

بررسی اثر مهارکنندگی آنزیم استیل کولین استرازی اسانس و عصاره‌های حاصل از اندام هوایی یونجه زرد

لاله خدائی^۱، حلما جعفرزاده^۲، فریده رنجبری^۳، سمیه سلطانی^۴

تاریخ دریافت ۱۴۰۳/۱۱/۲۹ تاریخ پذیرش ۱۴۰۴/۰۱/۲۴

چکیده

پیش‌زمینه و هدف: گیاهان دارویی الهام‌بخش مطالعات جدید برای رفع علائم بیماری آلزایمر هستند. در منابع طب سنتی ایرانی، گیاه یونجه زرد برای بهبود علائم نسیان یا فراموشی آورده شده است. هدف از این مطالعه، بررسی اثر مهارکنندگی آنزیم استیل کولین استراز اسانس و عصاره‌های حاصل از یونجه زرد به روش المن است.

مواد و روش کار: سرشاخه‌های گل‌دار یونجه زرد به روش تقطیر با بخار آب اسانس گیری شده و ترکیبات اسانس با کمک دستگاه GC-MS شناسایی و تعیین مقدار گردیده و توسط دو سیستم حلال به روش سوکسله عصاره گیری شد. عصاره‌ها با استفاده از آون و خشکاندن انجمادی دهیدراته شدند. اثر مهارکنندگی آنزیمی اسانس و عصاره‌های مختلف توسط روش المن موردسنجش قرار گرفت.

یافته‌ها: بررسی ترکیبات اسانس یونجه زرد منجر به شناسایی ۱۸ ترکیب شد که به ترتیب هگزیل بوتیرات (۸/۱۸)، استیک اسید اکتیل استر (۷/۷۳)، فیتول (۵/۵۴)، اکتیل بوتیرات (۳/۹۵)، و هگزاهیدروفارنسیل استون (۳/۷۶) بیشترین درصد ترکیبات را به خود اختصاص دادند. نتایج روش المن نشان داد که اسانس فاقد اثر مهاری آنزیم بوده و بیشترین اثر مهاری توسط عصاره اتانولی فریزدراید (۷۰/۹±۲/۴۸ درصد) است. عصاره فریز دراید اتانول اثر مهاری قوی‌تری نسبت به عصاره خشک‌شده با آون نشان داد. بررسی فیتوشیمیایی اولیه بر روی عصاره اتانولی نشان داد که به‌احتمال قوی ترکیبات فنولیک و کومارین‌ها مسوول ایجاد اثر مهارکنندگی آنزیمی هستند.

بحث و نتیجه‌گیری: خشک کردن انجمادی یک روش مناسب برای خشکاندن عصاره اتانولی حاصل از گیاه یونجه زرد است زیرا می‌تواند منجر به حفظ کومارین‌ها و ترکیبات فنولیک عصاره گردد. همچنین نتایج نشان دادند که عصاره اتانولی فریزدراید یونجه زرد دارای قوی‌ترین اثر مهارکنندگی آنزیم استیل کولین استراز بوده و می‌تواند دارای پتانسیل و ارزش دارویی باشد.

کلیدواژه‌ها: یونجه زرد، روش المن، اسانس، کومارین، ترکیبات فنولیک، آلزایمر

مجله مطالعات علوم پزشکی، دوره سی و پنجم، شماره دوازدهم، ص ۹۹۳-۹۸۵، اسفند ۱۴۰۳

آدرس مکاتبه: دپارتمان فارماکوتوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران، تلفن: ۰۴۱-۳۳۳۷۹۵۲۷

Email: khodaiel@gmail.com

مقدمه

وابسته به عوامل متعددی است و یکی از عوامل دخیل سیستم کولینرژیک مغز و ناقل عصبی استیل کولین است. سیستم کولینرژیک مغز و ناقل عصبی استیل کولین در روند یادگیری و مکانیسم حافظه نقش مهمی ایفا می‌کند. کاهش و تخریب نورون‌های کولینرژیک و استیل کولین در مغز از عوامل مستعد کننده برای بیماری آلزایمر است. فعالیت بالای آنزیم استیل کولین استراز می‌تواند منجر به تخریب استیل کولین و مستعد شدن فرد

آلزایمر نوعی بیماری مزمن و غیرقابل برگشت فراموشی و شایع‌ترین علت زوال عقل است که توانایی‌های ذهنی و عملکردهای شناختی افراد به دلیل تخریب سلول‌های عصبی کاهش پیدا کرده و به‌مرورزمان پیشرفت می‌کند (۱). علائم اولیه آلزایمر شامل مشکل در تشخیص مکان و زمان و کاهش حافظه است و معمولاً در افراد بالای ۶۰ سال ایجاد می‌شود (۲). پاتوفیزیولوژی بیماری آلزایمر

^۱ دپارتمان فارماکوتوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران (نویسنده مسؤل)

^۲ دپارتمان فارماکوتوزی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

^۳ مرکز تحقیقات سلامت باروری زنان، مرکز آموزشی و درمانی الزهرا، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

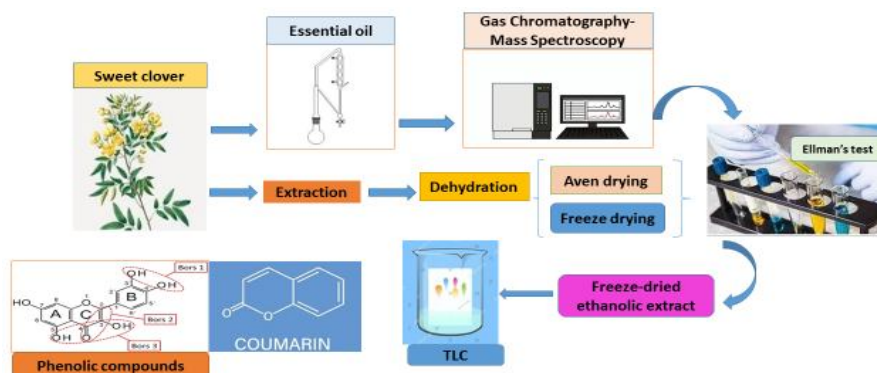
^۴ دپارتمان شیمی دارویی، دانشکده داروسازی، دانشگاه علوم پزشکی تبریز، تبریز، ایران

گیاه بومی مناطق آسیایی ازجمله کشور ایران است. اثرات فارماکولوژیک متعددی ازجمله اثرات ضد میکروبیال، ضد التهاب، ضد فشارخون، آنتی اکسیدان، هپاتوپروتکتیو و نوروپروتکتیو و ضد آلزایمر از این گیاه گزارش شده است. این گیاه مملو از ترکیبات گیاهی با نام کومارین‌ها و فورانوکومارین‌هاست که با توجه به نتایج یافته‌های مطالعات پیشین، این ترکیبات گیاهی دارای اثر مهارکنندگی آنزیم استیل کولین استراز هستند (۸). خشک کردن یکی از مراحل اصلی و اساسی برای تهیه عصاره‌های گیاهی است که به منظور خروج حلال باقیمانده از عصاره انجام می‌شود انتخاب نوع روش خشک کردن و دمای مورد نظر تأثیر بسزایی در حفظ ترکیبات مؤثره عصاره‌ها دارد. روش آون به دلیل در دسترس بودن و هزینه کمتر از پرکاربردترین روش‌های خشک کردن عصاره‌ها است. روش خشک کردن انجمادی یک روش جدید است که عصاره حاصل از آن دارای کیفیت بهتری از نظر حفظ ترکیبات و مواد مؤثره است (۹). مطالعات پیشین نشان داده‌اند که روش خشک کردن انجمادی نسبت به روش دهیدراتاسیون با آون، روش خشک کردن با اثر تهجمی کمتر است، زیرا باعث می‌شود ترکیبات فنولیک، مثل آنتوسیانین‌ها، فلاونول‌ها و کومارین‌ها غلظت بالاتری در محصول نهایی داشته باشند (۱۰). هدف از این مطالعه بررسی اثر مهارکنندگی آنزیمی اسانس و عصاره‌های مختلف به دست آمده از گیاه یونجه زرد است که با دو روش خشک کردن با آون و خشک کردن انجمادی به دست آمده‌اند. در این مطالعه میزان فعالیت‌های مهارکنندگی آنزیم کولین استرازی به دست آمده از موارد مذکور با هم مورد مقایسه قرار گرفته و قوی‌ترین عصاره با اثر مهارتی معرفی خواهد شد. از آنجایی که ترکیبات فنولیک، همچون فلاونوئیدها و کومارین‌ها می‌توانند دارای اثر مهارکنندگی آنزیم استیل کولین استراز باشند، هدف بعدی این مطالعه بحث در رابطه با تأثیر روش خشک کردن انجمادی در میزان حفظ ترکیبات مذکور و مهارکنندگی آنزیم استیل کولین استراز است.

جهت ابتلا به بیماری آلزایمر گردد (۳-۴). ترکیباتی که بتوانند آنزیم استیل کولین استراز را در مغز مهار کرده یا فعالیت آن را کاهش بدهند، به افزایش میزان استیل کولین در مغز کمک نموده و می‌توانند از شروع یا پیشرفت بیماری آلزایمر ممانعت به عمل آورند. داروی دونپزیل یک داروی شناخته شده و متداول ضد آلزایمر است و برای کاهش علائم زوال عقل مرتبط با بیماری آلزایمر تجویز می‌شود. این دارو با مهار برگشت‌پذیر آنزیم استیل کولین استراز منجر به افزایش آنزیم استیل کولین در مغز می‌شود. این دارو، زوال عقل را درمان نکرده بلکه از سرعت پیشرفت علائم می‌کاهد. دونپزیل دارای یکسری عوارض جانبی گزارش شده، همچون تهوع، استفراغ، و اسهال است که مصرف آن را برای برخی از بیماران محدود می‌سازد (۵). امروزه یکی از زمینه‌های تحقیقاتی، یافتن ترکیبات جدید اثربخش، با حداقل عارضه جانبی است. از آنجایی که گیاهان دارویی منبع غنی از ترکیبات بیواکتیو هستند، در زمینه تحقیقات به منظور یافتن داروهای ضد آلزایمر هم مورد استفاده قرار گرفته‌اند (۶).

حکمای طب سنتی ایران منابع ارزشمندی را در اختیار انسان‌های امروزی قرار داده‌اند که در این منابع به شرح بیماری‌ها و درمان آن‌ها پرداخته‌اند. در منابع نفیس طب و داروسازی ایرانی، یکسری از گیاهان دارویی برای درمان بیماری نسیان یا فراموشی، به معنی ناتوانی مغز در نگهداری اطلاعات معرفی شده‌اند. از آنجایی که بیماری نسیان شباهت‌های بسیاری با بیماری آلزایمر دارد، گیاهان معرفی شده می‌توانند برای کارهای آزمایشگاهی و حتی کارآزمایی بالینی مورد استفاده قرار گیرند. علاوه بر این، گیاهان دارویی به دلیل داشتن ترکیبات فعال زیستی متنوع و عوارض جانبی کمتر نسبت به داروهای شیمیایی، منابع ارزشمندی جهت معرفی داروهای جدید محسوب می‌شوند (۷).

یکی از گیاهان معرفی شده در منابع طب سنتی ایرانی، گیاه یونجه زرد با نام سنتی اکلیل الملک و نام علمی (L.)Pall Melilotus officinalis متعلق به خانواده Fabaceae است. این



تصویر (۱): خلاصه تصویری

مواد و روش کار

جمع‌آوری گیاهان

اندام هوایی یونجه زرد (سرشاخه‌های گل‌دار و ساقه‌ها)، در خردادماه سال ۱۴۰۱، از مراتع روستای زنگلان در نزدیکی شهرستان خوی جمع‌آوری گردید و بعد از جمع‌آوری در هرباریم دانشکده داروسازی شناسایی شده و کد TBZFP-4110 به آن تعلق گرفت. نمونه‌های گیاه در دمای آزمایشگاه، ۲۵ درجه سانتی‌گراد، و به مدت یک هفته، خشک‌شده و توسط آسیاب برقی (IKA, Germany) پودر شدند.

عصاره‌گیری به روش سوکسله

۲۰۰ گرم از پودر خشک‌شده گیاه توزین شد و عصاره‌گیری به روش سوکسله با کمک دو فرمت مختلف از سیستم حلال‌ها انجام گرفت. ابتدا با سیستم حلال اول شامل پترولیوم اتر-اتیل استات-متانول و سپس با سیستم حلال دوم شاملان هگزان-دی کلرومتان-اتانول عصاره‌گیری انجام گردید. عصاره‌های حاصل توسط دستگاه روتاری تغلیظ گردیده و سپس به دو روش خشکاندن با آون در دمای ۳۰-۴۰ درجه و سپس به کمک فریزدرای یا خشکاندن انجمادی، خشک گردیدند. عصاره‌های حاصل جهت انجام ادامه آزمایش‌ها در یخچال نگهداری شدند.



تصویر (۲): دستگاه خشک‌کننده انجمادی یا فریزدرایر آزمایشگاهی

کروماتوگرافی لایه‌نازک از عصاره‌های حاصل از یونجه زرد باهدف شناسایی ترکیبات فنولیک و کومارین‌ها

با استفاده از لوله موئین، بر روی فاز ثابت یعنی قطعاتی از کاغذ TLC (صفحات آلومینیومی پوشیده شده از سیلیکاژل) به‌اندازه ۲۰×۱۰ سانتیمتر لکه‌گذاری عصاره‌ها انجام شد. سیستم حلال‌های مناسب کومارین‌ها و فلاونوئیدها، که مستخرج شده از مقالات بودند موردبررسی قرار گرفتند تا بهترین سیستم حلال استخراج گردد.

سپس به حلال موردنظر اجازه داده شد تا در تانک TLC بر روی کاغذ کروماتوگرام پیشروی نماید. بعد از پیشروی سیستم حلال، ابتدا مشاهده لکه‌ها توسط اتاناک مجز به لامپ ماورا بنفش در دو طول‌موج ۲۵۴ و ۳۶۵ نانومتر صورت گرفت. به‌منظور بررسی شدت رنگ لکه‌های ایجادشده، معرف مربوط به شناسایی ترکیبات کومارینی، پتاسیم هیدروکساید اتانولی و به‌منظور بررسی مشتقات فنولیک، معرف آنیزالدهید سولفوریک اسید مورد استفاده قرار گرفت و مقادیر Rf یا فاکتور بازدارندگی لکه‌ها محاسبه گردید (۱۱).

اسانس‌گیری به روش تقطیر با بخار آب

عمل اسانس‌گیری، با روش تقطیر با بخار آب، توسط ۵۰۰ گرم از اندام‌های هوایی خشک‌شده گیاه یونجه زرد، با استفاده از آب به حجم ۵۰۰ میلی‌لیتر، به مدت ۴ ساعت، و به کمک دستگاه کلونجر انجام شد. اسانس به‌دست‌آمده، به‌منظور آزمایش‌های بعدی در فریزر نگهداری گردید.

آنالیز توسط دستگاه کروماتوگرافی گازی و طیف‌سنجی جرمی

اسانس حاصل از یونجه زرد توسط دستگاه Shimadzu GC/MS-QP5050A که به یک ستون DB-1 متصل بود، مورد جداسازی و شناسایی قرار گرفت. در بخش کروماتوگرافی گازی، برای جداسازی ترکیبات فرار، گرمادهی با درجه حرارت ۶۰ درجه سانتی‌گراد آغاز شد و پس‌از آن درجه حرارت با سرعت ۳ درجه سانتی‌گراد بر دقیقه، تا دمای ۲۸۰ درجه سانتی‌گراد افزایش یافت. دمای تزریق‌کننده و دتکتور ۲۷۰ درجه سانتی‌گراد، حجم نمونه تزریقی ۱ میلی‌لیتر با نسبت رقیق‌سازی ۱ به ۱۰۰، و گاز حامل هلیوم با سرعت جریان ۱.۳ میلی‌لیتر در دقیقه بود. در بخش MS نیز از انرژی یونیزاسیون معادل ۷۰ الکترون‌ولت جهت ایجاد شکست استفاده شد. شناسایی نهایی ترکیبات با مقایسه زمان بازداری اندیس کوئاس و الگوی شکست هر یک از ترکیبات با ترکیبات استاندارد صورت گرفت.

آماده‌سازی آنزیم استیل کولین استراز

۲ میلی‌لیتر خون انسان گرفته شده را برای اجتناب از ایجاد لخته سریعاً به لوله هپارینه منتقل، و به مدت یک دقیقه هم زده شد. به‌منظور جدا کردن سرم رویی، به آن ۸ میلی‌لیتر نرمال سالین افزوده در داخل لوله مخصوص سانتریفیوژ، در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور ۳۰۰۰ به مدت ۵ دقیقه سانتریفیوژ و بعد محلول رویی جدا و دور ریخته شد تا فقط گلبول‌های قرمز لیز نشده باقی بمانند. به‌منظور لیز گلبول‌های قرمز، لوله‌های محتوی گلبول‌ها به روی یخ منتقل شده و به آن‌ها آب مقطر افزوده شد. لوله‌های حاوی

گلبول‌های قرمز لیز شده، به مدت ۵ دقیقه و در دمای ۴ درجه سانتی‌گراد و دور ۳۰۰۰، سانتریفوژ شدند تا ناخالصی‌های احتمالی حذف شوند. محلول رویی که حاوی آنزیم‌ها بود به فریزر ۲۰- درجه انتقال داده شد.

اندازه‌گیری فعالیت استیل کولین استراز

یکی از روش‌های آزمایشگاهی معمول جهت بررسی اثر مهارکنندگی استیل کولین استراز، تست ال‌من است که در آن از استیل تیوکولین به‌عنوان سوبستر استفاده شده و این ترکیب تحت تأثیر کاتالیز آنزیمی قرار گرفته و محصول تیوکولین ایجاد می‌شود. مبنای این تست، اندازه‌گیری سرعت تولید تیوکولین به‌عنوان محصول کاتالیز آنزیم AChE است. تیوکولین تولید شده با DTNB یا دی تیو دی نیترو دی بنزوئیک اسید وارد واکنش می‌شود تا آنیون زردرنگ ۲- نیترو-۵- مرکاپتو بنزوئیک اسید را تولید کند.

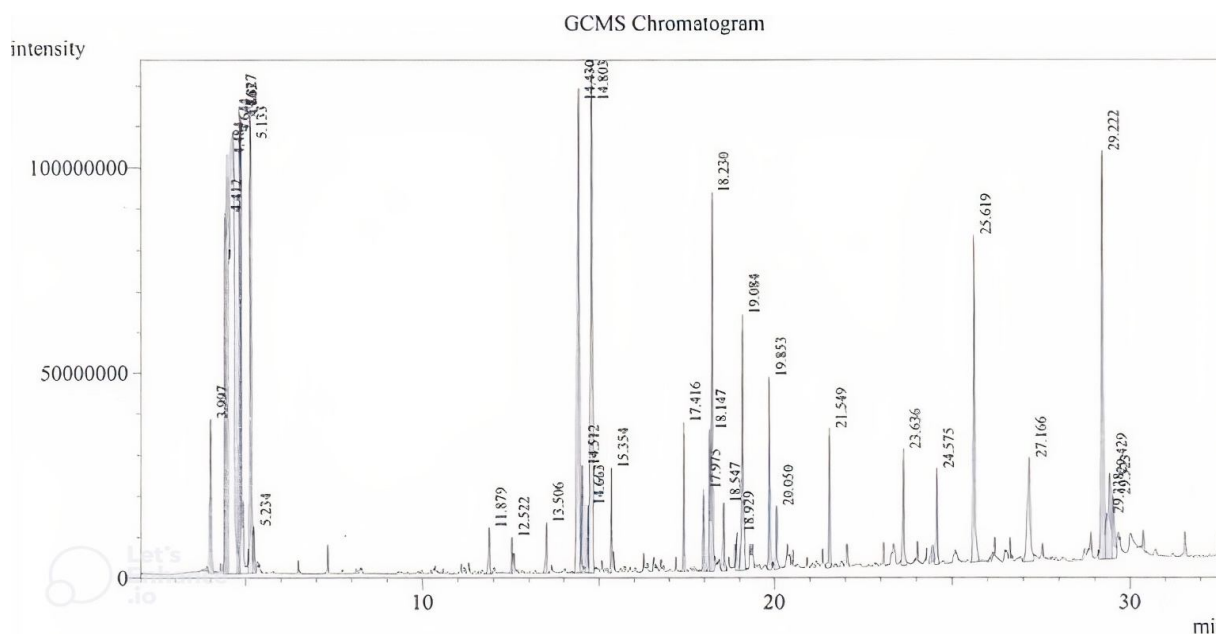
سرعت ایجاد رنگ در طول موج ۴۱۲ نانومتر به مدت پنج دقیقه به‌وسیله دستگاه اسپکتروفتومتر اندازه‌گیری و توسط برنامه ثبت شد (۱۲). به‌منظور اندازه‌گیری اثر مهاری عصاره‌ها، ۵ رقت مختلف ۱۲.۵ و ۲۵ و ۵۰ و ۱۰۰ و ۲۰۰ $\mu\text{g/mL}$ در سیستم حلال مناسب تهیه شدند و برای هر کدام ۳ تکرار در هر رقت اندازه‌گیری شد. تحلیل آماری داده‌ها به‌وسیله نرم‌افزار SPSS انجام گرفت. داروی دانیپیل به‌عنوان کنترل مثبت در نظر گرفته شد.

یافته‌ها

مقدار اسانس حاصل و شناسایی ترکیبات توسط دستگاه

GC-MS

تصویر ۲ کروماتوگرام حاصل از اسانس یونجه زرد بعد از تزریق به دستگاه کروماتوگرافی گازی را نشان می‌دهد.



تصویر (۳): کروماتوگرام حاصل از اسانس یونجه زرد بعد از تزریق به دستگاه کروماتوگرافی گازی

درصد حجمی-وزنی اسانس به‌دست‌آمده از ۵۰۰ گرم نمونه گیاهی پودر شده، ۰.۲ درصد بود. ترکیبات شناسایی شده از اسانس یونجه زرد در جدول ۱، نشان داده شده‌اند.

جدول (۱): نام، فرمول شیمیایی، زمان بازداری، KI محاسبه و گزارش شده و درصد ترکیبات شیمیایی شناسایی شده از اسانس یونجه زرد

شماره	نام ترکیب	فرمول شیمیایی	زمان بازداری	KI محاسبه‌شده	KI گزارش شده	%
۱	هگزیل بوتیرات	C10H20O2	۱۴/۴۳	۱۰۳۸	۱۰۴۰	۸/۱۸
۲	ان-دکانال	C10H20O	۱۴/۶۶	۱۰۴۴	۱۰۴۴	۰/۶۱
۳	استیک اسید اکتیل استر	C10H20O2	۱۴/۸۰	۱۰۴۵	۱۰۵۰	۷/۷۳

شماره	نام ترکیب	فرمول شیمیایی	زمان بازداری	KI محاسبه شده	KI گزارش شده	%
۴	هگزیل-۲-متیل بوتیرات	C11H22O2	۱۵.۳۵	۱۰۴۶	۱۱۱۰	۰/۹۰
۵	۱-اکتن-۳-ایل بوتیرات	C12H22O2	۱۷/۹۷	۱۱۱۲	۱۲۲۰	۰/۷۰
۶	هگزانوئیک اسید هگزیل استر	C12H24O2	۱۸/۱۵	۱۲۱۷	۱۲۲۰	۱/۴۰
۷	اکتیل بوتیرات	C12H24O2	۱۸/۲۳	۱۲۲۱	۱۲۳۰	۳/۹۵
۸	ان اکتیل-۲-متیل بوتیرات	C13H26O2	۱۹/۰۸	۱۲۲۳	۱۳۰۷	۲/۹۰
۹	۳-متیل-۵-پروپیل نونان	C13H28	۱۹/۸۵	۱۳۱۱	۱۳۳۲	۱/۷۰
۱۰	بتا یونون	C13H20O	۲۰/۰۵	۱۳۳۰	۱۳۳۴	۰/۶۸
۱۱	هگزانوئیک اسید هپتیل استر	C13H26O2	۲۱/۵۵	۱۳۳۶	۱۳۷۰	۱/۲۹
۱۲	تری دکانال	C13H26O	۲۳/۶۳	۱۳۷۵	۱۴۳۵	۱/۱۷
۱۳	اکتانوئیک اسید هگزیل استر	C14H28O2	۲۴/۵۷	۱۴۲۹	۱۵۱۰	۰/۹۱
۱۴	هگزاهیدروفارنسیل استون	C16H32O2	۲۵/۶۱	۱۵۱۵	۱۷۶۰	۳/۷۶
۱۵	پالمیتیک اسید	C18H36O	۲۷/۱۶	۱۷۶۳	۱۹۱۲	۲/۲۱
۱۶	لینولئیک اسید	C18H32O2	۲۹/۳۳	۱۹۱۳	۱۹۹۰	۰/۸۸
۱۷	۹-هگزادکانئیک اسید	C16H30O2	۲۹/۴۲	۱۹۹۵	۲۰۰۰	۱/۱۶
۱۸	فیتول	C20H40O	۲۹/۵۲	۲۰۰۳	۲۱۰۰	۵/۵۴

جدول شماره ۲، مقدار و درصد عصاره‌های به‌دست‌آمده از

۲۰۰ µg/mL پودر اندام هوایی یونجه زرد را به دو روش خشک‌کردن

با آون و فریزدرایر را نشان می‌دهد. درصد مهار داروی دانپزیل

به‌عنوان کنترل مثبت، ۹۶ درصد است.

ترکیبات جدول ۱، به ترتیب افزایش زمان بازداری، محاسبه و

مقایسه شاخص کواتز چیده شده و ۴۵/۶۷ درصد از ترکیبات اسانس

یونجه مورد شناسایی قرار گرفتند.

جدول (۲): مقدار و درصد عصاره‌های به‌دست‌آمده از ۲۰۰ گرم پودر اندام هوایی یونجه زرد به دو روش خشک‌کردن با آون و فریزدرایر

عصاره	مقدار (گرم) و درصد عصاره خشک‌شده با آون	مقدار (گرم) و درصد عصاره خشک‌شده با فریزدرایر
اتانولی	۱۸/۹ (۹/۴۵٪)	۱۷/۶ (۸/۸)
متانولی	۱۸/۴ (۹/۲۱٪)	۱۶/۹ (۸/۴۵)
پترولیوم اتری	۱۶/۵۳ (۲۶/۸٪)	۱۵/۴۶ (۷/۷۳٪)
اتیل استاتی	۱۱/۴۸ (۵/۷۴٪)	۱۰/۸۶ (۵/۴۳٪)
هگزانی	۷/۵۸ (۳/۷۹٪)	۵/۶۵ (۲/۸۲٪)
دی کلرومتانی	۲/۵۶ (۱/۲۸٪)	۱/۸۱ (۰/۹٪)

جدول (۳): اثر مهارکنندگی آنزیمی ۲۰۰ µg/mL عصاره‌های دهیدراته شده حاصل از گیاه یونجه زرد با استفاده از دو وسیله آون و

فریزدرایر

درصد مهار آنزیم عصاره خشک‌شده توسط فریزدرایر	درصد مهار آنزیم عصاره خشک‌شده توسط آون	عصاره‌ها
۱.۹±۰.۰۳۴	۲.۱±۰.۰۱۷	پترولیوم اتر
۲.۸±۰.۰۰۳	۴.۹±۰.۰۰۹	اتیل استات
۲۸.۱±۰.۰۴۳	۲۳.۱±۲.۱۶	متانول
۳.۴±۰.۰۲۴	۲.۰±۰.۰۰۳	ان-هگزان
۲۹.۹۰±۰.۰۸۶	۲۳.۴±۰.۰۰۹	دی کلرومتان
۷۰.۹±۲.۰۴۸	۴۹.۵±۲.۰۰۴	اتانول

بحث و نتیجه‌گیری

شیوع بالای بیماری آلزایمر در کل جهان و تأثیر شناخته شده داروهای مهارکننده استیل کولین استراز در مهار و کنترل بیماری منجر به مطالعه ترکیبات مختلف شیمیایی و گیاهی برای ساخت داروهای جدیدتر و متنوع‌تر شده است. گیاهان به دلیل داشتن ترکیبات متنوع، با مکانیسم‌های مختلف این پتانسیل را دارا می‌باشند که علائم بیماری آلزایمر را کاهش داده و یا حتی بهبود بخشند (۱۳).

گیاهان خانواده Fabaceae من جمله گیاه یونجه زرد، از گیاهانی است که در منابع طب سنتی ایرانی به عنوان برطرف‌کننده علائم فراموشی یا نسیان معرفی شده است. این گیاه مملو از ترکیبات فنولیک و کومارینی شناخته شده است که ترکیبات موجود در عصاره اتانولی عبارتند از پاراهیدروکسی بنزوئیک اسید گلیکوزیده، سالیسیلیک اسید، مشتقات کومارینی، بتائین، فومالیک اسید، لوتئولین و کرسٹین. همچنین مطابق با یافته‌های مطالعات قبل ترکیبات متعدد مربوط به مشتقات هیدروکومارینی و گلیکوزید کامپفرول شناسایی شده است (۱۴، ۱۵).

در این مطالعه مقدار اسانس و عصاره‌های اندام هوایی یونجه زرد استخراج و تعیین مقدار گردید. از بین عصاره‌های حاصل، عصاره‌های اتانولی و متانولی بیشترین مقدار را به خود اختصاص دادند. مقدار اسانس به دست آمده به کمک روش تقطیر با بخار آب از ۵۰۰ گرم پودر اندام هوایی یونجه زرد، ۲/۰ درصد بود.

بررسی ترکیبات اسانس یونجه زرد منجر به شناسایی ۱۸ ترکیب شد که مجموع درصد آن‌ها نشان می‌دهند که ۴۵/۶۷ درصد از ترکیبات مورد شناسایی قرار گرفته‌اند که از بین ترکیبات شناسایی شده، به ترتیب هگزیل بوتیرات (۸/۱۸ درصد)، فیتول (۵/۵۴ درصد)، اکتیل بوتیرات (۳/۹۵ درصد)، و هگزامیدروفارنسیل استون (۳/۷۶ درصد) بیشترین درصد ترکیبات را به خود اختصاص می‌دهند. بر اساس مطالعه پیشین که بر روی ترکیبات اسانس اندام هوایی یونجه زرد جمع‌آوری شده از کشور اکراین انجام شده است، بیشترین ترکیبات موجود هگزامیدروفارنسیل استون (۱۶/۶۴ درصد)، بتا ادمول (۱۱/۴۹ درصد)، گلوبولول (۸/۶۵ درصد)، و فیتول (۴/۵۲ درصد) بودند (۱۵). مقایسه نتایج حاصل از بررسی ترکیبات اسانس این دو نوع گیاه یونجه زرد روینده در دو ناحیه مختلف تأیید می‌کند که ارتفاع، ناحیه جغرافیایی، و حتی فصل رویش گیاه در مقدار و حتی نوع ترکیبات تشکیل‌دهنده روغن فرار گیاه می‌تواند مؤثر باشند. بنابراین فاکتورهای گفته شده از لحاظ کیفی و هم از لحاظ کمی بر روی روغن فرار یونجه زرد تأثیرگذار هستند (۱۶).

اثر مهارکنندگی آنزیم استیل کولین استرازی اسانس و عصاره‌های به دست آمده از دو سیستم حلال، با استفاده از تست المن مورد بررسی قرار گرفتند. از بین میزان مهار به دست آمده برای عصاره‌های مختلف، عصاره اتانولی خشک شده توسط آون میزان مهار ۴۹/۵ درصد، و عصاره فریزدراید میزان مهار ۷۰/۹ درصد را نشان دادند. بر اساس مطالعات پیشین که تست‌های فنول و فلاونوئید تام بر روی عصاره‌های این گیاه انجام شده، میزان قابل توجهی از ترکیبات مذکور در عصاره اتانولی گیاه موجود بوده‌اند. همچنین مطالعات فیتوشیمیایی بر روی عصاره اتانولی اندام هوایی یونجه زرد، منجر به شناسایی ترکیبات از دسته فلاونوئیدها، کومارین‌ها و فنولیک اسیدها شده‌اند. اسیدهای فنولیک شناخته شده در عصاره متانولی شامل پاراهیدروکسی بنزوئیک اسید، پاراهیدروکسی سینامیک اسید، سالیسیلیک اسید، فومالیک اسید و کافئیک اسید هستند که در مطالعات قبلی به مقدار قابل توجه از گیاه استخراج شده و در اعمال اثر مهار آنزیمی گیاه نقش برجسته‌ای ایفا می‌کنند. فلاونوئیدهای شناسایی شده از این گیاه، شامل لوتئولین و کرسٹین بوده و انواع مختلفی از ترکیبات کومارینی از این گیاه استخراج شده‌اند. اثر سینرژیکی این ترکیبات در کنار هم می‌تواند دلیل توجیه‌کننده اثر مهارکنندگی آنزیمی عصاره اتانولی گیاه باشد (۱۵، ۱۷).

به منظور اثبات حضور ترکیبات فنولیک در عصاره اتانولی، از روش کروماتوگرافی لایه‌نازک استفاده شد. سیستم حلال مناسب برای کروماتوگرافی ترکیبات فنولیک عصاره اتانولی، بوتانول و استیک اسید به نسبت (۱:۹) بود که زیر لامپ یو-وی به رنگ زرد-نارنجی و با معرف به رنگ آبی دیده شدند. سه لکه زیر نور ماورابنفش با فاکتورهای بازدارندگی ۰.۴۹، ۰.۶۶، ۰.۱۱ مشاهده گردیدند. برای شناسایی ترکیبات کومارینی عصاره اتانولی، سیستم حلال هگزان و اتیل استات به نسبت (۳:۲) به کار برده شد و سه لکه در زیر لامپ یو وی با فلورسانس آبی بنفش مشاهده شده و با معرف به رنگ آبی دیده شدند. سه لکه با فاکتورهای بازدارندگی ۰.۹۶، ۰.۸۹، و ۰.۳۲ مورد مشاهده قرار گرفتند.

نتیجه جالب توجه به دست آمده از این مطالعه این است که عصاره دهیدراته شده به دست آمده توسط فریزدرایر در عصاره‌های اتانولی، متانولی، هگزانی و دی کلرومتانی دارای اثر بهتری از عصاره دهیدراته شده توسط آون است. یکی از دلایل نتیجه مزبور حل شدن بهتر عصاره فریزدراید نسبت به آون درآید است. چون فریزدراینگ با حذف آب و افزایش تخلخل و سطح با به عبارتی دیگر با افزایش هیگروسکوپیسیت به انحلال بهتر عصاره‌ها در حلال‌ها کمک می‌کند (۱۸). دلیل دیگر مشاهده اثر قوی‌تر عصاره‌های فریزدراید خصوصاً

تشکر و قدردانی

نویسندگان از حمایت مالی و معنوی معاونت پژوهشی دانشگاه علوم پزشکی تبریز کمال تشکر را دارند.

حمایت مالی تحقیق

این مقاله مستخرج از پایان‌نامه دانشجویی با اخذ گونت از دانشگاه علوم پزشکی تبریز با کد ثبت ۶۸۷۰۴ است.

تضاد منافع

هیچ‌یک از نویسندگان دارای تضاد منافع نمی‌باشند.

ملاحظات اخلاقی

کد اخلاق اخذ شده برای این پژوهش

IR.TBZMED.REC.1401.086 است.

مشارکت نویسندگان

لاله خدائی و سمیه سلطانی در تدوین پیش‌نویس مقاله، نظارت بر انجام کارهای آزمایشگاهی نقش داشته‌اند. حلما جعفرزاده و فریده رنجبر در انجام کارهای آزمایشگاهی، جمع‌آوری داده‌ها، و آنالیز داده‌ها مشارکت نموده‌اند.

در عصاره اتانولی، پایداری بیشتر ترکیبات فنولیک، از جمله اسیدهای فنولیک، فلاونوئیدها و کومارین‌ها در روش فریزدارید نسبت به آون دراید است (۱۹). لازم به ذکر است که دو عصاره پترولیوم اتری و اتیل استاتی خشک‌شده به روش آون اثر قوی‌تری از نوع فریزدارید نشان داده‌اند. منتها به دلیل هیدروفوبیسیته حلال‌های مذکور، و داشتن اثر مهارکنندگی ضعیف احتمال وجود ترکیبات فنولیک و کومارین‌ها ضعیف بوده و ارزش مطالعاتی بیشتر را ندارند.

نتایج حاصل از مطالعه اثر مهارکنندگی کولین استرازی عصاره‌ها و اسانس یونجه زرد نشان داد که عصاره اتانولی فریزدارید، احتمالاً به دلیل محتوی بودن فلاونوئیدها و کومارین‌ها، پتانسیل مهار آنزیم استیل‌کولین استراز را دارد. نتایج این مطالعه هم‌راستا با مطالب منابع طب سنتی ایران است که گیاه یونجه زرد را جهت رفع علائم نسیان معرفی نموده است. نتایج مطالعه حاضر پیش‌زمینه‌ای جهت بررسی اثر مفید گیاه یونجه زرد در بهبود علائم آلزایمر است و جهت اثبات بهتر و بیشتر این موضوع، نیاز به انجام مطالعات تکمیلی حیوانی و بالینی است.

References:

1. Mehta M, Adem A, Sabbagh M. New Acetylcholinesterase Inhibitors for Alzheimer's Disease. *Int J Alzheimers Dis* 2012;(1):728983. <https://doi.org/10.1155/2012/728983>
2. Gharbali A, Golestani R, Nazarbaghi S. Difrentiationl discrimination of Alzheimer patients from normal aging by computerize analysis of brain NMR. *Stud Med Sci* 2024;35(2):136-44. <https://doi.org/10.61186/umj.35.2.136>
3. Tavakoli Z, Taheri M, Roghani M. The effect of diosgenin on cognitive deficits and oxidative stress induced by lipopolisacchride in rats. *Stud Med Sci* 2024;35(7):604-20. <https://doi.org/10.61186/umj.35.7.604>
4. Mojarad A, Sadri Damirchi E, Sheykholeslami A, Rezaeisharif A, Abbasi V. Brain stimulation and cognitive rehabilitation: a dual approach to manage aggreition and nocturnal behavior in patients with mild alzheimer's disaese. *Stud Med Sci* 2024;35(4):326-36. <https://doi.org/10.61186/umj.35.4.326>
5. Birks JS, Harvey RJ. Donepezil for dementia due to Alzheimer's disease. *Cochrane Database Syst Rev* 2018;6:1-235. <https://doi.org/10.1002/14651858.CD001190.pub3>
6. Taqui R, Debnath M, Ahmed S, Gosh A. Advances on plant extracts and phytochemicals with acetylcholinesterase inhibition activity for possible treatment of Alzheimer's disease. *Phytomed Plus* 2022;2(1):100184. <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2021.100184>
7. Iranshahy M, Javadi B. Diet therapy for the treatment of Alzheimer's disease in view of traditional Persian Medicine: A review. *Iran J Basic Med Sci* 2019;22(10):1102-17.
8. Borhani G, Mazandarani M, Abbaspour H. Antioxidant, Antibacterial Activity, Ethnopharmacology, Phytochemical in Different Extracts of *Melilotus officinalis* L. as an Anti-infection and Anti-diabetic in Traditional Uses of Two Northern Provinces From Iran. *Crescent J Med Biol Sci* 2024;11(2):83-91. <https://doi.org/10.34172/cjmb.2024.3012>

9. Nwankwo CS, Okpomor EO, Dibagar N, Wodeski M, Zweirz W. Recent developments in the hybridization of the freeze-drying technique in food dehydration: A review on chemical and sensory qualities. *Foods* 2023;12(18):3437. <https://doi.org/10.3390/foods12183437>
10. Torres CD, Díaz-Maroto MC, Hermosín-Gutiérrez I, Pérez-Coello MS. Effect of freeze-drying and oven-drying on volatiles and phenolics composition of grape skin. *Anal Chim Acta* 2010;660(1-2):177-82. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2009.10.005>
11. Kovač-Bešović EE, Durić K. Thin layer chromatography-application in qualitative analysis on presence of coumarins and flavonoids in plant material. *Bosn J Basic Med Sci* 2003;3(3):19-26. <https://doi.org/10.17305/bjbms.2003.3523>
12. Ellman GL. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol* 1961;7(2):88-95. [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)
13. Mukherjee PK, Kumar V, Mal M, Houghton PJ. Acetylcholinesterase inhibitors from plants. *Phytomedicine* 2007;14(4):289-300. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2007.02.002>
14. Sowa-Borowiec P. Sweet Clover (*Melilotus* spp.) as a Source of Biologically Active Compounds. *Molecules* 2025;30(3):526. <https://doi.org/10.3390/molecules30030526>
15. Al-Snafi AE. Chemical constituents and pharmacological effects of *Melilotus Officinalis*-A review. *IOSR J Pharm* 2020;10(1):26-36. <https://doi.org/10.22159/ijcpr.2019v11i6.36338>
16. De Sá Filho JCF, Nizio DAC, Oliveira AMS, Alves MF. Geographic location and seasonality affect the chemical composition of essential oils of *Lippia alba* accessions. *Ind Crops Prod* 2022;188:115602. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2022.115602>
17. Borhani G, Mazandarani M, Abbaspour H. Antioxidant, Antibacterial Activity, Ethnopharmacology, Phytochemical in Different Extracts of *Melilotus officinalis* L. as an Anti-infection and Anti-diabetic in Traditional Uses of Two Northern Provinces From Iran. *Crescent J Med Biol Sci* 2024;11(2):83-91. <https://doi.org/10.34172/cjmb.2024.3012>
18. Park HJ, Lee Y, Eun JB. Physicochemical characteristics of kimchi powder manufactured by hot air drying and freeze drying. *Biocatal Agric Biotechnol* 2016;5:193-8. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2016.02.002>
19. Zorić Z, Verica DU, Sandra P. Kinetics of the degradation of anthocyanins, phenolic acids and flavonols during heat treatments of freeze-dried sour cherry *Marascea* paste. *Food Technol Biotechnol* 2014;52(1):101-8.

ANTICHOLINESTERASE INHIBITORY ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL AND EXTRACTS FROM AERIAL PARTS OF *MELILOTUS OFFICINALIS*

Laleh Khodaie^{1*}, Helma Jafarzadeh², Faride Ranjbari³, Somaieh Soltani⁴

Received: 17 February, 2025; Accepted: 13 April, 2025

Abstract

Background & Aims: Medicinal plants serve as a valuable resource for novel approaches to alleviating dementia symptoms. In Persian medicine manuscripts, *Melilotus officinalis* (sweet clover) was proposed as a treatment for dementia-related symptoms. This study aimed to evaluate the cholinesterase inhibitory activity of sweet clover extracts and essential oil using Ellman's method.

Materials & Methods: The essential oil from the aerial parts of sweet clover was obtained via hydrodistillation. Phytochemical composition of the volatile oil was analyzed by GC-MS. Additionally, the plant material was extracted using two solvent systems: (1) petroleum ether, ethyl acetate, and methanol; and (2) *n*-hexane, dichloromethane, and ethanol. The extracts were dehydrated via oven-drying and freeze-drying. Acetylcholinesterase inhibitory activity of the volatile oil and extracts was assessed using Ellman's test. A preliminary phytochemical analysis of the ethanolic extract was performed by TLC.

Results: GC-MS analysis of the volatile oil identified 45.67% of its phytoconstituents, comprising 18 compounds, including hexyl butyrate, phytol, octyl butyrate, and hexahydrofarnesyl acetone. Ellman's test revealed that the volatile oil exhibited no inhibitory activity, whereas the freeze-dried ethanolic extract (200 µg/mL) showed 70.9% inhibition. The freeze-dried extract demonstrated significantly higher inhibitory activity than the oven-dried extract. TLC analysis of the ethanolic extract confirmed the presence of phenolic compounds and coumarins, which are likely responsible for its bioactivity.

Conclusion: The freeze-dried ethanolic extract exhibited the strongest acetylcholinesterase inhibitory activity, suggesting that freeze-drying is the preferred dehydration method for sweet clover extracts. Phenolic compounds and coumarins are probable contributors to this inhibitory effect.

Keywords: Sweet clover, *Melilotus officinalis*, Ellman's test, essential oil, coumarin, phenolic compounds, Alzheimer's disease

Address: Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

Tel: +984133379527

Email: khodaiei@gmail.com

SOURCE: STUD MED SCI 2025; 35(12): 993 ISSN: 2717-008X

This is an open-access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution-noncommercial 4.0 International License](https://creativecommons.org/licenses/by-nc/4.0/) which permits copy and redistribute the material just in noncommercial usages, as long as the original work is properly cited.

¹ Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran (Corresponding Author)

² Department of Pharmacognosy, Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran

³ Women's Reproductive Health Research Center, Al-Zahra Educational and Treatment Center, Tabriz, Iran

⁴ Department of Medicinal Chemistry, Faculty of Pharmacy, Tabriz University of Medical Sciences, Tabriz, Iran