www.mums.ac.ir
Medical Journal of Mashhad
University of Medical Sciences
Vol. 67, No.1, P: 26-39
Mar-May2024

مجله دانشکده پزشکی دانشگاه علوم پزشکی مشهد
سال ۶۷، شماره ۱
فروردین-اردیبهشت۱۴۰۳ صفحه ۲۶-۳۹

مقاله اصلی

ارزیابی اثرات ضد دردی عصاره *Eremostachys laevigata*

تاریخ دریافت: ۱۴۰۲/۰۱/۰۶ - تاریخ پذیرش: ۱۴۰۲/۱۱/۲۸

پریسا احمدنیا [۱]
حسن نورافکن [۲*]
اسد اسدی [۳]
علی فرامرزی [۴]

[۱] دانشجوی دکتری گیاهان داروئی؛ ادویه ایی و نوشابه ایی، گروه علوم باغبانی، واحد میانه، دانشگاه آزاد اسلامی، میانه، ایران
[۲] استادیار گروه علوم باغبانی، مرکز تحقیقات گیاهان دارویی و محصولات ارگانیک، واحد میانه، دانشگاه آزاد اسلامی، میانه، ایران(نویسنده مسول)
[۳] استادیار فارماکولوژی، تخصصی دامپزشکی، واحد میانه، دانشگاه آزاد اسلامی میانه
[۴] استادیار اکولوژی کشاورزی، زراعت، واحد میانه، دانشگاه آزاد اسلامی میانه، ایران.

Email: hassannourafcan@gmail.com

خلاصه

مقدمه: *Eremostachys* spp. به عنوان یک داروی گیاهی رایج در طب سنتی ایران با کاربردهای پزشکی ضد درد در نظر گرفته شده است. برای بررسی اثرات ضد دردی گیاه سنبل بیابانی رفیع ، عصاره‌های متانولی، آب مقطری، کلروفرمی، عصاره ان- هگزانی و استونی ریشه استخراج شده و ۳۰ دقیقه قبل از درد ناشی از فرمالین، تزریق اسید استیک و روش صفحه داغ، در غلظت ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم به موش تزریق شد. کنترل‌های مثبت و منفی به ترتیب مورفین و نرمال سالین بودند. غلظت ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره ریشه گیاه می‌تواند به اندازه مورفین در تسکین درد ناشی از فرمالین مؤثر باشد. در آزمایش صفحه داغ و فرمالین، عصاره گیاهی ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم می‌تواند درد را به اندازه مورفین تسکین دهد، اما در آزمایش اسید استیک تاثیر چندانی ندارد و این نشان می‌دهد که ممکن است از طریق سیستم عصبی مرکزی نسبت به سیستم محیطی عمل کند. میزان فنولیک با استفاده از روش فولین سیوکالتیو تعیین شد. کل فلاونوئیدها با روش رنگ سنجی کلرید آلومینیوم به روش اسپکتروفتومتری اندازه گیری شدند. مقدار کل فنولیک ۶/۸۷ میلی گرم بر گرم وزن خشک بود که براساس استاندارد اسید گالیک (GAE) و فلاونوئید ۰/۱۹ میلی گرم بر گرم وزن خشک براساس استاندارد روتین (RE) بیان شده بود. دو گلیکوزید ایریدوئیدی ضد درد، فلوئوزید I و سزاموزید با کمک HPLC مقدماتی فاز معکوس از ریشه این گیاه جدا گردیدند. بنابراین، عصاره متانولی ریشه *E. laevigata* می‌تواند کاندید مناسبی برای در نظر گرفتن بعنوان یک مسکن باشد.

کلمات کلیدی: چله داغی، سوکسله، تسکین دهنده درد، موش آزمایشگاهی

پی نوشت: این مطالعه فاقد تضاد منافع می‌باشد.

Doi: 10.22038/MJMS.2022.61665.3608

مقدمه

درد شدید یا مزمن یک احساس ناخوشایند است که در اثر آسیب یا تخریب بافتی ایجاد شده و می‌تواند توسط محرکهای شیمیایی، الکتریکی، حرارتی و مکانیکی القا شود که ممکن است فرد را بطور طولانی مدت اذیت کند (Morshedi et al., 2011). لذا، تلاش‌های مثمر ثمر زیادی برای شناسایی راههای کاهش درد یا از بین بردن درد انجام شده است (Rabie et al., 2015).

داروهای مسکن شیمیایی فراوانی با عوارض جانبی در صورت استفاده بیش از حد، وجود دارد که منجر به این قضیه می‌شود که به داروهای گیاهی و طبیعی توجه زیادی شود که ایمن‌تر، ارزان‌تر و دسترسی به آنها آسان‌تر می‌باشد (Asgari and Parvin, 2011). علاوه بر این، ترکیبات فعال طبیعی آنها باعث ایجاد تعادل زیستی بدن در برابر تجمع داروها می‌شود (Nasri, 2012).

Eremostachys spp. گیاهی دارویی با نام میله بیابانی متعلق به خانواده *Lamiaceae* است که دارای ۶۰ گونه شناخته شده است که عمدتاً در خاورمیانه و آسیای مرکزی و غربی از جمله افغانستان، پاکستان، ترکیه و ایران پراکنده شده است (Reshinger, 1982; Mozaffarian, 1996; Delazar et al., 2004). در ایران ۱۵ گونه *Eremostachys* در ارتفاعات دماوند، تا آذربایجان شرقی و غربی گزارش شده است. *Eremostachys* spp. به ویژه *E. laevigata* و *E. laciniata* به نام نام آذری چله داغی یا çilə dağı در ایران شناخته می‌شوند (Jamshidi and Ramezani, 2016). *Eremostachys laevigata* Bung گونه‌ای همیشگی و دائمی است که به طور گسترده در ارمنستان، ترکمنستان و روسیه (Azizian and Cutler, 1982)، کوه‌های زاگرس ایران (Ghahreman, 1996)، بزگوش، کوههای قافلانکوه میانه، ایران (Mozaffarian and Ramezani, 2013) پراکنده شده است. این گیاه یک گیاه چند ساله است که به عنوان درختچه‌ای پشمالو با ارتفاع ۱۰۰-۱۵۰ سانتی متر با گلهای سفید و بنفش از آوریل تا ژوئن یافت می‌شود. به طور سنتی در ایران به ویژه در آذربایجان شرقی از آن استفاده می‌شود (Mozaffarian and Ramezani, 2013).

خواص ضد درد و ضد التهابی از چندین گونه‌ی *Eremostachys* گزارش شده است (Azizian and Cutler, 1982). در طب سنتی ایران، ریشه‌ی برخی از گونه‌های *Eremostachys* که بیشتر در ماه آگوست جمع آوری می‌شوند (Mozaffarian and Ramezani, 2013) به عنوان یک داروی ضد درد و ضد التهاب به طور موضعی برای درمان دردهای موضعی، کبودی و تورم استفاده می‌شوند (Said et al., 2002; Delazar et al., 2004). چندین مورد در مورد داروهای مسکن، ضد التهاب، ضد درد، ضد مالاریا، ضد باکتری، ضد افسردگی و ضد اکسید کننده‌ی حاصل از گیاه *E. laciniata* گزارش شده است (Delazar et al., 2009; Modarresi et al., 2009; Khan et al., 2010; Nisar et al., 2011; Asgharian et al., 2017). *Eremostachys laciniata* به صورت خوراکی برای درمان آلرژی، سردرد و اختلالات کبدی (Said et al., 2002) و به عنوان نرم کننده و ملین ای برای تسکین ورم مفاصل در ایران استفاده شده است. گزارش شده است که *E. macrophyllai*s برای درمان زخم‌ها، نیش مار، روماتیسم و دردهای مفصلی نیز استفاده می‌گردد (Nori-Shargh et al., 2007).

Delazar و همکاران (۲۰۰۹) اثرات ضد درد عصاره متانولی و قسمتهای فاز جامد استخراج شده از ریزوم *E. laciniata* در موش‌ها را نشان دادند. Gharabagy و همکاران (۲۰۱۳) دریافتند که عصاره گیاه *E. laciniata* برای کاهش درد پس از جراحی رحم برداری (هیسترکتومی) بدون عوارض جانبی بطور قابل توجهی مؤثر است. Khan و همکاران (۲۰۱۰) اثرات ضد التهابی عصاره‌های متانولی، هگزانی، کلروفرمی، اتیل استاتی، بوتانولی و آبی *E. laciniata* را ارزیابی کردند و این گیاه را به عنوان منبع عالی از مواد ضد التهابی مهم معرفی نمودند.

به طور کلی، فنل ها، فلاونوئیدها و ایریدوئیدها به عنوان دو گروه مسکن و تسکین دهنده درد شناخته شده‌اند (El-Naggar and Beal، 1980؛ Dinda et al.، 2007؛ Delazar et al.، 2009). تحقیقات شیمیایی بر روی *Eremostachys* spp. نشان داد که در عصاره‌ها فلاونوئیدها و گلیکوزیدهای مونوترپن، آلکالوئیدها، کومارین ها (Gella and Vavilova، 1981؛ Azizian and

Cutler، 1982) و همچنین ایریدوئیدها (Calis et al.، 2007) وجود دارند. عصاره ریزوم *E. laciniata* منبع مهمی از آلکالوئیدها، گلیکوزیدهای ایریدوئید، فلاونوئیدها، فیتواسترول ها، تانن ها، رزین‌ها، کربوهیدرات، نشاسته، پروتئین‌ها، گلیکوزیدها، کومارین، ترپونیدها، استروئیدها و ساپونین می‌باشد (Modarresi et al., 2009; Nisar et al., 2011; Rehman et al., 2015; Asnaashari et al., 2015). مشتقات فرولیک اسید، دی ترپن گلیکوزید فورانول آبدان، گلیکوزیدهای ایریدوئید و گلیکوزیدهای فنیل اتانوئید از عصاره ریزومهای *E. glabra* شناسایی شده‌اند (Delazar et al.، 2004، 2006). لوآزین A و B و لوآزیوفولین و ارموزید A تا C نیز از عصاره *E. loasifolia* جدا گردیده‌اند (Mughal et al.، 2010؛ Ali et al.، 2012). تحقیقات دیگر وجود گلیکوزیدهای ایریدوئید در *E. moluccelloides* و ساختار ایزوفلاون را در عصاره *E. vicaryi* را نشان دادند (Calis et al.، 2007؛ Imran et al.، 2012). ان-هگزان و دیکلرومتان ریزومهای *E. macrophylla*، در عصاره‌های متانولی وجود دارند که آن را به عنوان منبع خوبی از ایریدوئیدها و حاوی دو جزء ایریدوئید ۶- هیدروکسیل لوگانین و لمالبید معرفی می‌کنند (Delazar and Asnaashari، 2018). Modarresiو همکاران (۲۰۱۳) به روش شیمیایی عصاره متانولی ریشه *Eremostachys Azerbaijananica* که یک گیاه ضد درد و ضدالتهاب موضعی است، را مورد مطالعه قرار دادند و گلیکوزیدهای ایریدوئید شامل لمالبید، پولچلوزید I و سزاموزید را گزارش کردند. *E. laevigata* در استان لرستان برای تسکین درد ناشی از نیش حشرات یا خزندگان استفاده می‌گردد (Amiri et al., 2007). علیرغم استفاده معمولی از *E. laevigata* در داروهای سنتی ایرانی، تحقیقات علمی بسیار محدودی در مورد خواص ضد درد این گونه انجام شده است.

هدف از این مطالعه یافتن ماهیت ضد دردی و میزان خاصیت ضد درد عصاره متانولی ریشه *E. laevigata* بود.

روش کار

مواد گیاهی

گیاه چله داغی با نام محلی در آگوست ۲۰۱۷ از روستای چرن واقع در نزدیکی کندوان، میانه، استان آذربایجان شرقی، ایران (37° 40′ 18″ N, 47° 32′ 52″ E، 2600 متر بالاتر از سطح دریا) جمع آوری شد. گیاهان توسط فلورا ایرانیکا شناسایی شدند (Reshinger, 1982). یک نمونه (TUM-ADE 0204) برای این مجموعه در هرباریوم دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، ایران نگهداری شده است.

آماده سازی عصاره‌های ریشه

ریشه گیاهان جمع آوری شده در سایه خشک شده و سپس با مخلوط کن آسیاب شده و پودر می‌شوند. مقدار ۵۰ گرم پودر گیاه توسط دستگاه سوکسله با استفاده از متانول ۸۰٪، آب مقطر، استون، کلروفرم و استون به عنوان حلال به مدت ۶ ساعت استخراج و در دستگاه روتاری (تبخیر کننده دوار) در دمای ۴۰~ ۴۲ درجه سانتی گراد قرار داده شده و سپس در دمای ۳۷ درجه سانتی گراد به مدت ۲۴ ساعت در آون، خشک شد. سپس محلول مادر با حل ۴۰۰ میلی گرم عصاره خشک در ۱ میلی لیتر نرمال سالین ۰,۹٪ در دمای ۴ درجه سانتی گراد نگهداری شد، و رقیق شد تا عصاره‌های گیاهی ۱۰۰، ۲۰۰ و ۳۰۰ میلی گرم در میلی لیتر به دست آید.

جداسازی گلیکوزید ایریدوئید

عصاره متانولی (۲ گرم)، استونی، کلروفرمی، آب مقطری و ان-هگزانی از طریق استخراج فاز جامد (SPE) با استفاده از یک کارتریج Waters, USA) C18 Sep-Pak)، با ترکیبات متفاوت مخلوط متانول/آب رقیق شدند (۹۰:۱۰، ۸۰:۲۰، ۴۰: ۶۰، ۶۰:۴۰ ۸۰:۲۰ و ۱۰۰: ۰). عصاره‌های متانولی، استونی، کلروفرمی، ان-هگزانی و عصاره آب مقطری با HPLC فاز معکوس (آلمان، D-14163) با ستون C18 (طول ۲۵۰ میلی متر، ۴,۶ میلی متر) مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفت (Delazar et al., 2013).

میزان فنول کل (TPC)

میزان فنول کل عصاره‌ها به روش فولین -سیوکالتو (Kaur and Kapoor, 2002) تعیین شد، سپس با استفاده از منحنی کالیبراسیون محاسبه شد و نتایج بر حسب میلی گرم اسید گالیک بر گرم وزن خشک عصاره‌ها گزارش گردید.

میزان فلاونوئید کل (TFC)

میزان کل فلاونوئیدهای (TFC) عصاره‌ها با استفاده از روش کلرید آلومینیوم تعیین گردید (Chang et al., 2002)، سپس منحنی کالیبراسیون رسم شده و نتایج بر حسب میلی گرم روتین بر گرم خشک عصاره‌ها محاسبه و گزارش شد.

گروه‌های آزمایشی

گروه‌های آزمایشی شامل شش گروه عصاره گیاهی در رقتهای ۱۰۰، ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم در میلی لیتر و همچنین شاهد مثبت (مورفین ۱۰ میلی گرم در کیلوگرم) و کنترل منفی (نرمال سالین) بودند. سه تکرار در هر گروه آزمایشی با سه موش نر انجام شد.

حیوانات آزمایشگاهی

NMRI موش‌های نر بالغ با وزن ۲۵-۳۰ گرم از خانه حیوانات دانشکده دامپزشکی، دانشگاه تهران، تهران، ایران که در قفسهای پلی پروپیلن نگهداری شدند و در شرایط استاندارد نگهداری از حیوانات (دمای ۲±۲۳ درجه سانتیگراد، رطوبت نسبی ۵ ± ۵۰ و چرخه‌های تاریک/روشنایی ۱۲/۱۲ ساعت) بودند، تهیه شدند. روش تجربی توسط کمیته اخلاقی حیوانات سازمانی (IAEC) تأیید گردید و مطابق با استانداردهای Zimmerman's برای مدیریت درد عمل کردند (Tekey et al.، 2012).

مطالعات ضد دردی

اثرات ضد درد عصاره متانولی، استونی، کلروفرمی، ان-هگزانی و آب مقطری ریشه *E. laevigata*، با استفاده از سه روش زیر مورد بررسی قرار گرفت.

۱،۸،۲. آزمون فرمالین

موش‌ها به مدت ۱ ساعت در ظرف پلی پروپیلن شفاف (۳۰×۳۰ × ۳۰ سانتی متر) برای سازگاری (آداپتیشن) نگهداری شدند. ظرف برعکس روی یک میز شیشه‌ای قرار گرفتند و یک آینه با زاویه ۴۵ درجه در زیر آنها قرار داشت تا حرکت پاهای موش قابل مشاهده باشد. سی دقیقه پس از تزریق داخل صفاقی تیمارهای ذکر شده در هر بخش گروههای آزمایشی، به پنجه عقبی راست ۵۰ میکرولیتر فرمالین ۲،۵٪ بطور زیر جلدی با استفاده از سرنگ انسولین تزریق شد. حیوانات به طور مداوم پس از ۰-۵، ۱۵-۶۰ دقیقه برای واکنش درد از جمله لیس زدن و گاز گرفتن پای تزریق شده زیرنظر قرار گرفته شدند. پاسخ‌های درد به عنوان شدت درد بر اساس مقیاس درد زیر نمره گذاری گردیدند (Hunskaar et al., 1986).

۰: حیوان روی پنجه تزریق شده قدم می زند یا محکم می‌ایستد

۱: پنجه تزریق شده مطلوب یا تا حدی بالا رفته است

۲: پنجه تزریق شده به وضوح از روی زمین برداشته شد

۳: موش پنجه تزریق شده را لیس زد، جوید یا تکان داد.

۵ دقیقه اول و ۱۵ تا ۶۰ دقیقه پس از تزریق به ترتیب به عنوان مرحله پاسخ زود و مرحله پاسخ دیر در نظر گرفته شد (Dubuisson and Dennis, 1997).

۲،۸،۲. انقباضات شکمی ناشی از اسید استیک

همه حیوانات قبل از آزمایش داخل یک جعبه شیشه‌ای شفاف به مدت ۳۰ دقیقه با محیط آزمایشگاه سازگار شدند. عصاره متانولی، استونی، ان- هگزانی، آب مقطری و کلروفرمی گیاه در غلظت‌های ذکر شده و مورفین و سالین نرمال به صورت داخل صفاقی با سرنگ انسولین (۱۰ میلی لیتر/کیلوگرم وزن موش) به موشها تزریق شد. سی دقیقه پس از تزریق داخل صفاقی ۰،۶٪ اسید استیک به حیوانات به میزان ۱۰ میلی لیتر بر کیلوگرم وزن موش برای شبیه سازی درد تزریق گردید. تعداد انقباضات شکمی و انقباض کامل هر دو پای موش دقایقی پس از تزریق اسید استیک در مدت زمانهای ۰-۵، ۵-۱۰، ۱۰-۱۵، ۱۵-۲۰، ۲۰-۲۵، ۲۵-۳۰، ۳۰-۴۵ و ۴۵-۶۰ شمارش شد (Collier et al., 1968).

۳،۸،۲. آزمون صفحه داغ

موش‌ها را به مدت ۳ تا ۵ دقیقه روی یک صفحه خاموش قرار دادند تا با شرایط دستگاه سازگار شوند سپس آنها را روی صفحه فلزی داغ که دمای ۵۰ درجه سانتیگراد داشت، قرار دادند که توسط یک استوانه پلکسی گلاس به ارتفاع ۲۶ و قطر ۱۹ سانتی متر احاطه شده بود تا از پریدن حیوانات جلوگیری شود. فقط موش‌هایی که در عرض ۲۰ ثانیه پاسخ درد اولیه (زود) را نشان دادند، برای مطالعه انتخاب شدند. موش‌ها قبل از تزریق تیمارهای ذکر شده روی صفحه داغ قرار گرفتند و زمان پاسخ موشها به

محرک درد به عنوان مقدار پایه در نظر گرفته شد. سپس، ۳۰ دقیقه پس از تزریق داخل صفاقی، مدت زمان پاسخ حیوانات در ۵، ۱۰، ۱۵، ۲۰، ۲۵، ۳۰، ۴۵ و ۶۰ دقیقه ثبت گردید. زمان سپری شده بین قرار دادن حیوان روی صفحه داغ و بروز لیسیدن پنجه‌های عقبی، تکان دادن یا پریدن از سطح به عنوان پاسخ تأخیری (دیر) در چند ثانیه ثبت شد. زمان قطع تاخیرهای صفحه داغ ۳۰ ثانیه تعیین شد. درصد محافظت در برابر محرک درد حرارتی با توجه به فرمول زیر محاسبه شد (Eddy and Leimbach, 1953; Cicero et al., 1996):

$$\text{درصد محافظت در برابر محرک حرارتی} = \frac{\text{پایه} - \text{تأخیر آزمون}}{\text{پایه} - \text{قطع کردن}} \times ۱۰۰$$

آنالیز آماری

داده‌های بدست آمده در قالب طرح کاملاً تصادفی با سه تکرار و با استفاده از نرم افزار SPSS نسخه ۱۹. مورد تجزیه و تحلیل قرار گرفتند. میانگین‌ها براساس آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ مقایسه شدند.

نتایج

آزمون فرمالین

تزریق داخل صفاقی ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره متانولی ریشه *E. laevigata*، ۳۰ دقیقه قبل از تزریق فرمالین نمی‌تواند درد ناشی از آن را در مرحله اولیه (زود) کاهش دهد، اما در مرحله آخر به طور قابل توجهی ضد درد است. با این حال، غلظت ۲۰۰، ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره گیاه می‌تواند درد ناشی از فرمالین را در مرحله اولیه و مرحله پایانی کاهش دهد. در مرحله آخر، افزایش غلظت عصاره گیاه منجر به اثرات ضد درد بیشتری می‌شود (یعنی با افزایش غلظت عصاره گیاه اثرات ضد درد آنهم بیشتر می‌گردد). غلظت ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره متانولی ریشه گیاه تفاوت معنی داری در اثر ضد درد ناشی از فرمالین در هر دو مرحله اولیه و آخر با مورفین نداشت (جدول ۱) همچنین سایر عصاره‌ها اثرات ضد درد را نشان نمی‌دهند.

جدول ۱. شدت درد ناشی از فرمالین تحت تأثیر عصاره متانولی ریشه *Eremostachys laevigata*، مورفین و تزریق سالین نرمال

تیمارها		مرحله اولیه (فاز زود) (۰-۵ دقیقه)	مرحله آخر (فاز دیر)(۱۵-۶۰ دقیقه)
عصاره گیاهی (میلی گرم بر کیلوگرم)	**100**	1.7 ^{b} (15)	2.4 ^{ab} (10)
	200	1.4 ^{c} (30)	2.1 ^{b} (23)
	300	1.0 ^{d} (49)	1.7 ^{cd} (35)
	400	0.7 ^{e} (56)	1.4 ^{de} (65)
مورفین		0.5 ^{e} (79)	1.2 ^{e} (56)
کنترل		2.0 ^{a}	2.7 ^{a}

* داده‌ها به صورت میانگین (درصد سکونت در مقایسه با گروه نرمال سالین) و حروف هستند. حروف مشابه در هر ستون تفاوت غیرمعنی داری را با توجه به آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ نشان می‌دهد. (n = 9 در هر گروه)

انقباضات شکمی ناشی از اسید استیک در موش

انقباضات شکمی به عنوان یک واکنش درد به تدریج طی ۲۰ دقیقه اولیه پس از تزریق اسید بدنبال سالین نرمال افزایش یافت اما به طور قابل توجهی تا ۶۰ دقیقه کاهش یافت، که نشان دهنده یک واکنش طبیعی و سازگاری تدریجی بدن موش‌ها برای ایجاد درد بعد از ۲۰ دقیقه است. پدیده مشابه نیز به وضوح در عصاره‌های گیاهی و تزریق مورفین مشاهده گردید.

جدول ۲. انقباضات ناشی از اسید استیک تحت تأثیر عصاره متانولی ریشه *Eremostachys laevigata*، مورفین و تزریق نرمال سالین

مواد تزریقی	غلظت (mg/kg)	مدت زمان پس از تزریق (دقیقه)								
		0 – 5	5 – 10	10 – 15	15 – 20	20 – 25	25 – 30	30 – 45	45 - 60	میانگین
عصاره *E. laevigata*	100	7.8 ab (7) *	8.2 ab (8)	8.9 a (3)	9.3 ab (7)	7.2 b (12)	5.8 b (15)	4.9 b (17)	4.7 ab (11)	7.1 (9)
	200	7.2 bc (14)	8.0 ab (10)	8.4 ab (3)	8.9 bc (11)	6.7 bc (18)	5.2 b (24)	4.4 bc (25)	4.0 bc (25)	6.6 (15)
	300	6.7 cd (20)	7.3 bc (18)	8.0 bc (13)	8.4 cd (16)	6.0 cd (26)	4.3 c (37)	3.8 cd (36)	3.6 c (32)	6.0 (23)
	400	5.9 d (30)	6.7 c (25)	7.2 c (22)	7.8 d (22)	5.6 d (32)	3.7 c (46)	3.2 d (46)	2.8 d (47)	5.3 (32)
مورفین	10	3.0 e (64)	3.4 d (62)	4.1 d (55)	4.7 e (53)	3.3 e (60)	2.3 d (66)	1.6 e (73)	1.1 e (79)	2.9 (63)
نرمال سالین	-	8.4 a	8.9 a	9.2 a	10.0 a	8.2 a	6.8 a	5.9 a	5.3 a	7.8
میانگین		6.5	7.1	7.6	8.2	6.2	4.7	4.0	3.6	

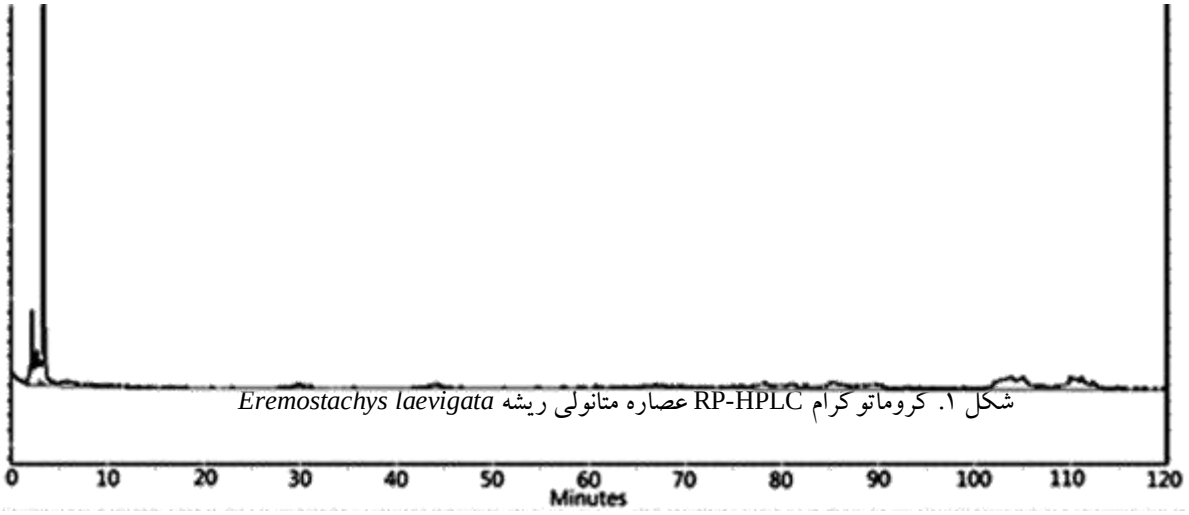
* داده‌ها به صورت میانگین (درصد سکونت در مقایسه با گروه نرمال سالین) و حروف هستند. حروف مشابه در هر ستون تفاوت غیرمعنی داری را با توجه به آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ نشان می‌دهد. (n = 9 در هر گروه)

جدول ۳. زمان تأخیر در آزمایش صفحه داغ در موش‌های تیمار شده با عصاره متانولی ریشه *Eremostachys laevigata*، مورفین و تزریق نرمال سالین

مواد تزریق شده	**غلظت (mg/kg)**	**زمان تأخیر (دقیقه)**								
		5	**10**	**15**	**20**	**25**	**30**	**45**	**60**	**میانگین**
عصاره *E. laevigata*	**100**	5.0 c	4.3 d	4.6 c	3.1 c	3.0 c	2.7 d	1.7 c	1.1 c	3.2 c
	200	6.6 c	5.0 d	4.1 c	3.4 c	3.0 c	2.7 d	1.7 c	1.1 c	3.4 c
	300	8.2 bc	12.3 c	27.4 b	43.1 b	34.1 b	28.8 c	24.9 b	23.1 b	25.2 b
	400	11.6 b	23.8 b	34.7 a	48.6 a	42.2 a	37.0 b	34.4 a	32.6 a	33.1 ab
مورفین	**10**	15.2 a	29.6 a	36.8 a	48.7 a	45.0 a	42.8 a	37.4a	35.3 a	36.3 a
نرمال سالین		1.1 d	1.1 d	1.1 c	1.7 c	1.7 c	1.1 d	1.1 c	1.1 c	1.2 c
میانگین		7.9	12.7	18.1	24.8	21.5	19.2	16.8	15.7	

* داده‌ها به صورت میانگین (درصد سکونت در مقایسه با گروه نرمال سالین) و حروف هستند. حروف مشابه در هر ستون تفاوت غیرمعنی داری را با توجه به آزمون دانکن در سطح احتمال ۵٪ نشان می‌دهد. (n = 9 در هر گروه)

به طور کلی، هیچ یک از عصاره‌های گیاهی رقیق شده در هر دوره زمانی معینی نمی‌تواند به عنوان مورفین ضد درد باشد. به عبارت دیگر، مورفین در مجموع حدود دو برابر بیشتر از رقت ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره گیاه اثر ضد درد داشت. رقت ۱۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره متانولی گیاه تنها با سالین نرمال در ۲۰-۴۵ دقیقه متفاوت بود. در ۵ تا ۲۰ دقیقه اول پس از تزریق اسید استیک، به عنوان اوج درد، رقت‌های ۱۰۰ و ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم عصاره متانولی گیاه نمی‌تواند هیچ اثر ضد درد مهمی را ایجاد کند. با این حال، تیمار ۲۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم در ۱۵ دقیقه پایانی می‌تواند در مقایسه با کنترل منفی، مسکن مهمی باشد. عصاره متانولی گیاه در رقتهای ۳۰۰ و ۴۰۰ میلی گرم بر کیلوگرم، در همه زمان‌ها به طور قابل توجهی مسکن بود و دارای اثر تسکین دهندگی بود اما نه در مدت زمان ۴۵-۶۰ دقیقه (جدول ۲)، همچنین سایر عصاره‌ها اثرات ضد درد را نشان نمی‌دهند.



شکل ۱. کروماتوگرام RP-HPLC عصاره متانولی ریشه *Eremostachys laevigata*

آنالیز HPLC مقدماتی فاز معکوس مربوط به عصاره متانولی ریشه *E. laevigata* دو ساختار گلیکوزید ایریدوئید، که بدون شک با نامهای فلوئوزید I (Rt: ۳,۳۳ دقیقه) و سزاموزید (Rt: ۱۰۰,۷۳ دقیقه) هستند (شکل ۱) رانشان داد، همچنین عصاره استونی، کلروفرمی، ان- هگزانی و آب مقطری حاوی گلیکوزید ایریدوئید نبود.

میزان فنولیک با استفاده از معرف فولین-سیوکالتو در متانول، استون، کلروفرم، ان-هگزان و عصاره آب مقطر و محتویات فلاونوئید در عصاره‌های گیاهی با استفاده از کلرید آلومینیوم به روش رنگ سنجی اندازه گیری شد. کل محتوای فنلی عصاره متانولی ریزوم، بدست آمده از منحنی کالیبراسیون (y = 12. 29x + 0.299، R2 = 0.927)، معادل 6.87 گالیک اسید در هر گرم، و کل محتوای فلاونوئید (y = 0.392 - 0.008، 0.2 = R2، 0.999) معادل 0.19 روتین در هر گرم بود، همچنین سایر عصاره‌ها حاوی فنل و فلاونوئیدها نبودند.

فنولیک کل و محتویات فلاونوئیدی MeOH استخراج شده از قسمت‌های هوایی *Eremostachys macrophylla* Montbr متعاقباً دارای فلاونوئیدهای بیشتری با مقادیر ۴۸,۶۷۴ ± ۰,۰۴۲۰ میلی گرم GAE بر ۱۰۰ گرم عصاره (معادل گالیک اسید بر ۱۰۰ گرم) و ۰,۸۴۴ ± ۰,۰۳ میلی گرم کوئرستین در ۱۰۰ گرم عصاره خشک بود (Asgharian *et al*., 2017).

Uddinو همکاران (۲۰۱۲) دریافتند که TPC در عصاره متانولی *Portulaca oleracea* L.برابر ۳,۶ میلی گرم گالیک اسید در هر گرم وزن خشک است. مشاهده شد که مقدار کل فنولیک عصاره

متانولی برگ *Coleus blumei* Benth برابر ۱,۱۷ میلیگرم در وزن خشک و فلاونوئیدهای کل معادل ۷,۸ کوئرستین بر میلیگرم وزن خشک بود، کل محتوای فنلی عصاره متانولی برگ در *Salvia officinalis* L. برابر ۱,۹۵۸ میلی گرم بر گرم وزن خشک و کل محتوای فلاونوئید عصاره متانولی برابر ۵,۱۲ میلیگرم کوئرستین بر گرم وزن خشک گیاه بود، مقدار کل فنولیک عصاره متانولی برگها در *Lavandolla officinalis* L. برابر ۰,۹۷۷ میلیگرم بر گرم وزن خشک و کل محتوای فلاونوئیدی برابر ۲,۲ کوئرستین در میلیگرم وزن خشک بود، مقدار کل فنل در عصاره متانولی برگ در *Rosmarinus officinalis* برابر ۱,۷۱۳ میلی گرم بر گرم وزن خشک و کل محتوای فلاونوئیدی ۱ کوئرستین بر میلیگرم وزن خشک مشاهده شد، کل فنل در عصاره متانولی برگ در *Melissa officinalis* L برابر ۱,۶۸۸ میلی گرم در گرم وزن خشک و مقدار کل فلاونوئید برابر ۰,۲ کوئرستین در میلیگرم وزن خشک بود (Sytar et al., 2018). در نتیجه، با توجه به میزان کل فنل موجود در این گیاه، برخی از اثرات ضد درد را می‌توان به فنل نسبت داد.

بحث

Eremostachys spp. بیشتر به دلیل خواص ضد درد و ضد التهابی خود با کاربردهای گسترده‌ی در طب سنتی ایران مورد توجه قرار می‌گیرد (Delazar et al., 2009). *E. laevigata* گونه‌ای است که در استان آذربایجان شرقی، ایران توسط مردم بومی رشد داده شده و استفاده می‌گردد (Mozaffarian, 1996). با این حال، جنبه ضد درد آن کمتر مطالعه شده است. این تحقیق به طور تجربی توانایی ضد درد قابل توجهی از عصاره متانولی ریشه *E. laevigata* را نشان داد. عصاره‌های استونی، کلروفرمی و عصاره آب مقطری با استفاده از سه روش تحریک کننده درد مورد بررسی قرار گرفتند.

در آزمایش فرمالین، عصاره متانولی ریشه *E. laevigata* می‌تواند به طور قابل توجهی درد ناشی از فازهای عصبی اولیه و مزمن التهابی ثانویه ناشی از تزریق زیر جلدی فرمالین در موش را کاهش دهد. مرحله اولیه احتمالاً نتیجه تحریک مستقیم گیرنده‌های درد در پنجه موش است، در حالی که مرحله ثانویه عمدتاً ناشی از پیشرفت تدریجی و مداوم التهاب است (Shibata et al., 1989; Heidari et al., 1996). همانطور که به طور معمول در داروهای مؤثر بر اعصاب مرکزی مانند مواد افیونی (تریاک) شناخته شده است، از مراحل اولیه و دیررس جلوگیری می‌کند (Hunskaar and Hole، 1987؛ Skilling et al.، 1990). این همان چیزی است که دقیقاً در مورفین به عنوان یک ماده افیونی یافت شد. در حالی که داروهای محیطی مانند هیدروکورتیزون و دگزامتازون فقط فاز دوم را مهار می‌کنند (Hunskaar and Hole، 1987؛ Shibata et al.، 1989). عصاره متانولی برگ مریم گلی (*Salvia officinalis*) همچنین باعث مهار قابل توجهی در دو مرحله حاد و مزمن درد ناشی از فرمالین در موش صحرایی می‌شود (Qnais et al., 2018). در مرحله اولیه و انتهایی به ترتیب ۵۲ و ۶۰ درصد مهار کننده درد بود. با این حال، ما با استفاده از عصاره متانولی ریشه چله داغی ۶۵ و ۵۶ درصد اثر ضد درد در مرحله اولیه و دیررس را مشاهده کردیم.

عصاره متانولی ریشه چله داغی وابسته به دوز بود و باعث کاهش تعداد انقباضات شکمی ناشی از تزریق اسید استیک گردید. در واقع، آزمایش‌های انقباض شکمی در مکانیسم‌های تسکین دهندگی درد (مکانیمهای مسکن) نقش دارند (Gene et al., 1998). انقباضات شکمی با حساسیت گیرنده‌های درد به پروستاگلاندین ها مرتبط هستند و داروهای ضد درد آنها احتمالاً از طریق سنتز عوامل مهار کننده پروستاگلاندین، خواص درمانی آنها را القا می‌کند (Ferreira, 1972). گمان می‌شود که اثرات تسکینی یافته شده در عصاره چله داغی با مکانیسم‌های جانبی پشتیبانی می‌شود. تزریق داخل صفاقی اسید استیک سطح پروستاگلاندین ها را در مایع صفاقی افزایش می‌دهد و برخی گیرنده‌های صفاقی را درگیر می‌کند و با القای نفوذپذیری مویرگی باعث ایجاد درد التهابی می‌شود. این مکانیسم احتمالاً به دلیل مهار مسیر سیکلواکسیژناز و لیپوکسیژناز در بافتهای محیطی است (Vinoth prabhu et al., 2011). بنابراین، فعالیت ضد درد گیاهان احتمالاً به دلیل سرکوب پروستاگلاندین اکسیداز و

گیرنده‌های درد است (Ferreira, 1972). تزریق عصاره متانولی برگ مریم گلی تعداد انقباضات شکمی را ۶۴٫۳٪ کاهش داد (Qnais et al., 2018) در مقایسه با ۳۲٪ مهار درد انقباض شکمی با تزریق ۴۰۰ میلی گرم در میلی لیتر عصاره متانولی چله داغی. این نتایج نشان می‌دهد که هر دو ترکیب گیاهی ذکر شده دارای اثر یکسانی هستند.

عصاره متانولی ریشه چله داغی به ویژه در غلظتهای بالا مدت زمان درد ناشی از حرارت ایجاد شده توسط صفحه داغ را که با تزریق مورفین در برخی مواقع پس از تزریق قابل مقایسه بود، بطور قابل توجهی کاهش می‌داد. آزمایش صفحه داغ مدلی از درد حاد فوق نخاعی است (Dubisson and Dennis, 1997) که در آن التهاب موضعی و تولید پروستاگلاندین های موضعی نقشی در ایجاد درد ندارند. بنابراین، اگر دارویی در این مدل اثر ضد درد قوی نشان دهد، به این معنی است که اثرات ضد درد آن از طریق سیستم عصبی مرکزی نخاع و مغز اعمال می‌شود (Paulino et al., 2012). عصاره چله داغی احتمالاً دارای اثرات ضد درد مرکزی است. آزمایش صفحه داغ در *E. laciniata* نشان داد که عصاره متانولی به دلیل گلیکوزیدهای ایریدوئید با مهار گیرنده‌های NMDA باعث کاهش کلسیم داخل سلولی می‌شود (Delazar et al., 2009) و در نتیجه فعالیت آنزیم سنتز کننده نیتریک اکسید و فسفولیپاز A ممانعت شده و بنابراین از تشکیل پروستاگلاندین ها جلوگیری کرده و تأثیر آنها را کاهش می‌دهد (Toker et al., 2004). گزارش شده است که در آزمایش صفحه داغ، عصاره متانولی *E. laciniata* اثرات ضد درد قابل توجهی را در ۴۵ دقیقه پس از تزریق نشان داد. تسکین درد عصاره متانولی ریشه *E. laevigata* دوام بیشتری داشت و تا ۶۰ دقیقه ادامه پیدا کرد.

مطالعات شیمیایی بر روی *Eremostachys* نشان دهنده وجود گلیکوزیدهای ایریدوئید، فلاونوئیدها، آلکالوئیدها، کومارین ها و گلیکوزیدهای مونوترپن است (Azizian and Cutler, 1982; Kim et al., 2003). وجود گلیکوزیدهای ایریدوئید نیز از گیاه *Eremostachys* spp گزارش شده‌اند (Delazar et al., 2004; Calis et al., 2007). ایریدوئیدها، متابولیت های ثانویه اصلی این گونه، متابولیت های ثانویه گیاهان و جانوران زمینی و دریایی هستند و در تعداد زیادی از خانواده‌های گیاهی معمولاً به صورت گلیکوزیدها یافت می‌شوند. گلیکوزیدهای ایریدوئید از گونه‌های مختلف گیاهان با طیف گسترده‌ای از خواص دارویی و زیستی جدا شده‌اند که از جمله خواص آن خاصیت ضد التهاب، ضد زخم، تقویت کننده، ضد چربی خون، ضد درد، محافظت کننده کبدی، محافظ عصبی و نوریتوژنیک می‌باشد (Dinda et al., 2007, 2009; Dinda et al., 2011). دو ساختار گلیکوزیدی ایریدوئید مثل ۶- هیدروکسیل لوگانین و لمالبید مربوط به اثرات ضد درد نیز از عصاره متانولی ریزومهای *E. macrophylla* به دست آمدند (Delazar and Asnaashari, 2018). علاوه بر این، سه گلیکوزید ایریدوئید شامل لمالبید، pulchelloside I و سزاموزید جدا شده از عصاره متانولی ریشه *E. Azerbaijananica* دارای اثرات ضد التهابی و ضد درد هستند (Modarresi et al., 2013). گلیکوزیدهای ایریدوئید و یک ترکیب ایزوفلاون به ترتیب در *Eremostachys moluccelloides* و *Eremostachys vicaryi* یافت شده‌اند (Calis et al., 2007; Imran et al., 2012). Suksamrarn و همکاران (۲۰۰۲) اثرات ضد درد و ضد التهابی گلیکوزیدهای ایریدوئید را تأیید می‌کنند. فلوئوزید و سزاموزید در عصاره متانولی ریشه *E. laevigata* مشابه گلیکوزیدهای ایریدوئید جدا شدند (Modarresi et al., 2009, 2013). این ترکیبات از طریق مکانیسم‌هایی مانند مهار آنزیم‌های سیکلواکسیژناز، لیپوکسیژناز و هیالورونیداز، دارای اثرات ضد التهابی هستند.

فلاونوئیدها و ترکیبات فنلی شناسایی شده در عصاره متانولی ریشه این گیاه می‌توانند خواص ضد درد موجود *E. laevigata* را توجیه کنند. اثر ضد درد فلاونوئیدها و ترکیبات فنلی (Bang et al., 2009) در گیاهان ثابت شده است. اثر ضد درد کوئرستین، که یک ترکیب فلاونوئیدی است، در القای درد توسط اسید استیک و همچنین فرمالین و آزمایشات حرارتی صفحه داغ گزارش شده است (Kaur et al., 2005; Valrio et al., 2009). مطالعات نشان داد که ترکیباتی مانند تیمول، فلاونوئیدها، پلی فنول ها و لیمونن ها در خانواده Lamiaceae ممکن است درد ناشی از سیستم تریاکی را کاهش دهد (Ghafari et al., 2006).

فلاونوئیدها سنتز پروستاگلاندین E را به عنوان گیرنده درد در پاسخ به محرک‌های التهابی مهار می‌کنند و در نتیجه با مهار آنزیم سیکلواکسیژناز درد را کاهش می‌دهند (Rezazadeh et al., 2009). ترکیبات فنلی و فلاونوئیدی مهارکننده آنزیم سنتز نیتریک اکسید هستند که با تزریق فرمالین باعث ایجاد درد می‌شوند (Sung et al., 2000).

نتیجه گیری

عصاره متانولی ریشه *E. laevigata* با استفاده از سه آزمون القای درد شامل فرمالین، اسید استیک و آزمون صفحه داغ با خواص ضددردی مشخص شد. در آزمایش فرمالین، اسید استیک و صفحه داغ، به ترتیب بر روی سیستم عصبی مرکزی، محیطی مؤثر بودند. استون، کلروفرم، ان-هگزان بخاطر غیر قطبی بودن، ترکیبات ضد درد را استخراج نمی‌کند، در نتیجه هیچ اثر ضد دردی نداشتند. آنالیز شیمیایی نشان داد که وجود فلاونوئید و فنل کل در عصاره‌های متانولی گیاه دلیل احتمالی برای خاصیت ضد درد *E. laevigata* است. از آنجا که تمام ترکیبات شناسایی شده از *E. laevigata* از نظر ساختاری متعلق به گروه گلیکوزیدهای ایریدوئید با اثرات ضد التهابی و ضد درد هستند، بنابراین انتظار می‌رود که استفاده سنتی و محلی از ریشه این گیاه در درمان التهابات و دردهای موضعی منطقی و مفید باشد.

References

Ali, B., Meh mood, R., Mughal, U.R., Malik, A., Safder, M., Hussain, R., Imran, M. & Tareen, R.B. 2012. Eremosides A–C, new iridoid glucosides from *Eremostachys loasifolia*. Helvitica Chimica Acta Journal 95(4): 586-593.

Amiri, H., Meshkat Al Sadat, M.H. & Lari Yazdi, H. 2007. Chemical composition of the essential oil of *Eremostachys Laevigata* bung. Daru Journal of pharmaceutical Sciences 15(1): 34- 40.

Asgari, A. & Parvin, N. 2013. The Analgesic effect of ethanolic extract of *Tanacetum parthenium* in acetic acid model. Zahedan Journal of Research in Medical Sciences 15(8): 22-25.

Asgharian, P., Delazar, A., Vatankhah, A.M., Javadzadeh, M. & Asnaashari, S. 2017. *In vitro* bioactivity and phytochemical evaluation of extracts from aerial parts of *Eremostachys macrophylla* Montbr. & Auch. The Iranian Journal of Pharmaceutical Research 4(2): 65-73.

Asnaashari, S., Heshmati Afshar, F., Ebrahimi, A., Bamdad Moghaddam, S. & Delazar, A. 2015. *In vitro* antimalarial activity of different extracts of *Eremostachys macrophylla* Montbr. & Auch. BioImpacts 5(3): 135-140.

Azizian, D. & Cutler, D.F. 1982. Anatomical, cytological and phytochemical studies on *Phlomis* L. and *Eremostachys* Bunge (Labiatae). Botanical Journal of the Linnean *Society* 85(4): 249 – 281.

Bang, J.S., Oh, D.H., Choi, H.M., Sur, B.J., Lim, S.J., Kim, J.Y.,Yang, H.I., Yoo, M.C., Hahm, D.H. & Kim, K.S. 2009. Anti-inflammatory and antiarthritic effects of piperine in human interleukin 1β- stimulated fibroblast-like synoviocytes and in rat arthritis models. *Arthritis Research* and *Therapy* 11(2): 1-9.

Calis, I., Guvenc, A., Armagan, M., Koyuncu, M., Charlotte, H., Gotfredsen, C.H. & Jensen, S.R. 2007. Secondary metabolites from *Eremostachys laciniata*. Natural *Product Communications* 3(2): 117-124.

Cicero, T.J., Nock, B. & Meyer, E.R. 1996. Gender- related differences in the antinociceptive properties of morphine. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics 279(2): 276-773.

Collier, H.O., Dinneen, L.C., Johnson, C.A. & Schneider, C. 1968. The abdominal constriction response and its suppression by Analgesic drugs in the mouse. The *British Journal of Pharmacology*. Chemotherapy 32(2): 295-310.

Chang, M., Yang, H. & Wen, J. 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. Journal of Food and Drug Analysis 10: 178-182.

Delazar, A. & Asnaashari, S. 2018. Two iridoid structures from *Eremostachys macrophylla* Montbr. & Auch. Journal of Reports in *Pharmaceutical Sciences* 7(2): 221-226.

Delazar, A., Heshmati Asl, B., Mohammadi, O., Heshmati Afshar, F., Nahar, L., Modarresi, M., Nazemiyeh, H. & Sarker, S.D. 2009. Evaluation of analgesic activity of *Eremostachys laciniata* in mice. Journal of Natural Remedies 9(1): 1-7.

Delazar, A., Modarresi, M., Shoeb, M., Nahar, L., Reid, R.G., Kumarasamy, Y., Majinda, R.R.T. & Sarker, S.D. 2006. Eremostachiin: a new furanolabdane diterpene glycoside from *Eremostachys glabra*. Natural *Product Research* 20(2): 72-167.

Delazar, A., Shoeb, M., Kumarasamy, Y., Byres, M., Nahar, L., Modarresi, M. & Sarker, S.D. 2004. Two bioactive ferulic acid derivatives from *Eremostachys glabra*. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences* 12(2): 49-53.

Delazar, A., Sarker, S.D., Nahar, L., Jalali, S.B., Modarresi, M. & Hamedeyazdan, S. 2013. Rhizomes of laciniata: isolation and structure elucidation of chemical constituents and a clinical trial on inflammatory diseases. *Advanced Pharmaceutical Bulletin* 3: 385.

Dinda, B., Chowdhury, D.R. & Mohanta, B.C. 2009. Naturally occurring iridoids, secoiridoids and their bioactivity. An updated review, part 3. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 57(8): 96-765.

Dinda, B., Debnath, S. & Banik, R. 2011. Naturally occurring iridoids, secoiridoids. An updated review, part 4. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 59(7): 33- 803.

Dinda, B., Debnath, S. & Harigaya, Y. 2007. Naturally occurring secoiridoids and bioactivity of naturally occurring iridoids and secoiridoids. A review, part 2. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 55(5): 689-728.

Dubuisson, D. & Dennis, S.G. 1997. The fomalin test: a quantitative study of the analgesic effects of morphine, meperidine, and brain stem stimulation in rat and cats. Pain 4(2): 74-161.

Eddy, N. B. & Leimbach, D. 1953. Synthetic analgesics. II. Dithienylbutenyl-and dithienylbutylamines. *Journal of Pharmacology* and Experimental Therapeutics 107(3): 93-385.

Eftekharsadat, B., Shakouri, S.K., Shimia, M., Rahbar, M., Ghojazadeh, M., Rashidi, M.R. & Faraji, M.H. 2010. Effect of *E. laciniata* (L) ointment on mild and moderate carpal tunnel syndrome: a double- blind, randomized clinical trial. *Phytotherapy* Research 25(2): 5-290

El-Naggar, L.J. & Beal, J.L. 1980. Iridoids. A review. The *Journal of Natural Products* 43(6): 649 - 707.

Ferreira, S.H. 1972. Prostaglandins aspirin-like drugs and analgesia. Nature New biology 240(102): 3-200.

Gella, E.V. & Vavilova, N.K. 1981. Monoterpen glycosides of *Eremostachys fetissovii*. *Khimija* Prirodnykh Soyedineniy 3: 390-391.

Gene, R.M., Segura, L., Adzet, T., Marin, E. & Iglesias, J. 1998. Heterotheca inuloides: anti-inflammatory and analgesic effects. Journal of *Ethnopharmacology* 60(2): 62-157.

Ghafari, H., Yasa, N., Mohammadirad, A., Dehghan, G., Zamani, M.J., Nikfar, S., Khorasani, R., Minaie, B. & Abdollahi, M. 2006. Protection by *Ziziphora clinopoides* of acetic acid-induced toxic bowel inflammation through reduction of cellular lipid peroxidation and myeloperoxidase activity. Human & Experimental Toxicology 25(6): 32- 325.

Ghahreman, A. 1996. Flora of Iran in Natural Colors. Research Institute of Forests and Rangelands Publisher, P 20, Tehran.

Gharabagy, P.M., Zamany, P., Delazar, A., Ghojazadeh, M. & Goldust, M. 2013. Efficacy of *Eremostachys laciniata* herbal extract on mitigation of pain after hysterectomy surgery. *Pakistan Journal* of *Biological Sciences* 16(17): 4- 891.

Hadipour, A., Azizi, M., Naghdi Badi, H., Panahandeh, J., Delazar, A. & Aroei, H. 2016. Phytochemical Diversity of *Eremostachys laciniata* Bunge Populations in Iran. *Journal* of *Medicinal Plants* 15(57): 9-17.

Heidari, M.R., Sharififar, F., Orangi, B. & Salmani-Befrouei, M. 1996. Analgesic effect of hydroalcoholic extract of Zingiber and piper nigrum in mice by tail-flick test. Journal of *Kerman University* of *Medical Sciences* 4(3): 107-113.

Hunskaar, S., Berge, O.G. & Hole, K. 1986. Dissociation between anti-inflammatory effects of acetylsalicylic acid and indomethacin in the formalin test. Pain. 25(1): 32-125

Hunskaar, S. & Hole, K. 1987. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory. Pain. 30(1): 14-103.

Imran, M., Mehmood, R., Mughal, U.R., Ali, B. & Malik, A. 2012. Vicarin, a new isoflavone from *Eremostachys vicaryi*. Journal of *Asian* Natural *Products Research* 14(3): 6-293.

Jamshidi, S. & Ramezani, A. 2016. Azerbaijanian Plant Local Names., with Persian, English & Scientific Equal Names. Norouzi Publication, P 35, Gorgan.

Kaur, R., Singh, D. & Chopra, K. 2005. Participation of α_2 receptors in the antinociceptive activity of quercetin. *Journal* of Medicinal *Food* 8(4): 32-529.

Kaur, C. & Kapoor, H.C. 2002. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. *International Journal* of *Food Science* & *Technology* 37: 153-161.

Khan, S., Nisar, M., Simjee, S.U., Rehman, W., Khan, R., Jan, I. & Momin, D. 2010. Evaluation of micronutrients level and antinociceptive property of *Eremostachys laciniata* (L). *African Journal of Biotechnology* 9(5): 775-777

Kim, S.R., Koo, K.A., Sung, S.H., Ma, C.J., Yoon, J.S. & Kim, Y.C. 2003. Iridoids from *Scrophularia buergeriana* attenuate glutamate-induced neurotoxicity in rat cortical cultures. Journal of *Neuroscience Research* 74(6): 55- 948.

Modarresi, M., Delazar, A., Nazemiyeh, H., Fathi-Azad, F., Smith, E., Rahman, M.M., Gibbons, S., Nahar, L. & Sarkaer, S.D. 2009. Antibacterial iridoid glucosides from *Eremostachys laciniata*. *Phytotherapy* Research 23(1): 99 – 103.

Modarresi, M., Foladnia, M., Rafiee, Z., Jafari, A. & Zarzasangan, K. 2013. Iridoid glycosides from *Eremostachys azerbaijanica* Rech. f. Root. *Journal* of *Medicinal Plants* Research 2(46): 66-77.

Morshedi, A., Dashti Rahmatabadi, M.H., Dehghan Harati, M., Bagherinasab, M.A. & Salami, A.S. 2011. The effect of *Artemisia sieberir* Besser. On inflammatory and neurogenic pain in mice. Journal of Medicinal. Plants 10(40): 48-57.

Mozaffarian, V. 1996. A Dictionary of Iranian Plant Names. Farhang Moaser Publisher, P 42, Tehran.

Mozaffarian, V. & Ramazani, A. 2013. Bozghoosh Vegetation & An Introduction to New species. Nashr Kashan, P 20, Kashan.

Mughal, U.R., Fatima, I., Malik, A. & Tareen, R.B. 2010. Loasifolin, a new flavonoid from *Eremostachys loasifolia*. Journal of *Asian* Natural *Products Research* 12(4):30-328.

Nasri, S. 2012. A review of the analgesic use of medicinal plants in Iran. Journal of Islamic and Iranian Traditional Medicine 3(3): 293-310.

Nisar, M., Khan, S., Dar, A., Rehman, W., Khan, R. & Jan, I. 2011. Antidepressant screening and flavonoids isolation from *Eremostachys laciniata* (L) Bunge. *African Journal of Biotechnology* 10 (9): 1696-1699.

Nori-Shargh, D., Kiaei, S.M. & Deyhimi, F. 2007. The volatile constituents analysis of *Eremostachys macrophylla* Montbr. & Auch. from Iran. Natural *Product Research* 21(8): 733–735.

Paulino, N., Scremin Paulino, A., Vautier, P., Pisco, L., Passarelli, C., Matheus de Freitas Costa, J., Michalik, D., Celso Pardi, P. & Agustin Quincoces Suárez, J. 2012. Evaluation of Anti nociceptive and Anti-Inflammatory Effects of Synthetic O-Prenylated Phenolic Derivatives. *Pharmacy* and *Pharmacology* 3(3): 348-357.

Rabiei, Z., Hojjati, M.R., Moradi Nafchi, A. & Rafieian Kopaei, M. 2015. Effect of various doses of *Lavandula officinalis* on acute pain in rat. *Razi Journal of Medical Sciences* 22(135): 115-121.

Rechinger, K.H. 1982. Flora Iranica Akademische Druck-U Verlagsanstalt, Graz 150(2): 108-216.

Rehman, H.U., Saeed, R., Iqbal, T., Ahmad, N., Khan, M.G.R., Munir, T., Alam, H.S., Saddique, M., Shah, I.U., Aslam, M.M. & Kanwal, Z.G. 2015. Antibacterial and phytochemical evaluation of the crude extract and Fractions of *Eremostachys laciniata*. *International Journal* of *Basic Medical Sciences* and *Pharmacy* 5(1): 3-20.

Rezazadeh, S.H., Zaringhalam, J., Manaheji, H. & Kebriaeezadeh, A. 2009. Anti-inflammatory and anti-hyperalgesic activities of *Stachys athorecalyx* on CFA-induced inflammation. *Journal* of. *Medicinal Plants Research* 3(5): 368-376.

Said, O., Khalil, K.h., Fulder, S. & Azaizeh, H. 2002. Ethnopharmacological survey of medicinal herbs in Israel, the Golan heights and the west bank region. Journal of *Ethnopharmacology* 83(3): 65 – 251.

Shibata, M., Ohkubo, T., Takahashi, H. & Inoki, R. 1989. Modified formalin test: characteristic biphasic pain response. Pain 38(3): 52-347.

Skilling, S.R., Smullin, D.H. & Larson, A. 1990. Differential effects of C- and N-terminal substance P metabolites on the release of amino acid neurotransmitters from the spinal cord: potential role in nociception. Journal of *Neuroscience Research* 10(4): 18-1309.

Suksamrarn, A., Kumpun, S., Kirtikara, K., Yingyongnarongkul, B. & Suksamrarn, S. 2002. Iridoids with anti-inflammatory activity from *Vitex peduncularis*. *Planta Medica* 68(1): 3-72.

Sung, H., Nah, J., Chun, S., Park, H., Yang, S.E. & Min, W.K. 2000. *In vivo* antioxidant effect of green tea. *European Journal of Clinical Nutrition* 54(7): 9-527

Sytar, O., Hemmerich, I., Zivcal, M., Rauh, C. & Brestic, M. 2018. Comparative analysis of bioactive phenolic compounds composition from 26 medicinal plants. Saudi Journal of Biological Sciences 25(4): 631-641.

Tekye, E., Moghadamnia, S., Eidi, A., Taghizadfarid, R., Ferdosi, R. & Zarringhalam, J. 2012. Investigation on the anti-inflammatory and analgesic of *Olea europaea* L. metanolic extract on male NMRI mouse. *Iranian South Medical Journal* 15(1): 13-24.

Toker, G., Kupeli, E., Memisoglu, M. & Yesilada, E. 2004. Flavonoids with antinociceptive and anti-inflammatory activities from the leaves of *Tilia argentea* (silver linden). Journal of *Ethnopharmacology* 95(2-3):7-393

Uddin, M.K., Juraimi, A.S., Ali, M.E. & Ismail, M.R. 2012. Evaluation of antioxidant properties and mineral composition of purslane (Portulaca oleracea L.) at different growth stages. *International Journal of Molecular* Sciences 10257–10267.

Valrio, D.A., Georgetti, S.R., Magro, D.A., Casagrande, R., Cunha, T.M., Vicentini, F.T., Vieira, S.M., Fonseca, M.J., Ferreira, S.H., Cunha, F.Q. & Verri Jr, W.A. 2009. Quercetin reduces inflammatory pain: inhibition of oxidative stress and cytokine production. *Journal of Natural Products* 72(11): 9-1975.

Vinoth Prabhu, V., Nalini, G., Chidambaranathan, N. & Sudrshan Kisan, S. 2011. Evaluation of anti-inflammatory and analgesic activity of *tridax procumbens* linn against formalin, acetic acid and CFA- induced pain models. International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences 3(2): 126-130.

Original Article

Investigation Antinociceptive Effects of Eremostachys laevigata Extracts

Received: 26/03/2023 - Accepted: 17/02/2024

Parisa Ahmadnia [1]
Hassan Nourafcan [2]
Assadi Assadi [3]
Ali Faramarzi [4]

[1] *PhD studentDepartment of Horticulture, College of Agriculture, Miyaneh Branch, Islamic Azad University, Miyaneh, Iran*

[2] *Assistant Professor Department of Horticulture, Miyaneh Branch, Islamic Azad University, Miyaneh, Iran*

[3] *Assistant ProfessorDepartment of Veterinary medicine, Miyaneh Branch, Islamic Azad University, Miyaneh, Iran*

[4] *Assistant Professor Department of Agronomy, College of Agriculture, Miyaneh Branch, Islamic Azad University, Miyaneh, Iran*

Email:
hassannourafcan@gmail.com

Abstract
Eremostachys spp. have been considered as common herbal medicine in Iranian folk medicine, with pain relief medical applications. To investigate antinociceptive effects of Eremostachys laevigata, methanol, distilled water, chloroform, N-hexan and acetone extracts of root were extracted and injected to mice 30 minutes before pain induced by formalin, acid acetic injection and hot plate methods, in the concentrations of 100, 200, 300 and 400 mg/kg. The positive and negative controls were morphine and normal saline, respectively. Remarkable antinociceptive effect was observed in plant root methanol extract on the pain caused by formalin injection in both acute and chronic phases, visceral pain induced by acetic acid test, and increasing of pain tolerance duration in hot plate test. In hot plate and formalin test, the plant extract of 400 mg/kg could relief the pain as much as morphine, but not in acetic acid test, indicating that it may act through the central nervous than peripheral system. The phenolic content was determined using Folin-Ciocalteu assay. The total flavonoids were measured spectrophotometrically by the aluminium chloride colorimetric assay. The amount of total phenolic was 6.87 mg/g dry weight, expressed as gallic acid equivalents (GAE) and flavonoid was 0.19 mg/g dry weight expressed as rutin equivalents (RE). Two antipain iridoid glucosides, phloyoside I and Sesamoside have separated reversed-phase preparative HPLC from the root of this plant. Therefore, E. laevigata root methanol extract could be a suitable candidate for being considered as pain reliever.

Key words: antipain, Chelle-Daghi, desert rod, pain reliever

Acknowledgement: There is no conflict of interest