

تاریخ دریافت: ۱۳۹۳/۱/۱۸

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۳/۴/۲۵

مجله دانشکده پزشکی اصفهان

سال سی و دوم / شماره ۲۹۱ / هفته چهارم مردادماه ۱۳۹۳

بررسی کمی اثر رفع انقباضی فراکسیون‌های حاصل از عصاره گیاه *Pycnocycla spinosa* Decne Ex. Boiss با استفاده از روش Bioassay بر انقباضات ایلئوم رت

دکتر حسن صدرایی^۱، دکتر مصطفی قنادیان^۲، دکتر غلامرضا اصغری^۳، مسعود جاهد^۴

مقاله پژوهشی

چکیده

مقدمه: عصاره گیاه اندام هوایی گیاه *Pycnocycla spinosa* (*P. spinosa*) دارای اثرات ضد اسپهال و آنتی اسپاسمودیک است و اثر ضد اسپهال آن از نظر کمی و کیفی بسیار به لوپرامید نزدیک است. هدف از این مطالعه، شناسایی فراکسیون فعال جدا شده از عصاره گیاه *P. spinosa* با استفاده از روش Bioassay بر روی انقباضات ایلئوم رت است.

روش‌ها: از اندام هوایی گیاه *P. spinosa* به روش استخراج متانولی تهیه و سپس فراکسیون‌های آن بر اساس پلاریته جدا و اثر ضد انقباضی آن‌ها بر روی اسپاسم عضلانی ایجاد شده توسط KCl روی بافت جدا شده ایلئوم تعیین و با عصاره‌ی تام مقایسه شد. سپس اثر آنتی اسپاسمی فراکسیون مؤثرتر انتخاب و با عصاره‌ی اصل مقایسه گردید. انقباضات بر اساس حداکثر دامنه‌ی انقباضات ثبت شده اندازه‌گیری شد و بر اساس درصد پاسخ اولیه بیان گردید. منحنی غلظت پاسخ برای هر گروه آزمایش رسم گردید و مقدار IC_{50} (غلظتی از عصاره که موجب ۵۰ درصد حداکثر اثر مهار می‌شود) محاسبه شد.

یافته‌ها: از میان هفت فراکسیون جدا شده از عصاره گیاه *P. spinosa* اولین فراکسیون که غیر پلارترین ترکیبات را نسبت به سایر فراکسیون‌ها دارا می‌باشد، قوی‌ترین اثر رفع انقباضی را دارد.

نتیجه‌گیری: عصاره گیاه *P. spinosa* حاوی ترکیبات فعال متعددی است، اما پوتنسی آن‌ها با هم متفاوت است. در این تحقیق، قوی‌ترین ترکیبات در فراکسیون اول وجود دارند و از این رو شناسایی ساختار شیمیایی ترکیب موجود در این فراکسیون توصیه می‌شود.

واژگان کلیدی: *P. spinosa*، ایلئوم، عصاره، KCl ، فراکسیون، IC_{50}

ارجاع: صدرایی حسن، قنادیان مصطفی، اصغری غلامرضا، جاهد مسعود. بررسی کمی اثر رفع انقباضی فراکسیون‌های حاصل از عصاره گیاه *Pycnocycla spinosa* Decne Ex. Boiss با استفاده از روش Bioassay بر انقباضات ایلئوم رت. مجله دانشکده پزشکی اصفهان ۱۳۹۳؛ ۳۲ (۲۹۱): ؟؟

* این مقاله حاصل پایان‌نامه‌ی دوره‌ی دکترای مرفه‌ای داروسازی به شماره‌ی ۱۸۹۰۹۳ در دانشگاه علوم پزشکی اصفهان است.

۱- دانشیار، گروه فارماکولوژی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۲- استادیار، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۳- استاد، مرکز تحقیقات علوم دارویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

۴- دانشجوی داروسازی، دانشکده‌ی داروسازی و علوم دارویی و مرکز تحقیقات علوم دارویی و کمیته‌ی تحقیقات دانشجویی، دانشگاه علوم پزشکی اصفهان، اصفهان، ایران

Email: asghari@pharm.mui.ac.ir

نویسنده‌ی مسؤول: دکتر غلامرضا اصغری

مقدمه

گیاه *Pycnocycla spinosa* (P.spinosa) گیاهی از خانواده‌ی چتریان می‌باشد که به صورت وحشی در ایران رشد می‌کند (۱). عصاره‌ی هیدروالکلی اندام هوایی گیاه حاوی ترکیبات شبه آکالوئیدی، شبه فلاونوئیدی و ساپونینی می‌باشد (۲). این عصاره‌ی هیدروالکلی دارای اثرات شل کننده‌ی ایلئوم می‌باشد (۲-۳). همچنین تحقیقات نشان می‌دهد که عصاره‌ی هیدروالکلی اندام هوایی گیاه انقباضات سایر عضلات صاف از جمله مثانه و رحم را نیز مهار می‌کند (۴-۵). اما غلظت مورد نیاز عصاره برای ایجاد اثر رفع انقباضی روی رحم، ۱۰ برابر غلظت مورد استفاده ایلئوم است؛ در نتیجه، عصاره‌ی هیدروالکلی اندام هوایی گیاه دارای اثر رفع انقباضی انتخابی روی ایلئوم می‌باشد (۵).

علاوه بر این، عصاره‌ی هیدروالکلی اندام هوایی گیاه اثرات ضد اسپهال هم دارد (۳، ۶) که این اثرات ضد اسپهال در مقایسه با دی‌سیکلومین بیشتر و مشابه لوپرامید است (۶). همچنین عصاره‌ی گیاه P.spinosa در دوزهایی که اسپهال را کنترل می‌کند، فاقد اثرات سوء روی سیستم قلبی-عروقی می‌باشد (۷). تحقیقات انجام شده بر روی بذر گیاه نیز نشان می‌دهد که مصرف عصاره‌ی هیدروالکلی آن می‌تواند انقباضات عضلانی ایلئوم و رحم را مهار کند (۵).

هر چند در مطالعات قبلی، اثر ضد انقباضی عصاره‌ی گیاه P.spinosa بررسی شده است، اما منجر به جداسازی و شناسایی فراکسیون و یا ترکیبات فعال اصلی نگردید (۸-۹). روش Bioassay راهکاری برای شناسایی فراکسیون فعال فارماکولوژی استخراج شده از ترکیبات گیاهی است. به دلیل اثرات ضد اسپاسم شناخته شده‌ی

عصاره‌ی گیاه P.spinosa، بر روی عضلات صاف امکان انجام آزمون زیستی (Primary assays) کمی بر روی انقباضات ایلئوم امکان پذیر است. هدف از این پژوهش، مقایسه‌ی اثر عصاره‌ی گیاه P.spinosa با فراکسیون‌های جدا شده از آن جهت زمینه‌سازی شناسایی ترکیب یا ترکیبات خالص از طریق تکنیک Bioassay بود.

روش‌ها

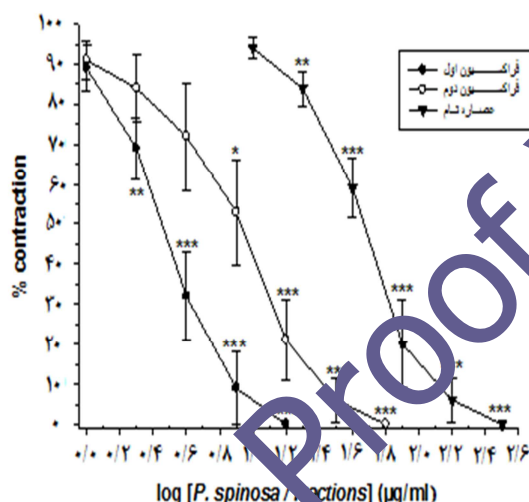
تهیه‌ی عصاره و فراکسیون‌های فعال: گیاه سگ‌دندان خاردار (*Pycnocycla spinosa* Decne. exBoiss.) از دامنه‌ی کوه صفا واقع در جنوب اصفهان جمع‌آوری و گونه‌ی آن شناسایی گردید. از اندام هوایی گیاه P.spinosa پس از طی مراحل جمع‌آوری، آسیاب کردن و خشک کردن با استفاده از روش پرکولاسیون عصاره‌ی متانولی تهیه شد (۱۰). سپس از طریق کروماتوگرافی ستونی با استفاده از سیستم حلال هگزان-متانول و با افزایش پلاریته‌ی حلال، ترکیبات پیریلاریته استخراج گردید و هفت فراکسیون حاوی ترکیبات پیریلاریته پلارترین ترکیبات در فراکسیون هفتم و غیر پلارترین آن‌ها در اولین فراکسیون جداسازی شدند. اثرات آنتی اسپاسمودیک عصاره‌ی تام و هر یک از فراکسیون‌ها در طول تحقیقات در *In vitro* بررسی گردید تا معلوم گردد کدام فراکسیون حاوی قوی‌ترین ترکیب مؤثره است.

بررسی اثرات اسپاسمودیک: آزمایش‌های فارماکولوژی مطابق روش قبل (۵-۲) انجام گرفت. به طور خلاصه، ایلئوم جدا شده‌ی رت در حمام بافت قرار داده شد و انقباضات توسط 80 mM KC1 ایجاد گردید. سپس اثرات آنتی اسپاسمی غلظت‌های مختلف تهیه شده از عصاره‌ی گیاه و هر یک از

انجام آزمون آماری و رسم نمودار از برنامه‌ی کامپیوتری ۱۱-Sigmaplot استفاده شد.

یافته‌ها

ایلیوم جدا شده در حمام بافت انقباضات خودبه‌خودی مختصری نشان می‌داد. کلرید پتاسیم در غلظت ۸۰ mM موجب انقباض ممتد (تونیک) بافت ایلیوم گردید. این انقباضات در طول آزمایش در بافت‌های شاهد کماکان پایدار بود. عصاره‌ی هیدروالکلی گیاه *P. spinosa* به صورت وابسته به غلظت (۱۰-۳۲ $\mu\text{g/ml}$) انقباض ناشی از KCl را مهار کرد (شکل ۱).



شکل ۱. اثر رفع انقباضی عصاره‌ی گیاه *Pycnocycla spinosa* در مقایسه با فراکسیون‌های جدا شده‌ی ۱ و ۲ بر روی انقباضات ناشی از کلرید پتاسیم (۸۰ mM) در بافت ایزوله‌ی ایلیوم رت. محور عمودی، میانگین درصد انقباضات را نسبت به شاهد قبل از افزودن دارو در هر بافت نشان می‌دهد و محور افقی لگاریتم غلظت دارو است. هر علامت میانگین پاسخ ۶ بافت مختلف است و خطوط عمودی واقع بر روی آن نشان دهنده‌ی انحراف معیار است. ستاره‌ها اختلاف آماری بین هر غلظت یا معادل حجمی حامل (Dimethyl sulfoxide یا DMSO) را نشان می‌دهد ($P < 0.001$ ، $P < 0.010$ ، $P < 0.050$ ، آزمون t).

فراکسیون‌های جدا شده روی انقباضات سنجیده شد و این اثر با گروه شاهد مقایسه گردید. غلظت‌های استفاده شده مطابق مطالعات قبلی با ۱۰، ۲۰، ۴۰، ۸۰ و ۱۶۰ شروع شد و در صورت نیاز افزایش یافت. اثر معادل حجمی حامل (DMSO یا Dimethyl sulfoxide) بر روی انقباضات ناشی از KCl سنجیده شد. هر گروه آزمایش، حداقل بر روی ۶ بافت متفاوت انجام گرفت.

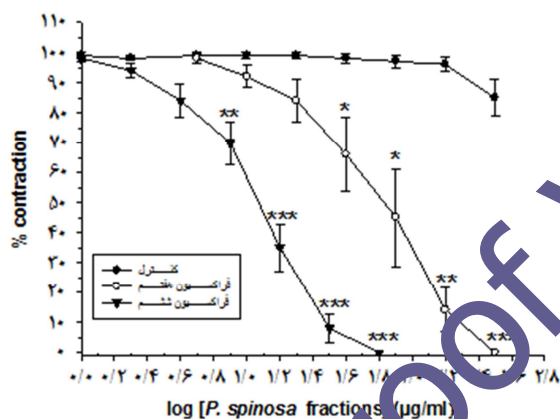
دارو و محلول‌ها: محلول تیروئید (Tyrode's solution) حاوی NaCl ۱۳۶/۹ mM، CaCl_2 ۱/۸ mM، KCl ۲/۶۸ mM، MgCl_2 ۵/۵۵ mM، NaHCO_3 ۱۱/۹ mM، Glucose در آب مقطر تهیه گردید. به طور مداوم با اکسیژن گازدهی شد. محلول ۲ M کلرید سدیم در آب مقطر تهیه گردید. عصاره و فراکسیون‌ها ابتدا به صورت غلظت ۱۰ mM در آب DMSO تهیه گردید و سپس با آب مقطر رقیق گردید. کلیه‌ی مواد شیمیایی از شرکت Merck بودند.

اندازه‌گیری انقباضات و آنالیز آماری: انقباضات بر اساس حداکثر دامنه‌ی انقباضات ثبت شده اندازه‌گیری شد و بر اساس درصد پاسخ اولیه بیان گردید. منحنی غلظت پاسخ برای هر گروه آزمایش رسم گردید و مقدار IC_{50} (غلظتی از عصاره که موجب ۵۰ درصد حداکثر اثر مهاری می‌شود) محاسبه گردید. میانگین و انحراف معیار برای هر گروه از نتایج محاسبه و مقایسه‌ی درون گروهی با استفاده از آنالیز واریانس یک طرفه (ANOVA یا Analysis of variance) انجام گرفت. مقایسه‌ی درون گروهی با استفاده از آزمون آماری t صورت گرفت. اختلافاتی که در آن $P < 0.050$ بود، معنی‌دار در نظر گرفته شد. برای

از میان ۷ فراکسیون جدا شده، همگی دارای فعالیت رفع انقباضی روی ایلنوم رت بودند؛ اما مهار انقباضات با غلظت‌های متفاوتی مشاهده گردید (جدول ۱).

از میان این فراکسیون‌ها، فراکسیون اول از همه قوی‌تر بود (شکل‌های ۱ و ۲). فراکسیون هفتم از همه ضعیف‌تر بود؛ به طوری که پوتنسی آن از عصاره‌ی تام هم کمتر بود (شکل ۳).

فعالیت رفع انقباضی سایر فراکسیون‌ها متوسط، اما بهتر از عصاره‌ی تام بود (شکل‌های ۱، ۲ و ۳). غلظت مؤثره‌ی این فراکسیون‌ها که موجب ۵۰ درصد حداکثر پاسخ مهار می‌شود (IC_{50}) در جدول ۱ آمده است.

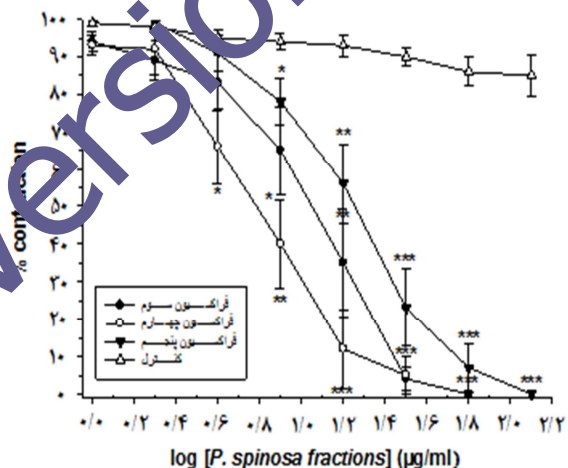


شکل ۳. اثر رفع انقباضی فراکسیون‌های ۶ و ۷ جدا شده از عصاره‌ی گیاه *Pycnocycla spinosa* بر روی انقباضات ناشی از کلرید پتاسیم (۸۰ mM) در بافت ایزوله‌ی ایلنوم رت. محور عمودی میانگین درصد انقباضات را نسبت به شاهد قبل از افزودن دارو در هر بافت نشان می‌دهد و محور افقی لگاریتم غلظت دارو است. هر علامت میانگین پاسخ ۶ بافت مختلف است و خطوط عمودی واقع بر روی آن، نشان دهنده‌ی انحراف معیار است. ستاره‌ها اختلاف آماری بین هر غلظت یا معادل حجمی حامل (DMSO یا Dimethyl sulfoxide) را نشان می‌دهد ($P < 0.001$ ، $P < 0.01$ ، $P < 0.05$ ، آزمون t). نوسانات مشاهده شده در بافت‌های شاهد از نظر آماری معنی‌دار نیست (آزمون ANOVA).

جدول ۱. مقایسه‌ی مقدار IC_{50} (غلظتی از دارو که موجب ۵۰ درصد حداکثر پاسخ مهار می‌شود) عصاره‌ی گیاه

Pycnocycla spinosa و فراکسیون‌ها

ماده	IC_{50} (میانگین \pm انحراف معیار) (n = 6)
عصاره‌ی تام گیاه ($\mu\text{g/ml}$)	$85/0 \pm 14/5$
فراکسیون ۱ ($\mu\text{g/ml}$)	$3/5 \pm 0/7$
فراکسیون ۲ ($\mu\text{g/ml}$)	$11/0 \pm 3/1$
فراکسیون ۳ ($\mu\text{g/ml}$)	$15/0 \pm 3/9$
فراکسیون ۴ ($\mu\text{g/ml}$)	$8/0 \pm 2/9$
فراکسیون ۵ ($\mu\text{g/ml}$)	$14/0 \pm 2/4$
فراکسیون ۶ ($\mu\text{g/ml}$)	$24/0 \pm 6/7$
فراکسیون ۷ ($\mu\text{g/ml}$)	$84/0 \pm 20/0$



شکل ۲. اثر رفع انقباضی فراکسیون‌های ۳، ۴ و ۵ جدا شده از عصاره‌ی گیاه *Pycnocycla spinosa* بر روی انقباضات ناشی از کلرید پتاسیم (۸۰ mM) در بافت ایزوله‌ی ایلنوم رت. محور عمودی میانگین درصد انقباضات را نسبت به شاهد قبل از افزودن دارو در هر بافت نشان می‌دهد و محور افقی لگاریتم غلظت دارو است. هر علامت میانگین پاسخ ۶ بافت مختلف است و خطوط عمودی واقع بر روی آن، نشان دهنده‌ی انحراف معیار است. ستاره‌ها اختلاف آماری بین هر غلظت یا معادل حجمی حامل (DMSO یا Dimethyl sulfoxide) را نشان می‌دهد ($P < 0.001$ ، $P < 0.01$ ، $P < 0.05$ ، آزمون t). نوسانات مشاهده شده در بافت‌های شاهد، از نظر آماری معنی‌دار نیست (آزمون ANOVA).

بحث

استفاده از بافت جدا شده برای سنجش اثرات داروها یکی از روش‌های مؤثره برای سنجش رابطه‌ی غلظت پاسخ داروها به شمار می‌رود. این روش به صورت گسترده‌ای برای داروهای مؤثر بر انقباضات عضلات استفاده می‌شود و امکان سنجش پوتنسی داروها برای مقایسه با هم را فراهم می‌آورد. در این تحقیق از این روش برای شناسایی فراکسیون‌های دربردارنده‌ی ترکیبات فعال دارویی موجود در عصاره‌ی گیاه *P. spinosa* استفاده گردید. بر خلاف آنالیز مولکولی، جداسازی ترکیبات مؤثر با هزینه‌ی کمتر و با سرعت بیشتری امکان پذیر است. علاوه بر این، در این روش امکان شناسایی ترکیبات گیاهی مؤثر من ناشناخته هم امکان پذیر است. با استفاده از این روش، نشان داده شد که گیاه *P. spinosa* حاوی ترکیبات متعددی با فعالیت فارماکولوژی رفع انقباض روی ایلئوم رت

است. از این میان، ۵ فراکسیون بیشترین فعالیت رفع انقباضی را داشتند و اثر آن‌ها از عصاره‌ی تام هم بیشتر بود. این نتایج نشان می‌دهد که عصاره‌ی گیاه *P. spinosa* دارای ترکیبات فعال متعدد با پوتنسی متفاوتی است. قوی‌ترین ترکیب در فراکسیون اول وجود دارد. از این رو توصیه می‌شود که فرایند خالص‌سازی بر روی این فراکسیون مؤثره ادامه یابد تا ماده‌ی خالص آن جدا گردد و از طریق روش‌های مدرن طیف سنجی (NMR, Mass & IR) ساختار آن شناسایی گردد.

تشکر و قدردانی

بدین‌وسیله از معاونت تحقیقات و فناوری دانشگاه علوم پزشکی اصفهان به دلیل تأمین مالی این پژوهش تشکر و قدردانی می‌گردد.

References

1. Mozaffarian V. Dictionary of Iranian plant names. Tehran, Iran: Farhang Moaser Publication; 1996. p. 443-4. [In Persian].
2. Sadraei H, Asghari G, Hekmatti AA. Antispasmodic effect of three fractions of hydroalcoholic extract of *Pycnocyclus spinosa*. J Ethnopharmacol 2003; 87(2-3): 187-90.
3. Sadraei H, Asghari G, Naddafi A. Relaxant effect of essential oil and hydro-alcoholic extract of *Pycnocyclus spinosa* Decne. exBoiss. on ileum contractions. Phytother Res 2003; 17(6): 645-9.
4. Sadraeia H, Asgharib Gh, Arabzadeha A. Effect of hydroalcoholic extract of *Pycnocyclus spinosa* on rat isolated bladder contraction. Iran J Pharm Res 2004; 4: 237-41.
5. Sadraei H, Asghari Gh, Andishah M. Antispasmodic effects of *Pycnocyclus spinosa* seed and aerial part extracts on rat ileum and uterus smooth muscle contractions. DARU J Pharm Sci 2008; 16(3): 160-3.
6. Sadraei H, Asghari G, Shams M. Antidiarrheal Action of Hydroalcoholic Extract of *Pycnocyclus spinosa* in Comparison with Loperamide and Dicyclomine. Iran J Pharm Res 2011; 10(4): 835-41.
7. Hajhashemi V, Asghari Gh, Hajhashemi V, Nezami M. Evaluation of cardiovascular effect of *Pycnocyclus spinosa* Decne. exBoiss. var. *spinosa* extract in anaesthetized rat. DARU J Pharm Sci 2006; 14(1): 11-4.
8. Behzad S. Isolation based on the biological effects of compounds containing contractile effect of *Pycnocyclus spinosa* Decne. ex.Boiss [Pharm D Thesis]. Isfahan, Iran: School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences; 2007. [In Persian].
9. Arasteh S. Phytochemical investigation of *Pycnocyclus spinosa* Decne. ex.Boiss root [Pharm D Thesis]. Isfahan, Iran: School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences; 2007. [In Persian].
10. Samuelsson G. Drugs of natural origin. 4th ed. Stockholm, Sweden: Swedish Pharmaceutical Press; 1999. p. 48-9.

Bioassay Guided Fractionation of *Pycnocycla spinosa* Extract Using Contraction of Rat Ileum

Hasan Sadraei PhD¹, Mostafa Ghanadian PhD², Gholamreza Asghari PhD³, Masoud Jahed⁴

Original Article

Abstract

Background: Hydroalcoholic extract from aerial part of *Pycnocycla spinosa* have shown to possess antispasmodic and anti diarrhoeal activities. Anti diarrhoeal effect of the extract both quantitatively and in quality are very close to loperamide. The aim of this research was identification of active fraction separated from extract of *P. spinosa* by applying bioassay method on contraction of rat ileum.

Methods: From aerial part of *P. spinosa* methanolic extract was prepared and then medium polar fractions were separated. The antispasmodic activities of separated fractions were assessed on rat isolated ileum contraction induced by KCl and compared with total extract. After that the most active fraction was identified for further comparison with control groups. Contraction were measured as maximum recorded amplitude and express as % of initial contraction. Full concentration response curve were plotted for each group of experiment and the IC₅₀ value (inhibitory concentration of extract causing 50% of maximum response) was calculated.

Findings: From nine fractions isolated from *P. spinosa* extract, the third fraction identified as the most active fraction which contains the active substance(s). Five fractions had a medium activity and two fractions were ineffective.

Conclusion: This research demonstrated that *P. spinosa* possessed a number of active substances with different potencies. The most potent substance was in the third fraction and therefore, purification and identification of this substance is recommended.

Keywords: *Pycnocycla spinosa*, Ileum, Extract, KCl, Fractions, IC₅₀

Citation: Sadraei H, Ghanadian M, Asghari Gh, Jahed M. **Bioassay Guided Fractionation of *Pycnocycla spinosa* Extract Using Contraction of Rat Ileum.** J Isfahan Med Sch 2014; 32(291): ??.

* This paper is derived from a Pharm D thesis No. 189093 in Isfahan University of Medical Sciences.

1- Associate Professor, Department of Pharmacology, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

2- Assistant Professor, Isfahan Pharmaceutical Sciences Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

3- Professor, Isfahan Pharmaceutical Sciences Research Center, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

4- Student of Pharmacy, School of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences AND Isfahan Pharmaceutical Sciences Research Center AND Student Research Committee, Isfahan University of Medical Sciences, Isfahan, Iran

Corresponding Author: Gholamreza Asghari PhD, Email: asghari@pharm.mui.ac.ir