DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.6.7

مقاله پژوهشی

بررسی محتوای فنول و فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌کولین‌استرازی نمونه‌های بره موم جمع آوری شده از سه منطقه استان کرمان

شهناز فتحی هفشجانی[۱]، صفا لطفی[۱*]، الهام رضوان نژاد[۱]، مجتبی مرتضوی[۱] و علی ریاحی مدوار[۲]

[۱] کرمان، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، گروه بیوتکنولوژی.

[۲] بجنورد، دانشگاه کوثر بجنورد، دانشکده علوم پایه، گروه سلولی و مولکولی.

تاریخ دریافت: ۱۳۹۹/۱۰/۱۵ تاریخ پذیرش: ۱۴۰۰/۱۱/۰۵

چکیده

بره‌موم (پروپولیس)، یک ماده طبیعی رزینی با خواص زیستی متعدد است که توسط زنبور عسل تولید می‌شود. در این مطالعه، عصاره اتانولی نمونه‌های بره‌موم جمع‌آوری شده از سه منطقه استان کرمان (لاله زار، راین و سرآسیاب) مورد بررسی قرار گرفته است. محتوای فنل و فلاونوئید کل عصاره‌ها بترتیب با روش فولین–سیوکالتو و آلومینیوم کلراید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی-کولین‌استرازی آنها با دو روش DPPH و المن مطالعه شد. نتایج به دست آمده نشان داد که محتوای فنل (۱۶۵/۹۷ میلی‌گرم اکی-والان گالیک‌اسید بر گرم عصاره) و فلاونوئید کل (۷۲/۲۶ میلی‌گرم اکی‌والان کوئرستین بر گرم عصاره) نمونه لاله‌زار نسبت به دو نمونه سرآسیاب و راین بیش از دو برابر و توانایی این نمونه در مهار رادیکال آزاد DPPH (IC_{50}: ۵/۶۴ µg/ml)، نسبت به دو نمونه دیگر حدود هفت برابر است. بنابراین، یک ارتباط مستقیم بین فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها و محتوای کل فنل و فلاونوئید آنها مشاهده شد. همچنین نتایج تست المن نشان داد که فعالیت آنتی‌کولین‌استرازی نمونه لاله‌زار (IC_{50}: ۱۴/۳۷ µg/ml) نسبت به دو نمونه راین و سرآسیاب به‌ترتیب ۴/۸ و ۵/۴ برابر بیشتر است. بنابراین با توجه به نتایج بدست آمده، بره‌موم لاله‌زار پتانسیل بسیار خوبی برای مطالعات بیشتر دارد.

واژه های کلیدی: بره‌موم (پروپولیس)، محتوای فنل کل، محتوای فلاونوئید کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فعالیت آنتی‌کولین-استرازی.

* نویسنده مسئول، تلفن: ۰۳۴۳۳۷۷۶۶۱۱ ، پست الکترونیکی: s.lotfi@kgut.ac.ir

مقدمه

بره موم (پروپولیس) که عموما به عنوان چسب زنبور نیز شناخته می شود یک ماده طبیعی رزینی و به شدت چسبنده است که به وسیله زنبور عسل با مخلوط کردن موم و بزاق حاوی آنزیم های خاص با ترکیبات مشتق شده از گیاهان تولید می‌شود (۳۶، ۳۷). بره موم که ترکیبی لیپوفیلیک است در دماهای مختلف، ویژگی های فیزیکی مختلفی را دارا می‌باشد. در سرما این ماده سخت و شکننده و هنگام گرم شدن، نرم، قابل انعطاف و بسیار چسبنده می شود (۲۱). نقطه ذوب بره‌موم ۶۰ تا ۷۰ درجه سانتی گراد است، اما برای بعضی از نمونه‌ها نقطه ذوب ممکن است به۱۰۰ درجه سانتی گراد هم برسد. رنگ این ماده طبیعی معطر و خوشبو بسته به نوع ترکیبات تشکیل دهنده از سبز تا قرمز و قهوه ای تیره متغیر است (۷، ۲۲، ۳۰). ترکیب شیمیایی بره موم نزدیک به رزین ها و ترکیبات موجود در منابع گیاهی است که برای تولید آن استفاده شده است. همراه با پیشرفت تحقیقات، ترکیبات متنوعی نظیر پلی فنول، آلدهیدهای فنلی، مونوترپن، اسیدهای آمینه، استروئیدها، کومارین‌ها و چندین نوع ترکیب دیگر در

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.6.7
مقاله پژوهشی

ساختار بره موم یافت شده است(۱۶، ۳۰، ۵۰). فعالیت زیستی بره‌موم به طور عمده به واسطه چند ماده نظیر فلاونوئیدها، ترپنها، اسیدهای کافئیک، فرولیک،کوماریک و استرها می‌باشد(۳۶، ۳۷).

بره موم خام را نمی توان به طور مستقیم مورد استفاده قرار داد. ابتدا باید با یک حلال مناسب، مواد تشکیل‌دهنده آن را به صورت محلول درآورد و بدین ترتیب عصاره بره موم را تهیه و از آن برای مصارف گوناگون استفاده نمود. روش های عصاره گیری ممکن است روی فعالیت آن تاثیر داشته باشد. به دلیل اینکه حلالهای مختلف، اجزای تشکیل دهنده مختلفی را حل کرده و استخراج می کنند از حلال های اتانول، متانول، آب، هگزان، استون، دی کلرومتان و کلروفرم به عنوان عصاره گیر استفاده می شود (۱۸، ۳۲).

نوع حلال بسته به نوع استفاده‌ای که از عصاره می‌شود متفاوت خواهد بود. معمولا از اتانول برای تهیه عصاره بره موم استفاده می شود. عصاره الکلی بره موم مدت زمان بیشتری توانایی نگهداری خواص موجود در بره موم را دارد. بیشترین مواد تشکیل‌دهنده فعال در محلول اتانول و پروپیل الکل مشاهده شده است و مواد تشکیل دهنده فعال کمتری در آب محلول هستند. این ماده طبیعی خارق العاده خواصی شامل اثر ضد باکتریایی، ضد قارچی، ضد انگلی، آنتی‌اکسیدانی، ضد التهابی و ضد پوسیدگی دندان دارد. همچنین به عنوان تقویت کننده سیستم ایمنی بدن، بهبود دهنده اختلالات دهان و لثه، بی حس کننده موضعی و کاهش دهنده فشار خون و قند خون و...کاربرد دارد (۸، ۳۸، ۴۱).

شواهد قابل توجهی در مورد جنبه های مختلف شیمیایی و زیستی بره موم وجود دارد، اما کاربرد درمانی و استفاده از آن توسط صنعت داروسازی هنوز محدود است. این مسیله عمدتا به دلیل تغییر ترکیب شیمیایی آن با منشاء جغرافیایی است، زیرا زنبورها از گیاهان مختلف در اکوسیستم های مختلف استفاده می کنند. شناسایی ترکیبات اصلی در نمونه های بره موم ضروری است. گزارش از خواص زیستی بره موم باید شامل یک بررسی دقیق از ترکیب و منابع گیاه شناسی آن باشد (۲۸، ۴۳). در این تحقیق، میزان فنل و فلاونوئید کل و همچنین فعالیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی-کولین‌استرازی عصاره های اتانولی نمونه‌های بره‌موم جمع-آوری شده از سه منطقه مختلف استان کرمان (لاله زار، راین و سرآسیاب) مورد مطالعه قرار گرفته است.

مواد و روشها

نئوستیگمین، آنزیم استیل کولین استراز مارماهی الکتریکی (نوع VI-S)، استیل تیوکولین یداید، معرف المن (DTNB)، آلبومین سرم گاوی (BSA)، ۲،۲-دی فنیل-۱-پیکریل هیدرازیل(DPPH)، معرف فولین-سیوکالتو، گالیک اسید، کوئرستین و آلومینیوم کلراید از شرکت سیگما (Sigma) خریداری شدند. دی پتاسیم هیدروژن فسفات (K_2HPO_4)، پتاسیم دی هیدروژن فسفات (KH_2PO_4) و آسکوربیک اسید از شرکت مرک (Merck) خریداری گردیدند.

تهیه عصاره اتانولی از نمونه های بره موم: نمونه های بره موم مورد استفاده دراین تحقیق، بصورت خام توسط زنبورداران از کندوهای زنبورعسل از سه منطقه مختلف استان کرمان (لاله زار، راین و سرآسیاب) جمع آوری شده است. در جدول ۱، نام منطقه جمع آوری و رنگ بره‌موم جمع آوری شده ذکر شده است.

جدول ۱- منطقه جمع آوری و رنگ نمونه های بره موم مورد استفاده در این مطالعه.

نمونه	موقعیت مکانی	رنگ نمونه
۱	لاله زار	سبز روشن
۲	راین	سبز متمایل به قهوه ای
۳	سرآسیاب	قهوه ای

نمونه های بره موم پس از گردآوری در محیطی تاریک و در دمای۲۰ - درجهٔ سانتی گراد در فریزر نگهداری شدند. برای تهیه عصاره اتانولی از این نمونه ها بدین ترتیب عمل

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.6.7

شد. ابتدا بره موم خام توسط نیتروژن مایع به پودر تبدیل گردید. حدود ۱۰ گرم از بره موم پودر شده در ۱۰۰ میلی لیتر اتانول ۸۰ درصد در ظروف تیره و در تاریکی خیسانده و به مدت ۷۲ ساعت در شیکر انکوباتور قرار داده شد و سپس نمونه ها سانتریفیوژ گردید. مایع رویی صاف شده با استفاده از دستگاه روتاری در دمای ۴۰ درجه سانتیگراد، تغلیظ و پس از تخلیه از مخزن دستگاه، جهت خشک شدن کامل، روی پلیت شیشه‌ای پخش گردید و در آون تحت خلا در دمای ۴۰ درجه سانتی گراد قرار داده شد. عصاره های اتانولی خشک شده از روی سطح پلیت جمع‌آوری و در ظروف تیره تا زمان انجام مراحل بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتی گراد نگهداری شدند.

سنجش میزان فنل کل: برای اندازه گیری میزان فنل کل از روش فولین-سیوکالتو (Folin-Ciocalteu) و از گالیک اسید به عنوان استاندارد کالیبراسیون استفاده شد (۵). معرف فولین-سیوکالتو یک محلول زرد رنگ است که در محیطی که حاوی مقدار زیادی فنل باشد به رنگ آبی تیره تغییر رنگ می‌دهد. در این روش اساس کار، احیای این معرف توسط ترکیبات فنولی در محیط قلیایی و ایجاد کمپلکس آبی رنگ می‌باشد. نتایج به دست آمده از این تست، بر حسب میلی‌گرم اکی‌والان گالیک اسید در گرم عصاره (mg GAE/g extract) بیان می‌شود (۴۵). بدین منظور ۱۰۰ میکرولیتر فولین-سیوکالتو ۰/۲ نرمال، ۱۵ میکرولیتر عصاره بره‌موم حل شده در اتانول ۸۰ درصد (غلظت نهایی: ۵۰ میکروگرم بر میلی لیتر) و ۵۸۵ میکرولیتر آب مقطر باهم مخلوط شدند. بعد از یک دقیقه، ۳۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۷/۵ ٪ به این مخلوط اضافه گردید و پس از آنکه نمونه به مدت ۳۰ دقیقه در محیط تاریک قرار داده شد، مقدار جذب آن توسط دستگاه اسپکتروفتومتر در طول‌موج ۷۳۵ نانومتر ثبت شد. برای هر نمونه سه تکرار در نظر گرفته شد. از مخلوط ۶۰۰ میکرولیترآب مقطر، ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین-سیوکالتو ۰/۲ نرمال و ۳۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۷/۵ ٪ به‌عنوان نمونه شاهد این تست استفاده شد.

سنجش میزان فلاونوئید کل: اندازه گیری فلاونوئیدها با استفاده از روش رنگ سنجی آلومینیوم کلرید انجام شد (۱۰). این ترکیب قادر به اندازه گیری ترکیباتی از جمله فلاونون و فلاونول در نمونه مورد نظر است. آلومینیوم کلرید با ترکیب شدن با گروه کتون و هیدروکسیل فلاونون و فلاونول یک ترکیب پایدار ایجاد می کند. هر چه رنگ ایجاد شده به زرد متمایل‌تر باشد، فلاونوئید موجود در نمونه بیشتر است. در این تست، از کوئرستین به عنوان استاندارد کالیبراسیون استفاده و نتایج بر اساس میلی‌گرم اکی‌والان کوئرستین در گرم عصاره (mg QE/g extract) گزارش شد (۴۹، ۲). برای انجام این آزمایش، ۵۰۰ میکرولیتر عصاره بره موم حل شده در اتانول ۷۵ درصد به ۵۰۰ میکرولیتر آلومینیوم کلرید ۲٪ موجود در کووت اضافه گردید (غلظت نهایی عصاره بره موم: ۵۰ میکروگرم برمیلی لیتر)، سپس کووت حاوی محلول فوق در تاریکی به مدت ۱۵ دقیقه انکوبه شد. بعد از این مدت، جذب آن در طول موج ۴۳۵ نانومتر با دستگاه اسپکتروفتومتر خوانده شد. از محلول حاوی ۵۰۰ میکرولیتر آلومینیوم کلرید ۲٪ و ۵۰۰ میکرولیتر آب مقطر به عنوان محلول شاهد استفاده گردید. برای هر نمونه سه تکرار در نظر گرفته شد.

ارزیابی فعالیت آنتی اکسیدانی: استفاده از روش (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) DPPH به منظور بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی و به طور کلی آنتی‌اکسیدانی‌های طبیعی، یکی از پرکاربردترین روش‌ها می باشد (۷). DPPH یک رادیکال آزاد هیدروفیل و پایدار به رنگ بنفش است که دارای حداکثر جذب در طول موج ۵۱۷-۵۱۵ نانومتر می‌باشد و در اثر احیا شدن به رنگ زرد کمرنگ و یا بیرنگ در می‌آید. هرچه یک نمونه دارای فعالیت آنتی‌اکسیدانی بالاتری باشد شدت کاهش رنگ بیشتر خواهد بود (۳۱).

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.6.7

برای انجام این آزمایش، برای هر نمونه از بره‌موم از شش غلظت مختلف عصاره حل شده در متانول استفاده شد و برای هر غلظت، آزمون سه بار تکرار گردید. ابتدا ۷۵۰ میکرولیتر از محلول DPPH (۰/۴میلی مولار) به ۲۵۰ میکرولیتر عصاره بره‌موم موجود در کووت اضافه شد. سپس محلول فوق به مدت ۳۰ دقیقه در جای تاریک انکوبه گردید. بعد از انکوبه کردن، جذب محلول در طول موج ۵۱۷ نانومتر تعیین شد. از محلول حاوی یک میلی لیتر متانول به عنوان محلول شاهد و از محلول شامل ۷۵۰ میکرولیتر DPPH و ۲۵۰ میکرولیتر متانول به عنوان نمونه کنترل استفاده شد. در این آزمایش، از اسید آسکوربیک به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

به منظور محاسبه فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها، با استفاده از فرمول پایین، درصد مهار رادیکال آزاد DPPH برای هر غلظت از عصاره بره‌موم و همچنین اسید آسکوربیک محاسبه شد و در نهایت با رسم نمودار دوز-پاسخ، شاخص IC_{50} (غلظتی از نمونه که در آن ۵۰٪ رادیکال DPPHمهار می‌شود) برای هر نمونه به دست آورده شد.

$$\text{Inhibition of DPPH } (\%) = [(A_{control} - A_{sample})/A_{control}] \times 100$$

$A_{control}$: جذب کنترل

A_{sample}: جذب نمونه

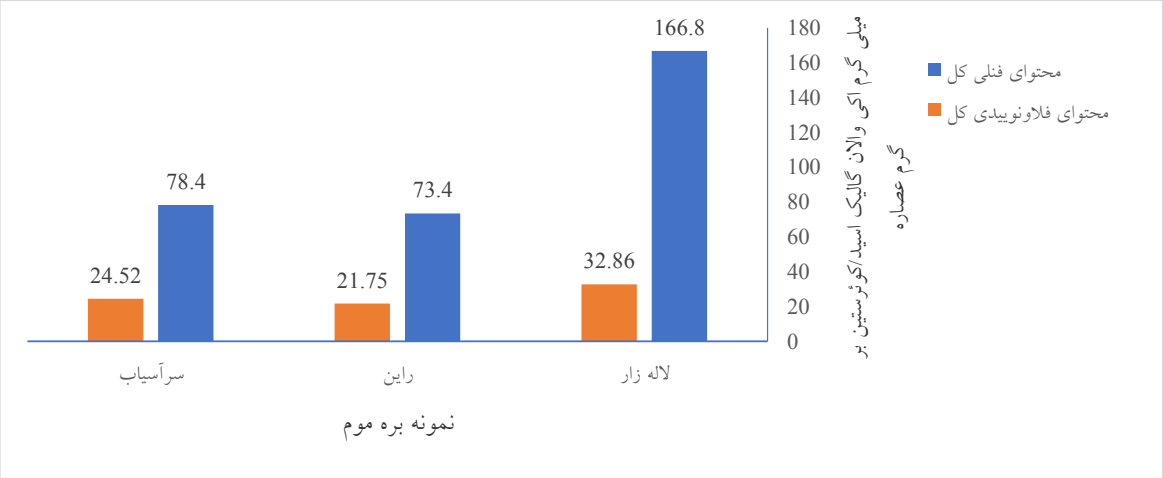
سنجش فعالیت آنتی‌کولین‌استرازی: در این مطالعه جهت بررسی فعالیت آنتی‌کولین‌استرازی عصاره اتانولی نمونه های بره موم، از روش المن استفاده شد (۶). فعالیت آنزیم استیل‌کولین‌استراز (AChE) در عدم حضور و حضور ۶ غلظت مختلف از هر عصاره مورد مطالعه قرار گرفت و برای هر غلظت سه تکرار در نظر گرفته شد. همه تست های آنزیمی با حجم کلی ۲۰۰µl و در پلیت های ۹۶ خانه انجام شدند. نتایج به دست آمده از این مطالعه به صورت غلظتی از عصاره که توانایی مهار فعالیت آنزیمی به میزان ۵۰ درصد را دارد (IC_{50}) بیان شد. از مهارکننده شناخته شده آنزیم استیل‌کولین‌استراز، نئوستیگمین، به عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

مخلوط واکنش حاوی بافر فسفات پتاسیم ۰/۱ مولار (pH= 8)، آنزیم (AChE) با غلظت نهایی ۰/۱ واحد بر میلی لیتر و DTNB با غلظت نهایی ۰/۵ میلی‌مولار بود. نمونه های بره موم به مدت ۱۰ دقیقه با مخلوط واکنش در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. سپس سوبسترا (استیل تیوکولین یدید) با غلظت نهایی ۱ میلی مولار به مخلوط واکنش افزوده و جذب نمونه‌ها بعد از ۱۰ دقیقه در ۴۰۵ نانومتر با دستگاه میکروپلیت ریدر (Elx808 BioTek Instruments) خوانده شد. یک نمونه حاوی همه اجزای واکنش به استثنای آنزیم به عنوان نمونه شاهد در نظر گرفته شد. در نهایت درصد مهار فعالیت آنزیم در هر غلظت از عصاره بره موم محاسبه شد. سپس تغییرات درصد مهار فعالیت آنزیمی نسبت به لگاریتم غلظت (نمودار دوز-پاسخ) برای هر عصاره ترسیم و مقدار IC_{50} با استفاده از این نمودار تعیین شد.

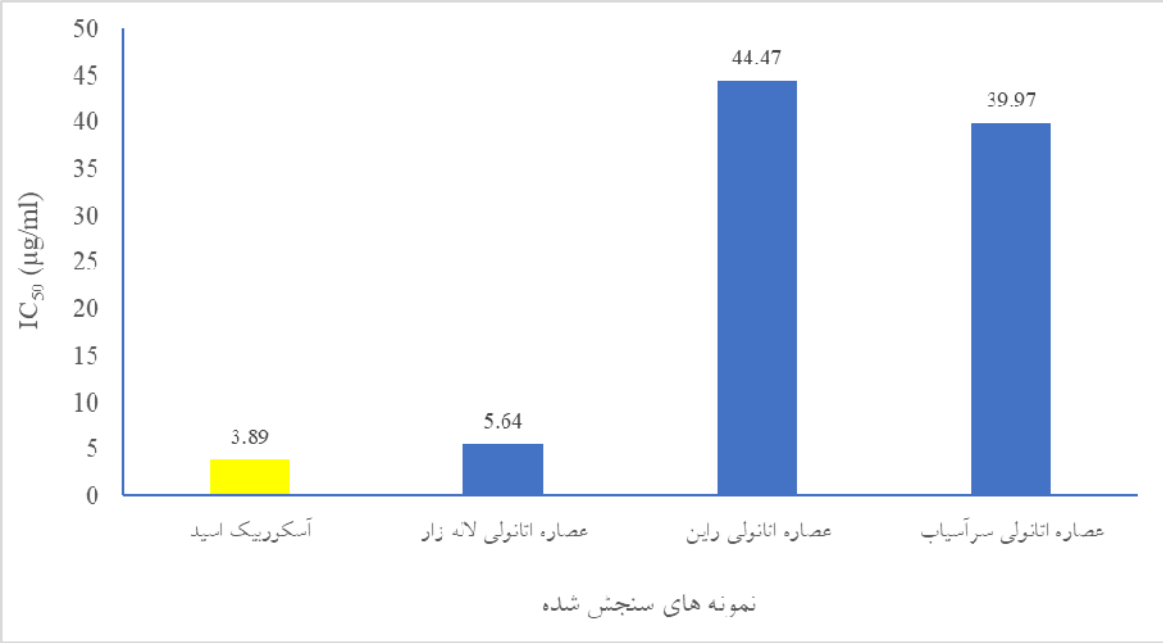
نتایج

محتوای فنل و فلاونوئید کل: در شکل ۱، محتوای فنل و فلاونوئید کل عصاره های اتانولی بره موم جمع آوری شده از سه منطقه مختلف کرمان، به صورت نمودار ستونی نمایش داده شده است. این نتایج به ترتیب بر حسب میلی-گرم اکی‌والان گالیک اسید در گرم عصاره (mg GAE/g extract) و میلی‌گرم اکی‌والان کوئرستین در گرم عصاره (mg QE/g extract) گزارش شده است. همانطور که به خوبی در شکل مشخص است بیشترین محتوای فنل کل مربوط به نمونه لاله زار (165.96 mg GAE/g extract) و کمترین مقدار مربوط به نمونه راین (mg GAE/g extract 70.25) می‌باشد. این دو نمونه همچنین به ترتیب از بیشترین (72.26 mg QE/g extract) و کمترین mg QE/g extract) (29.92 محتوای فلاونوئیدی کل برخوردار می‌باشند.

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.6.7
مقاله پژوهشی



شکل۱- میزان فنول و فلاونوئید کل عصاره اتانولی نمونه های بره موم.



شکل۲- نتایج بدست آمده از بررسی فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره اتانولی نمونه های بره موم با آزمون DPPH.

محتوای فنل و فلاونوئید کل نمونه سرآسیاب که در رتبه دوم قرار دارد به میزان کمی از نمونه راین بالاتر است.

فعالیت آنتی اکسیدانی: همانطور که قبلا اشاره شد به منظور سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های بره‌موم از روش DPPH و از آسکوربیک‌اسید به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. نتایج به دست آمده از این تست، به صورت غلظتی از عصاره که توانایی مهار رادیکال آزاد DPPH را به میزان ۵۰٪ دارد (IC_{50}) گزارش گردید. شکل ۲، مقادیر IC_{50} به دست آمده برای سه نمونه بره‌موم و همچنین آسکوربیک اسید را با یکدیگر مقایسه نموده است. همانطور که به خوبی در شکل دیده می‌شود توانایی نمونه لاله‌زار (IC_{50}: 5.64 µg/ml) در مهار رادیکال آزاد DPPH نسبت به آسکوربیک اسید (IC_{50}: 3.89 µg/ml) تقریبا یک و نیم برابر کمتر و نسبت به دو نمونه بره‌موم دیگر حدود هفت برابر بیشتر است. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نمونه

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.6.7

سرآسیاب (IC_{50}: 39.97 µg/ml) در مقایسه با نمونه راین (IC_{50}: 44.47 µg/ml) به میزان کمی بالاتر است.

فعالیت آنتی‌کولین‌استرازی: همانطور که در بخش مواد و روش ها اشاره شد فعالیت آنتی‌کولین‌استرازی نمونه‌های - بره‌موم با استفاده از روش المن بررسی و نتایج نهایی برای هر نمونه به صورت IC_{50} گزارش گردید. در این مطالعه، از نئوستیگمین به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. نتایج به دست آمده از این بخش در جدول ۲ نمایش داده شده است.

جدول۲- نتایج بدست آمده از بررسی فعالیت آنتی‌کولین‌استرازی عصاره اتانولی نمونه های بره‌موم. در این تست، از نئوستیگمین به عنوان کنترل مثبت استفاده شده است.

نمونه	IC_{50}
لاله زار	۱۴/۳۷ µg/ml
راین	۶۹/۵۳ µg/ml
سرآسیاب	۷۷/۷۳ µg/ml
نئوستیگمین	۲۲/۶۲ ng/ml

جدول۳- مقایسه نتایج بدست آمده از بررسی محتوای فنل و فلاونوئید کل و فعالیت آنتی اکسیدانی (DPPH) و آنتی کولین استرازی (المن) عصاره‌های اتانولی نمونه‌های بره موم مورد استفاده در این مطالعه.

	نمونه های بره‌موم		
آزمایش ها	لاله زار	راین	سرآسیاب
فنول کل (mg GAE/g extract)	۱۶۵/۹۷	۷۰/۲۵	۷۵/۲۹
فلاونوئید کل (mg QE/g extract)	۷۲/۲۶	۲۹/۹۲	۳۳/۸۹
DPPH (IC_{50}: µg/ml)	۵/۶۴	۴۴/۴۷	۳۹/۹۷
المن (IC_{50}: µg/ml)	۱۴/۳۷	۶۹/۵۳	۷۷/۷۳

مقایسه IC_{50} نئوستیگمین (22.62 ng/ml) با مقادیر IC_{50} عصاره‌های سه نمونه بره‌موم نشان می‌دهد که هر سه نمونه توانایی مهار آنزیم استیل‌کولین‌استراز را دارا می‌باشند. فعالیت آنتی‌کولین‌استرازی نمونه لاله‌زار (IC_{50}: 14.37 µg/ml) با اختلاف بسیار زیادی نسبت به دو نمونه بره‌موم دیگر بالاتر می باشد. مقایسه IC_{50} دو نمونه راین (69.53 µg/ml) و سرآسیاب (77.73 µg/ml) نشان می‌دهد که فعالیت آنتی‌کولین‌استرازی نمونه راین تا حدی از نمونه سرآسیاب بالاتر است.

بحث و نتیجه گیری

در این کار تحقیقاتی، عصاره اتانولی نمونه های بره‌موم زنبور عسل جمع‌آوری شده از سه منطقه مختلف کرمان (لاله زار، راین و سرآسیاب) مورد مطالعه قرار گرفته است. علاوه بر سنجش محتوای فنل و فلاونوئید کل عصاره ها، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی کولین استرازی آنها نیز به ترتیب با استفاده از روش DPPH و المن بررسی شده است. نتایج کلی به دست آمده از این مطالعه (محتوای فنل و فلاونوئید کل و مقادیر IC_{50} به دست آمده از دو تست DPPH و المن) در جدول ۳ ارایه شده است.

بره موم حاوی طیف گسترده‌ای از ترکیبات فنلی، به طور عمده فلاونوئیدها، اسیدهای فنولیک و استرهای آنها است (۷، ۳۰، ۳۹). خواص بیولوژیکی متعدد بره موم با محتوای فنلی و فلاونوئیدی آن مرتبط است. محتوای فلاونوئیدی بره موم به نوع گیاهان مناطق مختلف که توسط زنبورهای عسل جمع آوری شده اند، نسبت داده می شود (۹، ۱۷، ۴۳). برای فلاونوئیدها خواص بیولوژیکی متنوعی از جمله آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، ضدالتهابی، محافظت‌کننده کبدی، ضد سرطانی ثبت شده است (۱،۲، ۳۵). آنتی اکسیدان ها، رادیکال های آزاد مانند سوپراکسید، هیدروکسیل و پراکسیل را از بین می‌برند و نقش مهمی در جلوگیری از بیماری‌ها و اختلالات القا شونده توسط رادیکال‌های آزاد نظیر پیری، بیماری‌های قلبی-عروقی، آرتریت روماتوئید، سرطان، دیابت و بیماری‌های تحلیل-برنده اعصاب (بیماری آلزایمر و پارکینسون) و التهاب دارند (۴۷، ۴۸). ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی بره‌موم به خوبی

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.6.7

مورد مطالعه قرار گرفته است و با استفاده از روش های DPPH، $ABTS^+$، FRAP و ORAC به اثبات رسیده است (۲۷). فلاونوئیدها از جمله ترکیبات آنتی اکسیدانی قدرتمند موجود در انواع بره‌موم هستند که توانایی از بین بردن رادیکال‌های آزاد را دارا می باشند (۱۴).

در مطالعه حاضر، محتوای فنل و فلاونوئید کل عصاره اتانولی سه نمونه بره موم لاله زار، راین و سرآسیاب کرمان به ترتیب با روش فولین–سیوکالتو و آلومینیوم کلراید و فعالیت آنتی‌اکسیدانی آنها با تست DPPH مورد مطالعه قرار گرفت. مقایسه نتایج به دست آمده از آزمون DPPH (شکل ۲) با محتوای فنل و فلاونوئید کل سه نمونه بره‌موم (شکل ۱) نشانگر آن است که بین محتوای فنل و فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌ها رابطه مستقیم وجود دارد. به طوریکه نمونه لاله‌زار که نسبت به دو نمونه سرآسیاب و راین، توانایی بسیار بالاتری در مهار رادیکال آزاد DPPH از خود نشان می دهد (حدود هفت برابر) و IC_{50} آن به میزان کمی از کنترل مثبت (آسکوربیک اسید) بالاتر است محتوای فنل و فلاونوئید کل آن نیز نسبت به این دو نمونه بیش از دو برابر می باشد. این نتایج با نتایج به دست آمده از مطالعات انجام شده بر روی نمونه های بره‌موم آرژانتین (۲۳)، یونان و قبرس (۲۴)، ژاپن (۱۹) و لهستان (۴۴) مطابقت دارد.

بیماری آلزایمر (Alzheimer's disease: AD) که یک نوع بیماری پیشرونده تحلیل برنده اعصاب است رایج‌ترین دلیل بروز زوال عقل در افراد بالای ۶۵ سال محسوب می شود. AD به طور تدریجی منجر به زوال حافظه و شناخت و در نهایت مرگ می شود (۳۳، ۴۶). بر اساس فرضیه کولینرژیک پاتوژنز AD، دلیل بروز این بیماری به کاهش سطح استیل کولین، یک نوروترانسمیتر درگیر در دو فرایند حافظه و یادگیری، در هیپوکامپ و کورتکس مغز نسبت داده می شود (۱۲، ۲۰). اگرچه تا به امروز هیچ نوع درمان قطعی برای AD شناخته نشده است اما تجویز مهارکننده های آنزیم استیل‌کولین‌استراز (AChE) به منظور بهبود علایم فرم خفیف و یا حدواسط این بیماری، از استراتژی های درمانی اصلی محسوب می‌شود. هرچند استفاده از مهارکننده های AChE، اولین بار برای درمان بیماری آلزایمر مطرح شد اما با گذشت زمان، این داروها برای درمان انواع دیگری از زوال عقل و اختلالات سیستم عصبی مرکزی نظیر اختلال شناختی خفیف، زوال عقل با اجسام لوی، بیماری پارکینسون، سندرم داون، بیماری کورساکوف و زوال عقل عروقی نیز مورد استفاده قرار گرفتند (۱۱، ۲۹).

مطالعات فراوانی در سراسر جهان به منظور تشخیص و جداسازی مهارکننده های AChE با منشا طبیعی در جریان است. خانواده آماریلیداسه از جمله گیاهانی هستند که فعالیت آنتی‌کولین‌استرازی آنها به خوبی شناخته شده است. گونه‌های گالانتوس این خانواده، منبع اولیه آلکالوئید گالانتامین می باشند. گالانتامین یکی از مهارکننده های AChE تایید شده توسط FDA می‌باشد که هم اکنون به منظور بهبود علایم فرم های خفیف و حدواسط AD تجویز می شود (۱۵، ۳۴، ۴۰). مطالعاتی که بر روی چندین نمونه بره موم جمع آوری شده از مناطق مختلف کره جنوبی (۳)، ترکیه (۴) و مراکش (۱۳) انجام شده است نشاندهنده فعالیت آنتی‌کولین‌استرازی نمونه‌های بره‌موم می باشد (۴۲).

در این مطالعه، فعالیت آنتی‌کولین‌استرازی عصاره اتانولی سه نمونه بره‌موم با روش المن مورد بررسی قرار گرفت. از نئوستیگمین که مهارکننده شناخته شده و توانمند AChE می باشد به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. همانطور که در جدول ۲ مشاهده می شود IC_{50} نئوستیگمین در مقیاس نانوگرم و مقادیر IC_{50} هر سه عصاره در مقیاس میکروگرم می باشد. با توجه به اینکه نئوستیگمین یک ترکیب خالص با توانایی بسیار بالا در مهار AChE می باشد، اما عصاره های بره موم از مجموع چندین ترکیب مختلف تشکیل

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.6.7
مقاله پژوهشی

شده اند که فقط تعداد معدودی از آنها توانایی آنتی‌کولین-استرازی دارند این اختلاف مشاهده شده بین مقادیر IC_{50} نئوستیگمین و نمونه های بره‌موم کاملا منطقی و طبیعی است. از بین سه نمونه بره موم، نمونه لاله‌زار توانایی بسیار بالاتری در مهار AChE از خود نشان می دهد به طوریکه فعالیت آنتی کولین استرازی آن نسبت به دو نمونه راین و سرآسیاب به ترتیب ۴/۸ و ۵/۴ برابر بیشتر است. محتوای فنل و فلاونوئید کل این نمونه نیز نسبت به دو نمونه دیگر تفاوت قابل ملاحظه ای نشان می دهد. نتایج به دست آمده از این مطالعه با نتایج کارهای تحقیقاتی انجام شده بر روی نمونه های بره موم ترکیه (۴) و مراکش (۱۳) مطابقت دارد. اما مطالعه انجام شده بر روی چندین نمونه بره موم کره-جنوبی، هیچ نوع ارتباطی را بین فعالیت آنتی‌کولین‌استرازی و محتوای فنل و فلاونوئید کل نمونه ها نشان نمی دهد (۴۸).

با توجه اینکه مقالاتی مبنی بر فعالیت آنتی‌کولین‌استرازی فلاونوئیدها وجود دارد (۲۵، ۲۶) ممکن است بخشی و یا تمام فعالیت آنتی کولین استرازی مشاهده شده برای نمونه لاله زار و (دو نمونه دیگر) مربوط به فلاونوئیدها باشد. البته پاسخ دقیق به این سوال، نیازمند مطالعات بسیار گسترده تر در این زمینه می باشد. بدین منظور باید اجزای تشکیل دهنده هر عصاره به طور دقیق شناسایی و فعالیت آنتی‌کولین‌استرازی هر یک از این اجزا تعیین شود.

به طور کلی، نتایج به دست آمده از این کار تحقیقاتی (جدول ۳) نشان دهنده آن است که نمونه لاله زار نسبت به دو نمونه راین و سرآسیاب، از محتوای فنل و فلاونوئید کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌کولین‌استرازی بسیار بالاتری برخوردار است. این در حالی است که محتوای فنل و فلاونوئید کل نمونه سرآسیاب و همچنین فعالیت آنتی اکسیدانی آن به میزان کمی از نمونه راین بالاتر است، اما فعالیت آنتی‌کولین‌استرازی آن نسبت به این نمونه تا حدی پایین تر می‌باشد. بنابراین باتوجه نتایج به دست آمده به نظر می رسد نمونه بره موم منطقه لاله‌زار کرمان، پتانسیل بسیار خوبی برای بررسی و مطالعات بیشتر دارد. به ویژه شناسایی دقیق و جداسازی ترکیبات آنتی‌کولین‌استرازی این نمونه، به منظور معرفی و طراحی داروهای جدید برای آلزایمر از اهمیت خاصی برخوردار است.

تشکر و قدردانی

مقاله حاضر بخشی از پایان نامه دوره کارشناسی ارشد مصوب دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان می باشد که بدین وسیله نویسندگان از حمایتهای آن دانشگاه تشکر می نمایند.

منابع

۱- علیرضایی، ف. و کیارستمی، خ. ۱۳۹۹. بررسی اثر سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنتی اکسیدانی در کشت سلولی گیاه اسطوخودوس (Lavandula angustifolia Mill). مجله پژوهش های سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران). (۳)۳۳، ۳۴۷-۵۸.

۲- منتشلو، ج.، دلجو، علی. و پیری، خ. ۱۳۹۶. بررسی میزان فنول و فلاونوئیدها و فعالیت آنتی اکسیدانی عصاره های اتانولی، متانولی، کلروفرمی و اتیل استاتی پوست تنه و شاخه درخت بید (*Salix alba*. L.). مجله پژوهش های سلولی و مولکولی (مجله زیست شناسی ایران). (۳)۳۰، ۲۹۵-۳۰۳.

3. Ahn M-R, Kumazawa S, Hamasaka T, Bang K-S, and Nakayama T. 2004. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. Journal of Agricultural and Food Chemistry; 52(24): 7286-92.

4. Aliyazıcıoglu R, Sahin H, Erturk O, Ulusoy E, and Kolayli S. 2013. Properties of phenolic composition and biological activity of propolis from Turkey. International Journal of Food Properties; 16(2): 277-87.

5. Bakchiche B ،Habati M ،Benmebarek A ،and Gherib A. 2017. Total phenolic ،flavonoid contents and antioxidant activities of honey and propolis collected from the region of Laghouat (South of Algeria .(World News of Natural

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.6.7

Sciences. An International Sientific Journal; 11: 91-97.

6. Baltas N, Yildiz O, and Kolayli S. 2016. Inhibition properties of propolis extracts to some clinically important enzymes. Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry; 31(sup1): 52-55.

7. Bankova VS, de Castro SL, and Marcucci MC. 2000. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. Apidologie; 31(1): 3-15.

8. Blicharska N ،Seidel V ،Chemical diversity and biological activity of african propolis ،in Progress in the Chemistry of Organic Natural Products 109. 2019 ،Springer. p. 415-50.

9. Burdock G. 1998. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). Food and Chemical toxicology; 36 (4): 347-63.

10. 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 (3): 178-182.

11. Colovic MB, Krstic DZ, Lazarevic-Pasti TD, Bondzic AM, and Vasic VM. 2013. Acetylcholinesterase inhibitors: pharmacology and toxicology. Current neuropharmacology; 11(3): 315-35.

12. Contestabile A. 2011. The history of the cholinergic hypothesis. Behavioural brain research; 221(2): 334-40.

13. da Graça Miguel M, Doughmi O, Aazza S, Antunes D, and Lyoussi B. 2014. Antioxidant, anti-inflammatory and acetylcholinesterase inhibitory activities of propolis from different regions of Morocco. Food Science and Biotechnology; 23(1): 313-22.

14. Daleprane JB, Abdalla DS. 2013. Emerging roles of propolis: antioxidant, cardioprotective, and antiangiogenic actions. Evidence-based complementary and alternative medicine; 2013.

15. Dey A, Bhattacharya R, Mukherjee A, and Pandey DK. 2017. Natural products against Alzheimer's disease: Pharmaco-therapeutics and biotechnological interventions. Biotechnology Advances; 35(2): 178-216.

16. Diba K, Hashemi J, and Mahmoodi M. 2018. In vitro activity of Propolis alcoholic extract on opportunistic pathogenic fungi. International Journal of Research in Applied and Basic Medical Sciences; 4(2): 68-73.

17. Farooqui T, A Farooqui A. 2010. Molecular mechanism underlying the therapeutic activities of propolis: a critical review. Current Nutrition & Food Science; 6(3): 186-99.

18. Gómez-Caravaca A, Gómez-Romero M, Arráez-Román D, Segura-Carretero A, and Fernández-Gutiérrez A. 2006. Advances in the analysis of phenolic compounds in products derived from bees. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis; 41(4): 1220-34.

19. Hamasaka T, Kumazawa S, Fujimoto T, and NAKAYAMA T. 2004. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Japan. Food Science and Technology Research; 10(1): 86-92.

20. Hasselmo ME. 2006. The role of acetylcholine in learning and memory. Current opinion in neurobiology; 16(6): 710-15.

21. Hausen B, Wollenweber E, Senff H, and Post B. 1987. Propolis allergy: (I). Origin, properties, usage and literature review. Contact dermatitis; 17(3): 163-70.

22. Helfenberg K. 1908. The analysis of beeswax and propolis. Chemiker Zeitungm; 31: 987-98.

23. Isla MI, Zampini IC, Ordóñez RM, Cuello S, Juárez BC, Sayago JE, Moreno MIN, Alberto MR, Vera NR, and Bedascarrasbure E. 2009. Effect of seasonal variations and collection form on antioxidant activity of propolis from San Juan, Argentina. Journal of Medicinal Food; 12(6): 1334-42.

24. Kalogeropoulos N, Konteles SJ, Troullidou E, Mourtzinos I, and Karathanos VT. 2009. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. Food chemistry; 116(2): 452-61.

25. Khan H, Amin S, Kamal MA, and Patel S. 2018. Flavonoids as acetylcholinesterase inhibitors: Current therapeutic standing and future prospects. Biomedicine & Pharmacotherapy; 101: 860-70.

26. Khan MTH, Orhan I, Şenol F, Kartal M, Şener B, Dvorská M, Šmejkal K, and Šlapetová T. 2009. Cholinesterase inhibitory activities of some flavonoid derivatives and chosen xanthone and their molecular docking studies. Chemico-Biological Interactions; 181(3): 383-89.

27. Kocot J, Kiełczykowska M, Luchowska-Kocot D, Kurzepa J, and Musik I. 2018. Antioxidant potential of propolis, bee pollen, and royal jelly: Possible medical application .Oxidative medicine and cellular longevity; 2018.

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.6.7

28. Król W, Bankova V, Sforcin JM, Szliszka E, Czuba Z, and Kuropatnicki AK. 2013. Propolis: properties, application, and its potential.2013.

29. Kulshreshtha A, Piplani P. 2016. Current pharmacotherapy and putative disease-modifying therapy for Alzheimer's disease. Neurological Sciences; 37(9): 1403-35.

30. Marcucci M. 1995. Propolis: chemical composition ،biological properties and therapeutic activity. Apidologie; 26(2): 83-99.

31. Mensor LL, Menezes FS, Leitão GG, Reis AS, Santos TCd, Coube CS, and Leitão SG. 2001. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. Phytotherapy research; 15(2): 127-30.

32. Miguel MG, Nunes S, Dandlen SA, Cavaco AM, and Antunes MD. 2010. Phenols and antioxidant activity of hydro-alcoholic extracts of propolis from Algarve, South of Portugal. Food and Chemical Toxicology; 48(12): 3418-23.

33. Mohammadi-Farani A, Ahmadi A, Nadri H, and Aliabadi A. 2013. Synthesis, docking and acetylcholinesterase inhibitory assessment of 2-(2-(4-Benzylpiperazin-1-yl) ethyl) isoindoline-1, 3-dione derivatives with potential anti-Alzheimer effects. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences; 21(1): 47.

34. Mukherjee PK, Kumar V, Mal M, and Houghton PJ. 2007. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. Phytomedicine; 14(4): 289-300.

35. Nijveldt RJ, Van Nood E, Van Hoorn DE, Boelens PG, Van Norren K, and Van Leeuwen PA. 2001. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. The American journal of clinical nutrition; 74(4): 418-25.

36. Park YK, Alencar SM, and Aguiar CL. 2002. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. Journal of Agricultural and Food Chemistry; 50(9): 2502-06.

37. Pietta P, Gardana C, and Pietta A. 2002. Analytical methods for quality control of propolis. Fitoterapia; 73: S7-S20.

38. Przybyłek I, Karpiński TM. 2019. Antibacterial properties of propolis. Molecules; 24(11): 2047.

39. Salatino A, Fernandes-Silva CC, Righi AA, and Salatino MLF. 2011 Propolis research and the chemistry of plant products. Natural product reports; 28(5): 925-36.

40. Santos TCd, Gomes TM, Pinto BAS, Camara AL, and Paes AMdA. 2018. Naturally occurring acetylcholinesterase inhibitors and their potential use for Alzheimer's disease therapy. Frontiers in pharmacology; 9: 1192.

41. Schnitzler P, Neuner A, Nolkemper S, Zundel C, Nowack H, Sensch KH, and Reichling J. 2010. Antiviral activity and mode of action of propolis extracts and selected compounds. Phytotherapy Research; 24(S1): S20-S28.

42. Scotti L, Tullius Scotti M. 2015. Computer aided drug design studies in the discovery of secondary metabolites targeted against age-related neurodegenerative diseases. Current topics in medicinal chemistry; 15(21): 2239-52.

43. Sforcin JM, Bankova V. 2011. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? Journal of ethnopharmacology; 133(2): 253-60.

44. Socha R, Gałkowska D, Bugaj M, and Juszczak L. 2015. Phenolic composition and antioxidant activity of propolis from various regions of Poland. Natural Product Research; 29(5): 416-22.

45. Thimmaiah S. 1999. Methods of biochemical analysis: carbohydrates. Standard methods of biochemical analysis. Kalyani publishers, Noida: 49-77.

46. ul Islam B, Tabrez S. 2017. Management of Alzheimer's disease—An insight of the enzymatic and other novel potential targets. International journal of biological macromolecules; 97: 700-09.

47. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, and Telser J. 2007. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. The international journal of biochemistry & cell biology; 39(1): 44-84.

48. Wang X, Sankarapandian K, Cheng Y, Woo SO, Kwon HW, Perumalsamy H, and Ahn Y-J. 2016. Relationship between total phenolic contents and biological properties of propolis from 20 different regions in South Korea. BMC complementary and alternative medicine; 16(1): 65.

49. Woisky RG, Salatino A. 1998. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. Journal of apicultural research; 37(2): 99-105.

50. Yaghoubi M, Gh G, and Satari R. 2007. Antimicrobial activity of Iranian propolis and its chemical composition. DARU Journal of Pharmaceutical Sciences; 15(1): 45-48.

DOR: 20.1001.1.23832738.1402.36.1.6.7

مقاله پژوهشی

Investigation of total phenolic and flavonoid content, antioxidant and anticholinesterase activity of the propolis samples collected from three regions of Kerman province

Fathi Hafshejani Sh.[1], Lotfi S.[1], Rezvannejad E.[1], Mortazavi M.[1] and Riahi-Madvar A.[2]

[1] Dept. of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, I.R. of Iran.

[2] Dept. of Molecular and Cell Biology, Faculty of Basic Sciences, Kosar University of Bojnord, Bojnord, I.R. of Iran.

Abstract

Propolis is a resinous substance produced by honey bees through mixing wax and saliva with exudates collected from plants. This natural substance with many biological properties such as antioxidant, anticancer, antimicrobial and antifungal is popular as a natural remedy in traditional medicine around the world. In this project, propolis samples were collected from three regions of Kerman province (Lalehzar, Rayen and Sarasiab) and the prepared ethanolic extracts were studied. The obtained results showed that the contents of total phenol (165.97 mg equivalent gallic acid per gram of extract) and flavonoid (72.26 mg equivalent quercetin per gram of extract) of Lalehzar sample are more than two-fold higher than that of Sarasiab and Rayen samples. The ability of Lalehzar propolis to inhibit DPPH free radical (IC_{50}: 5.64 µg/ml) was also approximately seven times greater than that of the other two samples. Therefore, there is a direct relationship between antioxidant activity and total phenolic and flavonoid contents of the propolis samples. The data obtained from Elman test indicated that the anticholinesterase activity of Lalehzar sample (IC_{50}: 14.37 µg/ml) is 4.8 and 5.4-fold greater than that of Rayen and Sarasiab samples, respectively. Summing up the results, the Lalehzar propolis is a very good candidate for further studies. Considering that the administration of anticholinesterase drugs is the main strategy for symptomatic treatment of Alzheimer's disease and the other CNS disorders, identification and isolation of anticholinesterase compounds of the extract is especially important for development and design of the new drugs.

Keywords: Propolis, Total phenolic content, Total flavonoid content, Antioxidant activity, Anticholinesterase activity.