Complementary Medicine Journal
Volume 13, Issue 1, Spring 2023

Research Article

Preliminary Phytochemical and Physicochemical Study of *Cuscuta Chinensis* L. Aqueous Extract Compared with Previous Studies

Fatemeh Alijaniha [1,*], Fatemeh Emadi [1], Mohsen Naseri [2], Zahra Bahaedin [1]

[1] Assistant Professor, Clinical Trial Research Center, Shahed University, Tehran, Iran
[2] Professor, Clinical Trial Research Center, Shahed University, Tehran, Iran

*** Corresponding author:** Fatemeh Alijaniha, Assistant Professor, Clinical Trial Research Center, Shahed University, Tehran, Iran. E-mail: f.alijaniha@shahed.ac.ir

DOI: 10.61186/cmja.13.1.3

How to Cite this Article:
Alijaniha F, Emadi F, Naseri M, Bahaedin Z, Sharifan Z. Preliminary Phytochemical and Physicochemical Study of Cuscuta Chinensis L. aqueous Extract Compared with Previous Studies. *Complement Med J*. 2023;**13**(1):3-9. DOI: 10.61186/cmja.13.1.3

Received: 14 Nov 2022
Accepted: 17 May 2023
Keywords:
Cuscuta Chinensis L.
Physicochemical
Phytochemical
Aqueous extract
Standardization
© 2023 Arak University of Medical Sciences

Abstract

Introduction: *Cuscuta chinensis* L. is a widely used medicinal plant with little data on its standardization. This study aims to contribute to the efficiency and safety of its use by preliminary investigation on its physicochemical and phytochemical characteristics.

Methods: The extract was concentrated at low temperature to prepare a dry powder. Sensory evaluation was used to determine the organoleptic characteristics. Then the percentage of total ash, ash insoluble in acid and dry residue was measured by Pharmacopeia method. Total phenol and total flavonoid content as well as rutin content were measured by HPLC spectroscopic methods. The total number of microbes and the presence of the main pathogens were also investigated.

Results: The dried aqueous extract of C. chinensis was a powder with a brown color, herbal odor, the amounts of total ash and acid insoluble ash were28.16, 9.1%, respectively, and the amount of dry residue was 05.7%. The amount of total phenol content was 55.61 ± 9.02 mg Gallic acid/g and the amount of total flavonoid was 25.27 ± 1.2 mg Catechin/g. The total number of live bacteria, fungi, and yeast was less than 10 cfu/ml, and the sample did not contain the main pathogens under investigation.

Conclusions: The results of this study provide data on some physicochemical properties of *C. chinensis* extract that were not available in other resources. However, in order to achieve accurate standardization criteria, more information is needed, which can be obtained from more extensive research.

Copyright © *2023 The Author(s); Published by Complementary Medicine Journal. This is an open access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses /by-nc/4.0/) which permits others to copy and redistribute material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.*

مجله طب مکمل
دوره ۱۳، شماره ۱، بهار ۱۴۰۲

مقاله پژوهشی

بررسی مقدماتی فیتوشیمیایی و فیزیکوشمیایی عصارهٔ آبی گیاه کشوث (*Cuscuta chinensis* L.) در مقایسه با مطالعات قبلی

فاطمه علیجانی‌ها [۱*]، فاطمه عمادی [۱]، محسن ناصری [۲]، زهرا بهاءالدین [۱]

[۱] استادیار، مرکز تحقیقات کارآزمایی بالینی طب سنتی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
[۲] استاد، مرکز تحقیقات کارآزمایی بالینی طب سنتی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران
[*] **نویسنده مسئول:** فاطمه علیجانی‌ها، استادیار، مرکز تحقیقات کارآزمایی بالینی طب سنتی، دانشگاه شاهد، تهران، ایران. ایمیل: f.alijaniha@shahed.ac.ir

DOI: 10.61186/cmja.13.1.3

تاریخ دریافت: ۱۴۰۱/۰۸/۲۳
تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۰۲/۲۷
واژگان کلیدی:
Cuscuta chinensis L.
فیزیکوشیمیایی
فیتوشیمیایی
استانداردسازی
عصاره آبی

تمامی حقوق نشر برای دانشگاه علوم پزشکی اراک محفوظ است.

چکیده

مقدمه: کشوث *Cuscuta chinensis L* گیاه دارویی پرکاربردی است که داده‌های کمی در مورد استانداردسازی آن وجود دارد. این مطالعه قصد دارد با بررسی مقدماتی بر ویژگیهای فیزیکوشیمیایی و فیتوشیمیایی و ارائه بعضی معیارها جهت استانداردسازی عصاره آبی، به کارایی و ایمنی کاربرد آن در مطالعات کمک کند.

روش کار: در این مطالعه تجربی، گیاه کشوث (جمع آوری شده از استان همدان) عصاره گیری آبی شد و عصاره با دمای کم برای تهیه پودر خشک تغلیظ گردید. برای تعیین خصوصیات ارگانولپتیک از ارزیابی حسی استفاده شد. سپس درصد خاکستر کل، خاکستر نامحلول در اسید و باقیمانده خشک به روش فارماکوپه اندازه گیری شدند. فنل تام و فلاونوئید تام و همچنین محتوای روتین با روش‌های طیف‌سنجی HPLC تعیین مقدار شدند. همچنین تعداد کل میکروبی و وجود پاتوژن های اصلی بررسی شد.

یافته‌ها: عصاره آبی خشک شده کشوث پودری با رنگ قهوه‌ای، بوی گیاهی، خاکستر کل و خاکستر نامحلول در اسید به ترتیب ۲۸/۱۶، ۹/۱ درصد و باقیمانده خشک ۰۵/۷ درصد بود. محتوای فنل کل ۹/۰۲ ± ۵۵/۶۱ میلی گرم گالیک اسید در گرم و فلاونوئید کل ۱/۲ ± ۲۵/۲۷ میلی گرم کاتچین در گرم بود. تعداد کل باکتری‌ها، قارچها و مخمرهای زنده کمتر از 10 cfu/ml بود و نمونه فاقد پاتوژن‌های اصلی مورد بررسی بود.

نتیجه گیری: نتایج این مطالعه داده‌هایی را در مورد برخی از خواص فیزیکوشیمیایی عصاره کشوث ارائه می‌دهد که در منابع دیگر موجود نبود. اما برای دستیابی به معیارهای استانداردسازی دقیق به اطلاعات بیشتری نیاز است که می‌توان از تحقیقات گسترده‌تری به دست آورد.

مقدمه

توجه روز افزون به طب سنتی و گیاه درمانی منجر به افزایش استفاده از داروهای گیاهی گردیده است. استاندارد کردن داروهای گیاهی جهت دستیابی به حداکثر کارایی و ایمنی داروها، از اهمیت زیادی برخوردار است (۱).

کشوث با نام علمی Cuscuta chinensis L. متعلق به خانواده Convolvulacea یا سسیان، گیاهی انگلی است که زندگی مستقل ندارد و روی گیاهان دیگر رشد می‌کند. گونه‌های مختلفی از این گیاه وجود دارد که دو گونه آن به نامهای کشوث و افتیمون در منابع طب سنتی ایران ذکر شده و این دو گونه را از لحاظ گیاهشناسی به ترتیب معادل *C. chinensis* و *C. epithimum* در نظر می‌گیرند. *C. chinensis* یا کشوث در طب سنتی ایران بعنوان ملین، منقی و تقویت کننده جگر و معده و طحال و مفید برای یرقان در نظر گرفته شده است (۲، ۳) این گیاه کاربردهای وسیعی در طب چینی دارد و در آیورودا نیز برای اختلالات عصبی، گوارشی، تنفسی و نیز ایمپوتنس بکار می‌رود. مطالعات بالینی جدید هم خواص آنتی اکسیدان، ضد سرطان، تقویت کبد، آفرودیتیک و ضد التهاب برای آن نشان داده‌اند (۴). همانند سایر داروهای گیاهی، کیفیت مناسب و یکنواخت این دارو در اثربخشی درمانی آن بسیار تعیین کننده است. همچنین کنترل کیفیت بویژه از لحاظ تقلبی نبودن، آلوده نبودن و وجود مقدار کافی از مواد مؤثره برای ایمنی دارو نیز ضروری می‌باشد. مطالعات محدودی در مورد استانداردسازی این داروی گیاهی انجام گرفته و اطلاعات دقیق و کافی درمورد برخی خواص فیزیکوشیمیایی و فیتوشیمیایی عصاره خشک کشوث در دسترس نمی‌باشد.

مطالعه‌ای که در سال ۲۰۱۴ توسط شکرچی و همکاران درمورد ترکیبات فلاونوئیدی کشوث انجام شد از متد HPTLC برای مقایسه فینگرپرینت نمونه‌هایی از کشوث که روی پایه‌های مختلف رشد کرده بودند استفاده کرد. در عصاره هیدروالکلی تهیه شده از گیاه، فلاونوئیدهای عمده شامل hyperoside, rutin, isorhamnetin, kaempferol مقایسه شدند و نتایج نشان داد که میزان فلاونوئیدها در نمونه‌هایی که از پایه‌های مختلف بدست آمده بطور معنی دار متفاوت

Copyright © *2023 The Author(s); Published by Complementary Medicine Journal. This is an open access article, distributed under the terms of the Creative Commons Attribution-NonCommercial 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses /by-nc/4.0/) which permits others to copy and redistribute material just in noncommercial usages, provided the original work is properly cited.*

است و در نهایت پیشنهاد گردیدکه ترکیبی از تعیین مقدار فلاونوئیدهای عمده و انجام فینگر پرینت می‌تواند بعنوان روشی جهت ارزیابی کیفیت نمونه‌های مختلف این گیاه مورد استفاده قرار گیرد (۵). در مطالعه دیگری هم روش فینگر پرینت با HPLC برای شناسایی و تفکیک جنس Cuscuta استفاده شده است (۶). همچنین استفاده از مارکرهای شیمیایی ویژه برای تفکیک تقلبات جنس Cuscuta مورد استفاده قرار گرفته است (۷).

از بررسی مطالعات انجام شده مشخص گردید که اطلاعات دقیق و کافی درمورد خواص فیزیکوشیمیایی و فیتوشیمیایی عصاره خشک کشوث در دسترس نمی‌باشد. از این رو انجام تست‌های تکمیلی و گسترده‌تر برای تعیین مشخصات ضروری به نظر می‌رسد. با بدست آمدن این اطلاعات می‌توان معیارهای کامل‌تری برای ارزیابی و کنترل کیفیت این داروی گیاهی بدست آورد. این مطالعه سعی دارد بعنوان یک بررسی اولیه و با درنظر گرفتن بعضی خواص فیتوشیمیایی و فیزیکوشیمیایی، اطلاعات مناسبی در مورد ویژگیهای این عصاره گیاهی ارائه کند.

روش کار

در این پژوهش که یک مطالعه تجربی و آزمایشگاهی است درمورد گیاه کشوث با نام علمی Cuscuta chinensis Lam. (Convolvulace) انجام گردید. این گیاه پس از تهیه از فروشنده گیاهان دارویی معتبر در تهران (جمع آوری شده ازاطراف همدان)، توسط متخصص گیاهان دارویی در هرباریوم دانشکده داروسازی دانشگاه تهران شناسایی شد و کد هرباریومی (PMP-۱۳۷۶) به آن اختصاص یافت. سپس عصاره گیری انجام شد به این ترتیب که مقادیر مناسبی از گیاه، بعد از شستشو، با ده برابر وزن آن آبجوش به مدت ۲۰ دقیقه دم شد (یعنی در ظرفی با حجم مناسب گیاه با آبجوش مخلوط شده و درب ظرف پوشانده شد) سپس عصاره بوسیله تنظیف پارچه‌ای و سپس کاغذ صافی فیلتر شده با حرارت کمتر از ۷۰ درجه سانتیگراد تغلیظ شد و درنهایت با استفاده از سینی‌هایی با سطوح وسیع و جریان هوا پودرخشک عصاره آبی با راندمان حدود ۱۵٪ تهیه گردید (۸). سپس تستهای مورد نظر به شرح ذیل درمورد آن انجام گرفت.

لازم به ذکر است که مواد شیمیایی و معرف‌های مورد استفاده در این مطالعه، تهیه شده از شرکت Merck می‌باشد.

بررسی ویژگیهای ارگانولپتیک

خواصی چون رنگ، بو و ظاهر فیزیکی با دیدن و بوییدن پودر عصاره آبی کشوث مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به اینکه روش و معیارخاصی برای ارزیابی‌های ارگانولپتیک وجود ندارد، دریافتهای حسی توسط آزمونگر ثبت می‌گردد (۹).

بررسی ویژگیهای فیزیکوشیمیایی

خواصی چون درصد خاکستر تام و خاکستر نامحلول در اسید، باقیمانده خشک عصاره خشک کشوث اندازه گیری شد. برای این منظور از روشهای استاندارد ذکر شده در فارماکوپه استفاده گردید که شرح داده شده است.

خاکستر تام و خاکستر نامحلول در اسید

طبق روش فارماکوپه (۱۰) اندازه گیری گردید. به این ترتیب که مقداری از نمونه آزمایش را که شامل ۲ گرم پودر خشک عصاره کشوث بود، در یک بوته چینی تعیین وزن شده به آرامی سوزانده و به تدریج درجه حرارت را به ۲۵ ± ۶۲۵ درجه افزایش دادیم، تا زمانی که فاقد کربن شود، و وزن خاکستر تعیین گردید.

خاکستر نامحلول در اسید-خاکستر حاصل شده در بخش خاکستر تام را با ۲۵ میلی لیتر از اسید کلریدریک ۳ نرمال شرکت به مدت ۵ دقیقه جوشانده، مواد نامحلول را روی فیلتر بدون خاکستر جمع کرده و با آب داغ شسته، سوزانده و وزن کردیم. درصد خاکستر نامحلول در اسید محاسبه شده از وزن نمونه اولیه تعیین گردید.

باقیمانده خشک

اندازه گیری باقیمانده خشک بر اساس روش فارماکوپه USP انجام شد (۱۱). به این ترتیب که ۲ گرم از پودر عصاره گیاهی را درون ظرف شیشه‌ای درب داری که قبلاً به مدت ۳۰ دقیقه دردمای اتاق و درون دسیکاتور خشک و دقیقاً توزین شده است، قرار دادیم. بعد از ریختن نمونه درون ظرف و بستن درب آن، بوسیله ترازوی کالیبره ۲۱۰۱ Sartorius TEدقیقاً وزن کردیم. باحرکت آرام مواد را درون بطری پخش کرده طوریکه ضخامت حدود ۵ میلی متر بود. بعد از گذاشتن ظرف درون محفظه درب را برداشته و نمونه را در دمای اتاق و به مدت مشخص شده خشک کردیم. به محض باز کردن محفظه درب ظرف را بسته و بعد از رسیدن به دمای اتاق آن را وزن کردیم.

تعیین مقدار فنل و فلاونویید تام

ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی از متابولیت های ثانویه در گیاهان هستند که با داشتن خواص آنتی اکسیدانی نقش مهمی در عملکرد و اثرات بیولوژیک گیاه ایفا می‌کنند. سنجش میزان این ترکیبات می‌تواند معیاری کلی برای ارزیابی اثر بخشی داروی گیاهی باشد.

تعیین مقدار فنل تام

محتوای تام فنلی با استفاده از واکنشگر فولین- سایوکالتو اندازه گیری شد. ابتدا غلظتهای ۲۰۰، ۱۰۰، ۵۰، ۲۵، ۱۲/۵ میکرو گرم برمیلی لیتر از محلول استاندارد گالیک اسید را در آب تهیه شد. سپس غلظتهای ۲۰۰۰، ۱۰۰۰، ۵۰۰ میکروگرم بر میلی لیتر از پودر خشک عصاره آماده گردید. در بالنهای ۱۰ میلی لیتر مقدار ۵ میلی لیتر آب مقطر اضافه کرده سپس از محلولهای استاندارد و نمونه که قبلاً تهیه شده، به مقدار ۱ میلی لیتر به هر بالن افزوده شد. در ادامه مقدار ۰/۵ میلی لیتر معرف فولین- سیوکالتو را هم به نمونه و هم به استاندارد اضافه نموده، محلول‌ها را خوب بهم زده، و بعد از گذشت ۳ دقیقه؛ ۱ میلی لیتر از محلول ۲۰ درصد از کربنات سدیم که قبلاً تهیه شده را به بالنها ۱۰ میلی لیتر واکنش اضافه کرده و بلا فاصله بالنها با آب مقطر به حجم رسانده شد. در انتها بعد از گذشت زمان یک ساعت، جذب تمامی محلول‌های در طول موج ۷۶۵ نانومتر خوانده شد. دستگاه اسپکتروفتومتر (Human crop,Xma-۲۰۰۰)، مورد استفاده و برای هر ازمایش سه تکرار صورت گرفت.

یکی از بالنها حاوی محلول بلانک، شامل ۵ میلی لیتر آب، ۰/۵ میلی لیتر معرف فولین – سیکالتو و ۱ میلی لیتر محلول اشباع سدیم کربنات ۲۰ درصد بود که به حجم ۱۰ میلی لیتر رسید. این محلول بعد از اضافه کردن سدیم کربنات بلافاصله از رنگ زرد معرف فولین سیوکالتو، بی رنگ شد و با این محلول جذب دستگاه صفر گردید. باید توجه داشت

زمانی که معرف فولین رنگ آبی در می‌آید می‌توان جذب را با دستگاه خواند (۱۲).

تعیین مقدار فلاونوئید تام

از عصاره خشک کشوث غلظت‌های ۲۰۰۰،۱۰۰۰ و ۵۰۰ میکروگرم در میلی لیتر در متانول تهیه گردید. از استاندارد روتین غلظتهای ۷۵،۱۵۰،۳۰۰،۶۰۰ و ۱۲۰۰ میکروگرم در میلی لیتر در متانول تهیه شد. برای تهیه محلول بلانک از آب مقطر استفاده گردید. ۵۰ سی سی محلول سدیم نیتریت ($NaNO_2$)۵ درصد در آب مقطر و نیز ۵۰ سی سی محلول آلومینیوم کلرید ($AlCl_3$)۱۰ درصد در آب مقطر تهیه شد. ۱۰۰ سی سی ($NaOH$)۱ مولاردر آب مقطر تهیه گردید. ۱ سی سی از هرکدام از غلظتهای نمونه، استاندارد و بلانک در بالن ژوژه ۱۰ سی سی که محتوی ۴ سی سی آب مقطر بود ریخته شد. ۰/۳ سی سی سدیم نیتریت ۵ درصد به آن اضافه کرده و خوب مخلوط گردید. بعد از ۵ دقیقه به آن ۰.۳ سی سی آلومینیوم کلراید ۱۰ درصد که قبلاً تهیه شده اضافه کرده و خوب مخلوط گردید. بعد از ۶ دقیقه به آن ۲ سی سی سود ۱ مولار اضافه و مخلوط شد و با آب مقطر (۳/۴ میلی لیتر) بالن ژوژه را به حجم ۱۰ سی سی رسانده شد. سپس بعد از گذشت ۱۵ دقیقه جذب مخلوط صورتی رنگ در ۵۱۰ نانومتر خوانده شد. با استفاده از محلول بلانکی تهیه شده جذب دستگاه صفر گردید. لازم به ذکر است که برای هر غلظت سه تکرار (سه بالن ژوژه جداگانه) همزمان قرارداده شده وکل آزمایشات در یک روز انجام گردید (۱۳).

تعیین مقدار فلاونوئیدروتین به روش HPLC

جهت اندازه گیری مقدار روتین، از دستگاه HPLC مدل Knauer متصل شده به ستون ۱۸ Eclipse-XBD-C (5 µm × 6/4 cm × 25 cm) و مجهز به دتکتور UV-Vis Photo Diode Array (PDA)مدل Knauer- UV K2501 و پمپ مدلKnauer - K1001 استفاده گردید. جهت شستشو از فاز متحرک اسید استیک گلاسیال ۱٪ (فاز متحرک A)و متانول (فاز متحرک B) طبق برنامه شستشو مندرج در جدول ۱ با سرعت جریان3/1 ml/min بکار گرفته شد.

برای تهیه محلول استاندارد روتین، ۲۰ میلی گرم پودر استاندارد روتین (≥ 94%)Sigma-Aldrichرا وزن کرده و به بالن ۱۰۰ میلی لیتری انتقال داده شد. مقداری اتانول ۵۰ درصد به بالن افزوده و استاندارد را حل کرده و با آن به حجم رسانده شد. برای تهیه محلول‌های ۴،۲۰،۴۰ و ۱۰۰ ppm از این محلول حجم ۲،۱۰،۲۰ و ۵۰ میلی لیتر برداشته و به بالن ۱۰۰ میلی لیتری انتقال و با اتانول ۵۰ درصد به حجم می‌رسانده شد. و بعد از عبوز از صافی ۰/۴۵ میکرون برای تزریق استفاده گردید. جهت آماده سازی نمونه، ۱۲۵ گرم از پودر عصاره کشوث را درون بالن ۱۰۰ میلی لیتری ریخته و به آن ۵۰ میلی لیتر اتانول ۵۰ درصد اضافه گردید .بالن درون حمام اولتراسونیک قرار داده و به مدت ۱۰ دقیقه اولتراسونیک شد. بعد از گذشت این زمان اجازه داده شد تا نمونه خنک شود. مخلوط حاصل به وسیله اتانول ۵۰ درصد به حجم ۱۰۰ میلی لیتر رسانده و پس از عبور از فیلتر ۰/۴۵ میکرومتر درون ویال های HPLC جمع آوری گردید. درب ویال ها بسته و درون یخچال در دمای ۵ درجه سانتی گراد تا قبل از تزریق به دستگاه قرار گرفت (۱۴).

جدول ۱. برنامه زمانی شستشوی ستون در آنالیز HPLC عصاره کشوث

Time (min)	Mobile Phase A (per cent V/V)	Mobile Phase B (per cent V/V)
0-5	68	32
5-20	68→50	32→50
20-30	50→0	50→100
30-35	0	100

کنترل میکروبی

تعداد کل باکتریهای هوازی زنده و مخمر و کپک‌ها، طبق روش ذکر شده توسط WHO (۱۳) و با دو هدف تعیین تعداد کلی میکروب‌های هوازی زنده و بررسی وجود میکروارگانیسم‌های خاص انجام گرفت. برای آماده سازی ابتدایی، مقدار ۱۰ گرم از پودر عصاره خشک کشوث را به صورت یکنواخت با ۵ گرم پلی سوربات ۲۰ R مخلوط کرده و تا ۴۰ در جه سانتیگراد به مخلوط حرارت داده شد و در حین حرارت دادن در بن ماری آن را بهم زده شد. ۸۵ میلی لیتر لاکتوز براث به آن افزوده شد و تا حدود ۴۰ درجه حرارت داده شد تا اینکه امولسیون شکل بگیرد و PH را در حدود ۷ تنظیم گردید.

تعیین تعداد کلی میکروب‌های هوازی زنده

تحت شرایط استریل، ۱ میلی‌لیتر از نمونه داخل ارلن حاوی Tryptic Soy Broth (TSB) را به لوله آزمایش حاوی ۵ میلی‌لیترمحیط کشت استریل TSB افزوده شد. همچنین 1ml ازآن را در اولین لوله آزمایش از سری لوله‌های رقت سازی ریخته شد. برای رقت سازی تعداد ۶ لوله که هریک حاوی ۹ سی سی TSB بودند از قبل آماده و استریل شده بودند. به همین ترتیب یک سی سی از لوله اول به لوله دوم و بعد از هم زدن، یک سی سی از لوله دوم به لوله سوم وبه همین ترتیب تا به آخر انتقال یافت. به منظور شمارش کلنی‌ها نیاز به تهیه پلیت محیط کشت جامد بود که به ازای هر لوله رقت سازی شده، ۴ عدد پلیت که دو تا حاوی Caso Agar (TSA) برای باکتریها و دو تا حاوی Sabourad Dextrose Agar (SDA) برای قارچها باشند در نظر گرفته شد و محیط کشت‌های لازم استریل و درون ارلن آماده گردید. از هریک از لوله‌های رقت سازی شده، یک میلی‌لیترنمونه در هریک از پلیت‌های استریل ریخته و سپس محیط کشت‌های ذوب شده استریل را که دمای آن تاحدودی پایین آمده و از ۴۵ درجه سانتی‌گراد تجاوز نکند، درون پلیت‌های مربوطه ریخته شد و با حرکت دورانی مخلوط گردید. بعد از سرد شدن و جامد شدن محیط کشت‌ها آن‌ها را به طور وارونه در انکوباتور قرار داده شد. پلیت‌های TSA در انکوباتور C۳۶° و پلیت‌های SDA در C۲۵° قرار گرفتند. شمارش کلنی‌های حاصل در پلیت‌های TSA بعد از ۲۴ ساعت و در مورد پلیت‌های SDA بعد از ۷۲ ساعت انجام شد (۱۵).

یافته‌ها

ویژگیهای ارگانولپتیک عصاره آبی خشک کشوث بصورت رنگ قهوه‌ای، بوی گیاهی و قوام چسبناک بودند.

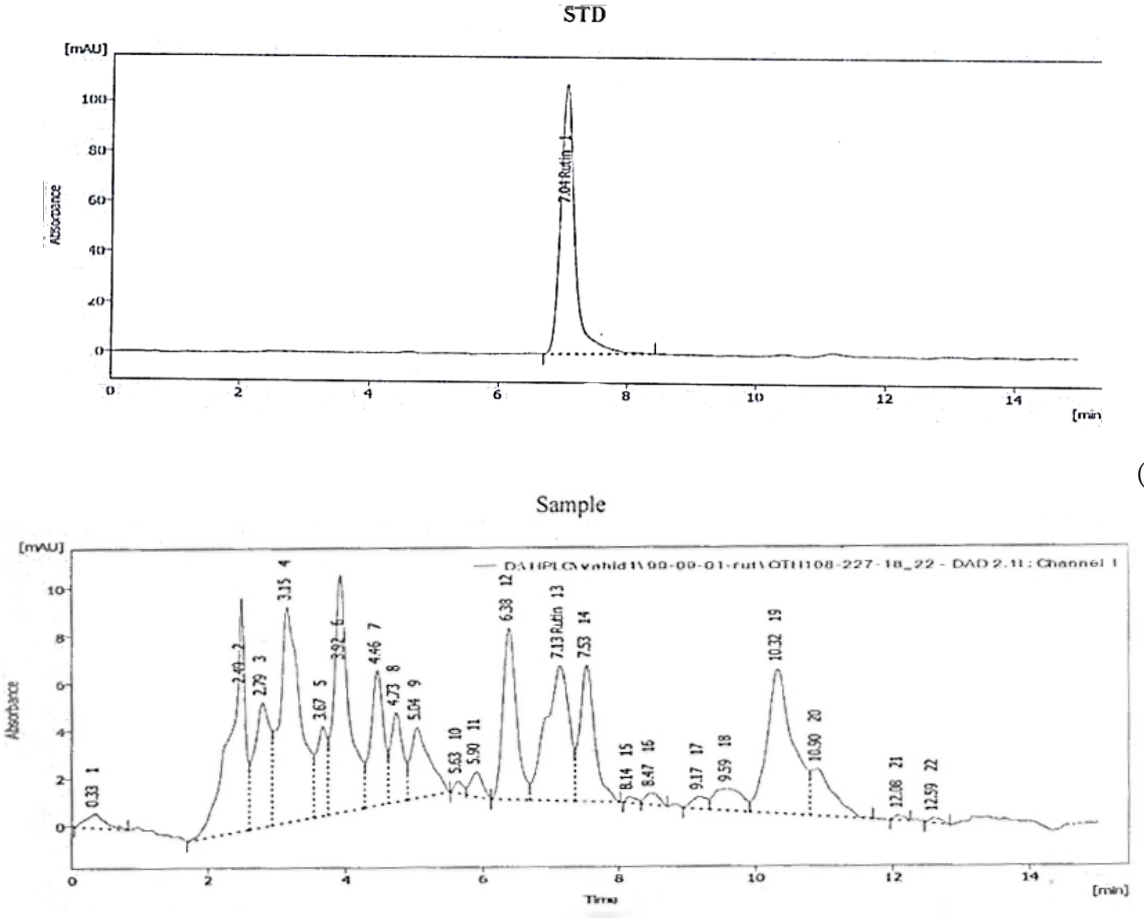
ویژگیهای فیزیکوشیمیایی

جدول ۲. ویژگیهای فیزیکوشیمیایی عصاره آبی خشک کشوث

نام آزمون	نتایج آزمون	مرجع
خاکستر تام	w/w٪ ۱۶/۲۸	USP 40/۵۶۱
خاکستر نامحلول در اسید	w/w٪۱/۹	USP 40/۵۶۱
کاهش وزن در خشک شدن	w/w٪۷/۰۵	USP 40/۵۶۱

جدول ۳. میانگین مقادیر تام ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی اندازه گیری شده در عصاره آبی خشک کشوث

روش و نام آزمون	نتایج آزمون
محتوای فنلی تام (معادل گالیک اسید)	mg Gallic acid/g،۹/۰۲ ±۵۵/۶۱
محتوای فلاونوئید تام (معادل روتین)	mg Rutin /g،۱/۲± ۲۷/۲۵



(A)

(B)

شکل ۱. کروماتوگرام حاصل از HPLC-DAD: (A) استاندارد روتین؛ (B) عصارهٔ آبی کشوث در طول موج 350 nm

نتایج حاصل ازتستهای انجام شده در جدول۲ خلاصه شده است.

نتایج تعیین مقدارفنل و فلاونویید تام

مقادیرتام ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی سنجیده شده درنمونه عصاره آبی خشک کشوث در جدول ۳ آمده است.

نتایج تعیین مقدار فلاونوئید روتین به روش HPLC

کروماتوگرام حاصل از HPLC استاندارد روتین در شکل ۱ نمایش داده شده است.

مقدار روتین در عصاره کشوث با استفاده از سطح زیر منحنی در کروماتوگرام حاصل از HPLC استاندارد روتین و عصاره و تطابق آن با مقدار غلظت روتین در محلول آماده سازی شده قابل اندازه گیری می باشد.

با در نظر گرفتن وزن اولیه مورد نظر از عصاره جهت محلول سازی مقدار روتین در عصاره اندازه گیری می‌شود.

$$\frac{A_1 \times m_2 \times p \times 5}{A_2 \times m_1}$$

سطح زیر پیک روتین در کروماتوگرام نمونه = $A1$
سطح زیر پیک روتین در کروماتوگرام رفرنس استاندارد = $A2$
جرم نمونه مورد آزمایش بر حسب گرم = $m1$
جرم رفرنس استاندارد مورد آزمایش بر حسب گرم = $m2$
درصد خلوص روتین = p

با استفاده از فرمول فوق مقدار فلاونوئید روتین به میزان ۳/۸۵ mg/g تعیین گردید.

نتایج کنترل میکربی

نتایج آزمایشات انجام شده در جدول ۴ خلاصه شده است:

جدول ۴. نتایج تستهای میکربی عصاره آبی خشک کشوث

Method & Test name	Reference Test	Specifications	Test Results	Unit
Total Plate Count	USP 40	Max 10^5	<10	cfu/gr
Total yeast & Mold Count	USP 40	Max 10^3	<10	cfu/gr
E. coli	USP 40	Negative	Negative	cfu/gr
Salmonella spp.	USP 40	Negative	Negative	cfu/gr

بحث

با بهره گیری از یافته‌های این پژوهش ویژگیهای ارگانولپتیک و بعضی از خواص فیزیکوشیمیایی عصاره آبی خشک شده کشوث تعیین شد. پودر عصاره آبی کشوث به رنگ قهوه‌ای و دارای بوی خاص گیاهی بود که میزان خاکستر تام و خاکستر نا محلول در اسید آن به ترتیب ۱۶/۲۸ و ۱/۹ درصد سنجیده شد. میزان کاهش وزن بعد از خشک شدن عصاره آبی خشک کشوث ۷/۰۵ درصد بود. در مورد میزان خاکسترها و رطوبت عصاره خشک کشوث گزارشی در مقالات یا فارماکوپه گیاهی یافت نشد. در مورد میزان خاکستر خود گیاه گزارشهای اندکی وجود داشت از جمله مطالعه‌ای که میزان خاکستر تام دانه‌های کشوث را ۸/۲ در صد تعیین کرده بود (۱۶). با وجود تفاوتی که در اثر عصاره گیری ممکن است ایجاد گردد، ولی می‌توان گفت که مقدار خاکستر تام اندازه گیری شده در این مطالعه با گزارش مذکور نزدیک می‌باشد.

میزان فنل تام در این مطالعه ۹/۰۲± ۵۵/۶۱ میلی گرم بر گرم برحسب گالیک اسید بدست آمد، در مطالعه دیگری میزان فنل تام عصاره‌های هیدروالکلی و کلرفرمی از گیاه کشوث به ترتیب ۴/۱۱ ±۵۶/۰۸ و ۰/۸۶ ± ۱۰/۶۴ میلی گرم بر گرم گزارش شده است که با توجه به عصاره گیری آبی در مطالعه ما، مقادیر فنل تام خیلی مشابه مقادیر حاصل از عصاره هیدروالکلی در مطالعه مزبور است (۱۷).

در مورد مقادیر فلاونوئیدهای موجود در گیاه گزارشات مختلفی وجود دارد از جمله در مطالعه‌ای که روشهای مختلف عصاره گیری را مقایسه کرده، میزان فلاونوئید روتین در C. chinensis را حدود ۳۰ تا ۴۲ میکروگرم بر میلی لیتر گزارش نموده است (۱۸). مطالعه دیگری که با هدف تعیین مقدار فلاونوئیدهای اصلی در گیاه کشوث با پایه‌های مختلف انجام شد و چهار فلاونوئید عمده را در نه نمونه مختلف از گیاه کشوث با پایه‌های مختلف اندازه گیری نمود نشان داد که مقادیر فلاونوئید روتین در این نمونه‌ها در محدود ۳/۶۱ تا ۹/۴۲ میلی گرم بر گرم متغیر بوده است (۵). این نتایج تقریباً با میزان بدست آمده در مطالعه ما هماهنگ است و می‌توان گفت با توجه به تنوع پایه‌های گیاهی که میزبان کشوث هستند مقادیر فلاونوئیدهای کشوث محدوده نسبتاً وسیعی دارد. در مطالعه دیگری میزان فلاونوئید استخراج شده از کشوث ۱۸/۷۵ میلی گرم بر گرم گزارش شده است البته برای دستیابی به این بازده از روش ویژه‌ای توام با آنزیم استفاده گردیده است (۱۹). همچنین مطالعه دیگری با بهره گیری از HPLC-ESI-MS/MS بعنوان یک روش انتخابی و حساس، شانزده ترکیب فعال گیاه کشوث را اندازه گیری کرده و میزان فنل تام و فلاونوئید تام را گزارش نمود. این مقادیر که بر اساس استانداردهای داخلی گالیک اسید و کاتشین سنجیده شدند به ترتیب در محدوده تقریبی ۱۰۲۲۶۳-۷۴۶ و ۶۹۷۴۹-۴۹۰۲ نانوگرم بر گرم گزارش شده‌اند که نشان دهنده تفاوت مقادیر ترکیبات فعال در نمونه‌های مختلف گیاه کشوث جمع آوری شده از نواحی مختلف می‌باشد (۲۰, ۲۱).

پس به نظر می‌رسد نوع حلال نیز در میزان فلاونوئید مورد سنجش اثر عمده داشته باشد و یک نوع عصاره گیری خاص باید برای استاندارد کردن در نظر گرفته شود. با وجود تفاوت در میزان انواع فلاونوئیدها در کشوث هایی با پایه‌های مختلف، می‌توان با در نظر گرفتن چند فلاونوئید عمده و با روشی مثل فینگر پرینت، به نتایج دقیق‌تری در راستای تشخیص هویت و استانداردسازی عصاره کشوث دست یافت (۵). در مجموع می‌توان گفت جمع آوری اطلاعات بیشتر در مورد خواص فیتو شیمیایی و فیزیکوشیمیایی عصاره کشوث می‌تواند به انتخاب معیارهای دقیق‌تر برای استانداردسازی این عصاره گیاهی کمک کند.

نتیجه‌گیری

از آنجا که معیارهای استاندارد کامل و دقیقی برای کنترل کیفیت اغلب گیاهان دارویی ایرانی از جمله کشوث موجود نمی‌باشد نمی‌توان ارزیابی کاملی در مورد کیفیت عصاره تهیه شده از آن انجام داد. در این مطالعه با در نظر گرفتن بعضی از خواص تعیین شده، از جمله کنترل میکربی می‌توان گفت که نمونه مورد بررسی در حد قابل قبول می‌باشد. نتایج این مطالعه اطلاعاتی در زمینه بعضی ویژگیهای فیزیکوشیمیایی و فیتوشیمیایی عصاره آبی کشوث در اختیار می‌گذارد هرچند برای دستیابی به معیارهای دقیق استانداردسازی نیاز به اطلاعات بیشتری است که از پژوهش‌های گسترده‌تر حاصل خواهد شد.

محدودیت‌های مطالعه

استفاده از نمونه گیاهی یک منطقه، از محدودیت‌های این مطالعه است. پیشنهاد می‌شود که بررسی جامعی از خواص فیزیکوشیمیایی و فیتوشیمیایی نمونه‌های کشوث مناطق مختلف کشور و با میزبان‌های مختلف انجام و نتایج بصورت معیارهایی با محدوده مشخص تنظیم گردد تا بتواند برای ارزیابی استاندارد بودن عصاره کشوث مورد استفاده در داروسازی مورد بهره برداری قرار گیرد.

ملاحظات اخلاقی

این مطالعه جهت تکمیل پایان نامه دستیاری خانم دکتر زهرا شریفان در دانشکده طب ایرانی دانشگاه شاهد با کد اخلاق IR.SHAHED>REC.1399.039 و توسط مرکز تحقیقات کارآزمایی بالینی طب سنتی دانشگاه شاهد انجام گرفته است.

References

1. Bijauliya RK, Alok S, Kumar M. A comprehensive review on standardization of herbal drugs. *Int J Pharm Sci Res*. 2017;**8**(9):3663-3677.
2. Shah B, Seth A. New York: Elsevier; Textbook of Pharmacognosy and Phytochemistry2010. 319-321 p.
3. Dermani FK, Saidijam M, Najafi R, Moradkhani S, Mohammadzaheri Z, Beiranvand N. Cytotoxic effects of hydroalcoholic extract of Cuscuta chinensis on PC3 and MCF7 cancer cell lines. *Avicenna J Phytomed*. 2021;**11**(3):258.
4. Donnapee S, Li J, Yang X, Ge AH, Donkor PO, Gao XM, et al. Cuscuta chinensis Lam.: A systematic review on ethnopharmacology, phytochemistry and pharmacology of an important traditional herbal medicine. *J Ethnopharmacol*. 2014;**157**:292-308. **doi:** 10.1016/j.jep.2014.09.032 **pmid:** 25281912
5. Shekarchi M, Kondori BM, Hajimehdipoor H, Abdi L, Naseri M, Pourfarzib M. Finger printing and quantitative analysis of Cuscuta chinensis flavonoid contents from different hosts by RP-HPLC. *Food Nutrition Sci*. 2014;**5**:914-921. **doi:** 10.4236/fns.2014.510101
6. Liang HT, Xiao PT, Jiang ZM, Wang JW, Liu EH. Spectrum-Effect Relationships Between High-Performance Liquid Chromatography Fingerprints and Hepatoprotective Activities of Cuscutae Semen. *J AOAC Int*. 2022;**105**(5):1447-1459. **doi:** 10.1093/jaoacint/qsac043 **pmid:** 35466362
7. Park I, Yang S, Choi G, Moon BC, Song JH. An Integrated Approach for Efficient and Accurate Medicinal Cuscutae Semen Identification. *Plants (Basel)*. 2020;**9**(11). **doi:** 10.3390/plants9111410 **pmid:** 33105814
8. Alijaniha F, Naseri M, Afsharypuor S, Fallahi F, Noorbala A, Mosaddegh M, et al. Heart palpitation relief with Melissa officinalis leaf extract: double blind, randomized, placebo controlled trial of efficacy and safety. *J Ethnopharmacol*. 2015;**164**:378-384. **doi:** 10.1016/j.jep.2015.02.007 **pmid:** 25680840
9. Saripalla DD, Khokhani ND, Kamath A, Rai RP, Nayak S. Organoleptic and physicochemical properties of natural-based herbal shampoo formulations with Cyclea peltata as a key ingredient. *J Cosmet Dermatol*. 2022;**21**(4):1666-1674. **doi:** 10.1111/jocd.14269 **pmid:** 34085368
10. USP pharmacopeae. 40 th edition. Articles of botanical origin. 561 p.
11. Articles of botanical origin. In: United States Pharmacopeia.40 th ed2017.
12. USP pharmacopeae. 40 th edition. LOSS ON DRYING. 731 p.
13. Lamuela-Raventós RM. Folin-Ciocalteu method for the measurement of total phenolic content and antioxidant capacity. Measurement of antioxidant activity & capacity: recent trends and applications. 2018 **11**:107-115. **doi:** 10.1002/9781119135388.ch6
14. Kainama H, Fatmawati S, Santoso M, Papilaya PM, Ersam T. The relationship of free radical scavenging and total phenolic and flavonoid contents of Garcinia lasoar PAM. *Pharma Chemist J*. 2020;**53**:1151-1157. **doi:** 10.1007/s11094-020-02139-5
15. Dat NT, Hanh NT, Thu DT, Thuy CT, Nuong HT. Determination of rutin content in sophora japonia L. Extracts used as raw material in supplements by high performance liquid chromatography. *Vietnam J Food Control*. 201910;**2**(3):51-55. **doi:** 10.47866/2615-9252/vjfc.80
16. WHO. Guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and redidues. WHO library Catalogue-in-Publication Data.2007.
17. Roohaninasab M, Mojtabaee M, Livani F, Heidari N, Alizadeh N, Khosravi S, et al. Beneficial esthetic lightening effects of Cuscuta extract on skin darkness in healthy individuals: A clinical trial study. *J Family Med Prim Care*. 2022;**11**(11):6890-6895. **doi:** 10.4103/jfmpc.jfmpc_783_22 **pmid:** 36993036
18. Jafarian AB, Ghannadi A, Mohebi B. Cytotoxic effects of chloroform and hydroalcoholic extracts of aerial parts of Cuscuta chinensis and Cuscuta epithymum on Hela, HT29 and MDA-MB-468 tumor cells. *Res Pharma Sci*. 2014;**9**(2):115.
19. Hajimehdipoor H, Kondori BM, Amin GR, Adib N, Rastegar H, Shekarchi M. Development of a validated HPLC method for the simultaneous determination of flavonoids in Cuscuta chinensis Lam. by ultra-violet detection. *Daru*. 2012;**20**(1):57. **doi:** 10.1186/2008-2231-20-57 **pmid:** 23352257
20. Wei YQ, Sun MM, Fang HY. Dienzyme-assisted salting-out extraction of flavonoids from the seeds of Cuscuta chinensis Lam. *Indust Crop Products*. 2019;**127**:232-236. **doi:** 10.1016/j.indcrop.2018.10.068
21. Du KZ, Li J, Guo X, Li Y, Chang YX. Quantitative Analysis of Phenolic Acids and Flavonoids in Cuscuta chinensis Lam. by Synchronous Ultrasonic-Assisted Extraction with Response Surface Methodology. *J Anal Methods Chem*. 2018;**2018**:6796720. **doi:** 10.1155/2018/6796720 **pmid:** 30671278