Archive of SID

بررسی اثر شل کنندگی عضلانی هسته سنجد بر روی موش و امکان جداسازی ترکیبات آن

* دکتر حسین حسین زاده،** دکتر محمد رمضانی، *دکتر نازنین نامجو
* مرکز تحقیقات علوم دارویی، پژوهشکده بوعلی و بخش فارماکودینامی و سم شناسی، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
**مرکز تحقیقات علوم دارویی، پژوهشکده بوعلی و بخش بیوتکنولوژی و فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی دانشگاه علوم پزشکی مشهد

خلاصه

شل کننده های عضلات اسکلتی به طور وسیعی در جراحی ها، شکستگی ها و رفع بعضی از انقباضات عضلانی به کار می روند. دراین تحقیق اثر شل کننده عضلانی عصاره آبی و الکلی هسته سنجد مورد بررسی قرار گرفت. جهت این امر از آزمون انقباض (عدم گرفتن میله) استفاده شد. نتایج نشان داد که عصاره تام آبی با دوز ۱/۲۵ و عصاره الکلی با دوز ۳/۶ گرم بر کیلوگرم بیشترین اثر یعنی ۸۷/۵٪ شلی عضلانی ایجاد کرد که این اثر وابسته به دوز می باشد. از دیازپام به عنوان شاهد مثبت با دوز ۲ میلی گرم بر کیلوگرم استفاده گردید. نتایج نشان داد که اثر شل کنندگی عصاره ها با دیازپام قابل مقایسه است. استخراج عصاره تام آبی با مخلوط کلرفرم – متانول نشان داد که در فاز آلی (عصاره کلرفرمی متانولی) اثر شلی عضلانی خیلی کاهش یافته ولی فاز آبی اثر شلی عضلانی خوبی داشته است هر چند اثر آن نسبت به عصاره تام آبی کمتر شده است. استخراج عصاره تام آبی با n- بوتانل اشباع با آب نشان داد که در فاز آلی (عصاره n - بوتانلی) اثر شلی عضلانی به میزان متوسطی ظاهر شده ولی اثر عصاره آبی حاصل از استخراج نسبت به اثر عصاره تام آبی کاهش نشان داده است. نتایج آزمایشات از جمله TLC عصاره آبی سنجد نشان داد که احتمالاً عامل موثر در شلی عضلانی فلاونوئیدها می باشند.

کلمات کلیدی : سنجد، عضله اسکلتی، روش آزمون انقباض، فلاونوئید

مقدمه

تیره سنجد مرکب از گیاهانی به صورت درخت یا درختچه می باشد که اغلب خاردار بوده و شامل ۳ جنس و بیش از ۲۰ گونه است. درخت سنجد با نام علمی *Elaeagnus angustifolia* در این خانواده و جنس قرار می‌گیرد.

میوه سنجد حاوی پتاسیم، منیزیم، سدیم، آهن، کلسیم، روی و مس می‌باشد (۱۰). همچنین حاوی اسیدهای چرب لینولئیک (عمده ترین در دانه)، پالمتیک، اولئیک و لینولنیک است. اسید مالیک، فسفولیپیدها و استروها همچنین در دانه وجود دارند که عمده ترین آنها بتاسیتوسترول می باشد (۵، ۸). گزارشاتی مبنی بر اثرات ضدالتهابی پوسته و میوه و دانه سنجد (۶)، اثرات ضد درد پوسته و میوه و دانه (۷، ۱۱) ، اثرات خواب آوری هسته (۴) ارائه شده است. در میوه ترکیبات فنلی از جمله ایزورهامن تین ۳- O - D-β گالاکتوپیرانوزید و نیز اسید کافئیک وجود دارد (۸). جوشانده یا دم کرده آن برای بیماریهایی مثل فلج و کزاز، قلب و زخمهای ریوی و تنگی نفس، تقویت معده و کبد و باز کردن گرفتگی ها و تحلیل گاز و نفخ و یرقان نافع است (۳). با توجه به گزارشات اولیه مبنی بر شلی عضلانی این ترکیب (۷) و همچنین مصرف جوشانده، یا دم کرده آن برای بیماریهایی مثل فلج و کزاز در طب سنتی (۳)، اثر شلی عضلانی هسته با تاکید بر جداسازی مواد موثره در این تحقیق مورد بررسی قرارگرفت.

www.SID.ir

Archive of SID

روش کار

جمع آوری گیاه و خشک کردن : میوه درخت سنجد در اواخر مهرماه ۱۳۷۸ از منطقه ایی شهرستان تربت حیدریه جمع آوری و در هر باریوم دانشگاه فردوسی مشهد با شماره ۲۳۱ شناسائی شد. بعداز جمع آوری گیاه دور از نور و در دمای اتاق خشك و پوسته و میان بر آردی آن جدا و هسته آن جمع آوری شد. پس از خشك شدن كامل، هسته ها با آسیاب به خوبی خرد شدند.

تهیه عصاره آبی گیاه : در این روش ابتدا آب مقطر را به داخل یك بشر ml ۱۰۰۰ ریخته و روی شعله قرار داده تا شروع به جوشیدن كند. سپس ۸۰ گرم پودر از دانه سنجد، به آرامی به ml ۴۰۰ آب مقطر در حال جوشیدن بشر اضافه شد. مدت ۱۵ دقیقه عمل جوشاندن ادامه یافت و در طول مدت جوشش با همزن شیشه ای محتوی بشر بهم زده شد و پس از اتمام ۱۵ دقیقه، محتویات بشر با كمك كاغذ صافی، قیف بوشنر و پمپ خلاء صاف گشته و روی محتویات كاغذ صافی ۲ تا ۳ بار آب مقطر اضافه شد و با اعمال فشار، آب آن خارج گردید.پس از صاف كردن، عصاره به دستگاه حذف حلال منتقل شده و حذف حلال صورت گرفت، سپس عصاره به داخل پلیت شیشه ای ریخته شده و روی بن ماری در دمای ۵۰-۴۰°C قرار داده شد تا خشك گردد. بعد به شیشه درب پوش دار ریخته و به یخچال منتقل شد.

ارزیابی حداكثر دوز قابل تحمل : برای این منظور ابتدا دوزهای مختلف عصاره ها از راه داخل صفاقی به گروههای ۵ تایی موش تجویز شد و مرگ و میر حیوانات به مدت ۷۲ ساعت كنترل گردید. بیشترین دوزی كه در آن مرگ و میر مشاهده نشد، به عنوان حداكثر دوز قابل تحمل در نظر گرفته شد.

بررسی اثرات شل كنندگی عضلانی به روش عدم گرفتن میله یا آزمون انقباض (Traction test)(۱۳): برای انجام این آزمایش میله فلزی محكم، به طول ۴۰ سانتی متر و با قطری مناسب در حد ۳-۲ میلی متر انتخاب شد به طوری كه در حالت عادی موش كوچك توانایی گرفتن میله را داشت. این میله از دو طرف به دو چوبه پایه دار متصل شد. ارتفاع چوبها از سطح بیشتر از ۳۰ سانتی متر بود. در این روش موشها را از طریق دو پای خود از میله آویزان كرده و اگر در مدت ۵ ثانیه برگشته و میله را با دستهای خود بگیرد، مشخص می‌شود كه ماده تجویزی اثر شل كنندگی عضلانی ندارد. پاسخ مثبت به شل كنندگی به صورت از دست دادن توانایی حیوان در گرفتن میله با دست ظاهر می‌شود. آزمایش فوق فقط بر روی موشهایی انجام شد كه قبل از تزریق بتوانند میله را با دستهای خود بگیرند. مطابق این روش عصاره یا ماده مورد آزمایش را از طریق داخل صفاقی به گروههای حداقل ۸ تایی موش تجویز كرده و در زمانهای ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰ و ۱۵۰ دقیقه پس از تجویز آزمایش فوق را انجام داده و تعداد موشهایی كه می‌افتند یا نمی‌افتند یا نمی‌توانند میله را در عرض كمتر از ۵ ثانیه با دست بگیرند، یادداشت گردید. از دیازپام به عنوان شاهد مثبت با غلظتهای ۰/۵ و ۱ و ۲ میلی گرم بر كیلو گرم و نرمال سالین به عنوان شاهد منفی استفاده شد.

تهیه عصاره الكلی هسته سنجد: پس از سوارکردن دستگاه سوكسله، ۱۵۰ گرم پودر هسته را توزین كرده و داخل كارتوش یا كیسه حرارتی مخصوص ریخته و با حلال اتانل ۹۶ ٪ به حجم ml ۱۲۰۰ در درجه حرار C° ۸۰ به مدت ۱۲ ساعت عمل حرارت دادن انجام داده شد پس از اتمام زمان لازم، عصاره سرد شده در بالن ابتدا با كاغذ صافی و بعد با قیف بوشنر و پمپ خلاء صاف شد. پس از صاف كردن، عصاره به دستگاه حذف حلال منتقل شده و حذف حلال صورت گرفت. سپس عصاره به پلیت شیشه ای منتقل و روی بن ماری، در دمای ۵۰°C -۴۰ خشك شد.

استخراج عصاره تام آبی با مخلوط كلرفرم - متانول به نسبت (۱:۱): از عصاره خشك آبی ۴ گرم برداشته و در ml ۴۰۰ آب مقطر حل شد. ml ۳۰۰ از مخلوط (۱:۱) كلرفرم و متانول تهیه شد. برای استخراج هر بار ml۵۰ از مخلوط كلرفرم متانول را به ml ۴۰۰ عصاره آبی اضافه كرده و پس از حدود ۳ دقیقه تكان دادن به داخل قیف دكانتور ریخته شده

www.SID.ir

Archive of SID

و پس از مدتی دو فاز در قیف دکانتور تشکیل می‌شود. فازها را از یکدیگر جدا کرده و هر فاز را پس از صاف کردن با کاغذ صافی و در دستگاه حذف حلال، حذف حلال کرده و سپس روی بن ماری خشک شد. لازم به ذکر است که عمل استخراج باید ۳ تا ۴ بار صورت گیرد و فازهای هر مرحله را با فازهای مشابه مراحل دیگر مخلوط شود.

بررسی اثر شل کنندگی عضلانی عصاره آلی و آبی حاصل از استخراج عصاره تام آبی با کلرفرم – متانول : گروههای ۸ تائی موش انتخاب شد. از نرمال سالین به عنوان شاهد منفی و از دیازپام ۲ میلی گرم بر کیلوگرم به عنوان شاهد مثبت استفاده شد. از فاز آلی یا فاز کلرفرمی متانولی حداکثر دوز قابل تحمل یعنی ۴ گرم بر کیلوگرم و ۷۰٪ حداکثر دوز قابل تحمل یعنی ۲/۸ گرم بر کیلوگرم تهیه شد. از فاز آبی یا فاز حاصل استخراج عصاره تام آبی با کلرفرم متانول معادل دوزهای عصاره تام آبی یعنی ۰/۸۷۵ و ۱/۲۵ گرم بر کیلوگرم انتخاب شدند. از عصاره تام آبی حداکثر دوز قابل تحمل یعنی ۱/۲۵ و ۷۰٪ آن یعنی ۰/۸۷۵ گرم بر کیلوگرم انتخاب شد. پس از تجویز دوزهای فوق به گروههای ۸ تایی موشها ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰و ۱۵۰ دقیقه بعد از تزریق، تست انقباض در موشها انجام شد و اثر به صورت درصد گزارش شده است.

استخراج عصاره تام آبی به کمک n- بوتانل اشباع با آب : برای تهیه n- بوتانل اشباع با آب به نسبت ۱ به ۲ از آب مقطر و n- بوتانل را در یك قیف دکانتور مخلوط کرده و عمل اختلاط به شدت انجام شد. سپس فاز بالایی (فاز n - بوتانل) را خارج کرده و از آن جهت استخراج استفاده شد و جهت استخراج عصاره آبی با n- بوتانل اشباع با آب، ۵گرم از عصاره خشك آبی را برداشته و در ml ۴۰۰ آب مقطر حل شد. بعد این عصاره را داخل قیف دکانتور ریخته و سه بار، هر بار با پنجاه میلی لیتر n - بوتانل اشباع با آب عمل استخراج انجام گردید. فازهای بالا و پایین هر مرحله جداگانه جمع آوری شد. از هر دو فاز جمع شده بعد از صاف کردن با کاغذ صافی و قیف بوشنر در دستگاه حذف حلال، حلال را حذف کرده و سپس در پلیت روی بن ماری خشك شد. سپس آنها را در ظرف درب دار ریخته و در یخچال نگهداری گردید.

بررسی اثر شل کنندگی عضلانی عصاره آلی و آبی حاصل از استخراج عصاره تام آبی با n- بوتانل اشباع با آب : گروههای ۸ تایی موش انتخاب شد و از نرمال سالین به عنوان شاهد منفی و از دیازپام (۲ میلی گرم بر کیلوگرم) به عنوان شاهد مثبت استفاده شد. از فاز آلی یا فاز n - بوتانلی حداکثر دوز قابل تحمل یعنی ۶/۲۵ گرم بر کیلوگرم و ۷۰٪ آن یعنی ۲/۸ گرم بر کیلوگرم انتخاب شد. از فاز آبی یا فاز حاصل از استخراج عصاره تام آبی با n - بوتانل و اشباع با آب دوزهای معادل دوزهای عصاره تام آبی یعنی ۸۷۵ /۰ و ۱/۲۵ گرم بر کیلوگرم انتخاب شدند. پس از تجویز دوزهای فوق به گروههای ۸ تایی موشها و گذشت زمانهای ۳۰، ۶۰، ۹۰، ۱۲۰و ۱۵۰ دقیقه از تزریق، آزمون انقباض در موشها انجام و اثر به صورت درصد گزارش شده است.

بررسی فیتوشیمیائی عصاره سنجد : غربالگری فیتوشیمیایی عصاره ها توسط مواد و واکنشگرهای زیر انجام پذیرفت. آلکالویید توسط واکنشگر Dragendorff، فلاونویید توسط منیزیم و اسید کلریدریك، تانن توسط معرف بوشاردا و ساپونین بر مبنای ایجاد کف مورد بررسی قرار گرفت (۱۲).

محاسبات آماری : جهت آنالیز داده ها از برنامه نرم افزاری Instat استفاده شد. جهت آنالیز داده های مربوط به بررسی شل کنندگی از آزمون فیشر (Fisher exact) استفاده شد. LD_{50} برمبنای برنامه PHARM/PCS, V4 و آزمون آماری Litchfield and Wilcoxon انجام شد و داده ها به صورت LD_{50} و محدوده اطمینان (CL) مربوطه گزارش شد. برای رسم کلیه نمودارها از برنامه نرم افزاری Sigma Plot 5.0 استفاده گردید.

نتایج

نتایج عصاره گیری

از ۸۰ گرم پودر هسته سنجد، ۳/۵ گرم عصاره تام آبی خشك به دست آمد. از ۱۵۰ گرم پودر هسته سنجد، ۲/۷ گرم

www.SID.ir

Archive of SID

عصاره الکلی به دست آمد که البته کاملا" خشک نبود و حالت چربی داشت. در مرحله بعد از استخراج ۴ گرم عصاره تام آبی با مخلوط کلرفرم و متانول، ۱/۲ گرم عصاره کلرفرمی – متانولی و ۲/۵ گرم عصاره آبی حاصل از این استخراج، به دست آمد. در مرحله بعد از استخراج ۵ گرم عصاره تام آبی با n – بوتانل اشباع شده با آب، ۱/۹ گرم عصاره n- بوتانلی و ۳ گرم عصاره آبی حاصل از این استخراج، به دست آمد.

تعیین LD_{50}

عصاره تام آبی هسته سنجد: LD_{50} با تزریق دوزهای ۰/۲، ۰/۸، ۱،۰/۵۶، ۱/۹۲، ۲/۴و ۳/۲ گرم بر کیلوگرم عصاره تام آبی محاسبه شد. تجویز داخل صفاقی این عصاره با دوزهای بالاتر از ۱/۲۵ گرم بر کیلوگرم وزن موش، ایجاد مرگ و میر کرده ولی دوزهای پایین تر از آن در ۷۲ ساعت بعد از تجویز هیچ مرگ و میری ایجاد نکردند، لذا دوز ۱/۲۵ گرم بر کیلوگرم وزن موش به عنوان حداکثر دوز قابل تحمل در نظر گرفته شد و LD_{50} عصاره ۱/۹۵ گرم بر کیلوگرم (۲/۳۹ و ۱/۶۱ : CL) تعیین شد.

عصاره الکلی هسته سنجد: LD_{50} با تزریق دوزهای ۰/۸، ۳/۲، ۳/۶، ۴، ۵، ۶/۲۵ و ۷/۸ گرم بر کیلوگرم وزن موش محاسبه شد. تجویز داخل صفاقی عصاره الکلی هسته سنجد با دوزهای بالاتر از ۳/۶ گرم بر کیلوگرم ایجاد مرگ و میر کرده ولی در دوزهای پایین تر از آن در ۷۲ ساعت بعد از تجویز داخل صفاقی هیچگونه مرگ و میری ایجاد نکردند، لذا دوز ۳/۶ گرم بر کیلوگرم وزن موش به عنوان حداکثر دوز قابل تحمل در نظر گرفته شد. LD_{50} عصاره الکلی ۵/۱۳ گرم بر کیلوگرم (۶/۱۷ و ۴/۲۷ : CL) تعیین شد.

عصاره کلرفرمی متانولی: تجویز داخل صفاقی عصاره کلرفرمی متانولی هسته سنجد با دوزهای بالاتر از ۴ گرم بر کیلوگرم ایجاد مرگ و میر کرده ولی در دوزهای پایین تر از آن در ۷۲ ساعت بعد از تجویز داخل صفاقی هیچگونه مرگ و میری ایجاد نشد، لذا دوز ۴ گرم بر کیلوگرم وزن موش به عنوان حداکثر دوز قابل تحمل در نظر گرفته شد. LD_{50} به علت محدودیت عصاره قابل محاسبه نبود.

عصاره n – بوتانلی هسته سنجد: تزریق داخل صفاقی عصاره n – بوتانلی هسته سنجد در دوزهای بالاتر از ۶/۲۵ گرم بر کیلوگرم وزن موش ایجاد مرگ و میر کرده است ولی در دوزهای پایین تر از آن در ۷۲ ساعت بعد از تجویز داخل صفاقی هیچگونه مرگ و میری ایجاد نشده است، لذا دوز ۶/۲۵ گرم بر کیلوگرم به عنوان حداکثر دوز قابل تحمل عصاره n بوتانلی تعیین شد. LD_{50} به علت محدودیت عصاره محاسبه نشد.

بررسی اثر شل کنندگی عضلانی عصاره ها به روش آزمون انقباض

اثر عصاره تام آبی هسته سنجد: عصاره آبی وابسته به دوز باعث شلی عضلانی به روش آزمون انقباض شد. با دوزهای بالاتر شروع اثر بعد از ۶۰ دقیقه مشاهده شد. کارایی عصاره آبی با دوزهای ۰/۸۷۵ و ۱/۲۵ گرم بر کیلوگرم مشابه اثر دیازپام (۲ mg/kg) بود (جدول ۱).

اثر عصاره الکلی هسته سنجد : عصاره الکلی با دوزهای بالا باعث شلی عضلانی در موش شد. این اثر با دوز ۳/۶ g/kg عصاره مشابه دوز ۲ mg/kg دیازپام بود. شروع اثر عصاره بعد از ۱۲۰–۹۰ دقیقه مشاهده شد (جدول۲).

اثر عصاره آلی و آبی حاصل از استخراج عصاره تام آبی با کلرفرم – متانول: طبق جدول ۳ عصاره کلرفرمی – متانولی در ۹۰ دقیقه بعد از تجویز در دوزهای ۲/۸ و ۴ گرم بر کیلوگرم و عصاره آبی حاصل از استخراج در دوز ۰/۸۷۵ گرم بر کیلوگرم تفاوت قابل ملاحظه ای با نرمال سالین ایجاد نکرد، فقط عصاره آبی حاصل از استخراج در دوز ۱/۲۵ گرم بر کیلوگرم تفاوت معنی داری با نرمال سالین ایجاد کرده است ($p < 0/05$).در این مطالعه شاهد مثبت دیازپام ۲ میلی گرم بر کیلوگرم است که اثرش از ۳۰ دقیقه تا ۱۲۰ دقیقه تفاوت معنی داری با نرمال سالین دارد ($p < 0/05$).

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ۱: بررسی اثر شل کنندگی عضلانی عصاره تام آبی هسته سنجد و دیازپام از راه داخل صفاقی در موش کوچک به روش آزمون انقباض (Traction test) با زمان ختم آزمایش ۵ ثانیه

زمان پس از تجویز (دقیقه) دوز	۳۰	۶۰	۹۰	۱۲۰	۱۵۰
نرمال سالین ۱۰ میلی لیتر بر کیلوگرم	٪۰	٪۱۲/۵	٪۱۲/۵	٪۱۲/۵	٪۱۲/۵
عصاره آبی ۰/۵ گرم بر کیلوگرم	٪۳۷/۵	٪۶۲/۵	٪۶۲/۵	٪۳۷/۵	٪۷۵ *
عصاره آبی ۰/۸۷۵ گرم بر کیلوگرم	٪۳۷/۵	٪۷۵ *	٪۷۵ *	٪۵۰	٪۷۸/۵ *
عصاره آبی ۱/۲۵ گرم بر کیلوگرم	٪۳۷/۵	٪۷۵*	٪۷۵ *	٪۷۵ *	٪۷۸/۵ *
دیازپام ۰/۵ میلی گرم بر کیلوگرم	٪۳۷/۵	٪۳۷/۵	٪۳۷/۵	٪۳۷/۵	٪۳۷/۵
دیازپام ۱ میلی گرم بر کیلوگرم	٪۳۷/۵	٪۵۰	٪۶۲/۵	٪۵۰	٪۶۲/۵
دیازپام ۲ میلی گرم بر کیلوگرم	٪۶۲/۵ *	٪۸۷/۵ *	٪۸۷/۵ *	٪۶۲/۵	٪۷۵ *

تعداد موشها در هر گروه ۸ عدد بود.

نتایج به صورت درصد عدم گرفتن میله بیان شده است.

آزمون فیشر، مقایسه با کنترل (نرمال سالین) : $p < ۰/۰۵$ *.

جدول ۲ : بررسی اثر شل کنندگی عضلانی عصاره الکلی هسته سنجد و دیازپام از راه داخل صفاقی در موش کوچک به روش آزمون انقباض (Traction test) با زمان ختم آزمایش ۵ ثانیه

زمان پس از تجویز (دقیقه) دوز	۳۰	۶۰	۹۰	۱۲۰	۱۵۰
نرمال سالین ۱۰ میلی لیتر بر کیلوگرم	٪۰	٪۱۲/۵	٪۱۲/۵	٪۱۲/۵	٪۱۲/۵
عصاره الکلی ۱/۴۴ گرم بر کیلوگرم	٪۲۵	٪۲۵	٪۳۷/۵	٪۷۵ *	٪۵۰
عصاره الکلی ۲/۵۲ گرم بر کیلوگرم	٪۳۷/۵	٪۵۰	٪۵۰	٪۷/۵ *	٪۷۵ *
عصاره الکلی ۳/۶ گرم بر کیلوگرم	٪۳۷/۵	٪۵۰	٪۸۷/۵ *	٪۷۸/۵ *	٪۸۷/۵ *
دیازپام ۰/۵ میلی گرم بر کیلوگرم	٪۳۷/۵	٪۳۷/۵	٪۳۷/۵	٪۳۷/۵	٪۳۷/۵
دیازپام ۱ میلی گرم بر کیلوگرم	٪۳۷/۵	٪۵۰	٪۶۲/۵	٪۶۲/۵	٪۵۰
دیازپام ۲ میلی گرم بر کیلوگرم	٪۶۲/۵ *	٪۸۷/۵ *	٪۸۷/۵ *	٪۷۵ *	٪۶۲/۵

تعداد موشها در هر گروه ۸ عدد بود.

نتایج به صورت درصد عدم گرفتن میله بیان شده است.

آزمون فیشر، مقایسه با کنترل (نرمال سالین) : $p < ۰/۰۵$ *.

جدول ۳ : بررسی اثر شل کنندگی عضلانی عصاره آلی و آبی حاصل از استخراج عصاره تام آبی با کلروفرم متانول از هسته سنجد و دیازپام از راه داخل صفاقی در موش کوچک به روش آزمون انقباض (Traction test) با زمان ختم آزمایش ۵ ثانیه

زمان پس از تجویز (دقیقه) دوز	۳۰	۶۰	۹۰	۱۲۰	۱۵۰
نرمال سالین ۱۰ میلی لیتر بر کیلوگرم	٪۰	٪۱۲/۵	٪۱۲/۵	٪۱۲/۵	٪۱۲/۵
عصاره کلرفرمی – متانولی ۲/۸ گرم بر کیلوگرم	٪۱۲/۵	٪۲۵	٪۳۷/۵	٪۵۰	٪۳۷/۵
عصاره کلرفرمی – متانولی ۴ گرم بر کیلوگرم	٪۲۵	٪۳۷/۵	٪۵۰	٪۵۰	٪۳۷/۵
عصاره آبی حاصل از استخراج ۰/۸۷۵ گرم بر کیلوگرم	٪۱۲/۵	٪۳۷/۵	٪۶۲/۵	٪۷۵ *	٪۶۲/۵
عصاره آبی حاصل از استخراج ۱/۲۵ گرم بر کیلوگرم	٪۲۵	٪۵۰	٪۷۵ *	٪۷۵ *	٪۵۰
عصاره تام آبی ۰/۸۷۵گرم بر کیلوگرم	٪۳۷/۵	٪۷۵ *	٪۷۵ *	٪۸۷/۵ *	٪۵۰
عصاره تام آبی ۱/۲۵ گرم برکیلوگرم	٪۳۷/۵	٪۷۵ *	٪۷۵ *	٪۸۷/۵ *	٪۷۵ *
دیازپام ۲ میلی گرم برکیلوگرم	٪۶۲/۵ *	٪۸۷/۵ *	٪۸۷/۵ *	٪۷۵ *	٪۶۲/۵

تعداد موشها در هر گروه ۸ عدد بود.

نتایج به صورت درصد عدم گرفتن میله بیان شده است.

آزمون فیشر، مقایسه با کنترل (نرمال سالین) :$p < ۰/۰۵$ *.

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ٤ : بررسی اثر شل کنندگی عضلانی عصاره آلی و آبی حاصل از استخراج عصاره تام آبی با n – بوتانل از هسته سنجد و دیازپام از راه داخل صفاقی در موش کوچک به روش آزمون انقباض (Traction test) با زمان ختم آزمایش ۵ ثانیه

زمان پس از تجویز (دقیقه) / دوز	۳۰	۶۰	۹۰	۱۲۰	۱۵۰
نرمال سالین ۱۰ میلی لیتر بر کیلوگرم	٪۰	٪۱۲/۵	٪۱۲/۵	٪۱۲/۵	٪۱۲/۵
عصاره n – بوتانلی ۴/۳۸ گرم بر کیلوگرم	٪۱۲/۵	٪۳۷/۵	٪۳۷/۵	٪۳۷/۵	٪۲۵
عصاره n – بوتانلی ۶/۲۵ گرم بر کیلوگرم	٪۱۲/۵	٪۳۷/۵	٪۳۷/۵	٪۵۰	٪۳۷/۵
عصاره آبی حاصل از استخراج ۰/۸۷۵ گرم بر کیلوگرم	٪۱۲/۵	٪۳۷/۵	٪۷۵ *	٪۷۵ *	٪۶۲/۵
عصاره تام آبی ٪۸۷۵ گرم بر کیلوگرم	٪۲۵	٪۶۲/۵	٪۸۷/۵ *	٪۷۵ *	٪۵۰
عصاره تام آبی ۱/۲۵ گرم بر کیلوگرم	٪۳۷/۵	٪۷۵ *	٪۷۵ *	٪۸۷/۵ *	٪۷۵ *
دیازپام ۲ میلی گرم بر کیلوگرم	٪۶۲/۵ *	٪۸۷/۵ *	٪۸۷/۵ *	٪۷۵ *	٪۶۲/۵

تعداد موشها در هر گروه ۸ عدد بود.

نتایج به صورت درصد عدم گرفتن میله بیان شده است.

آزمون فیشر، مقایسه با کنترل (نرمال سالین) :$p<0/05$*.

اثر عصاره آلی و آبی حاصل از استخراج عصاره تام آبی با n – بوتانل اشباع: طبق جدول ۴ عصاره آبی حاصل از استخراج با n – بوتانل اشباع با آب در ۳۰ و ۶۰ دقیقه بعد از تجویز در هیچ دوزی تفاوت معنی داری با شاهد منفی نداشته ولی در ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه بعد از تجویز در هر دو دوز ۰/۸۷۵ و ۱/۲۵ گرم برکیلوگرم تفاوت معنی داری با شاهد منفی داشته است ($p < 0/05$). در ۱۵۰ دقیقه بعد از تجویز هیچیک از دوزهای عصاره آبی حاصل از استخراج تفاوت معنی داری با شاهد منفی ندارد. عصاره تام آبی در دوزهای معادل با دوزهای عصاره آبی حاصل از استخراج از ۶۰ دقیقه بعد از تجویز تا ۱۵۰ دقیقه تفاوت معنی داری با شاهد منفی داشته است ($p <0/05$). دیازپام به عنوان شاهد مثبت در این تحقیق از ۳۰ دقیقه بعد از تجویز تا ۱۲۰ دقیقه تفاوت معنی داری با شاهد منفی داشته است ($p <0/05$).

آزمایشات جهت تشخیص ماده یا مواد مؤثره

کروماتوگرافی لایه نازک (TLC): بررسی صفحات کروماتوگرافی نشان داد که بهترین لکه ها در سیستم حلال n – بوتانل – اسیداستیک – آب در نسبت (۵:۱:۴) و (۴:۱:۵) ظاهر شد. در سیستم حلال کلرفرم – متانول در نسبت (۴:۶) بهترین لکه ها ظاهر شد. در سیستم حلال n – بوتانل – اسیداستیک – آب –کلرفرم در نسبت (۲:۲:۱:۴) بهترین لکه ها ظاهر شد، یعنی لکه ها در این نسبت های حلال، واضحتر و پررنگ تر بودند. در پلیتهای ۲۰×۲۰ که سیستمهای فوق قرار داده شد بهترین اثر در سیستم n – بوتانل – اسیداستیک – آب (۴:۱:۵) واضح شد که بهترین سیستم جهت فلاونوئیدها هم همین سیستم است.

کروماتوگرافی ستونی : کروماتوگرافی ستونی در این مورد به علت غلظت زیاد عصاره قابل استفاده نبود.

آزمون فلاونوئیدها در عصاره تام آبی، عصاره n – بوتانلی و عصاره آبی حاصل از استخراج باn – بوتانل: تفاوت رنگ لوله ها پس از افزودن براده منیزیم در این سه عصاره نشان دهنده این مطلب بود که در عصاره تام آبی، رنگ نارنجی به خوبی مشخص بود که نشانه حضور فلاونوئید در این عصاره بود. در عصاره n –بوتانلی رنگ نارنجی کمتر از عصاره آبی تام بود. در عصاره آبی حاصل از استخراج هم رنگ نارنجی واضح و مشخص بود (جدول ۵).

جدول ۵ : نتایج آزمون فلاونوئیدها در عصارهای مختلف سنجد

	عصاره تام آبی	عصاره n بوتانلی	عصاره آبی حاصل از استخراج با n بوتانل
فلاونوئید	+++	+	++

www.SID.ir

Archive of SID

جدول ٦: نتایج آزمونهای فیتوشیمی روی عصاره های مختلف سنجد

	فلاونوئید	تانن	آلکالوئید	ساپونین
عصاره آبی حاصل جوشاندن	+	+	–	+ جزئی
عصاره الکلی حاصل سوکسله	+	+	–	+ جزئی

بحث

عصاره جوشانده آبی، عصاره الکلی و عصاره کلرفرمی- متانول، عصاره n- بوتانلی هسته سنجد اثرات شل کنندگی به درجات متفاوت و در زمانهای مختلف نشان دادند.

نتایج بررسی اثر شل کنندگی عصاره آبی هسته سنجد نشان داد که اثر این عصاره وابسته به دوز بوده و از ۶۰ دقیقه بعد از تزریق داخل صفاقی اثر آن شروع شده و تا ۱۲۰ دقیقه ادامه یافته است. بیشترین اثر شلی عضلانی در دوز ۱/۲۵ گرم به کیلوگرم وزن موش دیده شده است که ۸۷/۵ ٪ بوده است.

نتایج بررسی اثر شل کنندگی عضلانی در عصاره الکلی حاصل از سوکسله هسته سنجد نشان داد که این اثر نیز وابسته به دوز بوده و با افزایش دوز و غلظت عصاره اثر آن نیز افزایش یافته است.

اثر این عصاره نیز در بالاترین غلظت آن یعنی حداکثر دوز قابل تحمل از ۹۰ دقیقه بعد از تجویز شروع شده و تا ۱۵۰ دقیقه ادامه یافته است. حداکثر اثر در دوز ۳/۶ گرم بر کیلوگرم، ۸۷/۵٪ است. این پدیده ممکن است به این دلیل باشد که احتمالاً" عامل شل کنندگی عضلانی موجود در این عصاره (عصاره اتانلی حاصل از سوکسله) غلظتش در خون دیرتر بالا می‌رود و تا زمان بیشتری هم باقی می‌ماند چون زمان شروع اثر آن و طول اثر آن از عصاره تام آبی بیشتر است. در ضمن چون حداکثر دوز قابل تحمل در عصاره الکلی بیشتر از عصاره آبی تام است، می‌توان گفت که روش جوشاندن برای استخراج عوامل شل کننده عضلانی بهتر است و آب هم حلال مناسبتری است.

نتایج بررسی اثر شل کنندگی عضلانی عصاره کلرفرمی متانولی حاصل از استخراج عصاره تام آبی با کلرفرم – متانول نشان داد که این عصاره اثرش حداکثر تا ۵۰٪ است که نسبت به نرمال سالین اختلاف معنی داری نشان نمی‌دهد. لذا از نظر آماری این اثر حائز اهمیت نیست. ولی بررسی اثر عصاره آبی حاصل از استخراج با کلرفرم متانول یا فاز آبی این استخراج، نشان داد که این عصاره در حداکثر دوز قابل تحمل خود دارای اثر می‌باشد. این اثر در ۹۰ دقیقه شروع شده و در ۱۲۰ دقیقه پایان یافته است و حداکثر اثر ۷۵٪ است.

همچنین تعیین حداکثر دوز قابل تحمل عصاره کلرفرمی – متانولی نشان داد که این مقدار بسیار بیشتر از عصاره تام آبی است که این پدیده می‌تواند به این علت باشد که عواملی که سبب مرگ و میر حیوان می‌شوند، عوامل قطبی هستند و سیستم کلرفرم – متانول که یك سیستم نیمه قطبی است تمایل کمتری برای انحلال این مواد دارد. ولی انحلال این مواد در فاز آبی حاصل از این استخراج بیشتر است چون در دوزهای یکسان با عصاره آبی تام این عصاره هم اثر شلی عضله را از خود نشان داد. حداکثر اثر این عصاره حاصل از استخراج با کلرفرم – متانول ۷۵٪ است و حداکثر اثر عصاره تام آبی ۸۷/۵٪ است.

نتایج بررسی اثر شل کنندگی عضلانی عصاره n - بوتانولی حاصل از استخراج عصاره تام آبی با n- بوتانل اشباع با آب هسته سنجد نشان داد که این عصاره در مقابل نرمال سالین تفاوت معنی داری ایجاد نکرده است و فاقد اثر است. همچنین در مقایسه با عصاره کلرفرمی متانولی هم اثر آن کمتر بوده است. همچنین نتایج ارزیابی حداکثر دوز قابل تحمل این عصاره نشان داد به علت غیر قطبی تر بودن این حلال انحلال عوامل مرگ و میر به داخل آن کم شده و لذا در دوز خیلی بالاتری سبب مرگ و میر حیوان شده است.

نتایج این بررسی نشان داد که درفاز آبی حاصل از استخراج عصاره تام آبی n – بوتانل، این فاز دارای تأثیر بوده

www.SID.ir

Archive of SID

و حتی نسبت به عصاره آبی حاصل از استخراج کلرفرم متانول اثر آن بیشتر بود.

در تمامی این مطالعات از نرمال سالین به عنوان شاهد منفی و از دیازپام ۰/۵ و ۱ و ۲ میلی گرم بر کیلوگرم به عنوان شاهد مثبت استفاده شد که البته فقط دیازپام ۲ میلی گرم بر کیلوگرم اثر قابل ملاحظه ای نسبت به نرمال سالین ایجاد کرد. اثر دیازپام نسبت به عصاره هسته سنجد زودتر شروع شده است و در ۳۰ دقیقه بعد از تجویز اثر خوبی داشته است و تا ۱۲۰ دقیقه ادامه داشته که این پدیده می تواند به این علت باشد که عامل شل کننده در دیازپام زودتر غلظتش در خون بالا می رود. دوز ۰/۵ و ۱ میلی گرم بر کیلوگرم از دیازپام به عنوان شاهد مثبت برای آزمون شل کنندگی مناسب نمی باشد زیرا در تمامی زمانها هیچ گونه اختلاف معنی داری با کنترل منفی (نرمال سالین) نداشت. دوز دیازپام در مقایسه با عصاره بسیار کمتر است که نشان دهنده قدرت اثر بسیار زیاد دیازپام در مقایسه با عصاره است. مکانیسم عمل اثر شل کنندگی دیازپام ممکن است از طریق مهار مسیرهای آوران چند سیناپسی انجام شود. از طرف دیگر دیازپام به عنوان یک واسطه عصبی مهار کننده، احتمالاً بازتابهای تک سیناپسی و چند سیناپسی را مهار می‌کند، همچنین ممکن است به طور مستقیم اعصاب حرکتی و عملکرد عضلانی را مهار سازد (۱).

این مطالعه نشان داد که عصاره حاوی آلکالوئید نبوده یا حاوی مقدار خیلی جزئی الکالوئید بوده است که احتمالاً اثر شل شدن مربوط به این جزء نبوده است چون معرفهای مایر و بوشارد هم تغییر رنگ و اضحی ایجاد نکرد (۴).

انجام آزمایشاتی جهت شناسایی ترکیبات موثر نشان داد که در TLC از عصاره ها واضحترین و پررنگ ترین و زردترین لکه ها در سیستم n - بوتانل - اسید استیک - آب در نسبت (۵:۱:۴) ظاهر شد که سیستم شناخته شده جهت ظهور فلاونوئیدها است.

طبق مطالعات قبلی وجود چند فلاونوئید از جمله مشتقات ایزورهامنتین در میوه سنجد اثبات شده است (۸). همچنین در بررسی میزان فلاونوئیدها در سه عصاره تام آبی، n - بوتانلی و عصاره آبی حاصل از استخراج با n - بوتانل می توان گفت که هر چه میزان فلاونوئید یک عصاره بیشتر بوده است، اثرش به همان نسبت بیشتر است. با انجام مطالعاتی که روی خواص فارماکولوژیکی فلاونوئیدها انجام شده است آثار زیر در آنها مشهود شده است:

فلاونوئیدها دارای اثرات ضد اسپاسم بر روی عضلات صاف می‌باشند و همچنین با مهار فعالیت بعضی از آنزیمها همانند پروتئین کیناز عملکرد عضلات اسکلتی را تغییر می‌دهند (۹).

لذا با توجه به نتایج حاصل از این مطالعه و سایر مطالعاتی که تا کنون روی هسته سنجد انجام شده و همچنین اثرات فارماکولوژی وسیع ترکیبات فلاونوئیدی و حضور موثر این ترکیبات در عصاره هسته سنجد احتمالاً گروههای مختلف فلاونوئیدها عوامل واسطه کننده اثر شلی عضلانی هستند.

فلاونوئیدها ترکیباتی هستند که در حلالهای قطبی مانند متانول، اتانول و آب حل می شوند. اتصال قند به ساختمان این ترکیبات باعث افزایش حلالیت آنها در آب شده و مخلوطی از آب و حلالهای ذکر شده برای انحلال آنها بسیار مناسب است. در مقابل آگلیکونهای فلاونوئید با قطبیت کمتر مانند ایزوفلاونها ، فلاونها و فلاونولها بیشتر در حلالهایی مثل کلرفرم حل می شوند (۲).

بنابراین اثرات شلی عضلانی عصاره های مختلف هسته سنجد با احتمال حضور آگلیکونهای فلاونوئید در عصاره کلرفرمی – متانولی و حضور گلیکونهای فلاونوئید به همراه آگلیکونهای فلاونوئید در عصاره های آبی و الکلی قابل توجیه می باشد.

نتیجه گیری کلی

این مطالعه نشان داد که عصاره جوشانده آبی و عصاره سوکسله اتانلی دارای اثرات شل کنندگی عضلانی می باشند که این اثر وابسته به دوز می باشد.

اثر شل کنندگی عضلانی وابسته به دوز سنجد، مربوط به ترکیبات قطبی و محلول در آب سنجد می باشد. با توجه به

www.SID.ir

Archive of SID

فیتوشیمی و نتایج بـه دسـت آمـده از کروماتوگرافی و سـایر آزمایشات و نیز خواص درمانی فلاونوئیدها، این احتمال وجود دارد اثر شل کنندگی عضلانی هسته سنجد به علـت فلاونوئیـد باشد. از آنجائی که هسته سنجد اثـرات ضـددردی (۷، ۱۱) و ضدالتهابی (۶) از خود نشان داده است و با توجه به اثرات شلی عضلانی آن، میوه این گیاه می‌تواند جـهت تهیـه فـرآورده ای مناسب در درمان بیماریهایی چـون اسـتئوآرتریت و آرتریـت روماتوئید به کار رود.

منابع

۱. بخش بررسی های علمی شرکت سهامی دارو پخش، اطلاعات و کاربرد بالینی داروهـای ژنریـك ایـران، چـاپ دوم، تهـران، ۱۳۷۱، ۷۸۱، ۲۴۹، ۲۴۰.

۲. رمضانی محمد، حسین زاده حسین، رحیمی زاده محمد، سـهرابی، یدالله، (۱۳۸۰). بررسی اثر پایین آورندگی قنـد خـون فراکسـیون های برگ درخت شاه تـوت در مـوش کـوچـك. مجلـه علـوم پایـه پزشکی ایران، جلد ۴، شماره ۱، ۲۴-۱۶.

۳. میر حیدر حسین، معارف گیاهی و کاربرد گیاهان در پیشـگیری و درمان بیماریها، جلد دوم، چاپ اول، دفتر نشر فرهنگ اسـلامی، تهران، ۱۳۷۲، ۱۶۴ – ۱۶۳.

۴. مـیر محمـدی قـوژدی محمـد، بررسـی اثـر خـواب آوری فراکسیونهای هسته سنجد بر روی مـوش کـوچـك، دانشـگاه علوم پزشکی مشهد، دانشکده داروسازی، مشهد، پایـان نامـه برای دریافت درجه دکترای داروسازی، ۱۳۷۸، ۱۱-۵.

5. Goncharova N. P., Glushenkova A. I., 1990, Lipids of oleaster fruits, Khim. Prir. Soedin, 1,17-21.

6. Hosseinzadeh H., Rahimi R., 1999, Anti-inflammatory effects of *Elaeagnus angustifolia*, Iran. J. Med. Sci., 24, 143-147.

7. Hosseonzadeh H., Taheri M. R., 2000, Antinociceptive effects of *Elaeagnus angustifolia* in mice, Med. J. Isl. Rep. Iran., 14, 77-81.

8. Kousova R. D., Kazakov A. I., 1998, Phenolic compounds in fruits of *Elaeagnus angustifolia*, Khim. Prir. Soedin., 3,455-6.

9. Markham K. R., Techniques of Flavonoids Identfication, Academic Press, London, 1982, 1-12, 15-18, 21-25, 30-35, 41-47,.

10. Qinghua Y., 1989, Air-Acetylene atomic absorbtion determination of light metal elements in Oleaster fruit Juice, Guangpuxue yo Guangpu fenxi, 9, 79-80.

11. Ramezani M., Hosseinzadeh H., Daneshmand N., 2001, Antinociceptive effect of *Elaeagnus angustifolia* fruit seeds in mice, Fitoterapia, 72, 255-262.

12. Trease G. E., Evans W. C., Pharmacognosy, Bailliere Tindall Press, London, 1983, 309-706.

13. Vogel H. G., Vogel W. H., Drug Discovery and Evaluation, Pharmacological Assays, Springer, Berlin, 1997, 210-212.