

## بررسی اثر ضد دردی و ضد التهابی ترکیب لیمون موجود در گیاهان دارویی

جواد چراغی<sup>۱</sup> و علی ولدی<sup>۲\*</sup>

۱- استادیار، دانشکده دامپزشکی، دانشگاه ایلام

۲- نویسنده مسئول، کارشناس ارشد زیست‌شناسی، ایلام، پست الکترونیک: ali2\_valadi@yahoo.com

تاریخ پذیرش: اسفند ۱۳۸۸

تاریخ اصلاح نهایی: آبان ۱۳۸۸

تاریخ دریافت: بهمن ۱۳۸۷

### چکیده

داروهای ضد درد موجود دارای عوارض جانبی بسیار هستند و یافتن داروهای گیاهی از اولویت پژوهشی محققان می‌باشد. باتوجه به وجود ترکیب لیمون در عصاره گیاهان ضد درد، در این پژوهش اثر ضد دردی این ترکیب در موش صحرایی بررسی شده است. در این پژوهش اثر ترکیب لیمون بر روی موش صحرایی نر مورد مطالعه قرار گرفت. بررسی اثر ضد دردی با آزمون فرمالین، بررسی اثر ضد التهابی با تست گزیلن و تهیه لیمون با روش دکانتاسیون انجام شد. در زمینه بررسی درد، عصاره پوست پرتقال با سه دوز ۲۰، ۳۰ و ۵۰ mg/Kg به موشها تزریق شد که هر سه دوز اثر ضد دردی و ضد التهابی از خود نشان دادند. که در این میان دوز ۵۰ mg/Kg بیشترین اثر ضد دردی (۸۹٪) را نشان داد.

واژه‌های کلیدی: لیمون، درد، تست فرمالین، التهاب، تست گزیلن.

### مقدمه

به دلیل عوارض جانبی متعدد داروهای ترکیبی موجود، محققین در چند دهه گذشته به داروهای گیاهی روی آورده‌اند. در این میان یکی از اهداف محققین یافتن داروهای گیاهی مؤثر در درمان درد و التهاب بوده است.

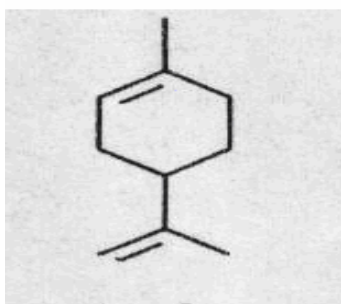
### درد و التهاب

اکثر بیماریها در بدن ایجاد درد می‌کنند که به وسیله آن می‌توان به نوع بیماری پی برد. بنابراین بحث درد از مباحث مهم فیزیولوژیک به حساب می‌آید (Guyton & Hall, 2004; Achilles et al., 2001). درد به‌طورعمده

یک مکانیسم دفاعی بدن است و هنگامی که بافتی دچار آسیب شود، بوجود می‌آید و موجب می‌شود که شخص از خود واکنش نشان داده و محرک مولد را از میان بردارد (Berne & Levy, 2006).

در نتیجه برهم‌کنش گیرنده‌های درد با سوپ التهابی (موادی که هنگام تخریب از بافتها آزاد می‌شوند) این حساسیت ایجاد شده و حس درد ایجاد می‌شود (Ganong, 2005). مواد حاصل از تخریب بافتی شامل پروتوئینهای خارج سلولی، اسید آراشیدونیک و سایر متابولیت‌های لیپیدی، برادی کینین، هیستامین، سروتونین و فاکتور رشد عصبی (Neural growth factor) می‌باشند که

به وزن ملکولی ۱۳۸/۲۳ است (فرجی، ۱۳۷۱). این ترکیب دارای بوی معطر لیمو بوده و در تهیه ویتامین A و مواد معطر بکار می‌رود. این ماده در پوست مرکباتی مانند لیموشیرین و نارنگی به‌عنوان ماده اصلی می‌باشد. اکثر موارد استفاده لیمون به خاطر معطر بودن و حلالیت مناسب آن است (فرجی، ۱۳۷۱).



شکل ۱- فرمول شیمیایی لیمون

## مواد و روشها

### حیوانات

حیوانات مورد استفاده در این پژوهش شامل موشهای صحرائی از نژاد ویستار و جنس نر انتخاب شدند. وزن تقریبی موشها  $150 \pm 20$  گرم بود. حیوانات از مرکز انستیتو پاستور ایران تهیه گردیده و به آزمایشگاه محل انجام تحقیق منتقل شدند.

حیوانات در گروههای ۶ تایی دسته‌بندی شده که شامل: گروه کنترل منفی، کنترل مثبت و گروههای آزمایشی مربوط به درد و التهاب بودند.

### تهیه ترکیب لیمون

برای تهیه لیمون از پوست پرتقال و سایر مرکبات استفاده شد. لیمون ترکیب اصلی پوست مرکبات می‌باشد (ملکی و دخانی، ۱۳۷۰). برای تهیه لیمون ابتدا پوست پرتقال را کاملاً له کرده و شیره آن گرفته می‌شود. برای

همگی به واسطه واکنش با گیرنده و یا کانال‌های یونی دردزا (Nociceptive ion channel) باعث تشدید پاسخ می‌شوند (Williams, 2000).

پروستاگلندین‌ها نیز در ایجاد حس درد نقش دارند. این مواد اثرهای مهم داخل سلولی دارند. اما علاوه بر آن بعضی از آنها هم در تحت شرایط فیزیولوژیک و هم تحت شرایط پاتولوژیک به داخل مایعات موضعی بافتی و به داخل گردش خون آزاد می‌شوند. پروستاگلندین توسط آنزیمی به نام سیکلو اکسیژناز ۲ یا COX-2، ساخته می‌شوند. این آنزیم از سلولهای آسیب‌دیده ترشح می‌شود. آنها از طریق اتصال به گیرنده‌های مرتبط با G پروتئینها و افزایش میزان cAMP در داخل سلولها سبب ایجاد حس درد می‌شوند (Kandel & Schwartz, 1992).

### ترکیب لیمون

بررسی پژوهشهای صورت گرفته بر روی عصاره گیاهانی که خاصیت ضد دردی دارند نشان می‌دهد که احتمالاً لیمون مسئول اثر ضد دردی و ضد التهابی در این گیاهان باشد که معروفترین آنها عبارتند از: اسانس گیاه کرفس (*Apium graveolens*) با بیش از ۶۰ درصد لیمون در اسانس (نصری و همکاران، ۱۳۸۶)، گیاه شوید (*Anethum graveolens*) دارای ۳۲ درصد لیمون (ولدی، ۱۳۸۷)، گیاه *Dracocephalum Kotschyi* که مقدار لیمون عصاره آن ۶۵ درصد می‌باشد (Golshani et al., 2004) و گیاه *Polygonum viscosum* با ۴۲ درصد لیمون (Datta et al., 2004). در تمامی موارد عصاره‌های گیاهان اثر ضد دردی و ضد التهابی معنی‌داری نشان داده‌اند.

لیمون مایعی بی‌رنگ، نامحلول در آب که در ۱۷۶ درجه سانتی‌گراد به جوش می‌آید که فرمول آن  $C_{10}H_{16}$  و

جدا کردن لیمونن از سایر ترکیب‌های موجود در شیره از روش دکانتاسیون (جداسازی از طریق چند فاز مختلف در دکانتور) در حلال اتانول استفاده شد (Brdocc, 1995).

### تست درد

برای تعیین اثر ضد دردی از تست فرمالین استفاده شد (Hunskar & Hole, 1987). بدین صورت که ابتدا موشها را گروه‌بندی کرده و به گروه کنترل منفی، سرم فیزیولوژیک، به گروه کنترل مثبت ۱۰ mg/Kg مورفین و به گروههای آزمایش، ماده لیمونن با دوزهای ۵۰ mg/Kg و ۳۰ و ۲۰ به صورت داخل صفاقی تزریق شد. در همه گروهها ۲۰ دقیقه بعد از تزریق، برای ایجاد درد ۲۰ میکرولیتر محلول فرمالین یک درصد به صورت زیر جلدی به کف پای چپ موشها تزریق شد. پس از تزریق فرمالین موشها را در جعبه درد قرار می‌دهیم. این جعبه شامل یک قفس فلزی است که دارای صفحه شیشه‌ای می‌باشد که موشها روی آن قرار می‌گیرند. روی این صفحه قیف دهان گشادی قرار گرفته است و در فاصله صفحه شیشه‌ای و سطح افق آینه‌ای با زاویه ۴۵ درجه تعبیه می‌شود تا مشاهده حیوان آسانتر باشد. جهت بررسی اثر درد حیوانات را از نظر لیسیدن کف پا و مدت زمان لیسیدن مورد مشاهده قرار دادیم. برای بررسی اثر درد حاد مدت لیسیدن در محدوده زمانی ۵-۰ دقیقه ثبت شد و برای بررسی درد مزمن مدت لیسیدن در محدوده زمانی ۲۵-۲۰ دقیقه ثبت گردید (Patricia & Maria, 2004).

### تست التهاب

برای تعیین اثر ضد التهابی از تست گزین استفاده می‌شود. این تست از طریق ایجاد التهاب در گوش با ماده

گزین در گوش موشها صورت می‌گیرد. جهت انجام این تست بعد از تزریق عصاره، ۲۰ میکرولیتر گزین در سطح قدامی و پشتی گوش راست حیوان تزریق شده و دو ساعت بعد حیوان کشته می‌شود. بعد هر دو گوش حیوان را جدا کرده و با استفاده از چوب‌پنبه سوراخ‌کن برشهای ۷ میلی‌متری از دو گوش چپ و راست گرفته شده و وزن می‌گردد و اختلاف وزن دو گوش چپ و راست مشخص می‌شود که به‌عنوان شاخصی برای التهاب است. جهت کنترل مثبت از دگزامتازون استفاده می‌شود (Golshani *et al.*, 2004).

### روش آنالیز آماری

در هر گروه از آزمایشها اثر دوزهای مختلف به صورت میانگین و انحراف معیار (Mean  $\pm$  SEM) در ۶ موش ثبت گردید. جهت تعیین وجود اختلاف معنی‌دار میان گروههایی که غلظت‌های متفاوت عصاره را دریافت کرده بودند با گروههای کنترل مثبت از آنالیز واریانس (ANOVA) و به دنبال آن تست توکی (Tukey test) استفاده شد و اختلاف با  $P < 0/01$  به‌عنوان مرز استنتاج آماری در نظر گرفته شد. برای انجام محاسبات آماری از نرم‌افزار SPSS استفاده گردید.

### نتایج

#### نتایج تست درد

برای بررسی درد حاد در همه گروهها زمان لیسیدن ۵-۰ دقیقه پنجه پا توسط موشها ثبت شد. جهت بررسی اثر مهاری عصاره پوست پرتقال بر درد مزمن، زمان لیسیدن پنجه پا در محدوده ۲۵-۲۰ دقیقه ثبت شد (Patricia & Maria, 2004).

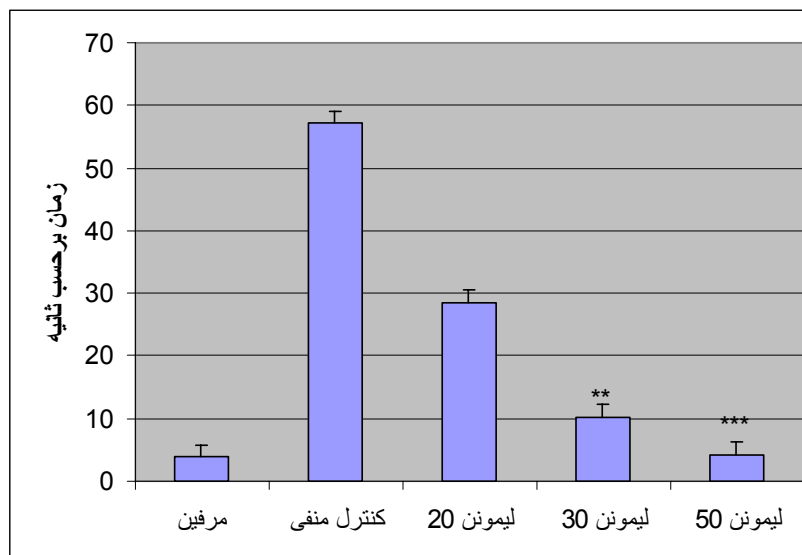
درصد مهار درد توسط عصاره پوست پرتقال در تست فرمالین در جدول ۱ نشان داده شده است. همان‌طور که در جدول ملاحظه می‌شود ماده لیمون هر سه دوز در فاز حاد و مزمن اثر ضد دردی نشان داده است. بیشترین تأثیر

جدول ۱- میانگین زمان لیسیدن ± انحراف معیار و درصد مهار درد در گروه‌های مختلف (فاز حاد و مزمن) (p<۰/۰۱)

گروه‌ها	زمان لیسیدن فاز حاد	زمان لیسیدن فاز مزمن	درصد مهار درد فاز حاد	درصد مهار درد فاز مزمن
کنترل منفی	۵۷/۱۳ ± ۱/۶۶	۲۵ ± ۱/۲۱		
مورفین با دوز ۷/۵	۳/۸۷ ± ۱/۲۶	۱/۱۳ ± ۰/۴۱۶	۹۵/۱	۹۴/۲
لیمون ۲۰	۲۸/۵۳ ± ۲/۲۱	۸/۲۳ ± ۱/۰۱	۵۸/۶	۵۱/۴
لیمون ۳۰	۱۰/۲ ± ۱/۷۵	۳/۸۵ ± ۰/۴۲۸	۷۷/۱	۷۲/۳
لیمون ۵۰	۴/۲ ± ۱/۱	۲/۸۹ ± ۰/۶۲	۸۹/۱	۹۰/۲

لیمون تفاوت چندان را نشان نمی‌دهند. به همین صورت شکل ۲ مقایسه زمان لیسیدن پنجه موشها در فاز مزمن را نشان می‌دهد.

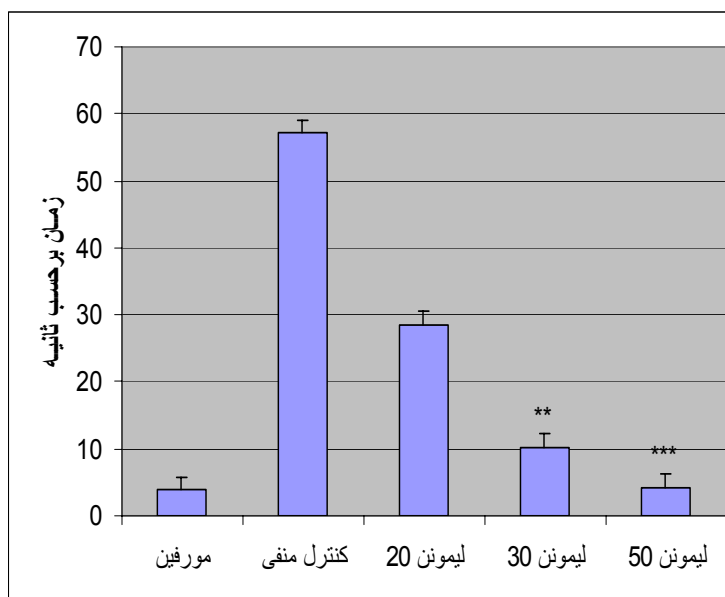
در شکل ۱ مقایسه زمان لیسیدن پنجه پا مربوط به درد حاد نشان داده شده است. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود، زمان لیسیدن برای مورفین و دوز ۵۰ mg/Kg



شکل ۱- نتایج حاصل از تزریق داخل صفاقی ترکیب لیمون بر درد حاد (۵-۰ دقیقه)

با استفاده از تست فرمالین در مقایسه با گروه شاهد و گروه کنترل مثبت (مورفین)

شکل براساس میانگین و انحراف معیار رسم گردیده است. (p<۰/۰۰۱) \*\*\* و (p<۰/۰۱) \*\* (نسبت به مورفین)



شکل ۲- نتایج حاصل از تزریق داخل صفاقی عصاره ترکیب لیمونن بر درد مزمن (۲۵-۲۰ دقیقه)

با استفاده از تست فرمالین در مقایسه با گروه شاهد و گروه کنترل مثبت (مورفین)

شکل براساس میانگین و انحراف معیار رسم گردیده است ( $p < 0.001$ ) و ( $p < 0.01$ ) \*\*

### نتایج تست التهاب

همان‌طور که در جدول ملاحظه می‌شود هر سه دوز تزریق شده اثر ضد التهابی معنی‌داری نشان داده که در این میان بیشترین اثر مربوط به دوز ۵۰ mg/Kg است.

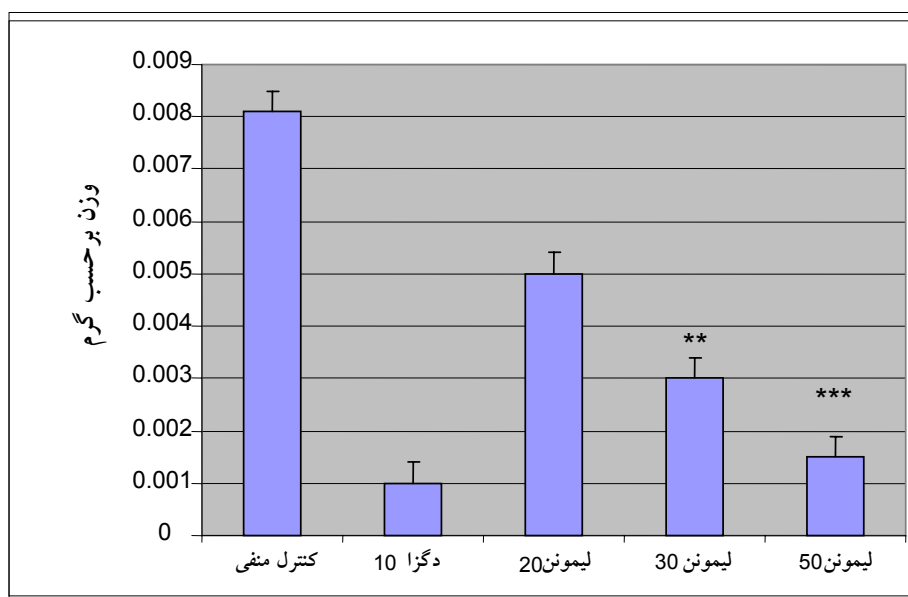
برای بررسی اثر ضد التهابی لیمونن از تست گزین استفاده شد. درصد مهار التهاب توسط ترکیب د- لیمونن در تست گزین در جدول ۲ نشان داده شده است.

جدول ۲- میانگین اختلاف وزن گوشها و درصد مهار التهاب در تحلیل واریانس و تست توکی ( $p < 0.01$ )

گروهها	میانگین اختلاف وزن گوشها	درصد مهار التهاب
کنترل منفی	$0.0016 \pm 0.0081$	-----
دگزا با دوز ۱۰	$0.0004 \pm 0.0011$	۸۹
لیمونن دوز ۲۰	$0.0002 \pm 0.0005$	۳۱
لیمونن دوز ۳۰	$0.0001 \pm 0.0003$	۵۸
لیمونن دوز ۵۰	$0.0007 \pm 0.0015$	۸۰

منفی و کمترین آن مربوط به دوز ۵۰ mg/Kg و دگزامتازون می‌باشد.

شکل ۳ مقایسه میانگین اختلاف وزن قطعات گوش را نشان می‌دهد. همان‌طور که در شکل مشاهده می‌شود بیشترین میانگین اختلاف وزن مربوط به گروه کنترل



شکل ۳- نتایج حاصل از تزریق داخل صفاقی ترکیب لیمون بر التهاب با استفاده از تست گزیلن در مقایسه با گروه شاهد و گروه کنترل مثبت (دگزامتازون)

شکل براساس میانگین و انحراف معیار رسم گردیده است ( $p < 0.001$  و  $p < 0.01$ ) \*\* (نسبت به دگزامتازون)

## بحث

۹۵٪ دارای اثر ضد دردی در فاز حاد و مزمن می‌باشد و دوز ۵۰ بیشترین اثر ضد دردی را در مقایسه با مورفین در هر دو فاز نشان داد.

در تست گزیلن نیز مشاهده شد که هر سه دوز ذکر شده ماده لیمون دارای اثر ضد التهابی می‌باشد که در این میان دوز ۵۰ mg/Kg با  $\alpha = 0.01$  و ضریب اطمینان ۹۹٪ بیشترین اثر ضد التهابی را در مقایسه با دگزامتازون نشان داد.

یکی از موادی که در بدن در ایجاد درد و التهاب نقش دارد پروستاگلندین‌ها می‌باشند. این ترکیب‌ها توسط آنزیم‌های سیکلو اکسیژناز یک و دو از ماده اسید آراشیدینیک ساخته می‌شوند (Williams, 2000). اکثر داروهای ضد درد و ضد التهاب موجود با مهار این آنزیم‌ها درد و التهاب را کاهش می‌دهند (Achilles et al., 2001). به نظر می‌رسد که لیمون نیز با مهار این آنزیم‌ها

در پژوهش انجام شده توانایی ترکیب لیمون در مهار درد و التهاب مورد بررسی قرار گرفت. در زمینه مهار درد و التهاب تاکنون پژوهشی درباره این ترکیب صورت نگرفته است و پایه اطلاعات ما برای بررسی اثر ضد دردی، وجود این ماده در تعدادی از گیاهان با خاصیت ضد درد و ضد التهابی است.

نتایج آزمون فرمالین در این پژوهش نشان داد که عصاره پوست پرتقال دارای اثر ضد دردی در دو فاز حاد و مزمن می‌باشد. بررسی آماری تحلیل واریانس نیز نشان می‌دهد که با میزان خطا ۱٪ ( $p < 0.01$ )، ضریب اطمینان ۹۹٪ ترکیب لیمون دارای اثر ضد دردی در دو فاز حاد و مزمن است. بررسی آزمون توکی در مقایسه بین گروه‌های آزمایش با گروه کنترل مثبت (مورفین) نشان می‌دهد که هر سه دوز تزریق شده با  $\alpha = 0.05$  و ضریب اطمینان

- Achilles, A.U., Haase, W. and Reilander, H., 2001. Biochemical and characterization of nociceptor. *Antimicrobial Chemotherapy*, 693: 243-244.
- Berne, R.M. and Levy, M.N., 2006. *Physiology*, 3d edition, C.V. Mosby Company, MI Press, Cambridge, MA and London, UK, 948p.
- Brdoce, R.J., 1995. Product of citrus fruit. *Food Technology*, 3: 74-77.
- Golshani, S., Karamkhani, F., Monsef-Esfehani, H.R. and Abdollahi, M., 2004. Apr Antinociceptive effects of the essential oil of *Dracocephalum kotschyi* in the mouse writhing test. *Tehran University of Medical Sciences Journal*, 7(1): 76-79.
- Datta, B.K., Datta, S.K., Chowdhury, M.M., Khan, T.H. and Kundu, J.K., 2004, Analgesic, antiinflammatory and CNS depressant activities of sesquiterpenes and a flavonoid glycoside from *Polygonum viscosum*. *Pharmazie*, 59(3): 222-225.
- Ganong, W.F., 2005. *Review of Medical Physiology*. McGraw-Hill Medical, UK, 932p.
- Guyton, A.C. and Hall, J., 2004. *Medical Physiology*. Volume 1, Tle press, New York, USA, 823p.
- Hunskaar, S. and Hole, K., 1987. The formalin test in mice: dissociation between inflammatory and non-inflammatory pain. *Pain*, 30(1): 103-114.
- Kandel, E.R. and Schwartz, Y., 2000. *Principle of Neural Science*. Elsevier, Holland, 1620p.
- Patricia, B. and Maria, M.S., 2004. Study of antinociceptive effect of isolated fractions from *petiveria alliacea* L. in mice. *Journal of Pharmacology and Physiology*, 19: 42-45
- Williams, L.A., 2000. *Neuroscience and Physiology*. Bull. Press, New York, USA, 578p.

مانع فعالیت پروستاگلندین‌ها شده و از این طریق در مهار درد و التهاب مؤثر است.

با توجه به نتایج بدست آمده در این پژوهش به نظر می‌رسد که می‌توان از لیمونن به‌عنوان جایگزین مناسب برای داروهای ضد درد و ضد التهاب موجود مانند مورفین و دگزامتازون استفاده کرد. البته رسیدن به این امر مهم نیاز به مطالعات و تحقیقات بیشتر دارد.

### منابع مورد استفاده

- فرجی، ر.، ۱۳۷۱. اصول نگهداری مواد غذایی. انتشارات دانشگاه شیراز، ۱۲۱ صفحه.
- ملکی، م. و دخانی، ش.، ۱۳۷۰. صنایع غذایی. جلد اول، انتشارات دانشگاه شیراز، ۷۶ صفحه.
- نصری، س.، رضائی، م. و یاسا، ن.، ۱۳۸۶. اثر ضد دردی گیاه کرفس. هجدهمین کنگره فیزیولوژی فارماکولوژی، دانشگاه علوم پزشکی مشهد، ۸-۴ شهریور: ۱۱۲.
- ولدی، ع.، ۱۳۸۷ بررسی اثرات ضد التهابی گیاه *Anethum graveolens* L. یازدهمین همایش علوم دارویی ایران، کرمان، ۲۸-۳۱ مرداد: ۸۵-۸۴.

## Effects of anti-nociceptive and anti-inflammatory component of limonene in herbal drugs

J. Cheraghi<sup>1</sup> and A. Valadi<sup>2\*</sup>

1- School of Veterinary Sciences, Ilam University, Ilam, Iran

2\*- Corresponding author, MSC Student, Ilam, Iran, E-mail: ali2\_valadi@yahoo.com

Received: January 2009

Revised: October 2009

Accepted: March 2010

### Abstract

Nature has served a rich repository of medicinal plants for thousands of years and impressive numbers of modern drugs have been isolated from natural sources, notably of plant origin. In this research anti-nociceptive and anti-inflammatory effects of Limonene have been investigated. Anti-nociceptive activity was investigated using formalin test method. Anti-inflammation activity was investigated using xylene test method and for limonene production decantation method was used. For investigation of anti-nociceptive activity, limonene was injected to mice in three different doses as 20, 30 and 50 mg/kg. The results showed 50 mg/Kg injection had the maximum anti-nociceptive and anti-inflammatory effect.

**Key words:** Limonene, pain, formalin test, Inflammation, xylene test.