جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

اثر ضد درد و ضد التهاب عصاره تام فراکسیون فلاونوئید و اسانس گل‌اروانه

(*Salvia hydrangea*)

دکتر ولی‌اله حاج هاشمی[1]؛ دکتر علیرضا قنادی؛ دکتر دادفر موسوی

چکیده مقاله.

مقدمه. گل اروانه با نام علمی *Saliva hydrangea*، درطب سنتی، به عنوان مسکن، برطرف کننده سردرد، ضد سرماخوردگی، ضد تب، برطرف‌کننده درد معده و ادرارآور استفاده شده امّا تاکنون تحقیقات فارماکولوژیک بر روی این گیاه صورت نگرفته است. هدف این مطالعه بررسی اثر ضد درد و ضد التهاب گیاه مزبور می‌باشد.

روشها. ابتدا از برگ و گل گیاه عصاره تام، فراکسیون فلاونوئیدی و اسانس تهیه شد و برای بررسی اثر ضد درد دو تست Light tail flick و رایزینگ ناشی از اسید استیک به کار رفت. در تست اول از راتهای نر از نژاد ویستار و با وزن ۱۸۰ تا ۲۲۰ گرم و در تست دوم از موشهای سوری با وزن ۲±۲۵ گرم استفاده شد. اثر ضد التهاب با استفاده از تست کاراژینان در رات‌های با وزن ۱۸۰ تا ۲۲۰ گرم سنجش شد.

نتایج. عصاره تام و فراکسیون فلاونوئیدی در تست Light tail flick اثر ضد درد نداشتند در حالی که مرفین به عنوان یک داروی ضد درد استاندارد پس از ۱۵ دقیقه حدود ۳۵ درصد حداکثر پاسخ ضد درد و پس از ۳۰ دقیقه حدود ۹۰ درصد حداکثر پاسخ ضد درد را ایجاد نمود. در تست رایزینگ ناشی از اسید استیک، عصاره تام و فراکسیون فلاونوئید اثر ضد درد قابل ملاحظه‌ای داشتند به طوری که اثرات آنها با ایندومتاسین (به عنوان یک داروی شاهد مثبت) قابل مقایسه بود. در تست کاراژینان، عصاره تام و فراکسیون فلاونوئیدی اثر ضد التهاب قابل توجهی داشتند در حالی که اسانس اثر کمی داشت.

بحث. باتوجه به این که در تست Light tail flick داروهای ضد درد قوی نظیر اپیوئیدها جواب می‌دهند، می‌توان گفت که این گیاه فاقد مواد ضد درد با ویژگیهای اپیوئیدی است. از طرف دیگر ایجاد پاسخ ضد درد عصاره تام و فراکسیون فلاونوئید در تست رایزینگ ناشی از اسید استیک و اثرات ضد التهاب آنها در تست کاراژینان بیانگر این مطلب است که این گیاه احتمالاً در کنترل درد، خصوصاً دردهای با منشاء التهابی می‌تواند مؤثر واقع شود.

● *واژه‌های کلیدی.* گل اروانه، اثر ضد درد، اثر ضد التهاب، فلاونوئید.

مقدمه.

گل اروانه با نام علمی *Salvia hydrangea* از گیاهان تیره نعناع (Labiatea) و از جنس مریم گلی (Salvia) می‌باشد. این گیاه در بسیاری از نقاط ایران، از جمله اطراف شهرهای کرج، قزوین، زنجان، تبریز، ارومیه، مراغه، همدان، کرمانشاه، سنندج، آباده، اقلید، اصطهبانات، بروجن، خوانسار، دهاقان و اصفهان به طور طبیعی می‌روید (۱).

گیاهان جنس مریم گلی در درمان نقرس، روماتیسم، سردردهای یک طرفه، سردردهای عصبی و خیز به کار می‌روند (۲) و در طب سنتی نیز از گل اروانه به عنوان مسکن، برطرف کننده سردرد، ضد سرماخوردگی، ضد تب، برطرف کننده درد معده و ادرارآور استفاده شده است (۳، ۴).

ترکیبات مؤثر گیاه گل اروانه شامل فلاونوئیدها و روغن فرّار (اسانس) می‌باشد. مطالعات انجام شده روی فلاونوئیدهای گیاه، منجر به استخراج و خالص سازی ۵ فلاونوئید از برگ شده است. در مطالعات انجام شده بر روی روغن فرار حاصل از گیاه گل اروانه، جمعاً ۱۲ ترکیب در اسانس گل (۸ ترکیب منوترپن و ۴ سزکویی‌ترپن) و ۱۳ ترکیب در اسانس برگ (۱۱ منوترپن و ۲ سزکوئی‌ترپن) شناسایی شده است (۵).

از آنجایی که در طب سنتی برای گل اروانه اثر تسکینی قایل بوده‌اند و با استناد به این مطلب که فلاونوئیدها متابولیسم اسیدآراشیدونیک را وقفه می‌دهند (۷، ۶)، بنابراین، با در نظر گرفتن این موارد و باتوجه به این که تاکنون روی این گیاه مطالعه فارماکولوژیک صورت نگرفته است، به بررسی اثر ضد درد و ضد التهاب عصاره تام، فراکسیون فلاونوئید و اسانس این گیاه می‌پردازیم.

روشها.

● جمع آوری گیاه. این گیاه از منطقه دهاقان (۲۰۹۰ متر ارتفاع از سطح دریا) جمع‌آوری و در سایه خشک شد.

● شناسایی گیاه. پس از تهیه چند نمونه هرباریومی از گیاه، این نمونه‌ها در مؤسسه تحقیقات جنگلها و مراتع کرج، شناسایی و تعیین نام علمی گردید.

● تهیه عصاره تام. ابتدا به نسبت مساوی از برگ و گل گیاه، مقدار ۵۰ گرم توزین و سپس با کمک آسیاب، به صورت پودر در آورده شد. به

۱- گروه فارماکولوژی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی و خدمات بهداشتی - درمانی استان اصفهان، اصفهان.

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد

پودر حاصل به نسبت ۱ به ۱۳، اتانول ۷۰ درصد اضافه و به مدت ۴۸ ساعت در محیط آزمایشگاه قرار داده و سپس با استفاده از قیف بوخنر صاف شد. عصاره حاصل با کمک دستگاه تقطیر در خلاء تغلیظ گردید.

● **تهیه عصاره فلاونوئیدی.** مقدار ۵۰ گرم از گیاه با نسبت یک به یک از گل و برگ وزن و سپس پودر گردید. بعد با محلول آب و اتانول به نسبت ۱ به ۱۰ مخلوط و به مدت ۴۸ ساعت در دمای آزمایشگاه قرار داده شد. سپس به مدت ۲ ساعت با کمک شیکر تکان داده و با قیف بوخنر عصاره از تفاله جدا شد. در مرحله بعد، مجدداً به تفاله حاصل، اتانول ۷۰ درصد اضافه شد و مراحل قبل تکرار گردید. حاصل دو مرحله به هم افزوده و با دستگاه تقطیر در خلاء، حجم به یک سوم کاهش داده شد. سپس برای جداسازی مواد چربی، ترپنوئید، کلروفیل و گزانتوفیل محلول حاصل چند بار با کلروفرم دکانته گردید و فاز کلروفرمی دور ریخته شد. باقیمانده در دستگاه تقطیر در خلاء کاملاً خشک گردید.

● **تهیه اسانس.** اسانس با استفاده از روش تقطیر با بخار آب و براساس روش فارماکوپه انگلستان تهیه شد (۸).

● **بررسی اثر ضد درد با روش Light tail flick.** از رات‌های نر از نژاد ویستار و با وزن ۱۸۰ تا ۲۲۰ گرم استفاده شد. برای بررسی اثر ضد درد، از روش D'Amour استفاده گردید (۹). در این روش نور لامپ دستگاه بر روی دم حیوان متمرکز می‌شود و در اثر درد ناشی از حرارت پس از مدت زمانی، حیوان دم خود را حلقه زده (Flick) و از محل نور دور می‌کند. در این روش، ابتدا تحمل حیوان نسبت به درد سنجیده می‌شود و زمان تحمل به عنوان Control latency در نظر گرفته می‌شود. سپس داروی مورد نظر تجویز و در فواصل زمانی مختلف تا ۱۲۰ دقیقه پس از تجویز دارو، مجدداً مدت زمان تحمل درد ثبت می‌گردد (Test latency) و بعد با کمک فرمول زیر درصد حداکثر پاسخ ضد درد محاسبه می‌شود.

$$\text{درصد حداکثر پاسخ ضد درد} = \frac{\text{Test lateney-control latency}}{\text{cut-off time -control latency}} \times 100$$

زمان cut-off، حداکثر زمان قابل تحمل است که آسیبی به دم رات وارد نکند و این زمان ۱۵ ثانیه در نظر گرفته شد.

● **بررسی اثر ضد درد با روش رایزینگ ناشی از اسید استیک.** در این روش برای ایجاد درد از تزریق داخل صفاقی اسید استیک ۱ درصد و به مقدار ۱ ml به ازای هر ۱۰۰ گرم وزن حیوان استفاده شد. آزمایش بر روی ۴ گروه ۵ تایی از موشهای سوری (Mice) با محدوده وزنی ۲±۲۵ گرم صورت گرفت. گروه اول به عنوان گروه کنترل نرمال سالین ۱ ml/۱۰۰ g، گروه دوم عصاره تام گل ارواله به مقدار ۲۰۰ mg/۱۰۰ g، گروه سوم فراکسیون فلاونوئید به مقدار ۲۰۰ mg/۱۰۰ g و گروه چهارم به عنوان شاهد مثبت، ایندومتاسین به مقدار ۰/۲۵ mg/۱۰۰ g از راه داخل صفاقی دریافت کردند. نیم ساعت بعد به هرکدام از موشها اسید استیک (۱ ml/۱۰۰ g) تزریق شد و پس از ۱۰ دقیقه تعداد رایزینگ (توئیچ‌ها و پیچشهای شکمی) به مدت ۱۰ دقیقه شمارش گردید (۱۲، ۱۳).

● **بررسی اثر ضد التهاب.** به منظور بررسی اثر ضد التهاب از تست کاراژینان استفاده شد (۱۰). ۱۰۰ میکرولیتر از سوسپانسیون ۱ درصد کاراژینان به زیر پوست پنجه راست حیوانات تزریق شد و حجم پا در زمانهای صفر، ۱، ۲، ۳، ۴ و ۲۴ ساعت پس از تزریق کاراژینان با استفاده از دستگاه پلتیسموگراف (مدل Ugo Basil، ساخت ایتالیا) تعیین شد. عصاره تام (۵۰۰ mg/kg)، فراکسیون فلاونوئید (۲۰۰ mg/kg) و اسانس (۰/۵ ml/kg) نیم ساعت قبل از تزریق کاراژینان به کار رفت. حیوانات گروه کنترل، نرمال سالین و گروه شاهد مثبت دگزامتازون (۱ mg/kg) دریافت کردند. این مواد همگی از راه داخل صفاقی (i.p) تزریق شدند. درصد افزایش حجم پا در تمام حیوانات در زمانهای ۱، ۲، ۳، ۴ و ۲۴ ساعت پس از تزریق کاراژینان محاسبه شد و سطح زیر منحنی (Area Under the Curve, AUC) درصد افزایش حجم پا بر حسب زمان محاسبه گردید.

● **محاسبات آماری.** برای مقایسه اختلاف بین میانگین مقادیر اندازه‌گیری شده در گروهها از روش آنالیز واریانس یک طرفه و به دنبال آن Student T-test استفاده شد.

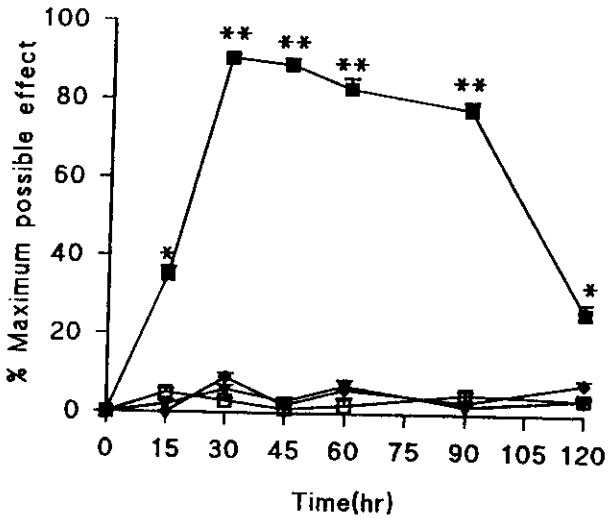
نتایج.

● **نتایج حاصل از عصاره‌گیری.** از ۵۰ گرم گیاه، ۲۹/۵ گرم عصاره تام تغلیظ شده به دست آمد. بنابراین، درصد عصاره تام ۵۹ درصد (W/W) می‌باشد. در مورد عصاره‌گیری فلاونوئیدی، از هر ۵۰ گرم گیاه، ۱۴/۶۹ گرم عصاره فلاونوئیدی تغلیظ شده حاصل شد که درصد آن ۲۹/۳۸ درصد (V/W) می‌باشد. ضمناً از ۷۰۰ گرم گیاه به نسبت یک به یک از گل و برگ، یک میلی‌لیتر اسانس به دست آمد و بنابراین، مقدار اسانس حاصل ۰/۱۴۲ درصد (W/V) می‌باشد.

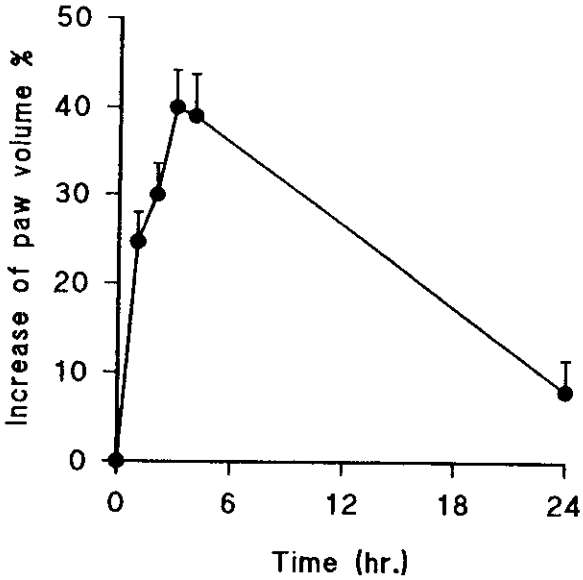
● **اثر ضد درد گیاه به روش Light tail flick.** عصاره تام و فراکسیون فلاونوئیدی، هیچیک اثر ضد درد نشان نداده‌اند (نمودار ۱). در حالیکه مرفین (۱۰ mg/kg ,i.p.) به عنوان یک داروی ضد درد استاندارد پس از ۱۵ دقیقه حدود ۳۵ درصد حداکثر پاسخ ضد درد و پس از ۳۰ دقیقه حدود ۹۰ درصد حداکثر پاسخ ضد درد را ایجاد نموده است. حداکثر اثر ضد دردی مرفین ۳۰ دقیقه پس از تزریق بروز نموده و بعد از آن به علت متابولیسم و دفع دارو اثر ضد درد با گذشت زمان کاهش یافته است.

● **بررسی اثر ضد درد گیاه به روش رایزینگ ناشی از اسید استیک.** عصاره تام، فراکسیون فلاونوئید و ایندومتاسین (به عنوان شاهد مثبت) تعداد رایزینگ را در مقایسه با گروه کنترل به طور معنی‌دار ($P<0/005$) کاهش داده‌اند (نمودار ۲).

جهت تهیه فایل WORD این مقاله به سایت DaneshResan.com مراجعه نمایید و عنوان مقاله را جستجو کنید
بیش از ۲ میلیون مقاله فارسی در این سایت موجود میباشد



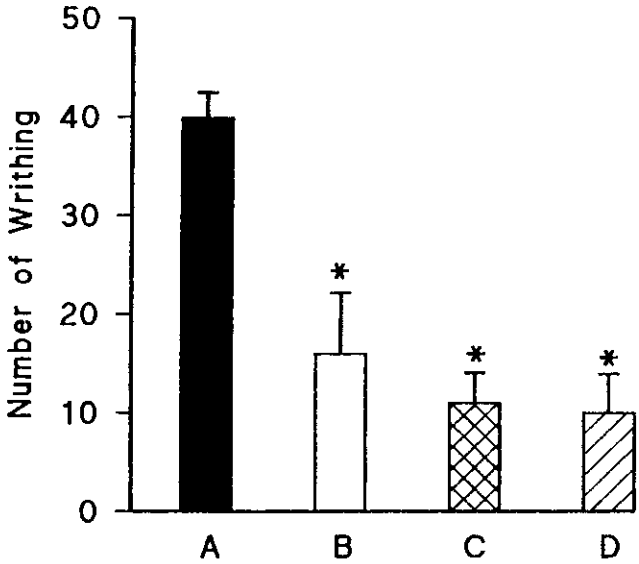
نمودار ۱. اثر ضد درد عصاره تام و فراکسیون فلاونوئید گل اروانه در روش Light tail flick. عصاره تام (مربع توخالی) به مقدار ۲۰۰ mg|kg، فراکسیون فلاونوئید (لوزی توپر) به مقدار ۲۰۰ mg|kg و مرفین (مربع توپر) به مقدار ۱۰ mg|kg از راه داخل صفاقی به کار رفت. گروه کنترل (مثلث توپر) سرم فیزیولوژی ۱ ml|kg دریافت کرد. اثر ضد درد تا زمان ۱۲۰ دقیقه پس از تزریق سنجش شد. مقادیر به صورت Mean±SEM درصد حداکثر پاسخ اثر ضد درد (MPE) مربوط به ۶ رات در هرگروه می‌باشد. $P<0/05$ *، $P<0/01$ **



نمودار ۳. اثر التهاب‌زای تزریق کاراژینان در زیر پوست پنجه پای رات. سوسپانسیون کاراژینان (۱ W|V ٪) به مقدار ۱۰۰ میکرولیتر در زیر پوست پنجه پای رات تزریق شد و در فواصل زمانی صفر، ۱، ۲، ۳، ۴ و ۲۴ ساعت حجم پا با کمک پله تیسموگراف اندازه‌گیری شد و درصد افزایش حجم پا نسبت به زمان صفر تعیین شد. نتایج به صورت Mean ± SEM مربوط به ۶ رات می‌باشد.

در مقایسه با گروه کنترل فراکسیون فلاونوئید به میزان ۶۰ درصد، عصاره تام به میزان ۷۳ درصد و ایندومتاسین به میزان ۷۵ درصد، درد ناشی از اسید استیک را مهار کرده است.

● **بررسی اثر ضد التهابی گیاه.** با تزریق کاراژینان، ادم ایجاد شده و



نمودار ۲. اثر ضد درد عصاره تام و فراکسیون فلاونوئید گل اروانه در روش رایزینگ ناشی از اسید استیک در موش سوری. گروه *A*: به عنوان کنترل نرمال سالین (۱ *ml*|۱۰۰ *g*)؛ گروه *B*: فلاونوئید (۲۰۰*mg*|۱۰۰*g*)؛ گروه *C*: عصاره تام (۲۰۰ *mg*|۱۰۰ *g*) و گروه *D*: ایندومتاسین (۰|۲۵ *mg*|*kg*) از راه داخل صفاقی دریافت کرد. نیم ساعت بعد اسید استیک ۱٪ (۱ *ml*|۱۰۰ *g*) از راه داخل صفاقی به کار رفت و ۱۰ دقیقه بعد به مدت ۱۰ دقیقه تعداد رایزینگ شمارش شد. نتایج به صورت *Mean±SEM* مربوط به ۵ موش سوری می‌باشد. * $P<0/005$

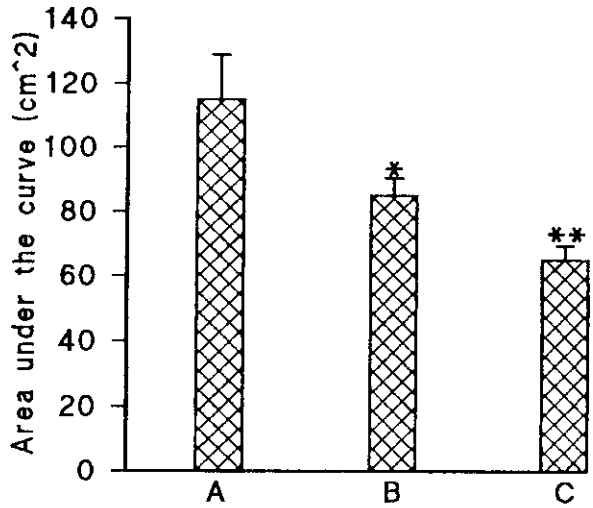
حجم پا افزایش می‌یابد به طوری که ۳ تا ۴ ساعت پس از تزریق کاراژینان، حداکثر افزایش حجم پا ایجاد می‌شود و پس از آن مقدار ادم کاهش می‌یابد (نمودار ۳).

نتایج حاصل از بررسی عصاره تام گیاه گل اروانه نشان می‌دهد که عصاره تام به صورت معنی‌دار ($P<0/05$) التهاب ناشی از کاراژینان را مهار نموده است (نمودار ۴)، دگزامتازون به عنوان یک داروی ضد التهاب استاندارد نیز به خوبی التهاب را مهار کرده و عصاره تام به مقدار ۲۶ درصد و دگزامتازون به مقدار ۴۴ درصد التهاب را کاهش داده است ($P<0/005$).

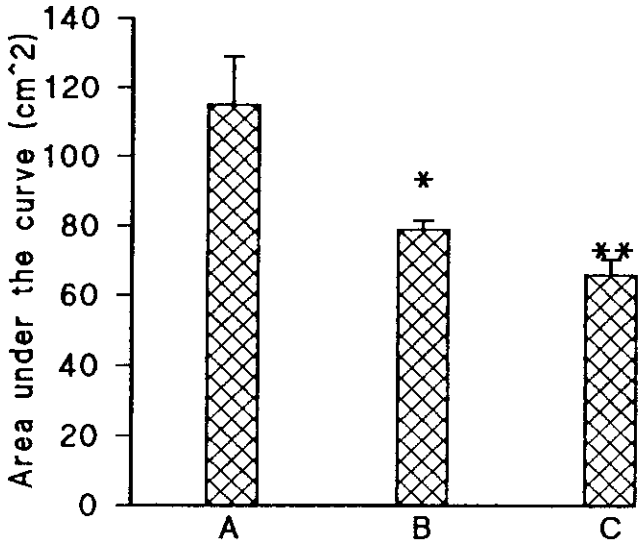
فراکسیون فلاونوئید به مقدار ۳۲ درصد التهاب ناشی از کاراژینان را مهار کرده است که این مقدار از نظر آماری قابل ملاحظه می‌باشد ($P<0/01$) (نمودار ۵). اسانس گیاه اثر ضد التهابی قابل توجه نداشت و فقط به اندازهٔ ۸ درصد التهاب را کاهش داد.

بحث.

در این مطالعه اثر ضد درد و ضد التهاب گیاه گل اروانه مورد بررسی قرار گرفت. با توجه به این که دو دسته مهم داروهای ضد درد، داروهای اپیوئیدی (نظیر مرفین) و داروهای غیر اپیوئید (نظیر آسپیرین، ایندومتاسین) می‌باشند (۱۱)، برای ارزیابی اثر ضد درد از دو تست Light tail flick و رایزینگ ناشی از اسید استیک استفاده شد. در تست اول داروهای اپیوئید به خوبی پاسخ می‌دهند در حالیکه داروهای غیر اپیوئید به این تست پاسخ نمی‌دهند (۱۲، ۱۳) و برای



نمودار ۴. اثر ضد التهاب عصاره تام گل اروانه در مقایسه با دگزامتازون. گروه *A*: نرمال سالین (۰/۲ *ml*)؛ گروه *B*: عصاره تام (۵۰۰ *mg/kg*) و گروه *C*: دگزامتازون (۱ *mg/kg*) از راه داخل صفاقی دریافت کرد و نیم ساعت بعد ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون کاراژینان در کف پای حیوانات تزریق شد مقادیر *Mean±SEM* سطح زیر منحنی، میزان افزایش حجم پا و مربوط به ۶ رات در هر گروه می‌باشد. $*P<0/05$؛ $**P<0/005$



نمودار ۵. اثر ضدالتهاب فراکسیون فلاونوئید گل اروانه در مقایسه با دگزامتازون. گروه *A*: نرمال سالین (۰/۲ *ml*)؛ گروه *B*: فراکسیون فلاونوئید (۲۰۰ *mg/kg*) و گروه *C*: دگزامتازون (۱ *mg/kg*) از راه داخل صفاقی دریافت کرد و نیم ساعت بعد ۱۰۰ میکرولیتر سوسپانسیون کاراژینان در کف پای حیوانات تزریق شد. مقادیر *Mean±SEM* سطح زیر منحنی، میزان افزایش حجم پا و مربوط به ۶ رات در هر گروه می‌باشد. $*P<0/05$ $**P<0/005$

ارزیابی اثر ضد درد آنها یکی از آزمایشها، آزمایش رایزینگ ناشی از اسید استیک می‌باشد (۱۳، ۱۴). بنابراین باتوجه به اینکه در این مطالعه هر دو تست استفاده شد چنانچه مواد ضد دردی با خواص اپیوئید و یا غیراپیوئید در گیاه وجود داشته باشد مشخص می‌شود.

در آزمایش Light tail flick، عصاره تام و فراکسیون فلاونوئید فاقد اثر ضد درد بودند و می‌توان گفت که مواد اپیوئیدی در این گیاه وجود ندارد.

بررسی اثر ضد دردی عصاره تام و فراکسیون فلاونوئیدی در آزمایش رایزینگ ناشی از اسید استیک با نتایج مثبت و خوبی همراه بود به طوری که این اثرات با اثر ایندومتاسین قابل مقایسه است. از آنجاییکه عصاره تام و فراکسیون فلاونوئید با دوز ۲ g/kg و ایندومتاسین با مقدار ۲/۵ mg/kg به کار رفته است، می‌توان گفت که قدرت اثر (Potency) عصاره تام و فراکسیون فلاونوئید از ایندومتاسین کمتر است.

هر چند فراکسیون فلاونوئید و عصاره تام با دوز مساوی به کار رفته‌اند اما اثر عصاره تام برجسته‌تر است که بیانگر این نکته است که احتمالاً علاوه بر فلاونوئیدها، مواد ضد درد دیگری نیز در عصاره تام وجود دارد.

بررسی اثر ضد التهاب گیاه نشان می‌دهد که عصاره تام و فراکسیون فلاونوئیدی، هر دو، اثر ضدالتهاب قابل توجهی دارند. با توجه به این که عصاره تام با مقدار ۵۰۰ mg/kg و فراکسیون فلاونوئید بامقدار ۲۰۰ mg/kg به کار رفته‌اند و با توجه به این که عصاره تام به میزان ۲۶ درصد و فراکسیون فلاونوئیدی به میزان ۳۲ درصد التهاب را مهار کرده است، می‌توان نتیجه گرفت که اثر ضد التهابی فراکسیون فلاونوئیدی از عصاره تام برجسته‌تر است.

با توجه به این که فلاونوئیدهایی که ساختمان آنها شبیه به فلاونوئیدهای جدا شده از گل اروانه بوده است، متابولیسم اسید آراشیدونیک را وقفه می‌دهند (۶، ۷) و با در نظر گرفتن این مطلب که پروستاگلاندین‌ها در ایجاد التهاب و تشدید درد اثر داشته (۱۲) و از اسید آراشیدونیک منشاء می‌گیرند، می‌توان گفت که احتمالاً فلاونوئیدهای گل اروانه با مکانیسم فوق‌الذکر در ایجاد اثر ضد درد و ضد التهاب نقش دارند.

در پایان با درنظر گرفتن عوارض شدید داروهای ضد التهاب غیر استروئیدی، چنانچه مطالعات سم‌شناسی و بالینی بر روی این گیاه نتایج مناسبی نشان دهد، می‌توان مصرف این گیاه را برای کنترل درد، خصوصاً دردهای با منشاء التهابی، توصیه نمود.

قدردانی و تشکر.

بدینوسیله از سرکار خانم مهندس محبوبه خاتم‌ساز که در شناسایی و تعیین نام علمی نمونه‌های گیاهی، ما را یاری نمودند، سپاسگزاری می‌نماییم.

مراجع.

1- Delghandi M. List of plants of herbarium (Iranian ministry of agriculture) Labiatae. Tehran: Agricultural and natural resources research organization 1991; 95-130.

۲- زرگری ع. گیاهان دارویی. چاپ چهارم، تهران: نشر دانشگاه تهران ۱۳۶۶؛ ۱: ۷-۲۶۴، ۶-۵۵۵ و ۳-۶۷۲.

۳- مؤمن حسینی م. تحفهٔ حکیم مؤمن. تهران: نشر کتاب فروشی محمودی ۱۳۶۰؛ ۶۴ و ۱-۳۴۰.

۴- عقیلی علوی خراسانی شیرازی م ح. قرابادین کبیر. تهران: نشر کتاب فروشی محمودی ۱۳۴۹؛ ۱۹۳.

۵- قنادی ع. بررسی فیتوشیمیایی گیاه Salvia hydrangea. پایان نامه دورهٔ تخصصی فارماکوگنوزی، دانشکده داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان ۱۳۷۳.

6- Craker LE, Simon JE. Herbs, spices and medicinal plants, Recent advances in botany horticulture and pharmacology. 1st Ed. Phoenix: oryx press 1992; 1: 81-95, 167-84.

7- Harvey A. Drugs from natural products, pharmaceutical and agrochemicals. 1st Ed. New York: Ellis Horwood 1993; 152-67.

8- British pharmacopoeia, London: British Pharmacopeia Commision 1993; A: 154-7.

9- D'Amour FE, Smith DI. A method for determining loss of pain sensation. J Pharmacol Exp Ther 1941; 72: 74-99.

10- Winter CA, Rosley EA, Nuss GW. Proceeding of the society for experimental biology and Medicine. 1962; 111: 544-7.

11- Hardman JG, Limbird LE. The pharmacological basis of therapeutics. 9th Ed. New York: McGraw Hill 1996; 617-659.

12- Turner A. Screening methods in pharmacology. 1st Ed. New York: Academic Press 1965.

13- Williamson EM, Okpako DT, Evans FJ. Selection, preparation and pharmacological evaluation of plant material. 1st Ed. New Yrok: John Wiley and Sons 1996; 131-154.

14- Berkenkopf JW, Weichman BM. Production of prostacyclin in mice following i.p. injection of acetic acid, Phenylbenzoquinone and zymosan, its role in the writhing response, Prostaglandins. 1988; 36: 693-709.