

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

شهناز فتحی هفشجانی<sup>۱</sup>، صفا لطفی<sup>۱\*</sup>، الهام رضوان نژاد<sup>۱</sup>، مجتبی مرتضوی<sup>۱</sup> و علی ریاحی مدوار<sup>۲</sup>

<sup>۱</sup> کرمان، دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته، پژوهشگاه علوم و تکنولوژی پیشرفته و علوم محیطی، گروه بیوتکنولوژی.

<sup>۲</sup> 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 اکی‌والان 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<sub>50</sub>: 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<sub>50</sub>: ۱۴/۳۷ µg/ml) نسبت به دو نمونه راین و سرآسیاب به ترتیب ۴/۸ و ۵/۴ برابر بیشتر است. بنابراین با توجه به نتایج بدست آمده، بره‌موم لاله‌زار پتانسیل بسیار خوبی برای مطالعات بیشتر دارد.

**واژه‌های کلیدی:** بره‌موم (پروپولیس)، محتوای فنل کل، محتوای فلاونوئید کل، فعالیت آنتی‌اکسیدانی، فعالیت آنتی‌کولین‌استرازی.

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

### مقدمه

است، اما برای بعضی از نمونه‌ها نقطه ذوب ممکن است به ۱۰۰ درجه سانتی‌گراد هم برسد. رنگ این ماده طبیعی معطر و خوشبو بسته به نوع ترکیبات تشکیل دهنده از سبز تا قرمز و قهوه‌ای تیره متغیر است (۷، ۲۲، ۳۰). ترکیب شیمیایی بره موم نزدیک به رزین‌ها و ترکیبات موجود در منابع گیاهی است که برای تولید آن استفاده شده است. همراه با پیشرفت تحقیقات، ترکیبات متنوعی نظیر پلی‌فنول، آلدئیدهای فنلی، مونوترپن، اسیدهای آمینه، استروئیدها، کومارین‌ها و چندین نوع ترکیب دیگر در

بره موم (پروپولیس) که عموماً به عنوان چسب زنبور نیز شناخته می‌شود یک ماده طبیعی رزینی و به شدت چسبنده است که به وسیله زنبور عسل با مخلوط کردن موم و بزاق حاوی آنزیم‌های خاص با ترکیبات مشتق شده از گیاهان تولید می‌شود (۳۶، ۳۷). بره موم که ترکیبی لیپوفیلیک است در دماهای مختلف، ویژگی‌های فیزیکی مختلفی را دارا می‌باشد. در سرما این ماده سخت و شکننده و هنگام گرم شدن، نرم، قابل انعطاف و بسیار چسبنده می‌شود (۲۱). نقطه ذوب بره‌موم ۶۰ تا ۷۰ درجه سانتی‌گراد

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 بره موم 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 الکتريکی (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 در این 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 بره موم 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 دمای ۲۰ - درجه سانتی گراد در فریزر نگهداری شدند. برای تهیه عصاره اتانولی از این نمونه ها بدین ترتیب عمل

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

بره موم خام را نمی توان به طور مستقیم مورد استفاده قرار داد. ابتدا باید با یک حلال مناسب، مواد تشکیل دهنده 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 استفاده ای که از عصاره می شود 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 تشکیل دهنده 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، آنتی اکسیدانی، 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

۰/۲ نرمال و ۳۰۰ میکرولیتر کربنات سدیم ۷/۵٪ به‌عنوان نمونه شاهد این تست استفاده شد.

**سنجش میزان فلاونوئید کل:** اندازه‌گیری فلاونوئیدها با استفاده از روش رنگ‌سنجی آلومینیوم کلرید انجام شد (۱۰). این ترکیب قادر به اندازه‌گیری 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 می‌کند. هر چه رنگ ایجاد شده به زرد متمایل‌تر باشد، فلاونوئید موجود در نمونه بیشتر است. در این تست، از کوئرستین به‌عنوان 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 بره‌موم حل شده در اتانول ۷۵ درصد به ۵۰۰ میکرولیتر آلومینیوم کلرید ۲٪ موجود در کووت اضافه گردید (غلظت نهایی عصاره بره‌موم: ۵۰ میکروگرم بر میلی‌لیتر)، 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 به‌عنوان محلول شاهد استفاده گردید. برای هر نمونه سه تکرار در نظر گرفته شد.

**ارزیابی فعالیت آنتی‌اکسیدانی:** استفاده از روش-2,2-DPPH (diphenyl-1-picrylhydrazyl) منظور بررسی خاصیت آنتی‌اکسیدانی عصاره‌های گیاهی و به‌طور کلی آنتی‌اکسیدانی‌های طبیعی، یکی از پرکاربردترین روش‌ها می‌باشد (۷). DPPH یک رادیکال آزاد هیدروفیل و پایدار به رنگ بنفش است که دارای حداکثر جذب در طول موج ۵۱۵-۵۱۷ 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).

شد. ابتدا بره‌موم خام توسط نیتروژن مایع به پودر تبدیل گردید. حدود ۱۰ گرم از بره‌موم پودر شده در ۱۰۰ میلی‌لیتر اتانول ۸۰ درصد در ظروف تیره و در تاریکی خیسانده و به مدت ۷۲ ساعت در شیکر انکوباتور قرار داده شد و سپس نمونه‌ها 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 سانتی‌گراد قرار داده شد. عصاره‌های اتانولی خشک شده از روی سطح پلیت جمع‌آوری و در ظروف تیره تا زمان انجام مراحل بعدی در دمای ۲۰- درجه سانتی‌گراد نگهداری شدند.

**سنجش میزان فنل کل:** برای اندازه‌گیری میزان فنل کل از روش فولین-سیوکالتو (Folin-Ciocalteu) و از گالیک اسید به‌عنوان 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 میلی‌لیتر) 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 طول موج ۷۳۵ نانومتر ثبت شد. برای هر نمونه سه تکرار در نظر گرفته شد. از مخلوط ۶۰۰ میکرولیتر آب مقطر، ۱۰۰ میکرولیتر معرف فولین-سیوکالتو

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 میلی مولار بود. نمونه های بره موم به مدت ۱۰ دقیقه با مخلوط واکنش در دمای ۲۵ درجه سانتی گراد انکوبه شدند. سپس سوپسترا (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<sub>50</sub> 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 (29.92 mg QE/g extract) محتوای فلاونوئیدی کل برخوردار می‌باشند.

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 (۰/۴ میلی 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<sub>50</sub> (غلظتی از نمونه که در آن ۵۰٪ رادیکال DPPH مهار می‌شود) برای هر نمونه به دست آورده شد.

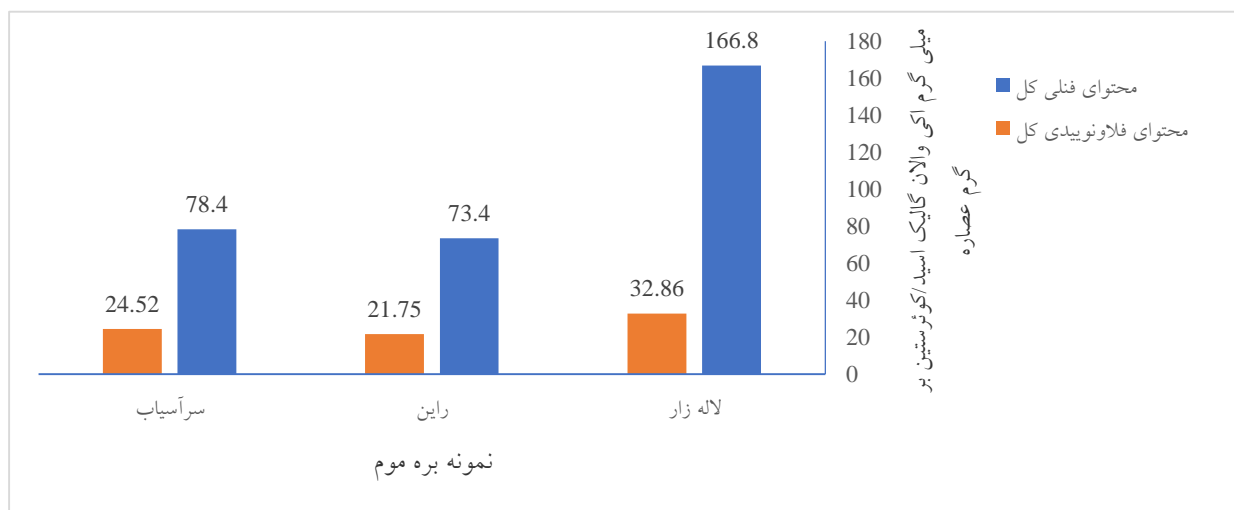
$$\text{Inhibition of (\%)} = [(A_{\text{control}} - A_{\text{sample}}) / A_{\text{control}}] \times 100$$

DPPH

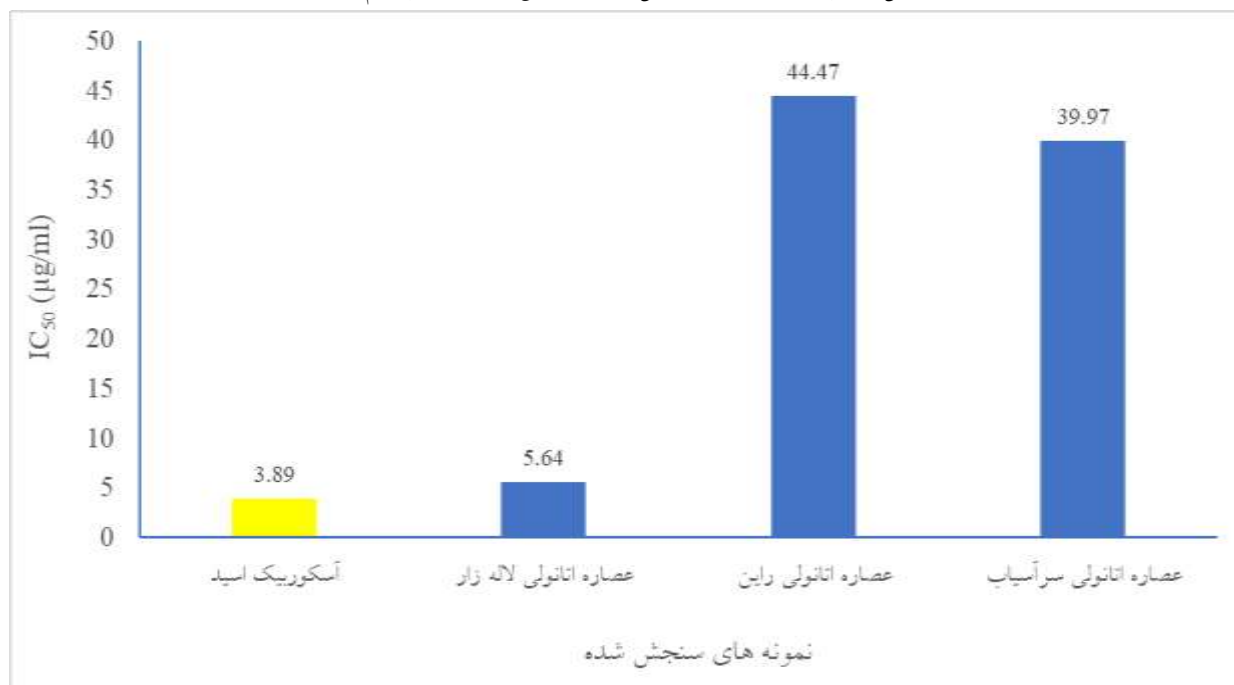
A<sub>control</sub>: جذب کنترل

A<sub>sample</sub>: 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 ۲۰۰ μl 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<sub>50</sub>) بیان شد. از مهارکننده شناخته



شکل ۱- میزان فنول و فلاونوئید کل عصاره اتانولی نمونه های بره موم.



شکل ۲- نتایج بدست آمده از بررسی فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره اتانولی نمونه های بره موم با آزمون DPPH.

میزان ۵۰٪ دارد (IC<sub>50</sub>) گزارش گردید. شکل ۲، مقادیر IC<sub>50</sub> به دست آمده برای سه نمونه بره موم و همچنین آسکوربیک اسید را با یکدیگر مقایسه نموده است. همانطور که به خوبی در شکل دیده می‌شود توانایی نمونه لاله‌زار (IC<sub>50</sub>: 5.64 µg/ml) در مهار رادیکال آزاد DPPH نسبت به آسکوربیک اسید (IC<sub>50</sub>: 3.89 µg/ml) تقریباً یک و نیم برابر کمتر و نسبت به دو نمونه بره موم دیگر حدود هفت برابر بیشتر است. ظرفیت آنتی‌اکسیدانی نمونه

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

**فعالیت آنتی‌اکسیدانی:** همانطور که قبلاً اشاره شد به منظور سنجش فعالیت آنتی‌اکسیدانی نمونه‌های بره موم از روش DPPH و از آسکوربیک اسید 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

فعالیت آنتی‌کولین‌استرازی نمونه لاله‌زار ( $IC_{50}$ : 14.37  $\mu\text{g/ml}$ ) با اختلاف بسیار زیادی نسبت به دو نمونه بره‌موم دیگر بالاتر می‌باشد. مقایسه  $IC_{50}$  دو نمونه راین ( $69.53 \mu\text{g/ml}$ ) و سرآسیاب ( $77.73 \mu\text{g/ml}$ ) نشان می‌دهد که فعالیت آنتی‌کولین‌استرازی نمونه راین تا حدی از نمونه سرآسیاب بالاتر است.

### بحث و نتیجه‌گیری

در این کار تحقیقاتی، عصاره اتانولی نمونه‌های بره‌موم زنبور عسل جمع‌آوری شده از سه منطقه مختلف کرمان (لاله‌زار، راین و سرآسیاب) مورد مطالعه قرار گرفته است. علاوه بر سنجش محتوای فنل و فلاونوئید کل عصاره‌ها، فعالیت آنتی‌اکسیدانی و آنتی‌کولین‌استرازی 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 ارائه شده است.

بره‌موم حاوی طیف گسترده‌ای از ترکیبات فنلی، به طور عمده فلاونوئیدها، اسیدهای فنولیک و استرها آنها است (۷، ۳۰، ۳۹). خواص بیولوژیکی متعدد بره‌موم با محتوای فنلی و فلاونوئیدی آن مرتبط است. محتوای فلاونوئیدی بره‌موم به نوع گیاهان مناطق مختلف که توسط زنبورهای عسل جمع‌آوری شده‌اند، نسبت داده می‌شود (۹، ۱۷، ۴۳). برای فلاونوئیدها خواص بیولوژیکی متنوعی از جمله آنتی‌اکسیدانی، ضد میکروبی، ضد التهابی، محافظت‌کننده کبدی، ضد سرطانی ثبت شده است (۱، ۲، ۳۵). آنتی‌اکسیدان‌ها، رادیکال‌های 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 تحلیل‌برنده اعصاب (بیماری آلزایمر و پارکینسون) و التهاب دارند (۴۷، ۴۸). ویژگی‌های آنتی‌اکسیدانی بره‌موم به خوبی

سرآسیاب ( $IC_{50}$ : 39.97  $\mu\text{g/ml}$ ) در مقایسه با نمونه راین ( $IC_{50}$ : 44.47  $\mu\text{g/ml}$ ) به میزان کمی بالاتر است.

**فعالیت آنتی‌کولین‌استرازی:** همانطور که در بخش مواد و روش‌ها 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 نتایج به عنوان کنترل مثبت استفاده شد. نتایج به دست آمده از این بخش در جدول ۲ نمایش داده شده است.

جدول ۲- نتایج بدست آمده از بررسی فعالیت آنتی‌کولین‌استرازی عصاره اتانولی نمونه‌های بره‌موم. در این تست، از نتایج به عنوان کنترل مثبت استفاده شده است.

| نمونه      | $IC_{50}$              |
|------------|------------------------|
| لاله‌زار   | ۱۴/۳۷ $\mu\text{g/ml}$ |
| راین       | ۶۹/۵۳ $\mu\text{g/ml}$ |
| سرآسیاب    | ۷۷/۷۳ $\mu\text{g/ml}$ |
| نتوستیگمین | ۲۲/۶۲ $\text{ng/ml}$   |

جدول ۳- مقایسه نتایج بدست آمده از بررسی محتوای فنل و فلاونوئید کل و فعالیت آنتی‌اکسیدانی (DPPH) و آنتی‌کولین‌استرازی (المن) عصاره‌های اتانولی نمونه‌های بره‌موم مورد استفاده در این مطالعه.

| نمونه‌های بره‌موم                     |          |       |         |
|---------------------------------------|----------|-------|---------|
| آزمایش‌ها                             | لاله‌زار | 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 ( $IC_{50}$ : $\mu\text{g/ml}$ ) | ۵/۶۴     | ۴۴/۴۷ | ۳۹/۹۷   |
| المن ( $IC_{50}$ : $\mu\text{g/ml}$ ) | ۱۴/۳۷    | ۶۹/۵۳ | ۷۷/۷۳   |

مقایسه  $IC_{50}$  نتوستیگمین ( $22.62 \text{ ng/ml}$ ) با مقادیر  $IC_{50}$  عصاره‌های سه نمونه بره‌موم نشان می‌دهد که هر سه نمونه توانایی مهار آنزیم استیل‌کولین‌استراز را دارا می‌باشند.

های آنزیم استیل‌کولین‌استراز (AChE) به منظور بهبود علائم فرم خفیف و یا حدوداً این بیماری، از استراتژی‌های درمانی اصلی محسوب می‌شود. هرچند استفاده از مهارکننده‌های 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 مهارکننده‌های AChE با منشأ طبیعی در جریان است. خانواده آماریلیداسه از جمله گیاهانی هستند که فعالیت آنتی‌کولین‌استرازی آنها به خوبی شناخته شده است. گونه‌های گالاتوس این خانواده، منبع اولیه آلکالوئید گالاتامین می‌باشند. گالاتامین یکی از مهارکننده‌های AChE تایید شده توسط FDA می‌باشد که هم‌اکنون به منظور بهبود علائم فرم‌های خفیف و حدوداً AD تجویز می‌شود (۱۵، ۳۴، ۴۰). مطالعاتی که بر روی چندین نمونه بره موم جمع‌آوری شده از مناطق مختلف کره جنوبی (۳)، ترکیه (۴) و مراکش (۱۳) انجام شده است نشان‌دهنده فعالیت آنتی‌کولین‌استرازی نمونه‌های بره‌موم می‌باشد (۴۲).

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

مورد مطالعه قرار گرفته است و با استفاده از روش‌های DPPH، ABTS<sup>+</sup>، FRAP و ORAC به اثبات رسیده است (۲۷). فلاونوئیدها از جمله ترکیبات آنتی‌اکسیدانی قدرتمند موجود در انواع بره‌موم هستند که توانایی از بین بردن رادیکال‌های آزاد را دارا می‌باشند (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 می‌دهد (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 می‌باشد. این نتایج با نتایج به دست آمده از مطالعات انجام شده بر روی نمونه‌های 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 تحلیل‌برنده اعصاب است رایج‌ترین دلیل بروز زوال عقل در افراد بالای ۶۵ سال محسوب می‌شود. AD به طور تدریجی منجر به زوال حافظه و شناخت و در نهایت مرگ می‌شود (۳۳، ۴۶). بر اساس فرضیه کولینرژیک پاتوژنز AD، دلیل بروز این بیماری به کاهش سطح استیل‌کولین، یک نوروترانسمیتر درگیر در دو فرایند حافظه و یادگیری، در هیپوکامپ و کورتکس مغز نسبت داده می‌شود (۱۲، ۲۰). اگرچه تا به امروز هیچ نوع درمان قطعی برای AD شناخته نشده است اما تجویز مهارکننده

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 آنتی‌اکسیدانی آن به میزان کمی از نمونه راین بالاتر است، اما فعالیت آنتی‌کولین‌استرازی آن نسبت به این نمونه تا حدی پایین تر می‌باشد. بنابراین با توجه نتایج به دست آمده به نظر می‌رسد 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 پایان‌نامه دوره کارشناسی ارشد مصوب دانشگاه تحصیلات تکمیلی صنعتی و فناوری پیشرفته کرمان می‌باشد که بدین وسیله نویسندگان از حمایت‌های آن دانشگاه تشکر می‌نمایند.

شده اند که فقط تعداد معدودی از آنها توانایی آنتی‌کولین‌استرازی دارند این اختلاف مشاهده شده بین مقادیر  $IC_{50}$  نئوستیگمین و نمونه های بره‌موم کاملاً منطقی و طبیعی است. از بین سه نمونه بره موم، نمونه لاله‌زار توانایی بسیار بالاتری در مهار AChE از خود نشان می‌دهد به طوری که فعالیت آنتی‌کولین‌استرازی آن نسبت به دو نمونه راین و سرآسیاب به ترتیب  $4/8$  و  $5/4$  برابر بیشتر است. محتوای فنل و فلاونوئید کل این نمونه نیز نسبت به دو نمونه دیگر تفاوت قابل ملاحظه ای نشان می‌دهد. 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 نمی‌دهد (۴۸).

با توجه اینکه مقالاتی مبنی بر فعالیت آنتی‌کولین‌استرازی فلاونوئیدها وجود دارد (۲۵، ۲۶) ممکن است بخشی و یا تمام فعالیت آنتی‌کولین‌استرازی 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 می‌باشد. بدین منظور باید اجزای

### منابع

- علیرضایی، ف. و کیارستمی، خ. ۱۳۹۹. بررسی اثر سالیسیلیک اسید بر فعالیت آنتی‌اکسیدانی در کشت سلولی گیاه اسطوخودوس (*Lavandula angustifolia* Mill). مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران). (۳۳(۳)، ۳۴۷-۵۸.
- منتشلو، ج.، دلجو، علی. و پیری، خ. ۱۳۹۶. بررسی میزان فنول و فلاونوئیدها و فعالیت آنتی‌اکسیدانی عصاره های اتانولی، متانولی، کلروفومی و اتیل استاتی پوست تنه و شاخه درخت بید (*Salix alba*. L. مجله پژوهش‌های سلولی و مولکولی (مجله زیست‌شناسی ایران). (۳(۳)، ۲۹۵-۳۰۳.
- 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.
- Aliyazıcıoğlu R, Sahin H, Ertürk O, Ulusoy E, and Kolaylı S. 2013. Properties of phenolic composition and biological activity of propolis from Turkey. *International Journal of Food Properties*; 16(2): 277-87.
- 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*

- Sciences. An International Scientific 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: Pharmacotherapeutics 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 Zeitung*; 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, Mourtziolos 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, Kielczykowska 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.

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 Juszcak 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. Yaghoobi 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.

## 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.<sup>1</sup>, Lotfi S.<sup>1</sup>, Rezvannejad E.<sup>1</sup>, Mortazavi M.<sup>1</sup> and Riahi-Madvar A.<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Dept. of Biotechnology, Institute of Science and High Technology and Environmental Sciences, Graduate University of Advanced Technology, Kerman, I.R. of Iran.

<sup>2</sup> 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  $\mu$ g/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  $\mu$ g/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.