



Investigation of acetylcholinesterase inhibitors in Frankincense (*Boswellia thurifera* Roxb.) gum extract prepared using different solvents

Mohammad Ali Zarei^{*1} and Parisa Sadeghzad²

1*- Corresponding author, Department of Biological Sciences, Faculty of Science, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran
E-mail: mazarei@uok.ac.ir

2- Department of Biological Sciences, Faculty of Science, University of Kurdistan, Sanandaj, Iran

Received: November 2023

Revised: August 2024

Accepted: August 2024

Abstract

Background and objectives: Alzheimer's disease is a progressive neurodegenerative condition that leads to cognitive decline and memory disorders. The primary symptoms include a gradual deterioration of cognitive functions and language abilities. One key factor contributing to Alzheimer's disease is the reduced level of acetylcholine, a crucial neurotransmitter in the brain. This decline is partly attributed to the increased activity of acetylcholinesterase, the enzyme responsible for breaking down acetylcholine. As a result, acetylcholinesterase inhibitors have become a promising treatment option for managing the disease. In recent years, there has been a growing interest in discovering more effective, plant-based drugs with fewer side effects. Frankincense gum (*Boswellia thurifera* Roxb.) is a significant medicinal plant in Iranian traditional medicine, known for its potential to enhance memory and cognitive function. The solvent used in the extraction process plays a crucial role in determining the quality and potency of the extracted compounds. Therefore, this study aimed to investigate the effect of different extraction solvents on the acetylcholinesterase inhibitory activity of frankincense gum extract.

Methodology: Ethanol, methanol, ether, ethyl acetate, acetone, and hexane were selected as solvents for extracting frankincense gum using the maceration method, followed by concentration with a rotary evaporator. The resulting extracts were then tested for their ability to inhibit acetylcholinesterase activity, as well as for their phenolic and flavonoid content. To evaluate the acetylcholinesterase inhibitory activity, Elman's method was employed, using a microplate spectrophotometry technique. Various concentrations of the extracts were tested to determine the inhibition percentage and calculate the IC₅₀ values. All measurements were performed in triplicate to ensure accuracy. Extracts exhibiting the most significant inhibitory effects were further analyzed to understand their enzyme inhibition kinetics. The total phenolic content of the extracts was measured using the Folin-Ciocalteu reagent. The absorbance of the reaction products was compared to a standard curve of Gallic acid to quantify the phenolic compounds. The total flavonoid content of the extracts was determined using the aluminum chloride colorimetric method, and the flavonoid content was calculated by comparing the absorbance of the extracts to the standard curve of quercetin solution. This comprehensive analysis allowed for a detailed evaluation of the acetylcholinesterase inhibitory potential and the chemical composition of the frankincense gum extracts, providing valuable insights into their



potential as therapeutic agents for Alzheimer's disease.

Results: The ethanol extract of frankincense exhibited the highest inhibitory effect on acetylcholinesterase activity, as indicated by its lowest IC₅₀ value. In contrast, the methanol extract, which had the highest IC₅₀ value, demonstrated the weakest inhibitory effect. The other solvents fell between these two, with increasing IC₅₀ values: hexane < ethyl acetate < ether < acetone. Enzyme inhibition kinetics revealed distinct patterns of inhibition. The acetone extract showed a competitive inhibition pattern, while the hexane extract exhibited a non-competitive inhibition pattern. The ethanolic, ethyl acetate, methanolic, and ether extracts displayed a mixed inhibition pattern. In terms of chemical composition, the ethanol extract contained the highest amount of total phenolic compounds, suggesting a strong correlation between phenolic content and inhibitory activity. However, the total flavonoid content was similar across all extracts, with no significant differences observed between them. These findings highlight the potential of frankincense extracts, particularly the ethanol extract, as promising candidates for further research and development in the treatment of Alzheimer's disease.

Conclusion: The findings of this study demonstrate that the ethanolic extract of frankincense gum exhibits a significant inhibitory effect on acetylcholinesterase enzyme activity. Additionally, this extract contains the highest concentration of total phenols, suggesting that ethanol is an effective solvent for extracting acetylcholinesterase inhibitors, which may possess phenolic properties. Future research aimed at isolating these phenolic compounds could lead to the discovery of potent inhibitors with potential medicinal applications.

Keywords: Acetylcholinesterase, enzyme inhibition, *Boswellia thurifera* Roxb., phenol, flavonoid, ethanol.

جستجوی عوامل مهارکننده استیل کولین استراز در عصاره صمغ کندر (*Boswellia thurifera* Roxb.) تهیه شده با حلال‌های مختلف

محمدعلی زارعی^{۱*} و پریسا صادق‌زاد^۲

۱- نویسنده مسئول، دانشیار، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران، پست الکترونیک: mazarei@uok.ac.ir

۲- دانشجوی کارشناسی ارشد، گروه علوم زیستی، دانشکده علوم، دانشگاه کردستان، سنندج، ایران

تاریخ دریافت: آبان ۱۴۰۲

تاریخ اصلاح نهایی: مرداد ۱۴۰۳

تاریخ پذیرش: شهریور ۱۴۰۳

چکیده

سابقه و هدف: بیماری آلزایمر یک بیماری پیش‌رونده و تحلیل برنده مغز بوده که باعث مختل شدن فکر و حافظه می‌شود. پیامدهای اصلی آلزایمر شامل کاهش عملکردهای شناختی و اختلالات زبانی است. یکی از دلایلی که موجب آلزایمر می‌شود، کاهش سطح انتقال دهنده عصبی استیل کولین در مغز است که بخشی از آن به دلیل فعالیت بالاتر استیل کولین استراز است، آنزیمی که مسئول تخریب آن است. بسیاری از مهارکننده‌های استیل کولین استراز، چه طبیعی و چه مصنوعی، در طول سال‌ها برای مقابله با پیشرفت بیماری ساخته و استفاده شده‌اند. از این‌رو، مهارکننده‌های استیل کولین استراز، گزینه مناسبی برای درمان این بیماری هستند. امروزه دستیابی به داروهایی مؤثرتر با عوارض جانبی کمتر با منشأ گیاهی از هدف‌های پژوهشگران می‌باشد. یکی از مهمترین فرآورده‌های گیاهی که در طب سنتی ایران برای تقویت یادگیری و حافظه بکار می‌رود صمغ گیاه کندر (*Boswellia thurifera* Roxb.) است. نوع حلال بر کیفیت ترکیبات استخراج شده بسیار مؤثر است، از این‌رو بررسی تأثیر نوع حلال استخراج، بر میزان خاصیت مهارکنندگی آنزیم استیل کولین استراز، توسط عصاره صمغ کندر هدف این پژوهش بود.

مواد و روش‌ها: حلال‌های اتانول، متانول، اتر، اتیل استات، استون و هگزان برای استخراج عصاره صمغ کندر به روش خیساندن و با استفاده از دستگاه روتاری اوپوراتور انتخاب شدند. عصاره‌های حاصل به منظور بررسی فعالیت مهار آلزایمر استیل کولین استراز و سنجش محتوی فنل و فلاونوئید مورد استفاده قرار گرفتند. برای سنجش اثر مهار عصاره‌ها از روش المن با رویکرد میکروپلیت اسپکتروفوتومتری استفاده شد. از غلظت‌های مختلف عصاره برای تعیین درصد مهار و محاسبه مقدار IC_{50} استفاده شد و تمام سنجش‌ها در ۳ تکرار انجام گردید. عصاره‌های با اثر مهارکنندگی بالاتر از نظر سینتیک مهار آنزیمی بررسی شدند. مقدار ترکیبات فنول تام عصاره‌های مختلف بدست آمده از کندر براساس مقدار جذب حاصل واکنش عصاره‌ها با معرف فولین سیوکالچيو و بر مبنای مقایسه آنها با منحنی استاندارد اسید گالیک محاسبه شد. مقدار فلاونوئید تام از عصاره‌های مختلف گیاه کندر بر مبنای رنگ‌سنجی آلومینیوم‌کلراید انجام شد. سپس با قراردادن میزان جذب عصاره‌های مختلف در معادله خط منحنی استاندارد محلول کوئرستین مقدار فلاونوئید تام محاسبه شد.

نتایج: عصاره اتانولی صمغ کندر با کمترین مقدار IC_{50} ($1/93 \text{ mg.mL}^{-1}$)، بیشترین اثر مهارکنندگی بر روی فعالیت آنزیمی استیل کولین استراز و عصاره متانولی صمغ کندر با بیشترین مقدار IC_{50} ($42/01 \text{ mg.mL}^{-1}$) کمترین اثر مهارکنندگی بر روی فعالیت آنزیمی استیل کولین استراز را از خود نشان دادند. سایر حلال‌ها براساس افزایش مقدار IC_{50} (هگزان < اتیل استات < اتر < استون) در میان این دو جای گرفتند. مطابق نتایج مطالعات سینتیک مهار آلزایمر، عصاره استونی کندر الگوی مهار رقابتی، عصاره هگزانی کندر الگوی مهار غیر رقابتی و عصاره اتانولی، اتیل استاتی، متانولی و اتری کندر الگوی مهار مرکب از خود نشان دادند. عصاره اتانولی حاوی بیشترین مقدار فنل تام بود ($4/36 \mu\text{g.mL}^{-1}$)، اما مقدار فلاونوئید تام آن با سایر عصاره‌ها تفاوت چندانی نداشت.

نتیجه‌گیری: نتایج بدست آمده از این تحقیق نشان می‌دهد که عصاره اتانولی بدست آمده از صمغ کندر به‌طور قابل توجهی دارای

اثرهای مهاری بر روی فعالیت آنزیم استیل کولین استراز است. در عین حال، عصاره اتانلی دارای بیشترین مقدار فنل تام است. بنابراین اتانل قادر به استخراج عوامل مهارکننده آنزیم استیل کولین استراز موجود در صمغ کندر با ماهیت فنلی احتمالی است. تلاش برای جداسازی عوامل فنلی ذکر شده می‌تواند موضوع مناسبی برای پژوهش‌های آینده با هدف دستیابی به مهارکننده‌های دارای کاربردهای دارویی باشد.

واژه‌های کلیدی: استیل کولین استراز، مهار آنزیمی، صمغ کندر، فنل، فلاونوئید، اتانول.

مقدمه

بیماری آلزایمر یک بیماری مزمن ناتوان کننده است که سیستم عصبی مرکزی را تحت تأثیر قرار می‌دهد. پیامدهای اصلی بیماری آلزایمر شامل کاهش عملکردهای شناختی و اختلالات زبانی است. یکی از دلایلی که موجب بیماری آلزایمر می‌شود، کاهش سطح انتقال دهنده عصبی استیل کولین در مغز است که بخشی از آن به دلیل فعالیت بالاتر استیل کولین استراز است، آنزیمی که مسئول تخریب آن است (Tattersall, 2009). بسیاری از مهارکننده‌های استیل کولین استراز، چه طبیعی و چه مصنوعی، در طول سال‌ها برای مقابله با پیشرفت بیماری ساخته و استفاده شده‌اند. اولین داروی مورد تأیید برای استفاده درمانی تاکرین بود که از طریق یک پیوند برگشت‌پذیر به آنزیم متصل می‌شود. با این حال، از آن زمان به دلیل اثرهای نامطلوب آن (سمیت کبدی) حذف شده است (Villegas et al., 2016). در حال حاضر دونپزیل و گالانتامین از داروهای امیدوارکننده برای مهار استیل کولین استراز با مزایای بالینی هستند. علاوه بر این، ریواستیگمین یک ترکیب شبه برگشت‌ناپذیر با اثر ضد استیل کولین استراز در نظر گرفته می‌شود که اثرهای مشابهی را در سطح بالینی ارائه می‌دهد (Saxena & Dubey, 2019).

استیل کولین استراز (EC 3.1.1.7) یک آنزیم کولینرژیک است که عمدتاً در اتصالات عصبی عضلانی، به‌ویژه در عضلات و اعصاب یافت می‌شود. این آنزیم متعلق به خانواده آنزیم‌های کربوکسیل استراز و هدف اولیه مهار توسط ترکیبات ارگانوفسفره مانند عوامل عصبی و آفت‌کش‌هاست. مهارکننده‌های کولین استراز معمولاً

عوارضی مانند گشاد شدن عروق، انقباض مردمک چشم‌ها، افزایش ترشح عرق، بزاق و اشک، ضربان قلب آهسته، ترشح مخاط در مجاری تنفسی و انقباض راه‌های هوایی ایجاد می‌کنند (Luo et al., 2021). مهارکننده‌های استیل کولین استراز به دو گروه سنتزی طبیعی تقسیم می‌شوند (Bubley et al., 2023). خود مهارکننده‌های طبیعی استیل کولین استراز به دو دسته آلکالوئیدها و تریپنوئیدها و سایر مواد شیمیایی گیاهی تقسیم می‌شوند (Arens & Kearney, 2019). کندر گیاهی دارویی متعلق به خانواده بوسراسه از راسته افراسنان می‌باشد. نام علمی یکی از گونه‌های رایج این گیاه *Boswellia thurifera* Roxb است که در بسیاری از مناطق جهان مانند جنوب آسیا، خاورمیانه، و شمال آفریقا یافت می‌شود (Hafez Ghoran et al., 2022). ماده اصلی کندر روغن است (۶۰٪) که این روغن حاوی مونوترپن‌ها (۱۳٪) و دی ترپن‌ها (۴۰٪) و اتیل‌استات (۲۱/۴٪)، اکتیل‌استات (۱۳/۴٪) و متیل‌نیزول (۷/۶٪) است (Al-Yasiry & Kiczorowska, 2016).

صمغ کندر که از گیاهان تیره بوسراسه (Burseraceae) و به‌ویژه از جنس بوسولیا (*Boswellia*) بدست می‌آید و از قرن‌ها پیش به‌عنوان یک ماده مؤثر در درمان بیماری‌هایی ازجمله مانند آسم و سرفه، بیماری‌های قلبی، اسهال و آلزایمر مورد استفاده قرار گرفته و برای درمان عفونت‌های تناسلی و اختلالات قاعدگی نیز استفاده می‌شود (Abdel-Tawab et al., 2011).

برای کندر خواص دارویی بی‌شماری ازجمله درمان التهاب، ترمیم زخم، بیماری‌های پوستی، عفونت‌های دستگاه ادراری و عفونت‌های تنفسی گزارش شده است. از این گیاه

تغلیظ، ماده مورد نظر را از مخزن دستگاه تخلیه و برای خشک شدن کامل روی شیشه ساعت پخش و در هود شیمیایی در دمای محیط قرار گرفت. پس از گذشت ۲۴ ساعت عصاره خشک شده از روی شیشه ساعت جمع‌آوری گردید و در میکروتیوب تا زمان سنجش در فریزر منفی ۲۰ درجه سانتی‌گراد نگهداری شد.

سنجش مهارشوندگی فعالیت آنزیم

اندازه‌گیری میزان مهار فعالیت آنزیم به روش رنگ‌سنجی المن (Ellman et al., 1961) با مختصری تغییرات انجام شد (Ingkaninan et al., 2003). سنجش‌ها در میکروپلیت‌های ۹۶ چاهکی و در حجم کل ۲۰۰ میکرولیتر و با استفاده از دستگاه میکروپلیت‌خوان (Tecan sunrise, Switzerland) انجام گردید (جدول ۱). در هر چاهکی به ترتیب ماده رنگی (DTNB)، بافر C، آنزیم استیل کولین استراز و بعد عصاره استخراج شده توسط حلال مورد نظر (متانول، اتانول، هگزان، اتیل استات، استون، اتر) ریخته شد و پس از گذشت ۵ دقیقه آنکوبه کردن در دمای ۳۰ درجه سانتی‌گراد، سوپسترا (استیل تیوکولین ایداید) اضافه گردید. به منظور شروع همزمانی واکنش‌ها، از سمپلر ۱۲ کاناله استفاده شد. سپس میکروپلیت در دستگاه میکروپلیت‌خوان قرار گرفت و پس از گذشت ۲ ثانیه شیک، جذب آن ۱۰ مرتبه به مدت ۱۰ دقیقه و هر دقیقه یک‌بار در طول موج 405 nm اندازه‌گیری شد.

محاسبه درصد مهار

پس از به پایان رسیدن سنجش، جذب میکروپلیت خالی از جذب چاهک‌های متناظر کسر شده و بعد با تفریق چاهک (شاهد) از جذب چاهک (آزمون)، جذب نهایی محاسبه می‌شد. سرعت واکنش براساس شیب نمودار جذب نهایی در مقابل زمان محاسبه شد. با مقایسه شیب نمودار کنترل منفی و شیب نمودار مربوط به عصاره و استفاده از رابطه ۱، درصد مهار آنزیم استیل کولین استراز به‌وسیله عصاره بدست آمد.

برای درمان بیماری‌هایی مانند تومور، اسهال خونی، تقویت حافظه و یادگیری استفاده شده است (Huang et al., 2022).

علاوه بر این، از صمغ گونه باسولیا ساکرا (*B. sacra*) برای درمان معده درد، تسکین دردهای عضلانی و درد مفاصل استفاده می‌شود (Rajabian et al., 2020). اثرهای کندر برای تقویت حافظه در طب سنتی پذیرفته شده است، ازاین‌رو مهار آنزیم استیل کولین استراز موضوع این پژوهش قرار گرفت. از سویی تأثیر حلالی که در روند استخراج عصاره بکار می‌رود در تعیین نوع مواد استخراج شده بر کسی پوشیده نیست. با این رویکرد، در این پژوهش از شش حلال مختلف برای عصاره‌گیری صمغ کندر استفاده شد و با هدف یافتن حلالی که قدرت استخراج بیشترین اثر مهاری را داشته باشد، اثر عصاره‌هایی که توسط حلال‌های مختلف تهیه شده بودند بر فعالیت آنزیم استیل کولین استراز بررسی شد.

مواد و روش‌ها

تهیه نمونه گیاهی

صمغ کندر از عطاری شفا یکی از عطاری‌های معتبر در شهر سنج‌تهیه و پس از تأیید توسط کارشناس گیاهان دارویی به آزمایشگاه بیوشیمی منتقل گردید. حبه‌های مرغوب و زرد رنگ کندر به‌وسیله آسیاب برقی کاملاً پودر شده و پس از توزین در ظروف درب‌دار در دمای اتاق نگهداری شدند. حدود ۱۰ گرم از پودر کندر در ۱۰۰ میلی‌لیتر از حلال مورد نظر (متانول، اتانول، هگزان، اتیل استات، استون، اتر) خالص حل شد و به‌مدت ۷۲ ساعت در ظروف تیره و به دور از نور خیس کرده و هم زده شدند تا مواد مورد نظر به خوبی حل شوند. پس از گذشت زمان مورد نظر، مواد داخل ظرف توسط کاغذ صافی واتمن شماره ۴۲ صاف شدند. مایع صاف شده به منظور تغلیظ به دستگاه تقطیر در خلأ منتقل شد. دمای دستگاه متناسب با نقطه جوش حلال مورد نظر تنظیم و با سرعت ۴۰ دور در دقیقه به مدت زمان ۶۰ دقیقه تغلیظ نمونه‌ها انجام شد. پس از

$$\text{رابطه ۱} \quad \text{شیب نمودار عصاره-شیب نمودار کنترل منفی} \times 100 = \text{مهار درصد}$$

$$\text{شیب نمودار کنترل منفی}$$

جدول ۱- محتویات چاهک‌های آزمایش در میکروپلیت ۹۶ چاهکی

Table 1. Test wells content in the 96-well microplate.

	Negative CTR*	Negative CTR Blank	Positive CTR	Positive CTR Blank
Buffer C** (μL)	50	100	-	50
Extract (μL)	-	-	50	50
Enzyme (μL)	50	-	50	-
DTNB*** (μL)	50	50	50	50
Substrate (μL)	50	50	50	50
Total Vol. (μL)	200	200	200	200

* CTR= Control, ** Tris-hydrochloric, 50 mM, pH 8 with 0.1% Bovine Serum Albumin

*** 5,5'-dithiobis [2-nitrobenzoic acid]

محاسبه IC_{50}

IC_{50} شاخصی است که برای نشان دادن قدرت مهارکنندگی یک مهارکننده بکار می‌رود و برابر غلظتی از مهارکننده می‌باشد که موجب مهار ۵۰ درصدی فعالیت آنزیم شود. مقدار IC_{50} با استفاده از معادله خط نمودار درصد مهار در مقابل لگاریتم غلظت مهارکننده محاسبه گردید.

و قرار دادن جذب عصاره در آن، مقدار فلاونوئید تام عصاره ارزیابی شد. آزمایش‌ها ۳ بار تکرار شدند و میانگین این تکرارها گزارش شد.

اندازه‌گیری محتوی فنل تام عصاره‌ها

مقدار فنل کل با روش فولین-سیوکالچو اندازه‌گیری شد. یک میلی‌گرم از عصاره مورد نظر در ۱۰ میلی‌لیتر متانول حل می‌شد تا نمونه اصلی ۰/۰۰۱٪ ایجاد شود. فراکسیون‌های ۰/۵ میلی‌لیتری (سه‌گانه) در لوله آزمایش ریخته می‌شد، سپس ۰/۵ میلی‌لیتر از معرف فولین سیوکالچو ۲ نرمال به لوله‌ها اضافه و به مدت ۲ دقیقه هم‌زده می‌شد. سپس ۱۰ میلی‌لیتر محلول سدیم کربنات ۷٪ اضافه می‌شد. جذب نمونه‌ها پس از یک ساعت قرار دادن آنها در دمای ۴۵ درجه سانتی‌گراد توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در ۷۶۵ نانومتر اندازه‌گیری می‌گردید. آزمایش‌ها برای عصاره و استاندارد سه بار تکرار شدند. برای رسم منحنی استاندارد اسید گالیک، محلول پایه‌ای از این ماده با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد، سپس از این غلظت، رقت‌های مختلف (۱۰۰، ۸۰، ۶۰، ۴۰، ۲۰، ۱۰) برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شدند. پس از طی مراحل مختلف، طبق روش مذکور جذب نمونه‌ها قرائت شد. براساس یک نمودار کالیبراسیون اسید گالیک، با بدست آوردن معادله خطی منحنی استاندارد و

اندازه‌گیری محتوی فلاونوئید تام عصاره‌ها

فلاونوئید تام نمونه‌ها به روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلراید و مطابق دستور کار چانگ-یانگ با کمی تغییرات اندازه‌گیری شد (Chang et al., 2002). طبق این روش، محلول ۰/۱ میلی‌گرم بر میلی‌لیتر از هر یک از عصاره‌ها تهیه می‌شد. ۰/۵ میلی‌لیتر از نمونه در ۱/۵ میلی‌لیتر متانول حل می‌شد. سپس ۰/۱ میلی‌لیتر کلراید آلومینیوم ۱۰٪ (وزنی-حجمی)، ۰/۱ میلی‌لیتر استات پتاسیم ۱ مولار و ۲/۸ میلی‌لیتر آب مقطر به آن اضافه می‌شد و به مدت ۳۰ دقیقه در دمای اتاق قرار می‌گرفت و در نهایت جذب مخلوط در ۴۱۵ نانومتر قرائت می‌گردید. از کوئرتستین برای رسم منحنی استاندارد استفاده شد. بدین صورت که ابتدا یک محلول از کوئرتستین با غلظت ۱۰۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر تهیه شد. سپس غلظت‌های دیگر (۱۰۰، ۸۰، ۶۰، ۴۰، ۲۰، ۱۰) برحسب میکروگرم بر میلی‌لیتر بدست آمد. براساس یک نمودار استاندارد کوئرتستین، با بدست آوردن معادله خط

کندر، ابتدا فعالیت آنزیم استیل کولین استراز در حضور کنترل در چند غلظت مختلف عصاره مورد سنجش قرار گرفت و میزان درصد مهارها و مقدار IC_{50} محاسبه گردید (شکل ۱). همانطور که ملاحظه می‌شود عصاره کندر استخراج شده توسط اتانول دارای کمترین مقدار و بیشترین اثر مهارکنندگی بر فعالیت آنزیم استیل کولین استراز است.

قرار دادن جذب عصاره در آن، مقدار فنول تام عصاره اندازه‌گیری شد (Shahidi & Nacz, 1995).

نتایج

تعیین درصد مهار آنزیم توسط عصاره‌های مختلف کندر و تعیین مقدار IC_{50} برای سنجش اثر حلال بر قدرت مهارکنندگی عصاره



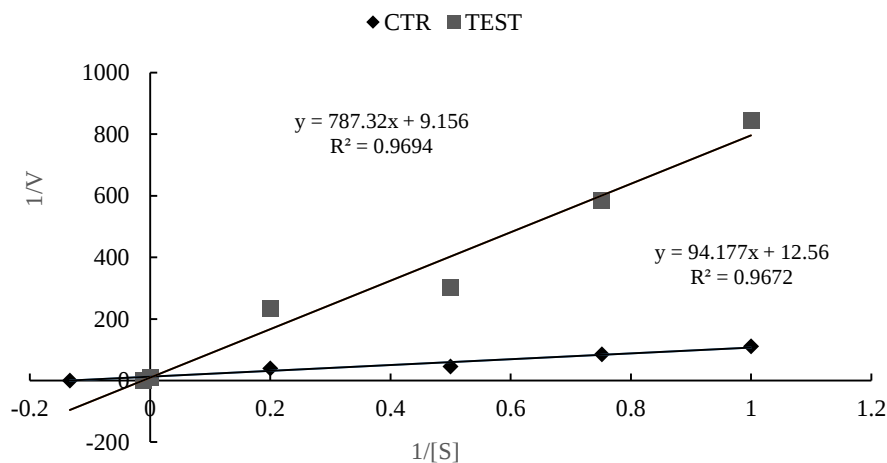
Different solvents-extracted *B. thurifera* gum extracts

شکل ۱- مقدار IC_{50} عصاره صمغ کندر استخراج شده توسط حلال‌های مختلف در رابطه با فعالیت استیل کولین استراز

Figure 1. IC_{50} value of different solvents-extracted *Boswellia thurifera* gum extracts in relation to acetylcholine esterase activity

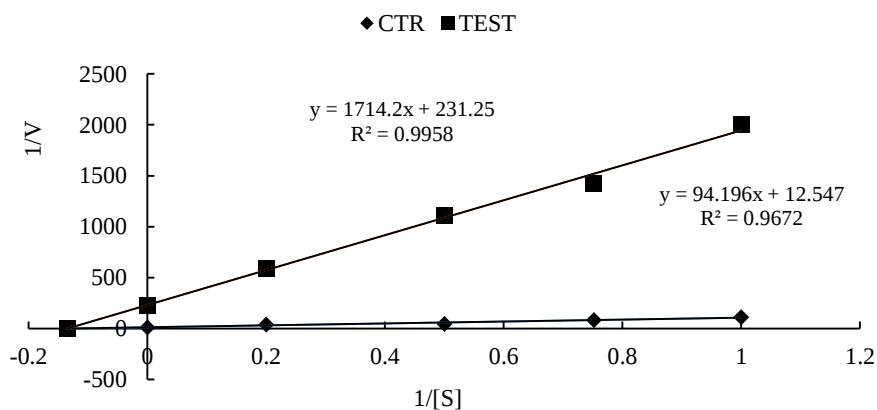
سوبسترا رقابت می‌نماید. در حالی که سایر حلال‌ها ظاهراً با استخراج مواد مختلف الگوی مهار مرکب (نارقاتبی- غیررقابتی) نسبت به آنزیم از خود نشان می‌دهند که می‌تواند در اثر اتصال مهارکننده هم به جایگاه فعال و هم به بخش‌های دیگری از آنزیم روی دهد (شکل‌های ۷-۳). توضیح اینکه در مهار نارقاتبی به هیچ عنوان رقابتی میان سوبسترا و مهارکننده بر سر جایگاه فعال آنزیم وجود ندارد، در حالی که در مهار غیررقابتی مهارکننده هم بر سر جایگاه فعال با سوبسترا رقابت می‌نماید و هم به مجموعه آنزیم سوبسترا متصل و فعالیت آنزیم را مختل می‌کند.

بررسی سینتیک مهار آنزیم استیل کولین استراز برای بررسی سینتیک مهار آنزیم استیل کولین استراز توسط عصاره کندر استخراج شده توسط حلال‌های مورد استفاده در این مطالعه، سرعت فعالیت آنزیم در غلظت‌های برابر مقادیر IC_{50} مهارکننده و در هفت غلظت سوبسترا اندازه‌گیری شد. آنگاه نمودار معکوس مضاعف (لاین‌ویور- برک) واکنش‌ها رسم شد که نتایج آن در شکل‌های ۷-۲ ملاحظه می‌گردد. شکل ۲ نشان‌دهنده مهار رقابتی آنزیم استیل کولین استراز توسط عصاره استونی صمغ کندر است، یعنی ترکیبی که توسط استون از صمغ کندر استخراج شده است بر سر جایگاه فعال با



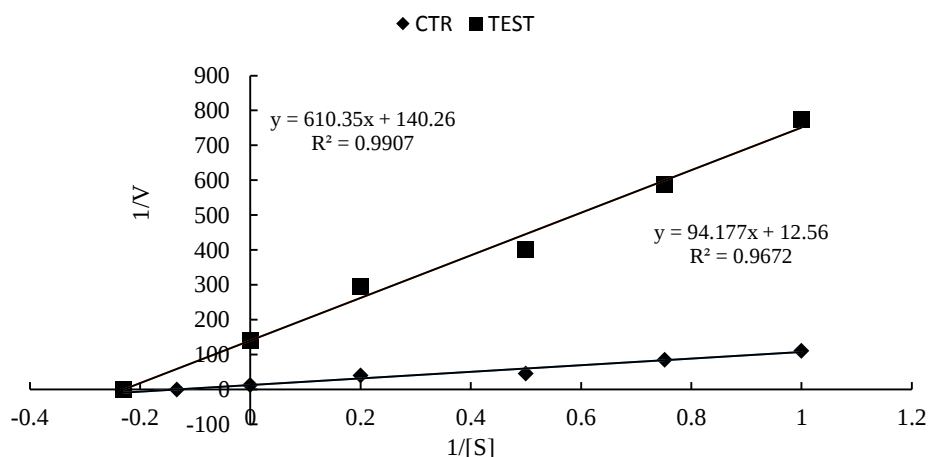
شکل ۲- نمودار معکوس مضاعف استیل کولین استراز (کنترل) در حضور عصاره استونی صمغ کندر (تست)، مهار رقابتی

Figure 2. Double reciprocal diagram of acetylcholine esterase (control) in presence of *Boswellia thurifera* gum acetone extract (test), competitive inhibition



شکل ۳- نمودار معکوس مضاعف استیل کولین استراز (کنترل) در حضور عصاره هگزانی صمغ کندر (تست)، مهار غیررقابتی

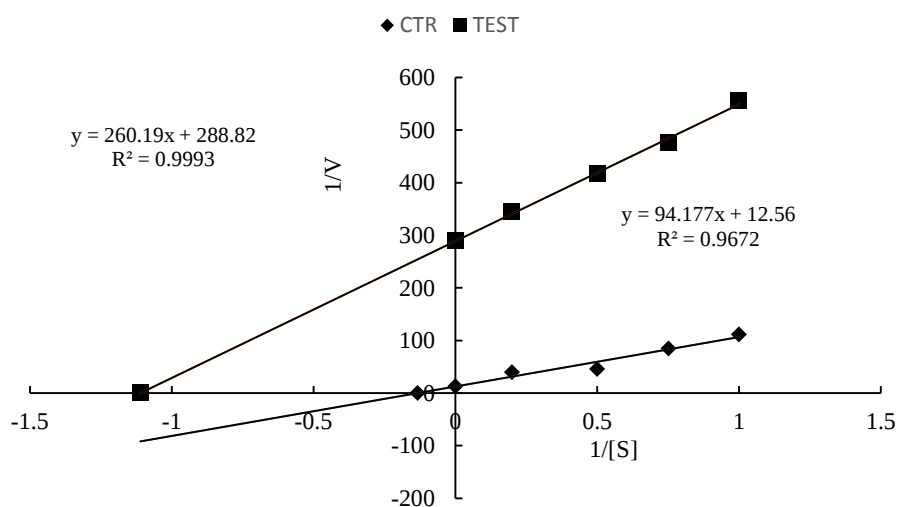
Figure 3. Double reciprocal diagram of acetylcholine esterase (control) in presence of *Boswellia thurifera* gum hexane extract (test), noncompetitive inhibition



شکل ۴- نمودار معکوس مضاعف استیل کولین استراز (کنترل)

در حضور عصاره متانولی صمغ کندر (تست)، مهار مرکب (نارقاتبی-غیرقاتبی)

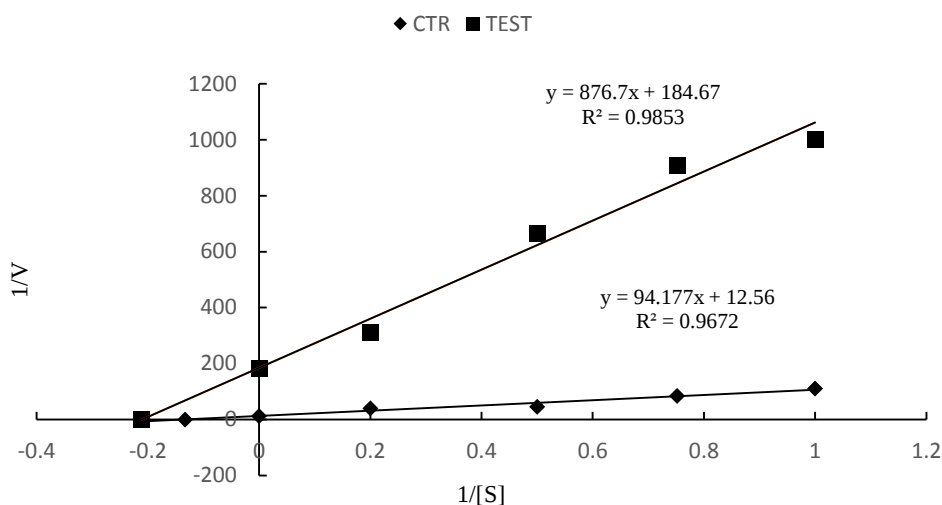
Figure 4. Double reciprocal diagram of acetylcholine esterase (control) in presence of *Boswellia thurifera* gum methanol extract (test), mixed (uncompetitive-noncompetitive) inhibition



شکل ۵- نمودار معکوس مضاعف استیل کولین استراز (کنترل) در حضور عصاره اتانولی صمغ کندر (تست)، مهار مرکب (نارقاتبی-غیرقاتبی)

غیرقاتبی)

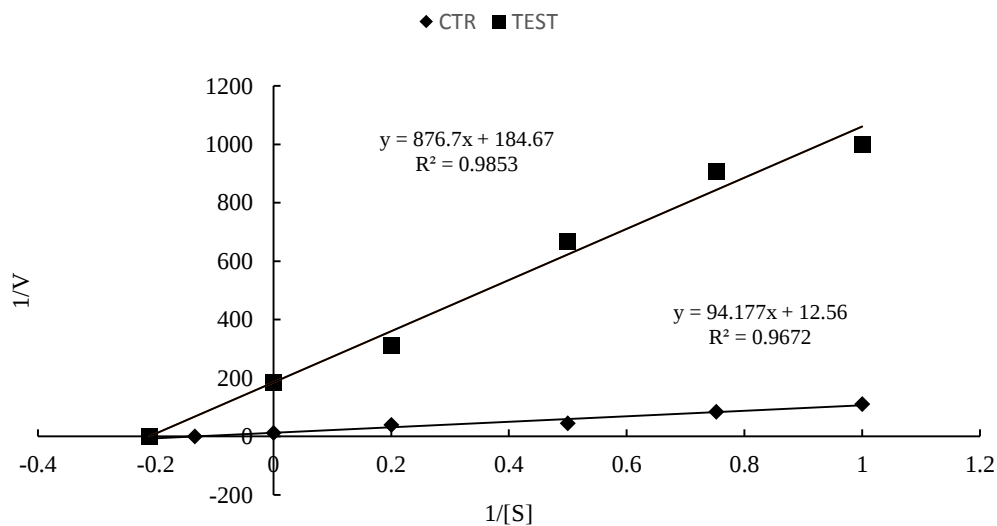
Figure 5. Double reciprocal diagram of acetylcholine esterase (control) in presence of *Boswellia thurifera* gum ethanol extract (test), mixed (uncompetitive-noncompetitive) inhibition



شکل ۶- نمودار معکوس مضاعف استیل کولین استراز (کنترل)

در حضور عصاره اتیل استاتی صمغ کندر (تست)، مهار مرکب (نارقاتبی-غیررقاتبی)

Figure 6. Double reciprocal diagram of acetylcholine esterase (control) in presence of *Boswellia thurifera* gum ethyl acetate extract (test), mixed (uncompetitive-noncompetitive) inhibition



شکل ۷- نمودار معکوس مضاعف استیل کولین استراز (کنترل)

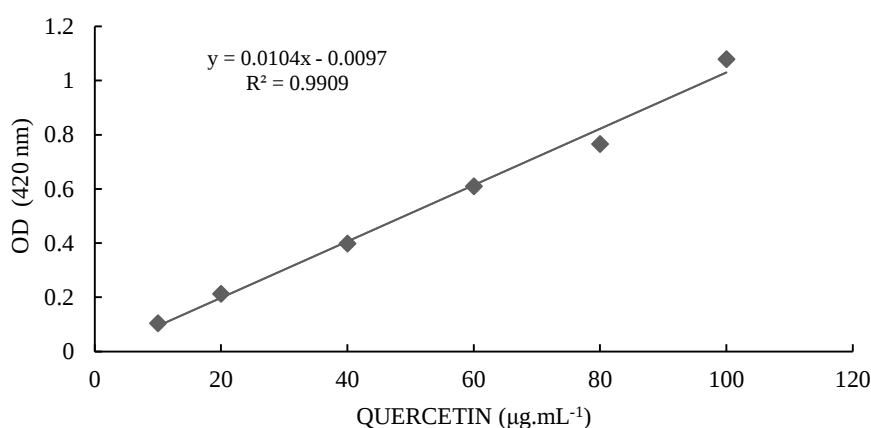
در حضور عصاره اتری صمغ کندر (تست)، مهار مرکب (نارقاتبی-غیررقاتبی)

Figure 7. Double reciprocal diagram of acetylcholine esterase (control) in presence of *Boswellia thurifera* gum ether extract (test), mixed (uncompetitive-noncompetitive) inhibition

۰/۱۶ میلی گرم هم‌ارز کوئرستین بر گرم ماده خشک عصاره، دارای بیشترین مقدار فلاونوئید استخراج شده است و در عصاره هگزانی با ۰/۰۲۹۰ میلی گرم هم‌ارز کوئرستین بر گرم ماده خشک عصاره، دارای کمترین مقدار فلاونوئید استخراج شده بود. در این میان مقدار فلاونوئید سنجش شده در عصاره اتانولی کندر (۰/۰۸۰ میلی گرم هم‌ارز کوئرستین بر گرم ماده خشک عصاره) چندان بالا نبود و نمی‌شود چندان به ماهیت فلاونوئیدی عوامل مؤثر عصاره اتانولی تأکید کرد.

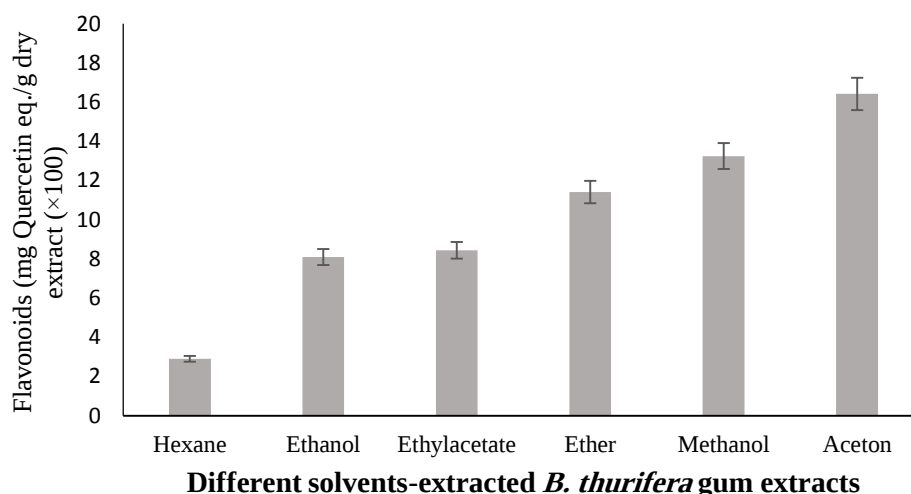
تعیین مقادیر فلاونوئید استخراج شده توسط حلال‌های مختلف از کندر

برای تعیین مقدار فلاونوئید تام هر یک از عصاره‌های مختلف صمغ گیاه کندر، ابتدا منحنی استاندارد محلول کوئرستین ترسیم شد (شکل ۸). سپس با قراردادن میزان جذب عصاره‌های مختلف در معادله خط منحنی استاندارد محلول کوئرستین، مقدار فلاونوئید تام هر یک از عصاره‌ها محاسبه شد (شکل ۹). نتایج سنجش محتوی فلاونوئید نشان داد که در عصاره استونی با



شکل ۸- نمودار استاندارد تغییرات جذب نوری در طول موج ۴۲۰ نانومتر در مقابل تغییرات غلظت کوئرستین

Figure 8. Standard graph of changes in absorbance at 420 nm versus changes in quercetin concentration



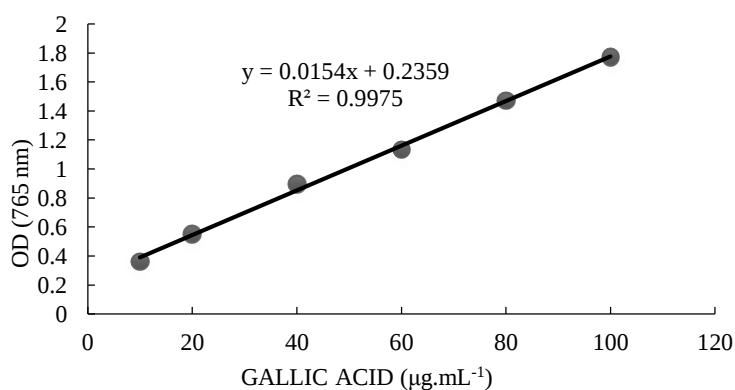
شکل ۹- مقدار فلاونوئید عصاره صمغ کندر استخراج شده توسط حلال‌های مختلف

Figure 9. Flavonoids content of different solvents-extracted *Boswellia thurifera* gum extracts

تعیین مقادیر فنول استخراج شده توسط حلال‌های مختلف از کندر

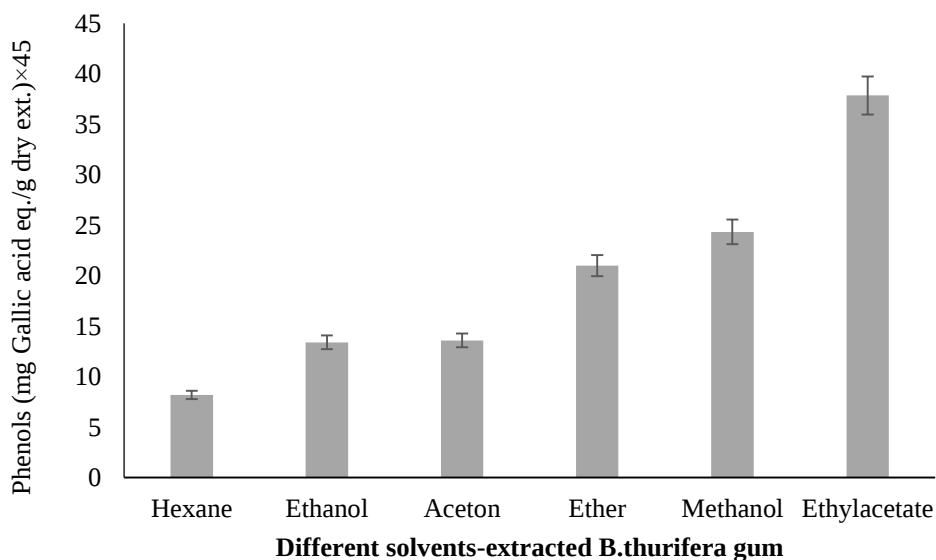
مقدار ترکیبات فنول تام عصاره‌های مختلف بدست آمده از صمغ کندر براساس مقدار جذب حاصل از واکنش عصاره‌ها با معرف فولین سیوکالچيو و بر مبنای مقایسه آنها با نمودار استاندارد اسیدگالیک (شکل ۱۰) محاسبه شد

(شکل ۱۱). مطابق نتایج این سنجش‌ها عصاره اتیل استاتی با مقدار ۰/۸۴ میلی گرم هم‌ارز اسیدگالیک بر گرم ماده خشک عصاره، بیشترین مقدار فنل کل را دارد و عصاره هگزانی با مقدار ۰/۱۸ میلی گرم هم‌ارز اسیدگالیک بر گرم ماده خشک عصاره، کمترین مقدار فنل کل را دارا بود.



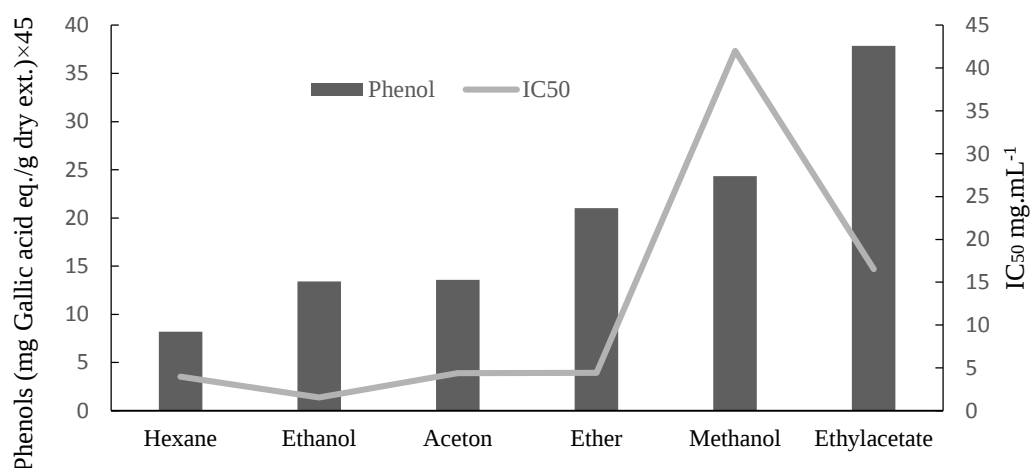
نمودار ۱۰- نمودار استاندارد تغییرات جذب نوری در طول موج ۷۶۵ نانومتر در مقابل تغییرات غلظت اسیدگالیک

Figure 10. Standard graph of changes in absorbance at 765 nm versus changes in gallic acid concentration



شکل ۱۱- مقدار فنول عصاره صمغ کندر استخراج شده توسط حلال‌های مختلف

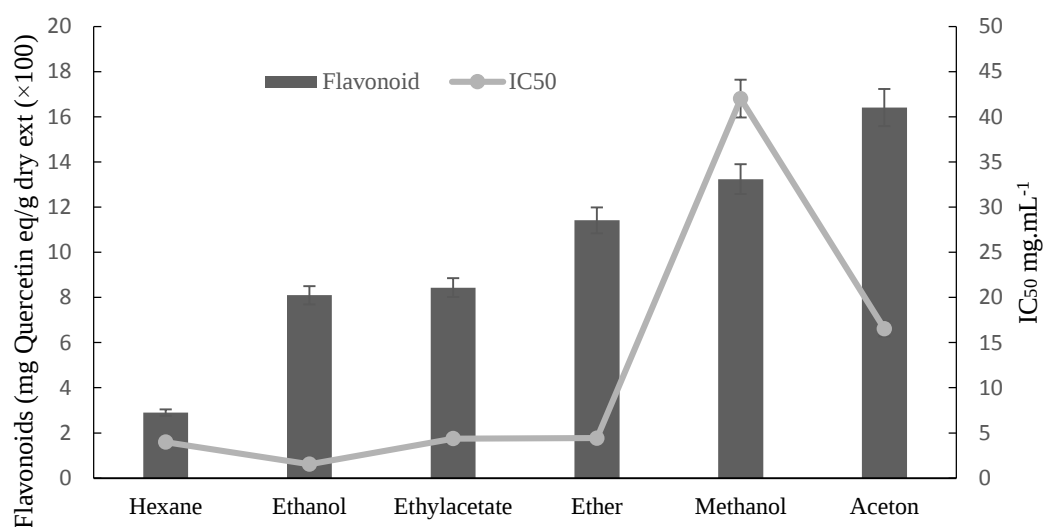
Figure 11. Phenols content of different solvents-extracted *Boswellia thurifera* gum extracts



Different solvents- extracted *B.thurifera* gum

شکل ۱۲- محتوی فنول و مقدار IC₅₀ عصاره صمغ کندر استخراج شده توسط حلال‌های مختلف

Figure 12. Phenols content and IC₅₀ value of different solvents-extracted *Boswellia thurifera* gum extracts



Different solvents- extracted *B.thurifera* gum

شکل ۱۳- محتوی فلاونوئید و مقدار IC₅₀ عصاره صمغ کندر استخراج شده توسط حلال‌های مختلف

Figure 13. Flavonoids content and IC₅₀ value of different solvents-extracted *Boswellia thurifera* gum extracts

بحث

طریق کاهش تجزیه استیل کولین استراز می‌گردد. اثرهای جانبی که در برخی از داروهای سنتزی برای مهار استیل کولین استراز استفاده می‌شد، محققان را به یافتن

استفاده از مهارکننده‌های استیل کولین استراز موجب کاهش عوارض ناشی از فعالیت آنزیم استیل کولین استراز از

مهارکننده‌های استیل کولین استراز با منشأ طبیعی علاقه‌مند کرد (Soreq & Seidman, 2001). در یک بررسی نشان داده شده که قرص‌هایی که حاوی عصاره کندر بوده به بیماران مبتلا به آلزایمر تجویز کردند و مشخص شد اثر مفید آن به دلیل وجود اسیدهای بوسولیک، نمک‌ها و مشتقات آنهاست. مصرف کندر برای تقویت حافظه و یادگیری که از دیرباز مرسوم بوده، بی ارتباط به این یافته‌های جدید بدست آمده نیست (Singh & Atal, 1986). از ترکیبات مهم موجود در کندر می‌توان اسانس، رزین‌ها و قندهایی از جمله قندهای زایلوز، آرابینوز، گالاکتوز و اسید اورونیک را نام برد (Badria et al., 2003).

مطالعات متعددی در مورد تأثیر نوع حلال و به‌ویژه میزان قطبیت آن بر نوع ترکیبات استخراج شده توسط آن حلال از یک عصاره گیاهی خاص انجام شده است که به‌وضوح این همبستگی و تأثیر را نشان داده‌اند (Tomsone et al., 2012; Dhawan & Gupta, 2017; Kajdžanoska et al., 2011).

با این رویکرد که حلال‌های مختلف قادر به استخراج مواد متفاوتی از پودر کندر حل شده در آن حلال خواهند بود و به این ترتیب می‌توان به روش افتراقی به ترکیب مؤثر و مهارکننده موجود در صمغ کندر نزدیک شد، از شش حلال مختلف برای عصاره‌گیری از پودر صمغ کندر استفاده شد. نتایج این پژوهش نشان داد که بیشترین فعالیت مهاري بر روی آنزیم استیل کولین استراز مربوط به عصاره اتانولی کندر می‌باشد. ترتیب کاهش فعالیت عصاره صمغ کندر تهیه شده با استفاده از حلال‌های مختلف، به صورت اتانول < هگزان < اتیل استات < اتر < استون < متانول است. برای بررسی خصوصیات رفتاری ترکیبات مؤثره موجود در عصاره‌های استخراج شده مختلف از روش تحلیل سینتیکی مهار آنزیم توسط عصاره‌ها استفاده شد. نتایج بدست آمده از بررسی سینتیکی نشان داد که به هر حال تفاوت‌هایی در الگوی سینتیکی مهار عصاره‌ها دیده می‌شود. بدین شکل که صرف‌نظر از قدرت مهارکنندگی عصاره‌ها، نیم‌رخ سینتیک مهار هر عصاره مشخص و متمایز بود. در این میان نوع مهار اعمال شده توسط عصاره استونی رقابتی، عصاره هگزانی

غیر رقابتی و برای سایر حلال‌ها با مختصر تفاوت‌هایی در جزئیات، الگوی مهار مرکب از خود نشان می‌دادند. نتایج ذکرشده به وضوح حکایت از تفاوت در ماهیت ترکیباتی است که به‌وسیله حلال‌های مختلف از صمغ کندر جدا شده‌اند. با توجه به نتایج اخیر و نظر به اینکه فلاونوئیدها محافظت عصبی در مغز را انجام می‌دهند، همچنین فلاونوئیدها می‌توانند مورفولوژی عصبی و جریان خون عروقی مغزی را تقویت کنند (Kay, 2010). در ادامه کار به سنجش محتوی فلاونوئید عصاره‌ها پرداخته شد. از سویی نظر به عملکرد فنل و ترکیبات فنلی و به دلیل تأثیرات روی سیستم عصبی مرکزی، سنجش محتوی فنلی عصاره‌ها نیز در دستور کار قرار گرفت. تا به حال بیشتر از ۱۰۰۰۰ ترکیب در قلمرو گیاهان شناسایی شده است که فعالیت‌های زیستی از جمله خواص ضدآلزیمری، ضد سرطانی، کاهنده قندخون و ضد التهابی به آنها نسبت داده شده است. به‌طور کلی تمامی این خواص، حاصل فعالیت‌های آنتی‌اکسیدانی، فلاونوئیدی و فنولی در گیاهان است (Vanessa & Mah, 2021). زمانی که مقایسه‌ای میان محتوی فنلی و مقدار IC_{50} عصاره‌ها انجام می‌شود (شکل ۱۲)، متوجه می‌شویم که عصاره اتانولی از لحاظ محتوی فنولی در موقعیت نسبتاً پایینی قرار دارد و نمی‌توان تأثیر عوامل فنولی را در قدرت مهارکنندگی این عصاره چشمگیر دانست. از نظر مقدار فلاونوئید تام عصاره‌ها، بیشترین مقدار مربوط به عصاره استونی صمغ مصطکی و کمترین مقدار مربوط به عصاره هگزانی صمغ مصطکی بود. در اینجا نیز عصاره اتانولی جایگاه بالایی از نظر محتوی فلاونوئید نشان نمی‌دهد (شکل ۱۳)، در نتیجه باز هم امکان دخالت فلاونوئید در عملکرد مهاري عصاره ذکرشده قطعی نیست.

سپاسگزاری

نویسندگان از معاون آموزشی و تحصیلات تکمیلی و معاون پژوهشی دانشگاه کردستان به دلیل تأمین اعتبار اجرای پایان‌نامه، تشکر و قدردانی می‌نمایند.

References

- Abdel-Tawab, M., Werz, O. and Schubert-Zsilavecz, M., 2011. *Boswellia serrata*: an overall assessment of in vitro, preclinical, pharmacokinetic and clinical data. *Clinical pharmacokinetics*, 50(6): 349-369.
- Al-Yasiry, A.R. and Kiczorowska, B., 2016. Frankincense-therapeutic properties. *Postępy higieny i medycyny doświadczalnej*, 70: 380-391.
- Arens, A.M. and Kearney, T., 2019. Adverse Effects of Physostigmine. *Journal of medical toxicology: official journal of the American College of Medical Toxicology*, 15(3): 184-191.
- Badria, F.A., Mikhaeil, B.R., Maatooq, G.T. and Amer, M.M., 2003. Immunomodulatory triterpenoids from the oleogum resin of *Boswellia carterii* Birdwood. *Zeitschrift fur Naturforschung. C, Journal of biosciences*, 58(7-8): 505-516.
- Bubley, A., Erofeev, A., Gorelkin, P., Beloglazkina, E., Majouga, A. and Krasnovskaya, O., 2023. Tacrine-Based Hybrids: Past, Present, and Future. *International journal of molecular sciences*, 24(2): 1717-1724.
- Chang, C.C., Yang, M.H., Wen, H.M. and Chern, J.C., 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of food and drug analysis*, 10: 18-27.
- Dhawan, D. and Gupta, J., 2017. Comparison of Different Solvents for Phytochemical Extraction Potential from *Datura metel* Plant Leaves. *International Journal of Biological Chemistry*, 11(1): 17-22.
- Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres Jr, V., Feather-Stone, R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochemical pharmacology*, 7(2): 88-95.
- Hafez Ghoran, S., Taktaz, F., Mozafari, A.A., Tunçtürk, M., Sekeroglu, N. and Kijjoa, A., 2022. Uncommon Terpenoids from *Salvia* Species: Chemistry, Biosynthesis and Biological Activities. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 27(3): 1128.
- Huang, K., Chen, Y., Liang, K., Xu, X., Jiang, J., Liu, M. and Zhou, F., 2022. Review of the Chemical Composition, Pharmacological Effects, Pharmacokinetics, and Quality Control of *Boswellia carterii*. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2022: 6627104.
- Ingkaninan, K., Temkitthawon, P., Chuenchom, K., Yuyaem, T. and Thongnoi, W., 2003. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. *Journal of ethnopharmacology*, 89(2-3): 261-264.
- Kajdžanoska, M., Petreska, J. and Stefova, M., 2011. Comparison of Different Extraction Solvent Mixtures for Characterization of Phenolic Compounds in Strawberries. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(10): 5272-5278.
- Kay, C., 2010. The future of flavonoid research. *British Journal of Nutrition*, 104(S3): S91-S95.
- Luo, X., Lauwers, M., Layer, P.G. and Wen, C., 2021. Non-neuronal Role of Acetylcholinesterase in Bone Development and Degeneration. *Frontiers in cell and developmental biology*, 8: 620543.
- Rajabian, A., Sadeghnia, H., Fanoudi, S. and Hosseini, A., 2020. Genus *Boswellia* as a new candidate for neurodegenerative disorders. *Iranian journal of basic medical sciences*, 23(3): 277-286.
- Saxena, M. and Dubey, R., 2019. Target Enzyme in Alzheimer's Disease: Acetylcholinesterase Inhibitors. *Current topics in medicinal chemistry*, 19(4): 264-275.
- Shahidi, F. and Naczk, M., 1995. *Food Phenolics: Sources, Chemistry, Effects and Applications*. Technomic Publishing Co., Lancaster. 331p.
- Singh, G.B. and Atal, C.K., 1986. Pharmacology of an extract of salai guggal ex-*Boswellia serrata*, a new non-steroidal anti-inflammatory agent. *Agents and Actions* 18: 407-412.
- Soreq, H. and Seidman, S., 2001. Acetylcholinesterase — new roles for an old actor. *Nat Rev Neurosci* 2: 294-302.
- Tattersall, J. 2009. Seizure activity post organophosphate exposure. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 14(10): 3688-3711.
- Tomsone, L., Kruma, Z. and Galoburda, R., 2012. Comparison of different solvents and extraction methods for isolation of phenolic compounds from horseradish roots (*Armoracia Rusticana*). *World Academy of Science, Engineering and Technology*, 64: 903-908.
- Vanessa, V.V. and Mah, S.H., 2021. Xanthone: Potential Acetylcholinesterase Inhibitor for Alzheimer's Disease Treatment. *Mini reviews in medicinal chemistry*, 21(17): 2507-2529.
- Villegas, L.G.C., Mashhadi, N., Chen, M., Mukherjee, D., Taylor K.E. and Biswas, N., 2016. A Short Review of Techniques for Phenol Removal from Wastewater. *Current Pollution Reports* 2: 157-167.