Archive of SID

بررسی اثرات ضد دردی فراکسیونهای برگ گیاه آویشن شیرازی (*Zataria multiflora*) بر روی موش

*دکتر محمد رمضانی ، دکترحسین حسین زاده و دکتر شکوفه سمیع زاده

*بخش بیوتکنولوژی و فارماکوگنوزی دانشکده داروسازی و مرکز تحقیقات علوم دارویی پژوهشکده بوعلی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

خلاصه

هدف از این مطالعه بررسی اثر ضد دردی فراکسیونهای برگ گیاه آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Boiss.) و امکان جداسازی این ترکیبات بود. برگ گیاه توسط دستگاه سوکسله با متانول، عصاره گیری شد و سپس آزمایشات فیتوشیمیایی بر روی عصاره صورت گرفت. نتایج این آزمایشات نشان دهنده حضور آلکالوئید (+++) و فلاونوئید (++++) بود. سپس اندام هوایی پودر شده گیاه با مخلوط متانول – کلروفرم (۱:۱) خیسانده و عصاره گیری شد. عصاره مزبور در مخلوط متانول و آب (۹:۱) به صورت سوسپانسیون در آمده و با n- هگزان استخراج شد. فراکسیون متانول-آب مجدداً در مخلوط متانول- آب (۳:۲) حل شده و با کلروفرم استخراج شد. فراکسیون متانول-آب به دست آمده بر روی ستون کروماتوگرافی حاوی سیلیکاژل جداسازی گردید و در نهایت ۶ فراکسیون از ستون به دست آمد. کلیه فراکسیونهای به دست آمده از نظر خاصیت ضد دردی به روش آزمون صفحه داغ و پیچش مورد بررسی قرار گرفتند.

همچنین تاثیر نالوکسان بر اثر ضددردی عصاره متانول-آب (۳:۲) نیز مورد بررسی قرار گرفت. در این مطالعه در هر دو روش صفحه داغ و پیچش، اثر ضد دردی مشاهده شد که این اثر وابسته به دوز بود.

عصاره متانول-آب (۹:۱)حدود ۹۰٪ اثر ضد دردی داشت که نزدیک به اثر ضد دردی مرفین mg/kg ۱۰ بود. همچنین مشاهده شد که نالوکسان قادر به مهار اثر ضد دردی عصاره و مرفین در روش صفحه داغ می باشد ولی در روش پیچش، نالوکسان نتوانست به طور کامل اثر ضد دردی عصاره را مهار کند. در ادامه فراکسیونی کردن عصاره فوق، فراکسیون متانول -آب (۹:۱) و فراکسیون متانول-آب (۳:۲) و سه فراکسیون حاصل از کروماتوگرافی ستونی دارای اثرات ضد دردی قابل مقایسه با مرفین بودند. جداسازی و شناسایی ساختمانی ماده یا مواد ضددرد در حال انجام است.

کلمات کلیدی: آویشن شیرازی، فیتوشیمی، روش صفحه داغ، روش پیچش

مقدمه

آویشن شیرازی (*Zataria multiflora* Boiss.) با نامهای محلی آویشن برگ پهن، آبشم، پونه بوی، آویشم،آویشن، پونه کوهی و پودینه صحرایی از گیاهان متعلق به تیره نعناع می باشد. این گیاه پراکندگی محدودی درجهان دارد و منحصراً در ایران، افغانستان وپاکستان می روید (۲). در طب سنتی گیاه آویشن شیرازی به عنوان ضدعفونی کننده و بادشکن مورد استفاده قرار می گیرد.

دم کرده این گیاه برای تسکین درد زایمان زودرس و درد شکستگی به کارمی رود (۲).

اثرات ضددردی و ضد التهابی مناسبی از عصاره تام الکلی و آبی این گیاه در موش گزارش شده است (۵). به این جهت در این تحقیق فراکسیونهای دخیل در اثر ضد دردی مورد بررسی قرار گرفت.

مواد و روش کار

موشهای کوچك آزمایشگاهی سفید با وزن ۳۲-۲۵ گرم مورد استفاده قرار گرفت. حیوانات در شرایط دمایی۲۵-۲۲ درجه سانتی گراد و در موقعیت نوری ۱۲ ساعت تاریك و ۱۲

www.SID.ir

Archive of SID

ساعت روشن مناسب، قرار داشتند. حیوانات از نظر رژیم غذایی و آب محدویت نداشتند.

جمع آوری و خشک کردن گیاه

گیاه آویشن شیرازی در تاریخ ۷۸/۳/۷ از کوههای اطراف طبس جمع آوری و درسایه خشك و سپس پودر گردید. یك نمونه سالم از گیاه خشك و سپس توسط کارشناس بخش گیاهشناسی دانشگاه فردوسی مشهد، مورد تأئید قرار گرفت (شماره نمونه هرباریوم دانشکده داروسازی مشهد ۲۱-۲۶۱۳ - ۱۵۳).

عصاره گیری برگ گیاه آویشن شیرازی به روش سوکسله

جهت عصاره گیری به روش سوکسله ۶۰ گرم پودر را درکارتوش کاغذی ریخته، سپس ۲۰۰ میلی لیتر متانول به عنوان حلال روی آن اضافه شد. پس از نصب و تنظیم دما به مدت ۱۲ ساعت عمل عصاره گیری انجام گرفت. وزن عصاره تغلیظ شده حاصل از این روش ۱۳ گرم بود.

بررسی فیتو شیمیایی مقدماتی گیاه آویشن شیرازی

این آزمایشات بر روی عصاره تام گیاه حاصل از روش سوکسله جهت بررسی حضور انواع متابولیت های ثانویه در گیاه انجام گرفت. توسط این آزمایشات ترکیبات آلکالوئید، فلاونوئید، تانن و ساپونین در گیاه ردیابی شد. ترکیب و حضور ماده با علامت مثبت از ۱ الی ۴ گزارش می گردد.

عصاره گیری به روش خیساندن

قبل از عصاره گیری به روش خیساندن، عمل حذف چربی از پودر گیاهی انجام شد. عمل حذف چربی بوسیله اتر دوپترول و با استفاده از دستگاه سوکسله انجام شد. پس از خشك شدن کامل گیاه، پودر چربی گیری شده را به داخل ارلن منتقل کرده سپس از مخلوط متانول و کلروفرم (۱:۱) به ظرف محتوی پودر اضافه شد. بعد از ۴۸ ساعت همزدن به طور متناوب ، عمل صاف کردن و حذف حلال با استفاده از دستگاه تقطیر در خلاء انجام گرفت. عصاره تغلیظ شده از بالن به پلیت های تمیز منتقل و روی بن ماری با حرارت $40^{\circ}C$ قرار داده شد. بعد از ۱۲ ساعت عصاره خشك شده بدست آمد. مقدار عصاره به دست آمده ۱۳ گرم بود. در تهیه عصاره متانول - کلروفرمی جهت آزمایشات ضد دردی، به منظور افزایش حلالیت از توئین به عنوان کمك حلال استفاده شد.

مطالعه سمیت حاد عصاره الکلی - کلروفرمی

هدف از مطالعه سمیت حاد تعیین محدوده دوز سمی عصاره الکلی - کلروفرمی برگ گیاه آویشن شیرازی بود. برای عصاره الکلی - کلروفرمی، دوز پایه، دوز ۱۵ /۰ g/kg به علت عدم مرگ و میر در نظر گرفته شد وسپس دوز پایه درعدد ۲ ضرب گردید و ۶ سطح دوز شامل ۰/۳، ۰/۶، ۱/۲، ۲/۴، ۴/۸ و ۹/۶ گرم بر کیلوگرم به دست آمد. دوزها به صورت داخل صفاقی به ۴ موش تزریق و بعد از ۲۴ ساعت تعداد مرگ ومیر، مشاهده و ثبت شد. از نرمال سالین ۱۰ ml/kg با اضافه چند قطره توئین۸۰ به عنوان شاهد منفی استفاده شد.

مطالعه اثر ضددردی فراکسیونها وعصاره آویشن شیرازی به روش صفحه داغ

بررسی اثر ضددردی به روش صفحه داغ از طریق تجویز داخل صفاقی انجام شد. از صفحه داغ با درجه حرارت $55 \pm 1^{\circ}C$ و زمان ختم عمل ۴۰ ثانیه استفاده شد.

طبق نتایج بدست آمده از آزمایشات مطالعه سمیت حاد، از سه سطح دوز از عصاره شامل ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۸ گرم بر کیلوگرم و یك کنترل مثبت مرفین با دوز ۱۰ mg/kg و حامل (نرمال سالین+ چند قطره توئین) به عنوان کنترل منفی استفاده شد.

موشها پس از توزین به ۵ گروه ۸ تایی تقسیم شده و زمان عکس العمل آنها قبل از تزریق، نسبت به محرك حرارتی اندازه گیری و ثبت شد. بعد از تزریق داخل صفاقی عصاره ها، پاسخ موشها نسبت به صفحه داغ به ترتیب در زمانهای ۰، ۳۰، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه بعد از تجویز اندازه گیری و ثبت شد.

مطالعه اثر ضددردی عصاره ها و فراکسیونهای گیاه آویشن شیرازی به روش آزمون پیچش

در این آزمایش از اسید استیك با غلظت (v/v) ۰/۷٪ به عنوان ماده محرك دردزای شیمیایی استفاده شد. ابتدا موشها به

www.SID.ir

Archive of SID

طور تصادفی انتخاب و به ۵ گروه ۸ تایی تقسیم شدند. به ترتیب دوزهای ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۸ گرم بر کیلوگرم از فراکسیون و مرفین mg/kg ۱۰ و نرمال سالین ml/kg ۱۰ + توئین از راه داخل صفاقی به آنها تزریق شد. بعد از نیم ساعت ml/kg ۱۰ از محلول تهیه شده از اسید استیک (۰/۷٪)، به صورت داخل صفاقی تزریق گردید. ۵ دقیقه بعد هرموش به یك بشر ۲ لیتری منتقل شده و تعداد پیچش به مدت ۳۰ دقیقه ثبت گردید.

جداسازی عصاره متانول – کلروفرمی

فازکلروفرمی – متانولی حاصل از عصاره گیری به روش خیساندن (۱۳g) در آب – متانول (۱:۹) حل و با n–هگزان توسط قیف دکانتور استخراج شد. فازهای حاصله در پلیت ریخته و خشك شد. مقدار عصاره آب – متانول (۱:۹)، ۹ گرم و عصاره – n هگزان، ۳/۵ گرم بود. عصاره ها برای بررسی اثر ضد دردی به موش تزریق شدند.

جداسازی عصاره آب – متانولی (۱:۹)

به علت قدرت اثر بیشتر عصاره آب – متانولی و همچنین بیشتر بودن وزن این عصاره نسبت به عصاره– n هگزان، این عصاره دوباره تفکیك شد. در این جداسازی ابتدا عصاره آب – متانولی در حلال آب و متانول (۲:۳) پراکنده شد و سپس توسط کلروفرم استخراج گردید. عصاره های حاصل از جداسازی حذف حلال و خشك شدند. میزان عصاره کلروفرمی ۲/۵ گرم و عصاره آب – متانول (۲:۳) ۴/۸۴ گرم بود.

مطالعه تأثیر نالوکسان بر اثر ضددردی عصاره آب – متانولی (۲:۳) به روش آزمون پیچش و صفحه داغ

در این مطالعه به گروههای مختلف موشها ابتدا نالوکسان با دوز mg/kg ۲ با حجم تزریقی ml ۰/۲۵ به صورت زیر جلدی در پشت گردن تزریق شد. بعد از ۲۰ دقیقه عصاره ها به روش داخل صفاقی با دوزهای ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۸ گرم بر کیلوگرم و مرفین با دوز mg/kg ۱۰ تجویز شد. در روش آزمون پیچش بعد از نیم ساعت دوز ml/kg ۱۰ محلول اسید استیك (۰/۷٪) به صورت داخل صفاقی تزریق گردید، ۵ دقیقه بعد تعداد پیچشها به مدت نیم ساعت ثبت گردید. در روش صفحه داغ، زمان پاسخ به محرك حرارتی (صفحه داغ با حرارت $55 \pm 1^{\circ}C$) در زمان ۰ و ۳۰ و ۶۰ و ۱۲۰ دقیقه اندازه گیری شد. در ضمن هر ۴۰ تا ۴۵ دقیقه یك بار نالوکسان به روش زیر جلدی، تجدید دوز گردید.

کروماتوگرافی ستونی فاز آب – متانولی (۲:۳)

مقدار ۴/۸۴ گرم از عصاره آب – متانول(۲:۳) به ستون حاوی سیلیکاژل (mesh: ۷۰–۲۳۰) افزوده شد و سپس ستون، با مخلوطی از حلالهای مختلف شامل اتردوپترول : کلروفرم : متانول با نسبت های متفاوت شسته شد و فراکسیونهای ۵۰ میلی لیتری جمع آوری گردید. سپس فراکسیونهای مشابه از نظر TLC (حلال متانول : کلروفرم) مخلوط و درنهایت ۶ فراکسیون به دست آمد. تمام فراکسیونها مورد ارزیابی اثر ضددردی به روش پیچش قرار گرفتند.

محاسبات آماری

جهت تعیین LD_{50} از برنامه رایانه ای (PHARMACOL-PC VerH) LD_{50} استفاده شد و داده ها به صورت LD_{50} و محدوده اطمینان (CL) گزارش شد. جهت انجام بقیه محاسبات آماری از برنامه نرم افزاری Instat استفاده گردید. ابتدا داده های خام به کامپیوتر داده شد و آزمون ANOVA روی آن انجام گرفت. چنانچه طبق آزمون Bartlet اختلاف معنی داری بین انحراف استانداردها وجود نداشت با استفاده از آزمون Tukey – Kramer آنالیز انجام می شد. برای رسم نمودارها از برنامه نرم افزاری Sigmaplot 50 استفاده شد.

نتایج

آزمایشات فیتوشیمیایی مقدماتی

میزان متابولیتهای ثانویه اندازه گیری شده در عصاره گیاه به صورت آلکالوئید ۳ مثبت، تانن منفی، ساپونین منفی و فلاونوئید ۴ مثبت مشاهده شد.

تعیین LD_{50}

با توجه به عدم ایجاد مرگ و میر با دوز g/kg ۰/۱۵ به مدت ۲۴ ساعت در ۴ موش، این دوز بعنوان دوز پایه انتخاب

www.SID.ir

Archive of SID

گردید و دوزهای ۰/۳، ۰/۶، ۱/۲، ۲/۴، ۴/۸۵ و ۹/۶ گرم بر کیلوگرم و نرمال سالین + توئین به عنوان کنترل منفی به میزان ml/kg ۱۰ به گروههای ۴ تایی از موشها تزریق شد و میزان مرگ و میر به مدت ۲۴ ساعت ارزیابی و ثبت گردید.

LD_{50} محدوده دوز سمی عصاره متانول – کلروفرمی گیاه آویشن شیرازی طی ۲۴ ساعت پس از تجویز عصاره ها برابر g/kg ۲/۴ به دست آمد.

بررسی اثر ضددردی عصاره متانول – کلروفرمی به روش صفحه داغ

تجویز داخل صفاقی عصاره فوق به موش سفید کوچک نشان داد که سی دقیقه بعد از تزریق تمامی حجم های عصاره (۰/۱، ۰/۲و ۰/۸ گرم بر کیلوگرم) و مرفین (mg/kg,ip۱۰) نسبت به کنترل منفی، تفاوت معنی دار نشان دادند. در این آزمایش حداکثر اثر ضد دردی در زمان ۶۰ دقیقه ظاهر شد و تا زمان ۱۲۰ دقیقه ($P<0/001$) ادامه داشت (شکل ۱).

بررسی اثر ضددردی عصاره متانول – کلروفرمی به روش پیچش

تجویز داخل صفاقی عصاره فوق به موش سفید کوچک نشان داد که تمامی حجم های عصاره (۰/۱، ۰/۲و ۰/۸ گرم بر کیلوگرم) و مرفین (mg/kg,ip ۱۰) نسبت به گروه کنترل منفی تفاوت معنی دار نشان دادند ($P < 0/001$). عصاره g/kg ۰/۸ تعداد پیچشها را حدود ۸۵ ٪ و مرفین حدود ۹۰٪ کاهش داد. اثر عصاره g/kg ۰/۸ تقریباً نزدیک به مرفین است (شکل ۲). دیکلوفناک پیچشها را حدود ۶۰ ٪ کاهش داد بنابراین اثر ضددردی عصاره بیشتر از دیکلوفناک (mg/kg۱۰) بود.

بررسی اثر ضددردی عصاره آب – متانولی (۱:۹) به روش پیچش

در این آزمایش تمامی حجم های عصاره (۰/۱، ۰/۲و ۰/۸ گرم بر کیلوگرم به صورت داخل صفاقی) نسبت به کنترل منفی کاهش معنی داری را در تعداد پیچش ها در حد مرفین (mg/kg,ip ۱۰) نشان دادند. اثر ضد دردی تمامی حجم های عصاره از دیکلوفناک (mg/kg,ip ۱۰) بیشتر بود (شکل ۳).

بررسی اثر ضددردی عصاره n– هگزان به روش پیچش

بررسی نتایج این آزمایش نشان داد که تمامی حجم های عصاره نسبت به کنترل منفی تعداد پیچشها را کاهش دادند (عصاره g/kg ۰/۸ ، حدود ۷۰٪) ولی نسبت به مرفین (mg/kg,ip۱۰) که تعداد پیچشها را حدود ۹۵٪ کاهش داد، این کاهش معنی دار نبود. همچنین اثر ضددردی حجم های عصاره تقریباً با دیکلوفناک (mg/kg,ip ۱۰) برابر بود (شکل۴).

بررسی اثر ضد دردی عصاره آب– متانولی (۲:۳) به روش پیچش

تجویز داخل صفاقی عصاره آب–متانولی (۲:۳) در محدوده دوزهای ۰/۱، ۰/۲و ۰/۸ گرم بر کیلوگرم همانند مرفین (mg/kg,ip ۱۰) تعداد پیچشها را حدود ۹۰٪ کاهش داد. اثر ضددردی تمامی گروهها از دیکلوفناک (mg/kg,ip ۱۰) که تعداد پیچشها را حدود ۶۴٪ کاهش داد بیشتر بود (شکل۵).

بررسی اثر ضددردی عصاره آب – متانولی (۲:۳) به روش صفحه داغ

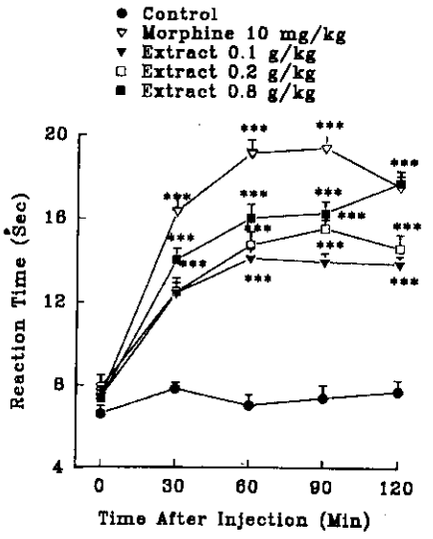
این آزمایش نشان داد که تجویز داخل صفاقی عصاره آب – متانولی (۲:۳) در محدوده دوزهای ۰/۱، ۰/۲و ۰/۸ گرم بر کیلوگرم، سی دقیقه بعد از تزریق اثر ضد دردی مناسبی را همانند مرفین (mg/kg,ip ۱۰) دارا بودند. بیشترین اثر ضد دردی در زمان ۶۰ دقیقه پس از تزریق در دوزهای ۰/۱، ۰/۲و ۰/۸ گرم بر کیلوگرم و در مورد ۰/۸g/kg در زمان ۹۰ دقیقه بعد از تزریق ظاهر شد اثر ضددردی تا ۱۲۰ دقیقه پس از تزریق ادامه داشت (شکل ۶).

بررسی تأثیر نالوکسان بر اثر ضددردی عصاره آب – متانولی (۲:۳) به روش پیچش

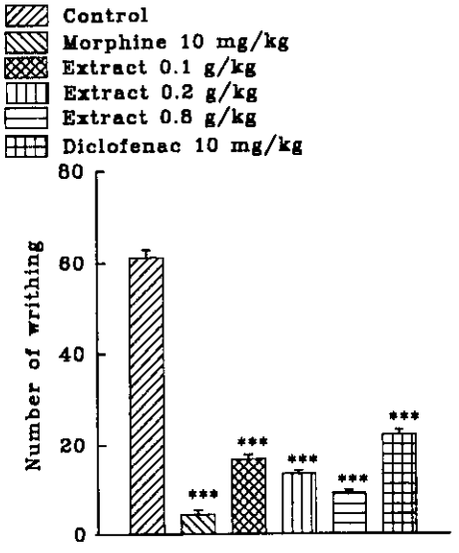
در این آزمایش نالوکسان (mg/kg, s.c. ۲) قادر به مهار اثر ضد دردی عصاره آب – متانولی(۳-۲) در محدوده دوزهای ۰/۸g/kg و ۰/۲ و ۰/۱ به طور کامل نبود (حدود ۲۵ ٪).

www.SID.ir

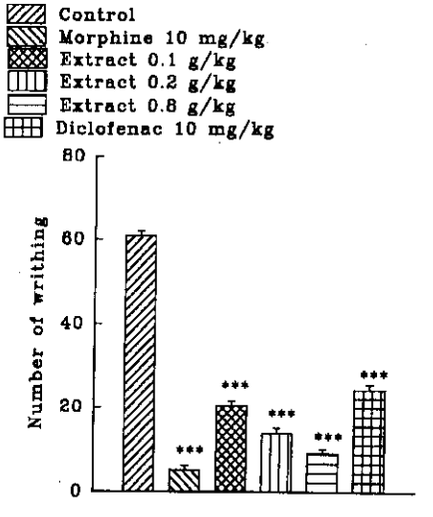
Archive of SID



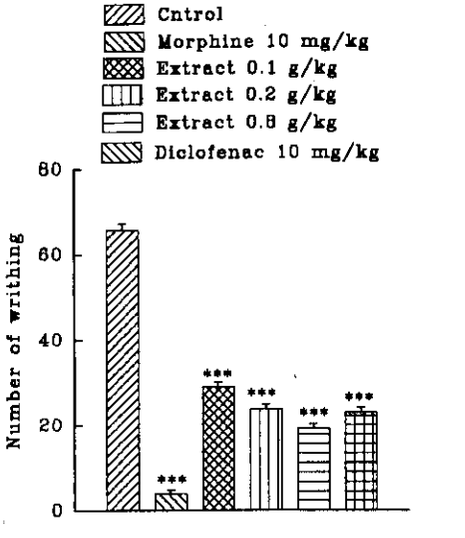
شکل۱: نمودار اثر ضد دردی عصاره متانول – کلروفرمی آویشن شیرازی، با روش تجویز داخل صفاقی در موش کوچک، به روش صفحه داغ. در این نمودار زمان عکس العمل حیوان به روی صفحه داغ (ثانیه) در مقابل زمان بعد از تجویز (دقیقه) رسم شده است. هر علامت بیانگر میانگین + خطای معیار زمان عکس و العمل ۸ موش می باشد. آزمون Tukey- Kramer، مقایسه با کنترل منفی (***P< ۰/۰۰۱)



شکل ۳: نمودار اثر ضد دردی عصاره آب – متانولی (۱:۹) آویشن شیرازی، با روش تجویز داخل صفاقی در موش کوچک، به روش پیچش. تعداد کشش های هر موش ۵ دقیقه بعد از تزریق اسید استیک، به مدت نیم ساعت محاسبه شد.عصاره گیاه و مرفین و دیکلوفناک ۳۰ دقیقه قبل از تجویز اسید، تزریق شدند.در این نمودار هر ستون بیانگر میانگین + خطای معیار تعداد کشش های در ۸ موش می باشد.
آزمون Tukey- Kramer، مقایسه با کنترل منفی (***P< ۰/۰۰۱)



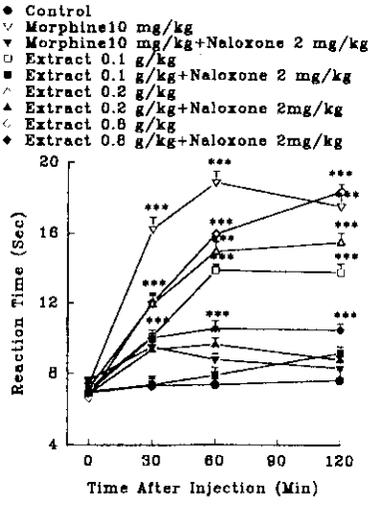
شکل ۲ : نمودار اثر ضد دردی عصاره متانول _ کلروفرمی آویشن شیرازی، با روش تجویز صفاقی در موش کوچک، روش پیچش
تعداد کشش های هر موش ۵ دقیقه بعد از تزریق اسید استیک، به مدت نیم ساعت محاسبه شد. عصاره گیاه و مرفین و دیکلوفناک ۳۰ دقیقه قبل از تجویز اسید، تزریق شدند.
در این نمودار هر ستون بیانگر میانگین + خطای تعداد کشش های در ۸ موش می باشد.
آزمون Tukey- Kramer، مقایسه با کنترل منفی (***P< ۰/۰۰۱)



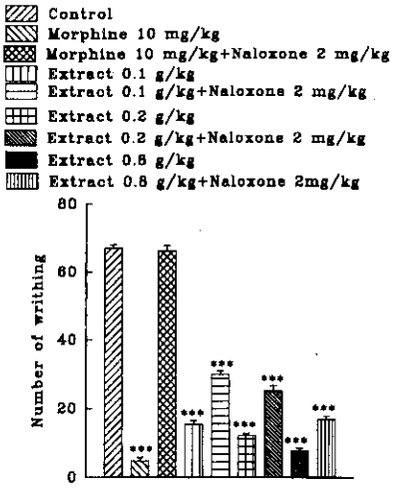
شکل٤: نمودار اثر ضد دردی n– هگزان آویشن شیرازی، با روش تجویز داخل صفاقی در موش کوچک، به روش پیچش. تعداد کشش های هر موش ۵ دقیقه بعد از تزریق اسید استیک، به مدت نیم ساعت محاسبه شد.عصاره گیاه و مرفین و دیکلوفناک ۳۰ دقیقه قبل از تجویز اسید، تزریق شدند.
در نمودار بالا هر ستون بیانگر میانگین + خطای معیار تعداد کشش های در ۸ موش می باشد.
آزمون Tukey- Kramer، مقایسه با کنترل منفی (***P< ۰/۰۰۱)

www.SID.ir

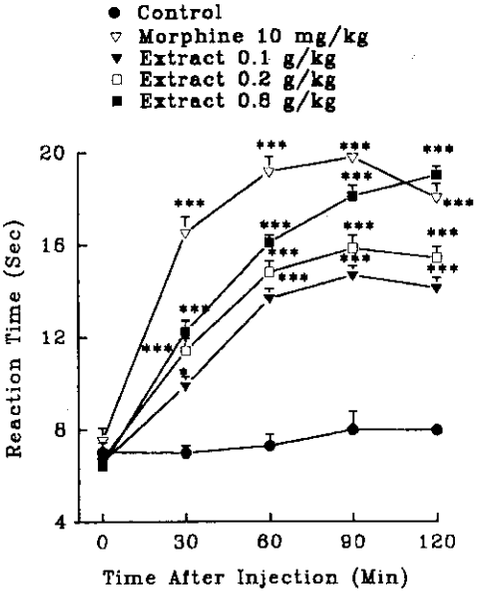
Archive of SID



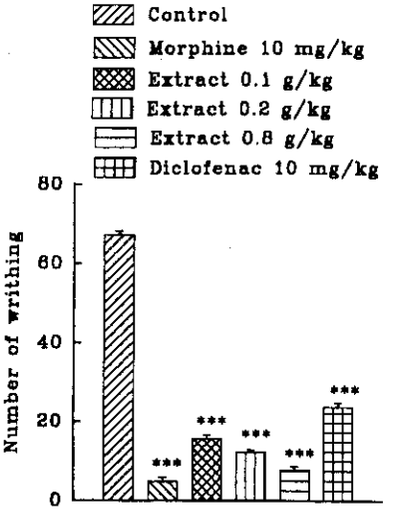
شکل۵: نمودار اثر ضد دردی عصاره اب – متانولی (۲:۳) آویشن شیرازی، با روش تجویز داخل صفاقی در موش کوچک، به روش پیچش. تعداد کشش های هر موش ۵ دقیقه بعد از تزریق اسید استیک، به مدت نیم ساعت محاسبه شد. عصاره گیاه و مرفین و دیکلوفناک ۳۰ دقیقه قبل از تجویز اسید، تزریق شدند. در نمودار بالا هر ستون بیانگر میانگین + خطای معیار تعداد کشش های در ۸ موش می باشد.
آزمون Tukey- Kramer، مقایسه با کنترل منفی (***P< ۰/۰۰۱)



شکل۷: نمودار تأثیر نالوکسان (زیر جلدی) بر اثر ضد دردی عصاره آب – متانولی (۲:۳) آویشن شیرازی، به روش تجویز داخل صفاقی در موش کوچک، به روش پیچش. تعداد کشش های هر موش ۵ دقیقه بعد از تزریق اسید استیک، به مدت نیم ساعت محاسبه شد. به گروههای مورد نظر ابتدا نالوکسان به صورت زیرجلدی تزریق شد پس از ۲۰ دقیقه عصاره ها و مرفین به روش داخل صفاقی نیم ساعت قبل از تجویز اسید، تزریق شدند. در نمودار بالا هر ستون بیانگر میانگین + خطای معیار تعداد کشش های در ۸ موش می باشد. آزمون Tukey- Kramer، مقایسه با کنترل منفی (***P< ۰/۰۰۱)



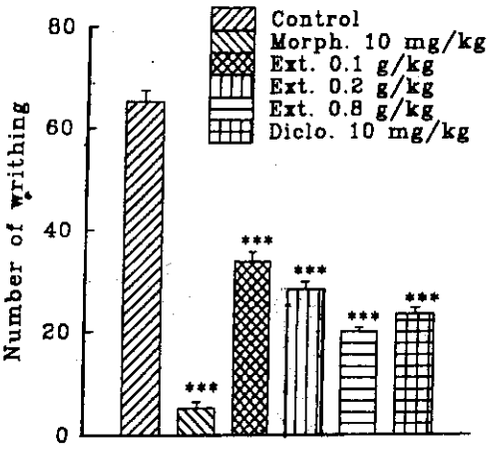
شکل٦: نمودار اثر ضد دردی عصاره آب – متانولی (۲:۳) آویشن شیرازی، با روش تجوبز داخل صفاقی در موش کوچک، به روش داغ.
در نمودار بالا زمان عکس العمل حیوان به روی صفحه داغ (ثانیه) در مقابل زمان بعد از تجوبز (دقیقه) رسم شده است . هر علامت بیانگر میانگین + خطای معیار زمان عکس العمل ۸ موش می باشد.
آزمون Tukey- Kramer، مقایسه با کنترل منفی (***P< ۰/۰۰۱)



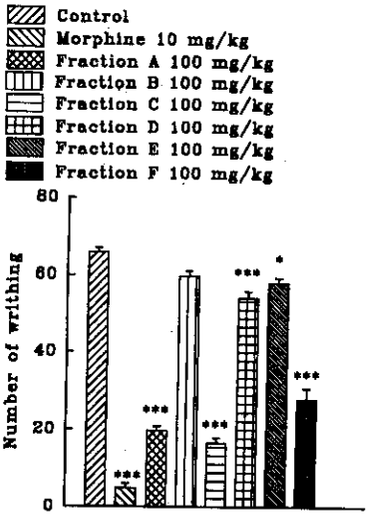
شکل۸: نمودار تأثیر نالوکسان (زیر جلدی) بر اثر ضد دردی عصاره آب – متانولی (۲:۳) آویشن شیرازی، به روش تجویز داخل صفاقی در موش کوچک، به روش داغ. در نمودار بالا زمان عکس العمل حیوان به روی صفحه داغ (ثانیه) در مقابل زمان بعد از تجویز (دقیقه) رسم شده است. هر علامت بیانگر میانگین + خطای معیار زمان عکس العمل ۸ موش می باشد.
آزمون Tukey- Kramer، مقایسه با کنترل منفی (***P< ۰/۰۰۱)

www.SID.ir

Archive of SID



شکل۹: نمودار اثر ضد دردی عصاره کلروفرمی آویشن شیرازی، با روش تجویز داخل صفاقی در موش کوچک، به روش پیچش.
تعداد کشش های هر موش ۵ دقیقه بعد از تزریق اسید استیک، به مدت نیم ساعت محاسبه شد. عصاره گیاه و مرفین و دیکلوفناک ۳۰ دقیقه قبل از تجویز اسید، تزریق شدند. در نمودار بالا هر ستون بیانگر میانگین + خطای معیار تعداد کشش های در ۸ موش می باشد.
آزمون Tukey- Kramer، مقایسه با کنترل منفی (***P< ۰/۰۰۱)



شکل۱۰: نمودار اثر ضد دردی فراکسیون های حاصل از کروماتوگرافی ستونی عصاره آب:متانول (۲:۳) با روش تجویز داخل صفاقی در موش کوچک به روش پیچش تعداد کشش های هر موش ۵ دقیقه بعد از تزریق اسید استیک، به مدت نیم ساعت محاسبه شد. عصاره گیاه و مرفین و دیکلوفناک ۳۰ دقیقه قبل از تجویز اسید، تزریق شدند. در نمودار بالا هر ستون بیانگر میانگین + خطای معیار تعداد کشش های در ۸ موش می باشد.
آزمون Tukey- Kramer، مقایسه با کنترل منفی (***P< ۰/۰۰۱)

درحالی که اثر مرفین (۱۰ mg/kg,ip) را حدود ۹۹ ٪ مهار کرد (شکل ۷).

بررسی تأثیر نالوکسان بر اثر ضددردی عصاره آب– متانولی (۲:۳) به روش صفحه داغ

در این آزمایش نالوکسان (۲ mg/kg, s. c.) توانست علاوه بر اثر ضد دردی مرفین (۱۰ mg/kg,ip) اثر ضددردی عصاره آب – متانولی (۲:۳) در محدوده دوزهای ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۸ گرم بر کیلوگرم را نیز مهار کند (شکل ۸). البته اثر مهاری نالوکسان نسبت به مرفین بیشتر از عصاره آب– متانولی بود.

بررسی اثر ضد دردی عصاره کلروفرمی به روش پیچش

تجویز داخل صفاقی این عصاره در محدوده دوزهای ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۸ گرم بر کیلوگرم نشان داد که این عصاره توانست پیچشها را تا حدودی کاهش دهد ولی نسبت به مرفین (۱۰ mg/kg,ip) این کاهش معنی دار نبود. همچنین اثر ضد دردی این عصاره از دیکلوفناک کمتر بود (شکل ۹).

نتایج به دست آمده از جداسازی فراکسیونها و بررسی اثر ضددردی آنها

فراکسیونهای ۱ تا ۲۴ حاصل از کروماتوگرافی ستونی عاری از ماده بودند و هیچ ترکیبی در این محدوده از ستون خارج نشد. بر روی فراکسیون ۲۴ تا ۶۷ بررسی صورت گرفت که پس از انجام کروماتوگرافی با لایه نازك و تعیین Rf، هر یك از فراکسیونها بصورت زیر مخلوط شدند.

فراکسیونهای ۲۵و ۲۶ و ۲۷ با Rf مشابه تقریباً" خالص بودند و بنام فراکسیون A نامگذاری شدند.

فراکسیونهای ۴۳ و ۴۴ و ۴۵ دارای Rf مشابه بودند و بنام فراکسیون B نامگذاری شدند.

فراکسیونهای ۴۷ تا ۵۱ دارای Rf مشابه بودند و بنام فراکسیون C نامگذاری شدند.

فراکسیونهای ۵۲ تا ۵۴ دارای Rf مشابه بودند و بنام فراکسیون D نامگذاری شدند.

فراکسیونهای ۵۵ و ۵۶ دارای Rf مشابه بودند و بنام فراکسیون E نامگذاری شدند.

www.SID.ir

Archive of SID

فراکسیونهای ۶۰ تا ۶۷ دارای Rf مشابه بودند و بنام فراکسیون F نامگذاری شدند.

۶فراکسیون بدست آمده جهت بررسی اثر ضددردی بر روی موش سفید کوچك مورد آزمایش قرار گرفتند.

فراکسیونA حدود ۷۰٪، فراکسیون C حدود ۷۵ ٪، و فراکسیونF حدود ۶۱٪ تعداد پیچشها را کاهش دادند و بقیه فراکسیونها تقریبا" عاری از اثر ضددردی بودند (شکل ۱۰).

بحث

در این مطالعه اثر ضد دردی فراکسیونهای برگ گیاه آویشن شیرازی بررسی شد. این بررسی نشان داد که فراکسیونهای مختلف برگ گیاه اثر ضد دردی مناسبی دارند.

به علت اثر ضد دردی بیشتر برخی از عصاره ها و همچنین بالا بودن میزان عصاره عمل جداسازی بر روی این عصاره ها صورت گرفت. این مطالعه نشان داد که هم در روش صفحه داغ و هم در روش پیچش عصاره های بدست آمده اثر ضد دردی داشتند. نالوکسان ۲ mg/kg توانست اثر ضددردی به روش صفحه داغ را همانند مرفین ۱۰ mg/kg در حدود ۹۵٪ مهار کند ولی در روش پیچش فقط تا حدودی اثر ضد دردی را مهار کرد.

ارزیابی نتایج فیتوشیمیایی گیاه

فلاونوئیدها از جمله ترکیباتی هستند که آثار ضددردی وضدالتهابی آنها گزارش شده است (۶، ۷ و۸).

همچنین در برگ گیاه آویشن شیرازی آلکالوئید و فلاونوئید جزء ترکیبات اصلی عصاره آن بودند. از طرف دیگر با توجه به آن که فلاونوئیدها ترکیباتی قطبی هستند و با توجه به جدا شدن فراکسیونها در ستون کروماتوگرافی با سیستم های حلال قطبی و اثر ضد دردی آنها می توان پیش بینی کرد که فراکسیون ضد درد نهایی می توانند جزء فلانوئیدها باشند.

مطالعه سمیت حاد و برگ گیاه آویشن شیرازی

از آنجایی که در این تحقیق، تعیین دقیق سمیت گیاه مورد نظر نبود محاسبه دقیق LD_{50} صورت نگرفت. ولی با توجه به آزمایشات انجام شده عصاره تا دوز ۱/۲g/kg فاقد مرگ و میر بود و LD_{50} عصاره متانول – کلروفرمی ۲/۴g/kg تعیین شد.

طبق آزمایشات انجام شده در دانشکده داروسازی مشهد LD_{50} عصاره جوشانده ۳/۸۵g/kg و عصاره الکلی ۳/۴۷g/kg بدست آمده است(۳). به نظر می رسد سمیت عصاره متانول – کلروفرمی از عصاره الکلی و جوشانده آبی بیشتر است.

بررسی اثر ضد دردی فراکسیونهای برگ گیاه آویشن شیرازی

در این مطالعه از دو روش صفحه داغ و پیچش برای بررسی اثر ضددردی استفاده شد. ضد دردهای فعال مرکزی مثل اپیوئیدها می توانند ظاهر شدن چنین پاسخهایی را به تأخیر اندازند. اما ضد دردهای محیطی مثل استیل سالی سیلیك اسید معمولا" اثر روی این پاسخها ندارند. پس روش صفحه داغ برای ارزیابی فعالیت ضد دردهای مرکزی استفاده می شود.

در روش پیچش، ضددردهای مخدر و غیر مخدر، داروهای ضد التهاب غیر استروئید در دوزهای نسبتا" پایین پاسخ می دهند. بنابراین در روش پیچش می توان فعالیت ضددردهای محیطی و ضد دردهای مرکزی را بررسی نمود (۱۰).

عصاره متانول – کلروفرمی برگ گیاه آویشن شیرازی در روش صفحه داغ در محدوده دوزهای۰/۱، ۰/۲ و ۰/۸ گرم بر کیلوگرم اثر ضددردی نشان داد. با توجه به اینکه اثر ضد دردی عصاره ۰/۸g/kg نسبت به ۰/۱ و ۰/۲ گرم بر کیلوگرم در زمان ۱۲۰ دقیقه بعد از تزریق افزایش داشته است

می توان پیش بینی کرد که احتمالا" اثر ضد دردی عصاره وابسته به دوز می باشد همچنین با توجه به پاسخ مناسب دوزهای عصاره نسبت به کنترل منفی احتمالا" عصاره توانسته است به طریقه مرکزی فعالیت ضد دردی مناسبی را از خود نشان دهند.

www.SID.ir

Archive of SID

همچنین اثر ضددردی عصاره متانول – کلروفرمی گیاه مجدداً" به روش پیچش، تکرار شد. در این آزمون عصاره در محدوده های دوزهای ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۸ گرم بر کیلوگرم اثر ضد دردی وابسته به دوز نشان داد.

با توجه به اینکه عصاره متانول – کلروفرمی در روش صفحه داغ و آزمون پیچش، فعالیت ضد دردی مناسب را از خود نشان داده اند و می توان پیش بینی کرد که این عصاره اثر ضد دردی خود را با هر دو مکانیسم محیطی و مرکزی اعمال کرده است (۱۰).

برای بررسی اثرضد دردی فراکسیونها، عصاره متانول – کلروفرمی جداسازی شد. ازاین جداسازی یک فاز آبی و یک فاز آلی (n – هگزان) بدست آمد. هر دو فاز بطور جداگانه برای بررسی اثر ضد دردی مورد آزمایش قرار گرفتند. طبق نتایج بدست آمده فاز آبی (آب – متانول ۱:۹) بر اساس آزمون پیچش توانست اثر ضد دردی مناسبی را در محدوده دوزهای ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۸ گرم بر کیلوگرم با کارایی شبیه مرفین ایجاد کند. این اثر طبق مطالعه انجام شده وابسته به دوزمی باشد. همچنین عصاره آب – متانولی (۱:۹) اثر ضد دردی بیشتری نسبت به دیکلوفناک (۱۰ mg/kg) از خود نشان داد. علاوه بر این فاز آلی (n –هگزان) نیز مورد بررسی قرار گرفت. این عصاره نیز اثر ضد دردی از خود نشان داد، اما با توجه به اثر کمتر آن نسبت به عصاره آب – متانولی (۱:۹) و همچنین کمتر بودن میزان این عصاره مطالعه بعدی روی عصاره آب – متانولی (۱:۹) انجام شد. در این مرحله نیز دو فاز آبی و آلی (کلروفی) تشکیل شد که هر دو مورد بررسی قرار گرفتند. فاز آبی (آب – متانول ۲:۳) در روش صفحه داغ درمحدوده های دزوهای ۰/۱، ۰/۲ و ۰/۸ گرم بر کیلوگرم اثر ضد دردی وابسته به دوز ایجاد کرد. با توجه به پاسخ مناسب دوزهای عصاره نسبت به کنترل منفی و کارآیی شبیه مورفین این عصاره احتمالاً" توانسته است به طریقه مرکزی فعالیت ضددردی مناسبی را از خود نشان دهد. با توجه به اینکه این مرحله آخرین مرحله جداسازی بود برای بررسی بیشتر مکانیسم آن اثر ضد دردی عصاره و مرفین در حضور نالوکسان (۲ mg/kg) نیز مورد بررسی قرار گرفت. طبق نتایج بدست آمده اثر ضد دردی دوزهای مختلف عصاره و مرفین توسط نالوکسان (۲ mg/kg) تقریباً" به طور کامل مهار شد. بنابراین احتمالاً" فعالیت ضد دردی عصاره با تأثیر روی گیرنده های اپیوئید می باشد (۱۲). همچنین برای مطالعه بیشتر بر روی این عصاره و بررسی بهتر مکانیسم اثر آن، آزمایش مجدداً" به روش پیچش تکرار شد. در این آزمون نیز عصاره در محدوده های۰/۱، ۰/۲ و ۰/۸ گرم بر کیلوگرم اثر ضد دردی وابسته به دوز با کارآیی شبیه مورفین نشان داد. همچنین تأثیر نالوکسان (۲ mg/kg) نیز بر روی اثر ضددردی این عصاره بررسی شد. بر اساس نتایج بدست آمده نالوکسان قادر به مهار کامل فعالیت ضد دردی عصاره آب – متانولی (۲:۳) نبوده است لذا پیش بینی می شود که احتمالاً" مواد موثره موجود در عصاره ها با اثربرگیرنده اوپیوئیدی مهار سنتز یا آزاد سازی پروستاگلاندینها توانسته اند، اثرات ضد دردی ایجاد کنند. همچنین عصاره می تواند با تأثیر مستقیم بر روی گیرنده ها به عنوان آگونیست، اثر خود را اعمال نمایند.

با توجه به اینکه در هر دو روش مورد استفاده در مطالعه ضد دردی با افزایش دوز عصاره ها، اثر بخشی ضد دردی نیز افزایش می یابد، در صورتی که زمان جهت رسیدن به حداکثر اثر در مورد تمام دوزهای عصاره تقریباً" یکسان است، بنابراین ممکن است افزایش مقدار دوز عصاره ها تنها منجر به افزایش غلظت پلاسمایی و اثرات آنها شده و تغییری در نیمه عمر جذب یا فراهمی زیستی (درصدی از عصاره که بعد از تجویز غیر وریدی وارد جریان خون می شود) ایجاد نکند. زیرا تغییر مقدار دارو چنانچه باعث تغییردر نیمه عمر جذب یا فراهمی آن نگردد منجر به افزایش متناسب غلظت پلاسما در تمام لحظات می شود. زمان لازم جهت رسیدن به ماکزیمم پیک تغییر نمی کند ولی اندازه ماکزیمم پیک متناسب با مقدار دارو افزایش می یابد. دلیل این مسأله بسیار واضح است زیرا مثلاً" با دو

www.SID.ir

Archive of SID

برابر شدن مقدار دارو، در هر لحظه مقدار داروی جذب شده نیز دو برابر می گردد و بدین ترتیب دو برابر مقدار قبلی دارو وارد بدن می شود مقدار داروی حذف شده نیز دو برابر مقدار قبل خواهد بود. در این صورت با توجه به اینکه مقدار داروی باقیمانده در بدن معادل تفاضل مقدار جذب شده و مقدار حذف شده می باشد بالطبع این مقدار نیز دو برابر می گردد (۱).

اثر ضد دردی عصاره کلروفرمی نیز بررسی شد که با توجه به نتایج بدست آمده و مقایسه آن با اثر ضد دردی عصاره آب – متانولی (۲:۳) نتایج چندان مطلوب نبود. بنابراین برای ستون کروماتوگرافی از عصاره آب – متانولی (۲:۳) استفاده شد.

از فراکسیونهای به دست آمده از ستون کروماتوگرافی سه فراکسیون دارای اثر ضد دردی بودند.

در ستون کروماتوگراق از هنگام افزودن متانول جدا سازی شروع شد و همچنین می دانیم که متانول یك ترکیب قطبی است و ترکیب فلاونوئید نیز در مطالعه فیتوشیمیایی اولیه گیاه موجود بود.

فلاونوئید ها ترکیباتی قطبی هستند که در حلالهای قطبی مانند متانول، بوتانول، اتانول و آب حل می شوند (۸). همچنین در یك مطالعه Hesperetin اثرات ضد درد و ضد التهاب مناسبی ایجاد کرده است (۹). همچنین فلاونوئیدهای morin, Chrysin اثر ضد دردی قابل ملاحظه ای در روش آزمون پیچش ایجاد کرده که مورد ترکیب اول از طریق سیستم اپیوئیدی و اثر محیطی اعمال کرده است (۱۱). بنابراین می توان پیش بینی کرد که احتمالاً ترکیب ضد درد موجود درعصاره یك ترکیب فلاونوئیدی باشد.

نتیجه گیری کلی

در این تحقیق برگ گیاه آویشن شیرازی از نظر فیتوشیمیایی و اثرات ضد دردی فراکسیونهای آن مورد بررسی قرار گرفت. نتایج بدست آمده از آزمایشات مقدماتی فیتوشیمیایی حاکی از این مطلب است که برگ گیاه مورد آزمایش فاقد تانن ، ساپونین بوده و احتمالاً دارای آلکالوئید و فلاونوئید باشد.

همچنین این مطالعه نشان داد که عصاره های متانول – کلروفرمی و آب – متانولی (۱:۹) و آب–متانولی (۲:۳) به هر دو روش صفحه داغ و پیچش اثر ضد دردی مناسبی را به صورت وابسته به دوز نشان دادند. اثر ضددردی در آزمون پیچش بطور کامل توسط نالوکسان مهار نشد ولی در آزمون صفحه داغ این اثر تقریباً به طور کامل مهار کرد. بنابراین می توان پیش بینی کرد که عصاره احتمالاً از طریق تاثیر بر روی گیرنده های اپیوئید، مهار آزادسازی پروستا گلاندینها و همچنین اثر مستقیم بر گیرنده های درد اثر خود را اعمال می نمایند.

با توجه به حضور فلاونوئید در عصاره و اینکه فلاونوئیدهایی با اثرات ضد درد و ضد التهاب از دیگر گیاهان جداسازی شده اند، لذا این احتمال وجود دارد که اثرات ضد دردی آویشن شیرازی مربوط به فلاونوئیدهای آن باشد.

منابع

۱. حسن زاده خیاط، محمد. بیوفارماسی و کینتیك داروها، جلد اول، انتشارات دانشگاه علوم پزشکی مشهد، مشهد، ۱۳۷۱، ۲۴۲ – ۲۴۰.

۲. زرگری، علی. گیاهی دارویی ایران، جلد ۴، چاپ پنجم، انتشارات دانشگاه تهران، تهران، ۱۳۷۲، ۵۷-۱.

۳. سلمانی، غلامعباس، بررسی سمیت حاد، اثرات ضددردی و ضد التهابی عصاره تام گیاه آویشن شیرازی بر روی موش سفید کوچك و بزرگ، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، دانشکده داروسازی، مشهد، پایان نامه برای دریافت درجه دکتری داروسازی، ۷۸-۱۳۷۷، ۱۲۲.

4. Fried B. S., hermg J., Thin layer chromatography techiques and application, 1st Ed., Basel, Marcsel Dekker, New York, 1982, 1-2.

5. Hosseinzadeh H., Ramezani M., and Salmani G. 2000, Antinociceptive, anti-inflammatory and acute toxicity effect of *Zataria multiflora Boiss.* extract in mice and rats, J. Ethnopharmacol., 73(3): 374- 385

www.SID.ir

Archive of SID

6. Luzclarena C., Otero J. A., 1991, Planta Med., 59: 26
7. Mariano M., Bye R., 1995, Planta Med., 62: 137.
8. Markham K. R., Techniqucs of Flavenoid Identification, Academic press, London, 1982.
9. Muthiah N. S., Viyayasekaran V., 1993, Ind. J. Pharm. Sci., 55: 180.
10. Pasternak G., Reisine T., Opioid Analgesics and antagonists, In: Hardman J.G., Limbird L. E. (eds),Goodman and Gilman's the Pharmacological Basis Therapeutics, 9th Ed., MG Graw Hills, New York, 1996, 521- 553,
11. Samban tham P. T., Viswanathan S., Reddy M. K., Ramachandran S., kameswaran L., 1985, Indian J. Parm. Sci., 47: 230-231.
12. Vogel H. G. and Vogel W. H., Analgesic, anti-inflammatory, antipyretic activity, In: Drug Discovery and Evaluation Pharmacological Assay, Springer Philadelphia , 1997, 360, 370, 382, 390, 402, 413.

www.SID.ir