

## بررسی اثر ضد دردی و اولسروژنیک عصاره متانولی گیاه ناخنک

دکتر محمود رضا حیدری<sup>۱</sup>، دکتر فریبا نجفی<sup>۲</sup>، دکتر علی اسدی پور<sup>۳</sup>، دکتر مهدی انصاری<sup>۴</sup>، دکتر محمدجواد زاهدی<sup>۵</sup> و دکتر مهرداد واحدیان<sup>۶</sup>

### خلاصه

بعضی از گیاهان در طب سنتی به عنوان ضد درد مصرف می‌شوند. هدف از این مطالعه، ارزیابی اثرات ضد دردی گیاه ناخنک (*Melilotus Officinalis*) است که به طور سنتی برای رفع دردهای روماتیسمی و میگرنی و موارد دیگر به کار می‌رود. به این منظور عصاره متانولی سوکسله و پرکوله این گیاه با دوزهای مختلف، به صورت داخل صفاقی به موش سوری تزریق و اثر ضد دردی آن با آزمون‌های Tail-Flick و فرمالین اندازه‌گیری شد. نتایج حاصل نشانگر این است که عصاره حاصل از روش سوکسله در آزمون Tail-Flick در تمامی دوزهای تزریق شده (۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم)، قادر به ایجاد اثر ضد دردی بوده و در تمامی زمان‌های مورد بررسی، اثر ضد دردی معنی‌داری نسبت به گروه شاهد داشته است. دوز ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از بین دوزهای تزریق شده بیشترین اثر ضد دردی را اعمال کرد و این اثر ۱۲۰ دقیقه بعد از تزریق عصاره به حداکثر رسید ( $P < 0/01$ ). اثر ضد دردی عصاره سوکسله بیشتر از عصاره پرکوله بود. در تست فرمالین، دوز مؤثر ۲۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم عصاره سوکسله دارای اثر ضد دردی معنی‌دار بود ( $P < 0/01$ ). از آنجا که پیش‌درمانی حیوانات با نالوکسان تغییری در اثر ضد دردی عصاره ایجاد نکرد، لذا احتمال دخالت گیرنده‌های اپیوئیدی در اثر ضد دردی عصاره منتفی است. در آزمون اولسروژنسیستی مشخص شد که اثر زخم‌زایی عصاره نسبت به دوز مشابه آن از ایندومتاسین، کمتر است ( $P < 0/01$ ). بر اساس نتایج این تحقیق، عصاره گیاه ناخنک دارای اثر ضد دردی می‌باشد.

واژه‌های کلیدی: گیاهان دارویی، ناخنک، اثر ضد دردی، تست Tail flick، تست فرمالین، اولسروژنسیستی

۱- دانشیار گروه سم‌شناسی و فارماکولوژی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی کرمان ۲- دکتر داروساز، ۳- استادیار گروه شیمی دارویی، ۴- مربی گروه داروسازی، دانشکده داروسازی، ۵- استادیار گروه داخلی، ۶- استادیار بخش جراحی دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی درمانی کرمان

## مقدمه

با توجه به این که داروهای ضد درد موجود دارای عوارض نامطلوبی هستند (۱۹،۲۰،۲۴)، جستجو برای یافتن داروهای ضد درد جدید که دارای عارضه کمتر باشند امری منطقی بوده و چنین به نظر می‌رسد که گیاهان دارویی جایگاه مناسبی در این کنکاش داشته باشند (۷،۸). در طب سنتی در مورد اثرات متفاوت گیاه ناخنک در درمان بیماری‌های گوناگون، به خصوص در درمان دردهای مفصلی، سردرد، تشنج و ورم روده و معده شواهدی موجود است (۲،۹،۱۲). نام‌های متداول این گیاه در زبان فارسی شامل: شبدر شیرین، شاه‌افسرزرد، یونجه زرد، شبدر زرد (۲،۳،۱۲) اکلیل‌الملک، ناخنک (۵) و اسپست زرد می‌باشد. در طب سنتی از میوه آن به عنوان ضد درد، ضد التهاب، ضد اسپاسم، ضد نفخ و تقویت کننده استفاده می‌شود (۲،۹،۱۲). دانه این گیاه در زخم‌های مخاطی، دردهای مفصلی، برونشیت، سردرد، آسم، هموروئید، کرامپها و کولیت استفاده می‌شود (۲۳). دم کرده آن جهت رفع تحریکات عصبی و اضطراب، سرگیجه، دردهای عصبی، میگرن، دردهای روماتیسمی، احتباس ادرار، التهاب و ورم کلیه و مثانه، سوء هاضمه، قولنج‌های کبدی و رفع درد معده مصرف دارد (۵،۹،۱۳،۱۵). در استعمال خارجی به صورت ضماد یا پماد بر روی محل‌های ملتهب و زخم‌های چرکی و متورم و ورم‌های مفصلی برای رفع دردهای روماتیسمی و رفع التهاب بکار می‌رود (۹،۱۰،۱۶).

تحقیقات متعددی در مورد اثر ضد دردی عصاره‌های گیاهی که در طب سنتی به عنوان ضد درد از آنها یاد شده با روش‌های جدید فارماکولوژیک در نقاط مختلف دنیا انجام شده است (۱،۷،۸،۱۸،۲۱) ولی در بررسی منابع اطلاعاتی، مطالعه علمی و کلاسیکی در مورد اثر ضد دردی گیاه ناخنک یافت نشد. لذا در این تحقیق، اثر ضد دردی این گیاه با روش فرمالین با مبنای شیمیایی ایجاد درد (۷،۲۲،۲۶) و Tail flick با مبنای فیزیکی ایجاد درد (حرارتی) (۸،۱۷) در موش سوری مورد بررسی قرار گرفت.

## مواد و روش‌ها

دستگاه‌های مورد استفاده شامل: دستگاه عصاره‌گیری پرکوله (پرکولاتور) و سوکسله، ترازوی دیجیتال (مدل Sartorius PT. 60)، آون، دستگاه تقطیر در خلأ (Heidolph WB 2000)، دستگاه Tail flick (ساخت شرکت پویای ارمغان مشهد)، آسیاب برقی (Minshun minolom) و مواد مورد استفاده شامل: متانول، فرمالین (ساخت کارخانه مرک

آلمان)، مرفین، A.S.A، نالوکسان (تهیه شده از شرکت داروپخش) و عصاره گیاهی بود.

## تهیه عصاره گیاهی

میوه گیاه ناخنک با نام علمی *Melilotus Officinalis* از تیره پروانه‌واران (Leguminosae) از منطقه ماهان واقع در استان کرمان در خرداد ماه تهیه و توسط بخش کشاورزی دانشگاه شهید باهنر نامگذاری شد. میوه یا همان دانه گیاه ناخنک پس از خشک کردن و پودر نمودن، به دوروش پرکوله به مدت ۷۲ ساعت و سوکسله بمدت ۴ ساعت توسط متانول ۸۰٪ عصاره‌گیری شد (۴،۱۱). پس از تغلیظ عصاره در دستگاه تقطیر در خلأ، در داخل آون با حرارت ۴۰ درجه سانتی‌گراد قرار گرفت تا عصاره کاملاً خشک شود.

## تهیه محلول تزریقی عصاره ناخنک

پس از خشک شدن کامل عصاره، مقداری از آن وزن و در حجمی معین از سرم فیزیولوژی حل شد تا غلظتی برابر با ۱۰۰ mg/ml به دست آید (۱ گرم عصاره خشک در ۱۰ میلی‌لیتر). سپس از این محلول غلظت‌های تجربی ۵، ۱۰، ۲۰ و ۳۰ میلی‌گرم در میلی‌لیتر از عصاره سوکسله و غلظت ۲۰ mg/ml از عصاره پرکوله تهیه شد و برای تزریق داخل صفاقی به موش به ازای هر ۱۰ گرم وزن بدن موش، ۰/۱ میلی‌لیتر از محلول‌های تهیه شده، توسط سرنگ انسولین تزریق شد (۸،۲۲). به این ترتیب دوزهای ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم، به حیوان تزریق گردید.

## حیوان مورد آزمایش

برای بررسی اثر ضد دردی از موش سوری و برای مطالعه اثر اولسروژنیسیته از Rat استفاده شد (۱۴،۱۹،۲۰). موش سوری نر سفید سوئیس (Male Swiss Albino Mice) با وزن تقریبی ۲۵-۲۰ گرم از انستیتو رازی خریداری گردید. حیوانات در دسته‌های ۲۰ تا ۳۰ عددی نگهداری شدند که دارای سیکل نوری ۱۲ ساعت نور، ۱۲ ساعت تاریکی بودند و از غذای ساخت کارخانه خوراک دام پارس تغذیه شدند. موش‌ها ۲۴ ساعت قبل از انجام آزمایش به محل منتقل شده و به آب و غذا دسترسی داشتند و یک ساعت مانده به انجام آزمایش، وزن و درفنس‌های مجزا، شماره‌گذاری شده و بدون آب و غذا نگهداری می‌شدند. درجه حرارت آزمایشگاه  $22 \pm 1$  درجه سانتی‌گراد و در طول آزمایشات ثابت بود. از هر حیوان فقط یک نوبت استفاده شد و

در پایان آزمایش، حیوانات از طریق قطع نخاع کشته شدند.

حیوان در زیر قیف و روی صفحه شیشه‌ای قرار می‌گیرد. در فاصله‌ای از صفحه شیشه‌ای و سطح افق، آینه‌ای با زاویه ۴۵ درجه قرار گرفته است که مشاهدات را آسانتر می‌کند. قبل از هر آزمایش حیوان به منظور تطبیق با محیط جدید، ۱۵ دقیقه زیر قیف شیشه‌ای قرار می‌گیرد. پس از این زمان، حیوان آماده تزریق می‌باشد.

محلول تزریقی، فرمالین ۰/۵ درصد به میزان ۲۵ میکرولیتر است که به عنوان عامل ایجاد کننده درد به کار می‌رود. این محلول به صورت زیر جلدی به کف پای حیوان تزریق می‌شود و بلافاصله پس از تزریق، مجدداً به زیر قیف شیشه‌ای منتقل شده و پاسخ در برابر درد در محدوده زمانی ۳۰ دقیقه ثبت می‌شود. پاسخ در برابر درد عبارت است از مجموع زمان‌هایی که صرف تکان دادن، لیسیدن و گاز گرفتن پای تزریق شده می‌شود (بر حسب ثانیه). این زمان‌ها هر ۵ دقیقه اندازه‌گیری می‌شوند و مقدار عددی آن معرف مقدار درد ایجاد شده در اثر تزریق فرمالین به کف پای حیوان می‌باشد (۲۲،۲۶،۲۷).

#### بررسی اثرات اولسروژنیک عصاره ناخنک

یکی از عوارض داروهای ضد درد به ویژه داروهای ضد درد و ضد التهاب غیراستروئیدی، ایجاد زخم‌های گوارشی می‌باشد. به این منظور در این پژوهش اثر اولسروژنیک ناخنک با ایندومتاسین که یک داروی ضد درد غیر استروئیدی می‌باشد، بررسی و مقایسه شد (۱۹). حیوان مورد آزمایش، Rat سفید و نر با وزن ۲۵۰-۲۰۰ گرم در گروه‌های ۳ تا می بود. حیوانات بایستی ۲۴ ساعت قبل از آزمایش در قفس‌های مشبکی نگهداری شوند به طوری که اولاً فقط به آب دسترسی داشته باشند و ثانیاً مدفوع آنها در دسترس نباشد. زیرا به دلیل نبودن غذا، مدفوع خود را مصرف می‌کنند که سبب ایجاد خطا در آزمایش می‌شود. بعد از ۲۴ ساعت، سوسپانسیون ایندومتاسین در نرمال سالین با دوزهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به صورت خوارکی توسط لوله خمیده متصل به سرنگ به حیوانات خوراند می‌شود. بعد از ۴ ساعت حیوان پس از بی‌هوشی به وسیله اتر کشته شده و معده آن جدا و دو سر آن بوسیله پنس گیره‌ای بسته می‌شود. سپس ۱۰ ml فرمالین ۲ درصد برای فیکس کردن لایه‌های داخلی دیواره، به درون معده تزریق می‌شود. بعد از ۲۰ دقیقه معده از قسمت انحنای بزرگتر آن برش داده شده و زخم‌های آن شمرده می‌شود. برای به دست آوردن شدت زخم (ulcer index) از معیار J-Score استفاده می‌شود (۱۹،۲۰). J-Score به صورت زیر محاسبه می‌شود:

#### آزمون‌های فارماکولوژی بررسی اثرات ضد دردی

آزمون‌های فارماکولوژیک گوناگونی برای بررسی اثرات ضد دردی وجود دارد. در این تحقیق از دو آزمون Tail Flick با مبنای فیزیکی ایجاد درد (حرارتی) (۸،۱۷) و آزمون فرمالین با مبنای شیمیایی ایجاد درد (۲۲،۲۶،۲۷) برای بررسی اثرات ضد دردی گیاه ناخنک استفاده شد.

در آزمون‌های ضد دردی تعداد موشهای هر گروه مورد آزمایش و شاهد ۷ عدد بود. گروه شاهد فقط حامل عصاره یعنی سرم فیزیولوژی را دریافت کردند.

#### آزمون Tail flick

در این آزمون میزان بی‌دردی از طریق مدت تأخیر در عکس العمل دم در مقابل حرارت آسیب‌رسان بافتی، اندازه‌گیری می‌شود که با تاباندن ستونی از اشعه نوری به انتهای دم در سطح پشتی یا شکمی دم است. این تأخیر شاخص اندازه‌گیری درد است (۸،۱۴).

تأخیر در عکس‌العمل حیوانات در زمان‌های ۱۵، ۳۰، ۴۵، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه پس از تزریق اندازه‌گیری شد. در این تست اثر دوزهای ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ mg/kg از عصاره سوکسله و ۲۰۰ mg/kg از عصاره پرکوله با اثر ۱۰ ml/kg سرم فیزیولوژی و ۳۰۰ mg/kg آسپرین و ۲/۵ mg/kg مرفین مقایسه شد.

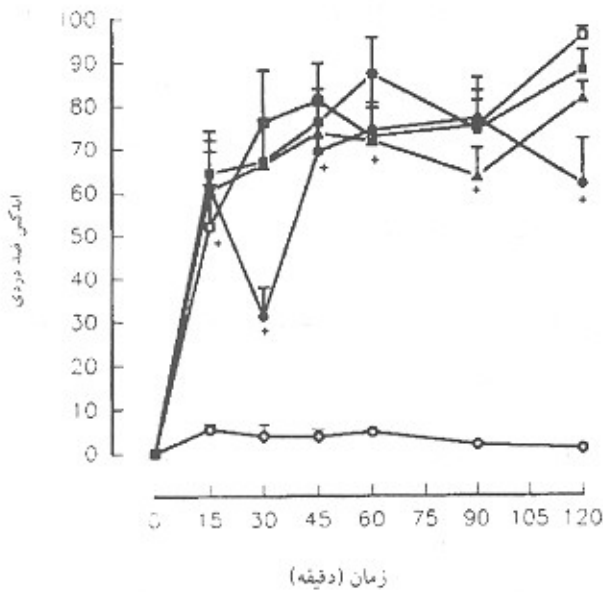
اثر ضد دردی با تعیین Analgesia Index مشخص می‌شود که با استفاده از فرمول ذیل محاسبه می‌گردد:

$$\% \text{Analgesia Index} = \frac{\text{Test Latency} - \text{Control Latency}}{\text{Cut off (10 sec)} - \text{Control Latency}} \times 100$$

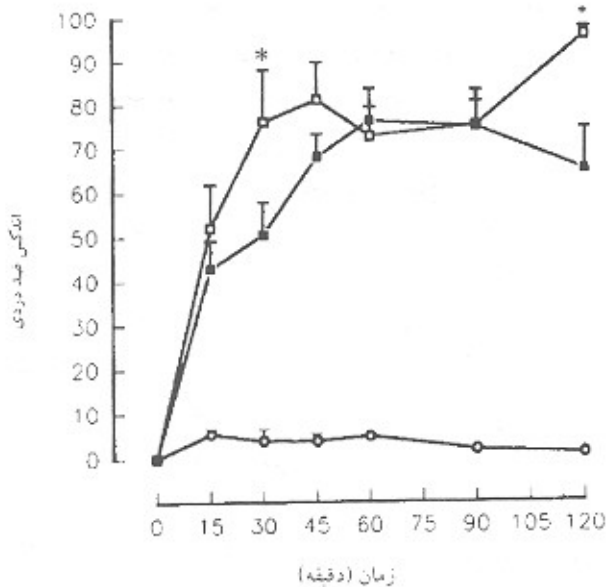
Latency: فاصله زمانی از لحظه تابش اشعه گرم‌مازای دستگاه تا جمع کردن و گریز دم حیوان از مسیر تابش.  
Cut off: حداکثر مدت مجاز تابش اشعه گرم‌مازا، چون بعد از آن تخریب بافتی روی می‌دهد (۸).

#### ب- آزمون فرمالین

این آزمون یکی از آزمون‌های استاندارد در مورد اندازه‌گیری پاسخ در برابر درد می‌باشد. در این روش حیوان در جایگاه مخصوصی که شامل یک چهارپایه آلومینیومی می‌باشد و روی آن صفحه‌ای شیشه‌ای قرار دارد، مستقر می‌گردد. بر روی صفحه شیشه‌ای، قیف دهان‌گشادی به قطر ۲۰ سانتی‌متر وجود دارد که



**نمودار ۱:** اندکس ضد دردی دوزهای مختلف عصاره سوکسله گیاه ناخنک بر حسب زمان در موش سوری با روش Tail flick به موش ها مقدار ۱۰ ml/kg نرمال سالین (○) یا عصاره سوکسله گیاه ناخنک با دوزهای ۵۰ (●)، ۱۰۰ (■)، ۲۰۰ (□) یا ۳۰۰ (▲) میلی‌گرم بر کیلوگرم تزریق گردیده است. هر نقطه نمایانگر میانگین  $\pm$  میانگین خطای معیار اندکس ضد دردی در ۷ موش می‌باشد.  $P < 0.01$ ، اختلاف معنی‌دار نسبت به گروه کنترل



**نمودار ۲:** مقایسه اندکس ضد دردی عصاره سوکسله و پرکوله گیاه ناخنک بر حسب زمان در موش سوری با روش Tail flick به موش ها مقدار ۱۰ ml/kg نرمال سالین (○) یا دوز ۲۰۰ میلی‌گرم از عصاره سوکسله (□) یا پرکوله (■) گیاه ناخنک تزریق گردیده است. هر نقطه نمایانگر میانگین  $\pm$  خطای معیار اندکس ضد دردی در ۷ موش می‌باشد.  $P < 0.05$  و  $P < 0.01$ ، اختلاف معنی‌دار نسبت به عصاره پرکوله

$$\text{Ulcer index} = a + 2b + 3c$$

a = تعداد زخم‌های کوچک‌تر از ۱ میلی‌متر

b = تعداد زخم‌های بین ۱ تا ۲ میلی‌متر

c = تعداد زخم‌های بزرگ‌تر از ۲ میلی‌متر

### آنالیز آماری

در هر سری از آزمایشات، اثر ضد دردی دوزهای مختلف به صورت میانگین و خطای معیار (Mean  $\pm$  SEM) در ۷ موش ثبت شده است. برای مقایسه اثر دوزهای متفاوت عصاره، حامل، مرفین و اسپرین، از آنالیز واریانس (ANOVA) و به دنبال آن متد Newman-Keuls و برای مقایسه اثرات اولسروژنیک عصاره با ایندومتاسین از t-test استفاده شد (۷، ۸).  $P < 0.05$  معنی‌دار در نظر گرفته شد.

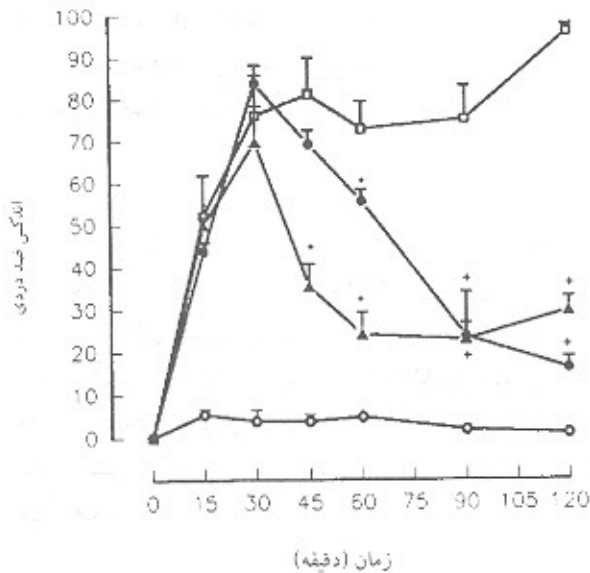
### نتایج

#### اثر ضد دردی

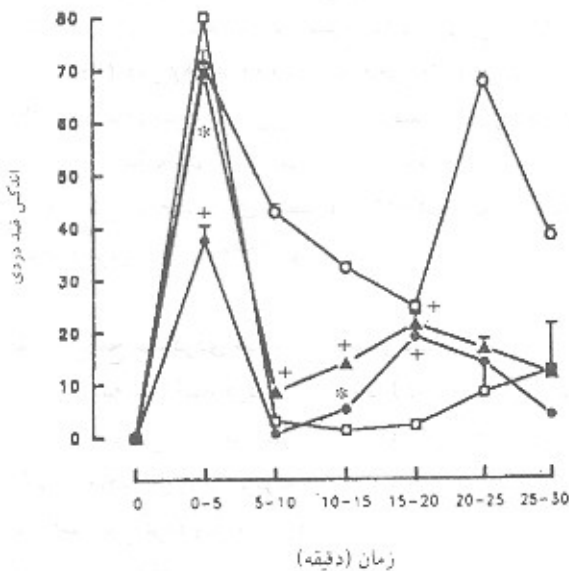
اثر ضد دردی عصاره متانولی حاصل از روش سوکسله با دوزهای ۵۰، ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به روش Tail-Flick سنجیده شد. همه دوزهای عصاره متانولی با روش سوکسله، در تمامی زمان‌ها پاسخ ضد دردی معنی‌داری را در مقایسه با سرم فیزیولوژی ایجاد کردند ( $P < 0.01$ ). دوز ۲۰۰ mg/kg عصاره حاصل از روش سوکسله در اکثر زمان‌های پس از تزریق بیشترین اثر ضد دردی را ایجاد کرد ( $P < 0.01$ ) لذا به عنوان دوز مؤثر شناخته شد. حداکثر اثر ضد دردی عصاره، ۱۲۰ دقیقه بعد از تزریق مشاهده گردید ( $P < 0.01$ ) (نمودار ۱).

مقایسه پاسخ ضد دردی عصاره سوکسله و عصاره پرکوله مقایسه اثر ضد دردی دوز مؤثر (۲۰۰ mg/kg) عصاره متانولی حاصل از روش سوکسله با دوز ۲۰۰ mg/kg عصاره متانولی حاصل از روش پرکوله نشان داد که این دو عصاره تقریباً شبیه هم عمل کرده و فقط در زمان‌های ۳۰ ( $P < 0.05$ ) و ۱۲۰ ( $P < 0.01$ ) دقیقه پس از تزریق، عصاره سوکسله مؤثرتر بود و در بقیه زمان‌ها اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد. بنابراین به طور کلی عصاره سوکسله مؤثرتر ارزیابی و در بقیه مراحل مورد استفاده قرار گرفت (نمودار ۲).

عمل کرد (نمودار ۴).



**نمودار ۳:** مقایسه اندکس ضد دردی عصاره سوکسله گیاه ناخنک و آسپرین و مرفین بر حسب زمان در موش سوری با روش Tail flick به موش‌ها مقدار ۱۰ ml/kg نرمال سالین (○) یا دوز ۲۰۰ میلی‌گرم از عصاره سوکسله (□) یا استیل سالیسیلیک ۳۰۰ mg/kg (▲) یا مرفین ۲/۵ mg/kg (●) تزریق گردیده است. هر نقطه نمایانگر میانگین ± خطای معیار اندکس ضد دردی در ۷ موش می‌باشد.  $P < 0.01$  اختلاف معنی‌دار نسبت به عصاره



**نمودار ۴:** مقایسه اثر ضد دردی عصاره سوکسله گیاه ناخنک با مرفین و استیل سالیسیلیک بر حسب زمان در موش سوری با تست فرمالین به هر گروه از موش‌ها نرمال سالین به میزان ۱۰ ml/kg (○) یا دوز ۲۰۰ میلی‌گرم از عصاره سوکسله گیاه ناخنک (□) یا مرفین ۲/۵ mg/kg (●) یا استیل سالیسیلیک ۳۰۰ mg/kg (▲) به صورت داخل صفاقی، ۱۵ دقیقه قبل از فرمالین تزریق گردیده است. هر نقطه نمایانگر میانگین ± خطای معیار مدت زمان پاسخگویی به اثر دردزایی فرمالین در ۷ موش می‌باشد.  $P < 0.05$  و  $P < 0.01$  اختلاف معنی‌دار نسبت به عصاره برکوله

مقایسه پاسخ ضد دردی عصاره سوکسله با مرفین و A.S.A. به روش Tail flick

برای مقایسه اثر ضد دردی عصاره با مرفین، دوز ۲/۵ mg/kg از مرفین به صورت داخل صفاقی به موش‌ها تزریق گردید و اثر ضد دردی آن با عصاره متانولی حاصل از روش سوکسله با دوز ۲۰۰ mg/kg مقایسه گردید. دوز ۲۰۰ mg/kg عصاره در زمان‌های ۱۵، ۳۰ و ۴۵ دقیقه پس از تزریق، اختلاف معنی‌داری نسبت به مرفین ایجاد نکرد و در دقیقه‌های ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ پس از تزریق، عصاره اثر ضد دردی بیشتری نسبت به مرفین ایجاد نمود ( $P < 0.01$ ). در مقایسه پاسخ ضد دردی مؤثرترین دوز عصاره سوکسله با دوز ۳۰۰ mg/kg از Acetyl Salicylic Acid (A.S.A.) در زمان‌های ۱۵ و ۳۰ دقیقه پس از تزریق، اختلاف معنی‌داری مشاهده نشد لذا اثر ضد دردی معادل با A.S.A. در این دقایق ایجاد شده است. در زمان‌های ۴۵، ۶۰، ۹۰ و ۱۲۰ دقیقه پس از تزریق اختلاف معنی‌داری ( $P < 0.01$ ) مشاهده گردید که نشان دهنده اثر ضد دردی بیشتر عصاره نسبت به A.S.A. در این دقایق بود (نمودار ۳).

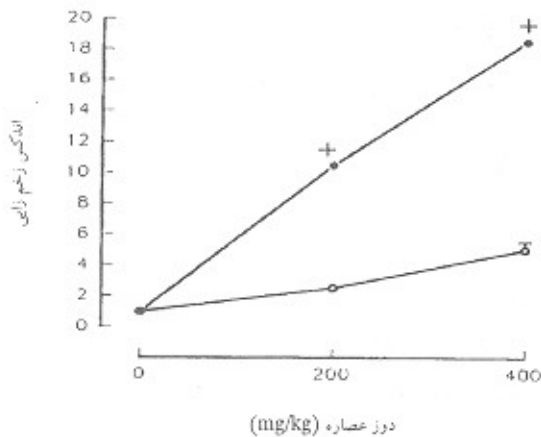
مقایسه اثر ضد دردی عصاره متانولی سوکسله با مرفین و A.S.A. به روش فرمالین

دوز ۲۰۰ mg/kg عصاره سوکسله در همه زمان‌ها به جز زمان ۵-۰ دقیقه، اثر ضد دردی معنی‌داری ایجاد نمود ( $P < 0.01$ ) (نمودار ۴). مقایسه اثر ضد دردی عصاره با ۲/۵ mg/kg مرفین نشان داد که در دقایق ۵-۰ و ۱۵-۲۰ با  $P < 0.01$  و در دقایق ۱۰-۱۵ با  $P < 0.05$  اختلاف معنی‌داری بین اثر ضد دردی عصاره سوکسله و مرفین وجود داشت که در دقایق ۵-۰ عصاره سوکسله ضعیف‌تر از مرفین و در دقایق ۱۰-۱۵ و ۱۵-۲۰ قوی‌تر از مرفین عمل کرده است. در بقیه زمان‌ها اختلاف معنی‌داری بین عصاره و مرفین وجود نداشت. این موضوع بیانگر آن است که عصاره اثر ضد دردی مناسب و قابل مقایسه‌ای با مرفین داشته است و فاز دوم درد را بهتر مهار می‌کند. در مقایسه اثر ضد دردی عصاره سوکسله با دوز ۲۰۰ mg/kg با A.S.A. با دوز ۳۰۰ mg/kg، در دقایق ۲۰-۲۵ و ۳۰-۲۵ اختلاف معنی‌داری بین عصاره و A.S.A. مشاهده نشد و این نشان می‌دهد که اثر ضد دردی عصاره در این دقایق تقریباً معادل با A.S.A. است. در دقایق ۵-۱۰، ۱۰-۱۵ و ۱۵-۲۰ با  $P < 0.01$  اختلاف معنی‌داری بین عصاره و A.S.A. مشاهده شد که در این دقایق، عصاره اثر ضد دردی بیشتری نسبت به A.S.A. ایجاد کرد. همچنین در دقایق ۵-۰ با اختلاف معنی‌داری ( $P < 0.05$ )، A.S.A. مؤثرتر از عصاره

و به روش‌های فرمالین و Tail flick اثر ضد دردی عصاره با نالوکسان و بدون حضور نالوکسان با هم مقایسه شدند که در هیچ‌یک از زمان‌ها اختلاف معنی‌داری بین آنها مشاهده نشد. این امر نشان‌دهنده آن است که گیرنده‌های اپیوئیدی، در اثر ضد دردی عصاره نقشی ندارند (نمودار ۵ و ۶).

مقایسه اثرات اولسروژنیک عصاره گیاه ناخنک و ایندومتاسین در معده Rat

نتایج بیانگر آن است که با خوراندن عصاره سوکسله ناخنک با دوزهای ۲۰۰ و ۴۰۰ میلی‌گرم به ازای هر کیلوگرم وزن بدن به Rat و مقایسه آن با ایندومتاسین با دوزهای مشابه، زخم ایجاد شده به وسیله ایندومتاسین در هر دو دوز، از عصاره سوکسله ناخنک با اختلاف معنی‌دار ( $P < 0/01$ ) بیشتر بود. (نمودار ۷).



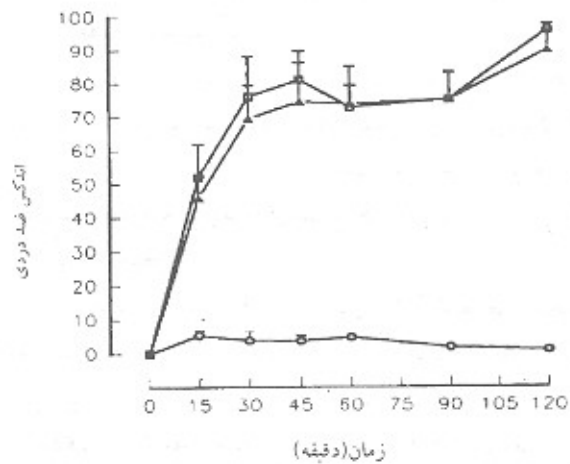
نمودار ۷: اندکس زخم‌زایی ایندومتاسین و عصاره سوکسله گیاه ناخنک بر حسب دوز در موش سوری  
به هر گروه از موش‌ها دوزهای ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی‌گرم بر کیلوگرم از عصاره سوکسله گیاه ناخنک (○) یا ایندومتاسین (●) به صورت خوراکی تجویز شده است. هر نقطه نمایانگر میانگین  $\pm$  خطای معیار در ۳ رت می‌باشد.  $P < 0/01$  اختلاف معنی‌دار نیست به اندومتاسین

### بحث و نتیجه‌گیری

ناخنک یا *Melilotus Officinalis* در طب سنتی به عنوان ضد درد، ضد التهاب، ضد سردرد و دردهای روماتیسمی و دردهای عصبی و میگرنی و نیز به عنوان آرام‌کننده و ضد اضطراب به کار می‌رود (۲، ۹، ۱۲). در این آزمایش اثرات ضد دردی عصاره متانولی ناخنک که به روش‌های پرکوله و سوکسله تهیه شده، در موش سوری نر با آزمون‌های Tail flick و فرمالین بررسی شده است. این مطالعه نشان داد که اگر میوه گیاه ناخنک با روش سوکسله توسط متانول ۸۰ درصد عصاره‌گیری شود، قادر است در دوزهای مختلف، اثرات ضد دردی قابل توجهی ایجاد کند. این

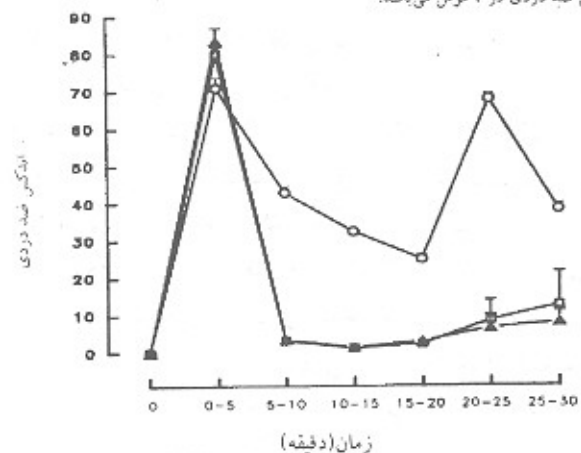
مقایسه اثر ضد دردی عصاره متانولی سوکسله در حضور نالوکسان به دو روش Tail flick و فرمالین

جهت یافتن مکانیسم اثر این عصاره، نالوکسان که یک آنتاگونیست و بلوک‌کننده انتخابی گیرنده‌های اپیوئیدی است، تجویز شد. ابتدا ۴ mg/kg نالوکسان به صورت زیرجلدی در ناحیه پشت حیوان تزریق گردید و پس از گذشت ۵ دقیقه، عصاره گیاهی با دوز ۲۰۰ mg/kg به صورت داخل صفاقی تزریق شد



نمودار ۵: اندکس ضد دردی مؤثرترین دوز عصاره سوکسله گیاه ناخنک در حضور نالوکسان بر حسب زمان در موش سوری با روش Tail flick

به موش‌ها مقدار ۱ ml/kg نرمال سالین (○) یا دوز ۲۰۰ mg/kg از عصاره سوکسله گیاه ناخنک در غیاب نالوکسان (□) یا همین دوز ۵ دقیقه پس از تزریق زیرجلدی ۴ mg/kg نالوکسان (▲)، به صورت داخل صفاقی تزریق گردیده است. هر نقطه نمایانگر میانگین  $\pm$  خطای معیار اندکس ضد دردی در ۷ موش می‌باشد.



نمودار ۶: اثر ضد دردی عصاره سوکسله گیاه ناخنک در حضور نالوکسان بر حسب زمان در موش سوری با تست فرمالین  
به هر گروه از موش‌ها نرمال سالین به میزان ۱ ml/kg (○) یا دوز ۲۰۰ میلی‌گرم از عصاره سوکسله گیاه ناخنک (□) یا همان دوز عصاره، ۵ دقیقه پس از تزریق زیرجلدی ۴ mg/kg نالوکسان (▲)، تزریق گردیده است. هر نقطه نمایانگر میانگین  $\pm$  خطای معیار در ۷ موش می‌باشد.

دور داشت.

این آزمایش برای بررسی مکانیسم درد و مواد ضد درد نیز بسیار مفید می‌باشد. داروهایی مانند ضد دردهای مخدر که اغلب به طور مرکزی عمل می‌کنند هر دو فاز درد ایجاد شده توسط فرمالین را مهار می‌نمایند در حالی که داروهایی مانند A.S.A، هیدروکورتیزون و دگزامتازون که به صورت ترجیحی در محیط عمل می‌کنند، تنها درد فاز دوم آزمایش فرمالین را مهار می‌کنند (۱۴). لذا با توجه به نتایج حاصل می‌توان اثر ضد التهاب را برای عصاره پیشنهاد کرد.

در آزمون فرمالین، تزریق دوز مؤثر ۲۰۰ mg/kg عصاره سوکسله نشان داد که این عصاره قادر نیست فاز اول درد (۵ دقیقه اول) را مهار کند ولی فاز دوم درد را مهار می‌کند بنابراین می‌توان گفت که عصاره به طور مرکزی عمل نکرده و اثر ضد دردی خود را از طریق محیطی اعمال می‌کند.

در آزمون فرمالین با توجه به این که A.S.A به طور محیطی عمل می‌کند، بر فاز دوم درد مؤثر است. اما مرفین به طور مرکزی عمل می‌کند ولی اغلب هر دو فاز را مهار می‌کند و با مقایسه دوز مؤثر ۲۰۰ mg/kg عصاره سوکسله با مرفین و A.S.A مشاهده شد که عصاره مشابه با A.S.A عمل کرده است و این مدرکی بر تأیید یافته‌های قبلی مبنی بر عملکرد محیطی عصاره می‌باشد.

در آزمون Tail-Flick، تقریباً در همه دوزها، بیشترین اثر ضد دردی ۱۲۰ دقیقه پس از تزریق عصاره، ایجاد می‌شود که این زمان رسیدن به حداکثر غلظت خونی ماده مؤثره یا متابولیت‌های آن است (۶). در این آزمون در زمان‌های ۴۵ و ۶۰ دقیقه نیز عصاره دارای اثر ضد دردی خوبی است که در زمان ۹۰ دقیقه این اثر کاهش یافته و پس از آن در دقیقه ۱۲۰ افزایش نشان می‌دهد. کاهش اثر ضد دردی در دقیقه ۹۰، احتمالاً به علت متابولیزه شدن ماده مؤثره می‌باشد و افزایش در دقیقه ۱۲۰ می‌تواند به علت تولید متابولیت‌های فعال باشد (۶) که قابل بررسی است.

با توجه به این که اثر ضد دردی عصاره در فاز دوم آزمون فرمالین قابل توجه بوده است و با توجه به این که فاز دوم درد در آزمون فرمالین ناشی از روند التهابی است (۲۶، ۲۷) لذا احتمال این که عصاره بر آنزیم سیکلواکسیژناز اثر مهاری داشته باشد، وجود دارد و همچنین احتمال بروز عوارض گوارشی نیز وجود دارد. به این منظور آزمون زخم‌زایی (اولسروژنیستی) انجام شد. در این آزمون مشخص شد که اثر زخم‌زایی عصاره نسبت به دوز مشابه ایندومتاسین خیلی کمتر است. با توجه به این یافته مشخص می‌شود که عارضه گوارشی عصاره گیاه ناخنک خیلی کمتر از ایندومتاسین است و به عنوان یک امتیاز مثبت برای این گیاه به

عصاره در تمامی دوزهای تزریق شده قادر به ایجاد پاسخ ضد دردی است و اختلاف معنی‌داری نسبت به گروه شاهد ایجاد می‌کند ( $P < 0.01$ ). دوز ۲۰۰ mg/kg دارای بیشترین اثر ضد دردی بوده و ۱۲۰ دقیقه پس از تزریق بیشترین اثر ضد دردی را نشان داده است ( $P < 0.01$ ). به نظر می‌رسد که دوز ۲۰۰ mg/kg قادر به ایجاد غلظت خونی کافی برای ایجاد حداکثر اثر ضد دردی می‌باشد (۶، ۷، ۸). کاهش اثر ضد دردی در دوز ۳۰۰ mg/kg می‌تواند به دلیل اثرات غیر فارماکولوژیک یا سمی عصاره باشد (۸). مقایسه اثر ضد دردی عصاره سوکسله با پرکوله در دوز ۲۰۰ mg/kg به روش Tail flick نشان می‌دهد که دوز سوکسله در زمان‌های ۳۰ و ۱۲۰ دقیقه پس از تزریق مؤثرتر عمل کرده است. بنابراین عصاره‌گیری به روش سوکسله و توسط متانول ۸۰ درصد روش بهتری برای استخراج مواد مؤثره‌ای است که باعث ایجاد بی‌دردی می‌شوند و احتمالاً ماده مؤثره گیاه به وسیله حرارت بهتر استخراج می‌شود. این یافته با یافته‌های قبلی در تحقیقات مشابه مطابقت دارد (۷) و همچنین با واقعیت‌های علمی مبنی بر این که عصاره‌گیری از اندام‌های سخت گیاهی به روش سوکسله مناسبتر است نیز همخوانی دارد (۴، ۱۱). A.S.A و مرفین به دلیل این که هر دو به عنوان ضد درد در بازار دارویی ایران موجود هستند، برای مقایسه با اثر ضد دردی عصاره استفاده گردیدند.

در مقایسه ۲۰۰ mg/kg عصاره سوکسله با A.S.A ۳۰۰ mg/kg و ۲/۵ mg/kg مرفین در روش Tail-Flick عصاره ناخنک در اغلب زمان‌های پس از تزریق اختلاف معنی‌داری نسبت به مرفین نداشت و در سه زمان اثر بهتری از خود نشان داد و از آنجا که مرفین شاهد مثبت است، هر قدر اختلاف با مرفین کمتر باشد بیانگر این است که اثر ضد دردی عصاره بیشتر بوده و به مرفین نزدیک‌تر است (۱، ۷). البته باید توجه داشت که حداقل دوز مرفین برای ایجاد اثر ضد دردی، دوز ۲/۵ mg/kg است ولی عصاره ناخنک با دوز ۲۰۰ mg/kg دارای بیشترین اثر ضد دردی است که با دوز ۲/۵ mg/kg مرفین قابل مقایسه است. با توجه به این که این عصاره به صورت تام استفاده شده است لذا تفاوت مشاهده شده دور از انتظار نیست و کارایی عصاره نسبتاً خوب است. مقایسه همین دوز عصاره با A.S.A نشان داده است که عصاره ناخنک نظیر A.S.A قادر به مهار فاز دوم درد می‌باشد. درد ایجاد شده در آزمایش فرمالین دارای دو فاز مشخص است که فاز اول احتمالاً نتیجه تحریک مستقیم گیرنده‌های درد در پنجه پای حیوان می‌باشد و فاز مرکزی است در حالی که در فاز دوم درد تا حد زیادی ناشی از فرآیند التهاب است (۱۴). هر چند نقش حساس شدن مسیرهای مرکزی درد را نیز نباید از نظر

حساب می‌آید.

از آن جا که اثر ضد دردی این عصاره در هیچ کدام از فازهای درد حاد و مزمن توسط نالوکسان ممانعت نشد، این تصور قوت می‌گیرد که سیستم اپیوئیدی احتمالاً در بی‌دردی ایجاد شده توسط عصاره نقشی ندارد.

در خاتمه می‌توان نتیجه‌گیری کرد که عصاره ناخنک می‌تواند به عنوان یک داروی ضد درد مطرح باشد و نتایج این تحقیق یک مدرک علمی در تأیید ادعاهای مردم در مصارف سنتی آن به عنوان ضد درد است. البته استفاده از آن به عنوان یک داروی تسکین دهنده درد، نیاز به اطلاعات بالینی بیشتری دارد. علاوه بر این، مواد مؤثره‌ای که احتمالاً ایجاد بی‌دردی می‌کنند و نحوه عمل آنها و همچنین سمیت آنها هنوز ناشناخته است که زمینه

تحقیق بیشتری را می‌طلبد.

با توجه به این که گیاه ناخنک در اغلب نقاط کشور ما می‌روید و تقریباً می‌توان گفت که بومی ایران است (۲۵)، بنابراین برای تحقیق و بررسی بسیار مناسب بوده و به راحتی در دسترس است. باید مطالعات بیشتری برای شناخت مکانیسم و اثرات ضد دردی و بررسی خواص فارما کویکتیک و فارما کودینامیک عصاره گیاه صورت گیرد تا شاید بتواند به صورت یک شکل دارویی، فرموله شده و به بازار دارویی عرضه گردد.

### سپاسگزاری

از زحمات خانم کریمی‌نژاد و خانم عظیمی و آقای وفاق‌زاده که در تهیه این مقاله همکاری نمودند، صمیمانه تشکر و قدردانی می‌شود.

### Summary

Analgesic and Ulcerogenic Effect of Methanolic Extract of *Melilotus Officinalis*

MR. Heidari, PhD.<sup>1</sup>, F. Najafi, Pharm D<sup>2</sup>., A. Asadi pour, PhD<sup>3</sup>., M. Ansari, PhD<sup>4</sup>., MJ. Zahedi, MD<sup>5</sup>. and M. Vahedian, MD.<sup>6</sup>

1. Associate Professor of Pharmacology & Toxicology, School of Pharmacy, Kerman University of Medical Sciences and Health Services 2. Pharmacist 3. Assistant Professor of Pharmaceutical Chemistry, 4. Instructor, School of Pharmacy, 5. Assistant Professor of Internal Medicine, 6. Assistant Professor of General Surgery, Kerman University of Medical Sciences and Health Services, Kerman, Iran

*In traditional medicine, Some plants are used as analgesic. The aim of this investigation was to evaluate the analgesic effect of "Melilotus Officinalis", which is used traditionally to relieve rheumatic pain, migrain and as anti-inflammatory agent. For this purpose different doses of the suxheleted and percolated extract of melilotus officinalis, were injected intraperitoneally to mice and the analgesic effect was determined by tail flick and formalin tests. The results showed that, suxheleted methanolic extract with doses of 50, 100, 200 and 300mg/kg induced significant analgesia effect in comparsion with the control group (P<0.01). The maximum analgesic effect was observed in 200mg/kg which reached to its peak at 120 min after injection (P<0.01). Analgesic effect of suxheleted extract was higher than percolated one. Pretreatment of animals with naloxane did not change the analgesic effect of the extract, therefore the involmment of opioid receptors was excluded in this respect. The ulcerogenicity test showed that the ulcerogenic effects of the extract was lower than that of the same dose of indomethacine. Overall the results indicated that the extract of the plant had analgesic effect.*

*Journal of Kerman University of Medical Sciences, 2001; 8(4): 210-219*

**key words:** Medicinal Plants, *Melilotus Officinalis*, Pain Measurement



## منابع

۱. احمدیانی، ابوالحسن؛ سمنانیان، سعید و فریدونی، مسعود: مهار درد حاد و مزمن با عصاره الکل ریزوم گیاه آقطی در موش صحرایی. مجله فیزیولوژی و فارماکولوژی ایران، ۱۳۷۲، جلد ۱، شماره ۲، پاییز و زمستان، ص ۱۲۷-۱۲۳.
۲. امین، غلامرضا؛ گیاهان دارویی سنتی ایران. انتشارات معاونت پژوهشی وزارت بهداشت درمان و آموزش پزشکی، جلد اول، چاپ فرهنگ، ۱۳۷۰، ص ۱۳۳.
۳. آئینه‌چی، یعقوب: مفردات پزشکی و گیاهان دارویی ایران. انتشارات دانشگاه تهران، چاپ دوم، ۱۳۷۰، ص ۲۰۰ و ۳۳۴ و ۱۰۴۰ و ۱۰۷۹.
۴. آئینه‌چی، یعقوب: روش‌های نوین تجزیه شیمیایی گیاهان. انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۵۸، ص ۳۵-۱.
۵. پویان، محمد: گیاهان دارویی جنوب خراسان. جلد اول و دوم، چاپ اول، نشر دانش، ۱۳۶۸، ص ۷۹.
۶. حسن‌زاده خیاط، محمود رضا: بیوفارمسی و کیتیک داروها. انتشارات دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ۱۳۷۱، ص ۲۴۰.
۷. حیدری، محمود رضا، دادوند، احسان و جلالی، سمیرا: بررسی اثر ضد دردی عصاره متانولی کلپوره در موش سوری به دو روش Tail flick و فرمالین. مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان، ۱۳۷۸، دوره ششم، شماره ۲، ص ۷۶-۶۷.
۸. حیدری، محمود رضا؛ شریفی‌فر، فریبا؛ اورنگی، بهروز و سلمانی بفرولی، محسن: بررسی اثر ضد دردی عصاره هیدروالکلی زنجبیل و فلفل سیاه به روش Tail-Flick در موش سوری. مجله دانشگاه علوم پزشکی کرمان، ۱۳۷۶، دوره چهارم، شماره ۳، ص ۱۱۳-۱۰۷.
۹. زرگری، علی: گیاهان دارویی. جلد اول، انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۶۸، ص ۶۲۳-۶۱۹.
۱۰. صمصام شریعت، سیدهادی؛ افشاری‌پور، صادق و معطر، فریبرز: درمان با گیاه و مبانی نسخه‌یجی گیاهی. چاپ سوم، ۱۳۶۶، ص ۲۰۶ و ۲۰۸.
۱۱. صمصام‌شریعت، سیدهادی: عصاره‌گیری و استخراج مواد مؤثره گیاهان دارویی و روش‌های شناسایی و ارزشیابی آنها. انتشارات مانی، ۱۳۷۱، ص ۱۰-۲۱.
۱۲. صمصام شریعت، سیدهادی: پرورش و تکثیر گیاهان دارویی. انتشارات مانی، چاپ اول، ۱۳۷۴، ص ۴۰۹ و ۴۱۰.
۱۳. میرحیدر، حسین: گنجینه اسرار گیاهان. جلد اول، انتشارات وحید، چاپ اول، ۱۳۶۳، ص ۱۹۲.
۱۴. واعظ مهدوی، محمدرضا: دیباچه‌ای بر روش‌شناسی مطالعات و پژوهش‌های درد. مرکز چاپ و انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۷۴، ص ۸، ۹، ۱۳، ۱۴.
۱۵. والاگ، ژان و استودولار، زیری: گیاهان دارویی، روش‌های کشت، برداشت و شرح مصور ۲۵۶ گیاه. ترجمه: ساعد، زمان: انتشارات قنوس، چاپ اول، ۱۳۷۰، ص ۲۳۰.
۱۶. هارپون، ج.ب: روش‌های نوین تجزیه شیمیایی گیاهان. ترجمه: آئینه‌چی، یعقوب: انتشارات دانشگاه تهران، ۱۳۵۸، ص ۶، ۷، ۲۴۴ و ۲۴۵.

17. Abbott FV, Melzack R and Samuel C. Morphine Analgesia in Tail flick and Formalin pain tests is mediated by different neural systems. *Exp Neurol* 1982; 75(3): 644-651.
18. Biswas AR, Ramaswamy S and Bapna JS. Analgesic effect of Momordica charantia seed extract in mice and rats. *J Ethnopharmacol* 1991; 31(1): 115-118.
19. Dehpour AR, Mani AR, Amanlou M, Nahavandi A, Amanpour S and Bahadori M. Naloxone is protective against Indomethacin induced gastric damage in cholestatic rats. *J Gastroenterol* 1999; 34(2): 178-181.
20. Dehpour AR, Mani AR, Alikhani Z et al. Enhancement of aspirin-induced gastric damage by cholestasis in rats. *Fundam Clin Pharmacol* 1998; 12(4): 442-445.
21. Elisabetsky E and Castilhos ZC. Plants used as analgesics by Amazonian caboclos as a basis for selecting plants for investigation. *Int J Crude Drug Res* 1990; 28(4): 309-320.
22. Heidari MR, Khalili F, Ghazi-Khansari M, Hashemi B and Zarrindast MR. Effect of picrotoxin on antinociception in the formalin test. *Pharmacol Toxicol* 1996; 78(5): 313-316.
23. James A. Duke CRC. Handbook of Medicinal Herbs, Boca Raton, Florida, CRC Press Inc 1985; 305.
24. Murray MD and Brater DC. Renal toxicity of the nonsteroidal anti-inflammatory drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 1993; 33: 435-465.

25. Rechinger K.H: Flora Iranica. Austria, 1984; PP199-206.
26. Shibata M, Ohkubo T, Takahashi H and Inoki R. Modified Formalin test: Characteristic biphasic pain response. *Pain* 1989; 38(3): 347-352.
27. Tjolsen A, Berge OG, Hunskaar S, Rosland JH and Hole K. The formalin test: an evaluation of the method. *Pain* 1992; 51(1): 5-17.