به آرامی و با هم زدن به فاز روغنی اضافه شد و جهت ایجاد یکنواختی بیشتر، فرآورده از هموژنایزر عبور داده شد. فرآورده تهیه شده به مدت ۴۸ ساعت در دمای آزمایشگاه جهت ایجاد پایداری، نگه‌داری شد و تست‌های مربوطه بر روی آن انجام گرفت.فرآورده جلدی مناسب علاوه بر خصوصیات ظاهری قابل قبول، باید از پایداری کافی در مدت مصرف برخوردار باشد. به این معنی که فرآورده باید ۲ تا ۵ سال پس از ساخت کیفیت خود را از لحاظ ویسکوزیته، رنگ، بو، pH و یکنواختی حفظ کند. به این علت که نمی‌توان برای بررسی کیفیت فرآورده ساخته شده مدت طولانی وقت صرف نمود، لذا از تست‌های تسریع شده پایداری استفاده می‌شود. در صورتی که فرآورده، این شرایط حاد را برای مدتی نسبتا کوتاه تحمل کند و کیفیت مطلوب خود را حفظ نماید، نشانه پایداری آن در مدت ۵ سال در شرایط متعارف است(۱۸).فرآورده از نظر ماکروسکپی باید ظاهری مناسب و شفاف داشته باشد و فاقد هر گونه کدورت باشد. از نظر میکروسکپی باید ذرات فرآورده به صورت یکنواخت پخش شده باشد و هیچ حبابی بین ذرات آن وجود نداشته باشد. در این آزمایش فرآورده تهیه شده پس از ۴۸ ساعت یعنی بعد از رسیدن به تعادل به صورت میکروسکپی بررسی شد. به این صورت که ۰/۵ گرم از فرآورده را روی لامی تمیز قرار داده و پس از قراردادن لامل بر روی آن با میکروسکپ نوری با بزرگنمایی ۴۰ یکنواختی آن بررسی شد(۱۸).پدیده کرمینگ به این مفهوم است که ذرات و قطرات معلق در امولسیون، در اثر نیروی ثقل به سمت بالا یا پایین حرکت می‌کنند. کوالسانس نیز به معنای پیوستن قطرات درشت است. این دو پدیده از علایم ناپایداری امولسیون‌ها هستند. بدین علت بررسی فرآورده‌ها از لحاظ ایجاد این دو حالت لازم به نظر می رسد(۱۹).برای انجام این آزمایش یک نمونه ۱۰ گرمی از فرآورده را در یک ظرف شیشه‌ای ریخته و کیفیت ظاهری این نمونه‌ها پس از گذشت یک هفته، یک ماه و سه ماه پس از تاریخ ساخت، بررسی شده و پایداری ظاهری آن ارزیابی گردید(۲۰). برای اندازه گیری عبور دارو از غشاء سنتتیکدر این آزمایش از سلول‌های انتشاری یک محفظه‌ای ساکن (Franz diffusion static cell) استفاده شد. فاز گیرنده‌ای که در این آزمایش استفاده شد، محلول هیدروالکلی متانول و آب با نسبت ۲۰٪ بود. بعد از رسیدن آب به دمای مورد نظر، سلول‌ها از فاز گیرنده پر و یک عدد مگنت تفلون با سرعت ۲۰ دور در دقیقه، جهت کمک به هم زدن فاز گیرنده در داخل سلول قرار داده شد. غشای سنتزی مورد استفاده از نوع غشای دیالیزی سلولزاستات با KD_a۱۲ Cut off = بود. این غشا به مدت ۲۴ ساعت قبل از شروع آزمایش در مقداری آب مقطر ۲ بار تقطیر خیسانده و روی سلول انتشاری قرار داده شد. سپس مقدار معینی از کرم توزین شده (۵گرم) و روی غشا قرار داده شد و درپوش سلول روی آن قرار گرفت. از لحظه‌ای که کرم روی غشا قرار داده شد زمان ثبت و در فواصل زمانی معین ۳۰ دقیقه،۱،۲،۳،۴،۵و۶ ساعت از فاز

گیرنده به مقدار ۱ میلی‌لیتر به عنوان نمونه برداشته شد. بعد از هر برداشت نمونه، ۱ میلی لیتر از محلول هیدروالکلی جایگزین شد تا مقدار فاز گیرنده ثابت بماند(۱۹).سپس میزان ترکیبات فنولی آزاد شده از هر نمونه و با کمک روش فولین سیکالتو تعیین گردید. پس از به دست آوردن جذب با توجه به منحنی استاندارد تانیک اسید، غلظت مربوطه و متعاقبا درصد آزادسازی محاسبه گردید. لازم به ذکر است که جهت صفر کردن دستگاه و خواندن جذب کرم دارویی از پلاسبو استفاده شد و نمودار درصدهای آزادسازی ترکیبات پلی فنلی بر اساس کینتیک درجه صفر، درجه یک، هیگوچی، پپاس، هیکسون، وی بول، واگنر خطی و واگنر لگاریتمی رسم شدند (۲۲-۲۱).هدف انجام این آزمایش تعیین pHفرآورده در یک دوره ۳ ماهه می‌باشد. pHفرآورده در فواصل زمانی صفر، یک هفته، یک ماه و سه ماه پس از ساخت در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد اندازه‌گیری شد. در هر مورد آزمایش سه بار تکرار گردید. به علت اینکه فرآورده نیمه جامد بود ۵ گرم از فرآورده توزین، و سپس با آب مقطر به حجم ۵۰ سی سی رسانده شد، سپس ظرف شیشه‌ای حاوی محلول فوق روی هیتر برقی تنظیم شده در دمای ۲۵ درجه قرار گرفت و یک همزن مغناطیسی جهت ایجاد محیط یکنواخت پیرامون الکترود در آن قرار داده شد و pH در زمان‌های ذکر شده اندازه‌گیری شد(۱۹).آلودگی میکربی امولسیون، خصوصیات فیزیکوشیمیایی فرآورده را به نحوی ناخوشایند تحت تاثیر قرار داده و مشکلات مختلفی از جمله تولید گاز، تغییرات رنگ و بو، هیدرولیز چربی‌ها و روغن‌ها، تغییرات pH در فاز آبی و بالاخره شکستن امولسیون را به دنبال خواهد داشت. بنابراین استفاده از یک نگه‌دارنده ضدمیکربی در فرآورده ضروری است(۲۳). جهت اطمینان از عملکرد مناسب ماده محافظ، تست کفایت ماده محافظ میکربی انجام می شود.برای انجام این تست، ابتدا ویال‌های حاوی میکروارگانیسم‌های استاندارد استافیلوکوکوس اورئوس و پزودوموناس آئروژینوزا، از مرکز کلکسیون قارچ‌ها و باکتری‌ها خریداری، و سپس هر میکروارگانیسم به طور جداگانه در محیط کشت شیب دار "سوی بین کازئین دایجست آگار" کشت داده شد. پس از رشد میکروارگانیسم‌ها بر روی محیط کشت ۵ میلی لیتر محلول نرمال سالین ۰/۹٪ استریل روی سطح محیط کشت ریخته و به وسیله سواپ استریل کلونی‌های رشد کرده از سطح محیط جدا و وارد محلول رویی گردید، سپس سوسپانسیون‌ها در دو لوله آزمایش استریل جمع آوری شد و میزان عبور نور از آنها در طول موج ۵۸۰ نانومتر اندازه گیری شد. درصورتی که سوسپانسیون مذکور در این طول موج، عبوری در حدود ۰/۳-۰/۲ داشته باشد این سوسپانسیون حاوی 10^8 Mo/mL می‌باشد. سپس هر یک از میکروارگانیسم‌ها به طور جداگانه در ۶ لوله توسط نرمال سالین استریل ۰/۹٪ تا 10^6 بار رقیق شد تا تعداد میکروارگانیسم‌ها به 10^2 Mo/mL رسید. از هر کدام از رقت-های 10^4و 10^5و 10^6دو نمونه، هر کدام به حجم ۱ میلی‌لیتر برداشته شد و داخل پلیت‌های استریل منتقل گردید. به هر کدام از پلیت‌های حاوی میکروارگانیسم، ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت SCDA که به دمای ۴۵ تا ۵۰ درجه سانتی‌گراد رسیده بود اضافه، و به آرامی مخلوط شد. پس از انجماد محیط‌های کشت، پلیت‌ها داخل گرم‌خانه با دمای ۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار داده شد. ۲۴ تا ۴۸ ساعت پس از کشت، میکروارگانیسم‌ها توسط دستگاه کلنی‌شمار شمارش شد تا از صحت تعداد میکروارگانیسم‌ها در سوسپانسیون میکربی اطمینان حاصل گردد. پس از تهیه پلیت‌ها در ادامه آزمایش از سوسپانسیون میکربی حاوی 10^8 Mo/mL استفاده گردید.

در این مرحله به دو نمونه ۲۰ میلی‌لیتری از فرآورده نیاز بود ولی چون فرآورده نیمه جامد بود ، ۲۰ گرم از فرآورده توزین و در ظرف شیشه‌ای استریل قرار گرفت و ۴-۳ قطره توئین ۸۰ به عنوان کمک حلال به آن اضافه شد و وزن نهایی توسط آب مقطر استریل، به ۱۰۰ گرم رسید. درب ظرف توسط کاغذ آلومینیومی استریل پوشانده شد و در بن ماری با دمای ۴۰-۳۵ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت. چون غلظت فرآورده و در نتیجه غلظت ماده محافظ موجود در آن یک پنجمغلظت ذکر شده در روش آزمایش بود به ۱ میلی‌لیتر از سوسپانسیون، ۴ میلی‌لیتر نرمال سالین ۰/۹٪ استریل افزوده شد و ۰/۱ میلی‌لیتر از آن به ارلن حاوی ۲۰ میلی‌لیتر فرآورده افزوده شد. سپس نمونه‌های مورد آزمایش در دمای اتاق(۲۵-۲۲ درجه سانتی-گراد) نگه‌داری شدند و پس از ۴۸ ساعت ۱ میلی‌لیتر از هر نمونه جداگانه به داخل پلیت استریل منتقل و روی آن ۲۰ میلی‌لیتر از محیط کشت SCDA ریخته شد و در دمای ۳۲ تا ۳۵ درجه سانتی‌گراد در گرم‌خانه نگه داری شد و پس از گذشت ۴۸ ساعت تعداد میکروارگانیسم‌ها توسط دستگاه کلنی‌شمار شمارش گردید. این عمل پس از گذشت ۲۸-۲۱-۱۴-۷ روز تکرار و تعداد میکروارگانیسم‌ها شمارش شدند(۲۴).

یافته‌ها

حضور فلاونوئید در دو گیاه با ایجاد رنگ زرد مایل به سبز در برابر لامپ ماوراءبنفش در آزمایش ویلسون تابوک تایید شد.وجود آلکالوئید در گیاه شاه تره حضور الکالوئید در گیاه شاه تره با ایجاد رسوب سفید با معرف مایر و ایجاد رسوب قهوه‌ای با معرف ید تایید شد.حضور اسیدفوماریک در عصاره گیاه شاه تره با نمودارشدن رسوب آبی مشخص گردید. حضور ساپونین در شیرین بیان با ایجاد کف پایدار در گیاه شیرین بیان تایید شد.تست فولین سیکالتو جهت اندازه گیری ترکیبات پلی فنولی استفاده شد. جذب به دست آمده از غلظت ۰/۱۶mg/mL انتخاب شد. تانیک اسید به عنوان استاندارد استفاده شد، جذب‌های به دست آمده از گیاهان در فرمول به دست آمده از تانیک اسید گذاشته شد و غلظت ترکیبات فنلی گیاهان بر حسب تانیک اسید بیان شد.با توجه به جذب های به دست آمده از غلظت های مختلف استاندارد

مقدار میلی گرم و درصد ترکیبات پلی فنولی موجود در عصاره هر گیاه محاسبه گردید. بدین صورت که در هر ۱گرم پودر لیوفیلیزه گیاه شاه‌تره مقدار ۹۵/۰۵ میلی‌گرم ترکیبات فنلی و در هر ۱گرم پودر لیوفیلیزه شیرین‌بیان ۵۳/۳ میلی‌گرم ترکیبات فنلی بر حسب تانیک اسید موجود بود.بر اساس نتایج به دست آمده و با توجه به اینکه کرم ساخته شده در مجموع حاوی ۴٪ عصاره گیاهی است، به طور کلی مقدار ۲۹۶/۷ میلی گرم ترکیبات فنولی در ۴ گرم مخلوط دو عصاره وجود دارد. با توجه به اینکه بازده عصاره گیری در شاهتره ۱۳/۸٪ و در شیرین بیان ۱۶/۶٪ به دست آمده بود درصد ترکیبات فنولی بر حسب یک گرم از پودر گیاه محاسبه شد. طبق نتایج به دست آمده در یک گرم پودر شاه‌تره ۱۳۲ میلی-گرم و در یک گرم پودر شیرین بیان ۸۹ میلی‌گرم موجود است.در نتایج حاصل از آزمایش یکنواختی فرآورده،فرآورده تهیه شده ۴۸ ساعت پس از ساخت از لحاظ ماکروسکپی یکنواخت بوده و ظاهری مقبول داشت. در بررسی میکروسکپی نیز این فرآورده کاملا یکنواخت و بدون حباب هوا بود.بررسی فرآورده از نظر کوالسانس و کرمینگ نشانن می‌دهدفرآورده مورد آزمایش در طی دوره‌های بررسی در شرایط طبیعی محیط کیفیت خود را به طور کامل حفظ کرده و هیچگونه تغییر ظاهری از قبیل کوالسانس و کرمینگ در آن مشاهده نشد.تست pH: نتایج مربوط به تغییرات pHفرآورده طی یک دوره سه ماهه در دمای ۲۵ درجه در جدول شماره ۲ آورده شده است.تست کفایت ماده محافظ میکربی: پس از گذشت ۱۴ روز نباید بیش از ۰/۱٪ غلظت اولیه، رشد میکروارگانیسم‌ها مشاهده شود و تعداد آنها نسبت به روز اول بایستی 10^3بار کاهش یابد. در این حالت ماده محافظ موجود در فرآورده به حد کافی توانایی و اثربخشی جهت جلوگیری از رشد میکروارگانیسم‌ها را داشته است.پس از تهیه پلیت و شمارش کلنی‌های میکروبی در روز اول و بررسی آن در روزهای ۲۸-۲۱-۱۴-۷ مشاهده شد که تعداد آنها نسبت به روز اول 10^3 بار کاهش یافته بود و بعد از گذشت ۱۴ روز کمتر از ۰/۱٪ غلظت اولیه رشد میکروارگانیسم دیده شد و در نتیجه غلظت ماده محافظ در فرآورده به حد کافی اثربخش بوده است.

تست آزادسازی: بر اساس نتایج به دست آمده از تست آزادسازی نمودار درصدهای آزادسازی ترکیبات پلی فنلی بر اساس کینتیک درجه صفر، درجه یک، هیگوچی، پپاس، هیکسون، وی بول، واگنر خطی و واگنر لگاریتمی رسم شدند(جدول شماره۳). مقایسه مقدار رگرسیون نمودارها و حداقل درصد خطا نشانگر آزادسازی ترکیبات پلی‌فنلی از فرمولاسیون در محیط گیرنده بر اساس کینتیک درجه یک می‌باشد.ضریب رگرسیون کینتیک درجه یک ۰/۹۹۴۷۶ به دست آمد که بزرگترین عدد نسبت به سایر مدل‌ها بود و حداقل درصد خطا ۵/۰۷ بود که کمترین عدد نسبت به سایر مدل‌ها به دست آمد.

جدول ۱: مقادیر نهایی به کار رفته از اجزای فرمولاسیون فرآورده دارویی

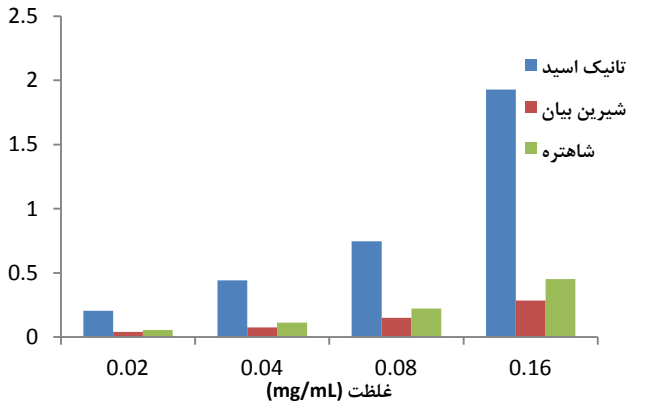
نوع فاز	اجزاء تشکیل دهنده فرمولاسیون	درصد وزنی (٪w/w)
روغنی	پارافین مایع	۵
	ستیل الکل	۵
	توین ۸۰	۰/۵
	اسپن ۲۰	۰/۵
	کربومر	۰/۸
	سپی ژل	۱۰
آبی	Polyacrylamide/C13-((14isoparaffin/Laureth-7	
	متیل پارابن	۰/۱۸
	پروپیل پارابن	۰/۰۲
	پروپیلن گلیکول	۵
	عصاره گیاه شیرین بیان	۲
	عصاره گیاه شاهتره	۲
	آب	تا ۱۰۰

جدول ۲: نتایج مربوط به تغییرات **pH**فرآورده طی یک دوره سه ماهه در دمای ۲۵ درجه.

مدت زمان	**pH** اندازه گیری شده
۴۸ساعت پس از ساخت	۶/۱±۰/۷
یک هفته پس از ساخت	۶/۳±۰/۲
۱ ماه پس از ساخت	۶/۲±۰/۳
۳ ماه پس از ساخت	۶/۲±۰/۵

جدول ۳: نتایج درصد آزادسازی ترکیبات پلی فنلی از فرمولاسیون منتخب بر حسب زمان(ساعت)

زمان	۰/۵	۱	۲	۳	۴	۵	۶
درصد آزادسازی	۸/۴۳	۱۲/۹۸	۲۸/۱۵	۳۹/۰۲	۴۴/۳۹	۵۳/۵۶	۶۱/۳۶



نمودار ۱: جذب به دست آمده از تانیک اسید و شیرین‌بیان و شاه‌تره در غلظت-های مختلف .نتایج بر اساس Mean± SD و حاصل سه بار تکرار می‌باشد جذب در طول موج ۷۶۵ نانومتر می‌باشد

بحث

امروزه با توجه به استقبال روزافزون از داروهای گیاهی گروه‌هایی از صنایع دارویی فعالیت تولیدی خود را عمدتا بر روی شناسایی مواد موثره، استخراج و ساخت داروهای گیاهی معطوف کرده اند.ترکیبات گیاهی موجود در گیاهان مورد استفاده در فرمولاسیون گیاهی با مکانیسم‌های مختلفی باعث ایجاد اثرات ضدالتهاب و ضد خارش می‌شوند. گیاه شیرین‌بیان فعالیت ضد حساسیت،

ضد میکربی، ضد ویروسی و حفاظت کبدی قابل توجهی دارد و به عنوان یک داروی گیاهی برای بیماری‌های پوستی مانند پسوریازیس و اگزمای آتوپیک استفاده می-شود(۲۵).همچنین شاه تره در درمان بیماری‌های پوستی و بهبود وضعیت پوست استفاده می‌شود. گزارش‌های بسیاری در مورد تاثیر موضعی آن در درمان خارش وجود دارد(۲۶).در ارتباط با آزمایشات مقدماتی حضور ترکیبات پلی فنلی در گیاهان مورد استفاده تایید شد. پلی فنل‌ها از جمله موادی هستند که دارای خاصیت ضد التهابی و آنتی اکسیدانی می باشند.پارافین مایع که در این امولسیون استفاده گردید هم نقش حامل برای ماده موثره را دارد و هم باعث افزایش قوام فرآورده و بهبود خواص پخش شوندگی بر روی پوست می شود(۲۳).افزودن کربومر سبب افزایش ویسکوزیته فرآورده می شود که نقش مهمی در شکل فرآورده دارد. سپی ژل به علت حساسیت کمتر پوستی و احساس چربی کم، در ایجاد اثر مرطوب کنندگی موثر است(۲۶).سورفاکتانت‌ها مانند توین و اسپن با اثرات پایین آورندگی کشش سطحی باعث کاهش موقتی عملکرد سدی استراتوم کورنئوم و کاهش نفوذناپذیری پوست می‌شود و در نتیجه در فرمولاسیون نقش جذب افزا را دارند(۲۳).

نتیجه‌گیری

با توجه به آزمایش‌های انجام گرفته و نتایج به دست آمده فرمولاسیون مورد نظر پایداری خوبی در برابر شرایط آزمایش از خود نشان داد. الگوی آزادسازی ترکیبات پلی‌فنلی از فرمولاسیون از مدل درجه یک پیروی می کند. اندازه گیری pH**در** زمان‌های مختلف نشان داد که با توجه به نزدیک بودن pHآنها به خنثی، فرمولاسیون موردنظر برای وارد شدن به بالین برای بیماری‌های التهابی پوست نظیر پسوریازیس مناسب است.

تشکر و قدردانی

نویسندگان این مقاله بر خود لازم می‌دانند که بدین وسیله از ریاست دانشکده داروسازی و معاونت پژوهشی و کارشناسان آزمایشگاه فارماکولوژی و فارماسیوتیکس دانشکده داروسازی و همچنین تمام دوستانی که ما را در این طرح همکاری نمودند، تشکر نمایند.

References

1. Wang X, Zhang H, Chen L, Shan L, Fan G, Gao X.Liquorice, a unique "guide drug" of traditional Chinese medicine: A review of its role in drug interactions. *J Ethnopharmacol* 2013;**150**(3):781-790.
2. Emami A, Ahi A.[Medical botany]. 1st ed. Tehran, Iran University of medical sciences,2008;PP:117,121-122,132,144,149-150(Persian).
3. Amani M, Sotudeh-Gharebagh R, Mostaoufi N, Kashani H. Optimal Extraction of Glycyrrhetinic Acid From Licorice Root. *J Technol* 2005; **3**(4): 376-580.
4. Ying-Qiu Li. Antiangiogenic Activity of *Glycyrrhiza* Extract. *Physics Procedia* 2012; **33**: 144-149.
5. Donatella P, Giuseppe L, Domenico M, Franco A, Massimo F. Ethosomes for skin delivery of ammonium glycyrrhizin ate: In vitro percutaneous permeation through human skin and in vivo anti-inflammatory activity on human volunteers. *Journal of Controlled Release* 2005; **106**: 99-110.
6. Khaligisigaroodi F, Jarvandi S, Taghizade M. *Therapeutic uses of Medicinal plants*. 1st ed. Tehran. *Arjmand*2010; **141**: 145(Persian).
7. Evans W, Trease G, Evans D. *Trease and Evans pharmacognosy*.16th ed. Washington. 243, 556.
8. Sajadi SA, Aslani A, Peimani A. [preparation topical formulations of licorice extract for the treatment of psoriasis]. *Daneshvaepezeshki* 2005;**15**(72): 27-36(Persian).
9. Gireesh KS, Vikas K. Acute and sub-chronic toxicity study of standardized extract of Fumariaindica in rodents. *Journal of Ethno Pharmacology*2011; **134**: 992-995.
10. Jowkar F,Jamshidzadeh A,MirzadehYazdi A,Pasalar M. The Effects of*FumariaParviflora L* Extract on Chronic Hand Eczema: A Randomized Double-Blind Placebo Controlled Clinical Trial**.** *IranianRed CrescentMedical Journal*2011; **13**: 824-828.
11. Harries MJ, Chalmers RJG, Griffiths CEM. Fumaric acid esters for severe psoriasis: a retrospective review of 58 cases. *British Journal of Dermatology* 2005; **153**(3): 549-551.
12. Anderson BJ,Philipson JD, Barnes J. *Herbal medicine: a guide for health-care professionals*. 2nd ed. London: *The Pharmaceutical Press* 2002; **45**: 224-225.
13. Effatpoor B. *The chemicalingredientsoftheherbs from Ardebil*.1st ed. Ardebil, Sheikh safiaddin, 2000; 9-16(Persian).
14. Sadeghi S. Clinical effect of *fumaria parviflora*in the treatment of atopic eczema. Ahvaz. Pharmacy department. Ahvaz jondishapoor university medical science 2003;37-41(Persian).
15. Basile A, Sorbo S, Lopez-saez JA, CastaldoCobianchi R. Antibacterial and antioxidant activities of ethanol extract from paullincupana mart. *J Ethno Pharm*2005; **102**(1): 322-368.
16. Singelton VL, Orthofer R, Lamuela RM. Analysis of total phenols and other oxidation substrate and antioxidants by mean of Folin-Cicalteu reagent. *Method Enzymal* 1999; **299**: 152-158.
17. Siahposh A, Sheikholeslami N. Evaluation (by double blind method) of Clinical Trials of using a topical

herbal cream containing Glycyrrhizaglabra, fumariaparviflora for atopic eczema.*Iran Med Lib Library*2011;**1**(1): 54-61.

18. Martin E, Hoover G. *Pharmaceutical Dispensing*. 6th ed. Pennsylvania, Make Company, 1966; PP: 490-494.
19. Poucher WA. *Poucher's Perfumes, Cosmetic and Soaps*. 9th ed. London, Chapman Hall, 1993; PP: 3, 451, 620-636.
20. Paul B. *Encylopediaof Emulsion Technology*. USA,Thieme, 1993; PP: 423-425.
21. Costa P, Sousa Lobo JM. Modeling and comparison of dissolution profiles. *Eur J Pharmsci* 2001; **13**: PP: 123-133.
22. Lu Rd, Abu-lzza K, Mao F. Nonlinear data fitting for controlled release device: an integrated computer program.*Inty Pharm* 1996; **129**: 243-510.
23. Aulton ME. *Aulton's Pharmaceutics: The design and manufacture of medicines*. 3rded. Churchill Livingston, Elsevier, 2007; PP: 391-392,567-595,400-401.
24. United States Pharmacopeia Convention. *The United States Pharmacopeia*. 30th ed. Washington, USA Convention INC, 2007; PP: 79-109.
25. Khanahmadi M, NaghdiBadi H, Akhondzadeh S, Khalighi – Sigaroodi F, Mehrafarin A, Shahriari S, et.al. A Review on Medicinal Plant of Glycyrrhizaglabra L. *Journal of Medical Plants* 2013; **12**(2): 1-12.
26. Gruewald J, Brendler T, Jaenicke C. *PDR for Herbal Medicines*. 2nded. New Jersey, Medical Economics, 2000; PP: 95,113,322-323,471-472.